

[文章编号] 1000-1182(2008)06-0673-04

骨保护素修饰的Beagle犬骨髓基质细胞 表达体系的建立与鉴定

赵春晖¹, 操小马^{1,2}, 梅陵宣¹

(1.安徽医科大学口腔医学院 口腔内科教研室, 安徽 合肥 230032;

2.安徽省合肥市第二人民医院 口腔科, 安徽 合肥 230011)

[摘要] 目的 利用pSecTag2/B-OPG真核分泌表达穿梭载体, 建立经骨保护素基因(OPG)修饰的Beagle犬骨髓基质细胞(BMSC)瞬时表达体系并检测其表达能力, 为基因工程与组织工程联合治疗牙周病提供细胞基础。方法 体外分离、培养Beagle犬BMSC, 通过脂质体法将已鉴定的目的基因瞬时转染至BMSC, 并用RT-PCR鉴定OPG是否有转录, 同时通过Western blot方法检测OPG在6周内的表达水平。结果 重组质粒pSecTag2/B-OPG经Hind III单酶切及EcoRI、BamHI双酶切, 电泳显示切下的片段均与预期大小相符, 经测序证实此基因与GeneBank中[gi:33878056]提供的序列一致; 鉴定正确的重组质粒在BMSC中有转录, 并且在39 d内都明显有OPG表达。结论 建立了骨保护素基因修饰的骨髓基质细胞瞬时表达体系。

[关键词] 成骨细胞; 骨髓基质细胞; 基因表达

[中图分类号] R783.4 **[文献标识码]** A

Establishment and identification of transiently expression system of bone marrow stromal cells modified by osteoprotegerin gene ZHAO Chun-hui¹, CAO Xiao-ma^{1,2}, MEI Ling-xuan¹. (1. Dept. of Oral Medicine, School of Stomatology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China; 2. Dept. of Stomatology, The Second People's Hospital of Hefei, Hefei 230011, China)

[Abstract] **Objective** In order to treat periodontitis by using tissue engineering and gene engineering technology, the article established a transient expression system of bone marrow stromal cells (BMSC) modified by osteoprotegerin (OPG) gene and detected its expression using eukaryotic secreted expression pSecTag2/B-OPG plasmid. **Methods** By isolation and culture of BMSC *in vitro*, the identified recombinant plasmid was transiently transfected into BMSC by Lipofectamine 2000 and OPG expression in BMSC was determined by RT-PCR and Western blot in 6 weeks. **Results** The fragments of the recombinant plasmid digested with Hind III, EcoRI and BamHI and examined by 10 g/L agarose electrophoresis, were consistent with predicted size. The sequence of OPG was identical to the sequence provided by GeneBank [gi:33878056]. OPG transcribing in BMSC was confirmed by RT-PCR and OPG sustainable expressing in BMSC was detected by Western blot in 39 days. **Conclusion** The transiently expression system of BMSC modified by OPG gene was successfully established.

[Key words] osteoblasts; bone marrow stromal cells; gene expression

牙周炎是以牙周支持组织破坏为特征的慢性感染性疾病, 牙槽骨吸收是牙周病的主要的病理变化。骨保护素(osteoprotegerin, OPG)基因是Simonet等^[1]发现的一种破骨细胞抑制因子。它是核因子 κ B

受体活化因子(receptor activator of nuclear factor kappa B ligand, RANKL)的假受体。OPG作用于破骨细胞抑制骨吸收主要途径是与其配体RANKL相结合, 阻止RANK与RANKL结合, 拮抗RANKL对破骨细胞分化和活性的影响。研究^[2]显示, 牙周病患者的龈沟液中RANKL表达增加, OPG表达下降, 两者比例明显高于健康人。由此设想通过上调牙周局部OPG表达量来阻断破骨细胞增殖、分化、成熟, 达到恢复因牙周病而引起的牙槽骨的吸收的目的。本实验通过脂质体法将分泌表达穿梭载体pSecTag2/B-

[收稿日期] 2008-03-09; [修回日期] 2008-05-10

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(C03031101); 安徽省教育厅自然科学基金资助项目(2004kj219); 安徽医科大学基金资助项目(2003zr01)

[作者简介] 赵春晖(1973-), 女, 安徽人, 讲师, 学士

[通讯作者] 梅陵宣, Tel: 0551-5167753

OPG瞬时转染至体外分离、培养的Beagle犬骨髓基质细胞内,证实OPG在骨髓基质细胞中持续表达,建立基因修饰的骨髓基质细胞瞬时表达体系,为进一步动物实验奠定细胞基础。

1 材料和方法

1.1 主要实验材料

pSecTag2/B-OPG(本课题组保存);限制性内切酶(New England Biolabs公司,美国); β -巯基乙醇(Sigma公司,美国);脂质体转染试剂盒Lipofectamine 2000(Invitrogen公司,美国);兔抗人OPG多克隆抗体(BA1475,博士德生物有限公司);SuperSignal West Femto Trial Kit试剂盒(Pierce公司,美国);Trizol逆转录试剂盒(Promega公司,美国);Beagle犬(约10月龄,清洁级,安徽医科大学试验动物中心)。其他常规试剂为进口分装或国产分析纯。

1.2 Beagle犬骨髓基质细胞的培养

戊巴比妥钠(1 mg/kg)股静脉麻醉动物,常规术区消毒,以18号骨穿针垂直刺入髌骨骨髓腔1.5~2 cm,连接20 mL注射器,注射器事先吸入1 mL抗凝液(组成:每1 000 U肝素加入1 mL DMEM无血清培养液),将抗凝液注入骨髓腔,反复抽吸骨髓共2~3 mL,立即注入含抗凝液的离心管中,与等体积的PBS混合,吹打、分散细胞。室温下900 g, 10 min离心,弃上清。调节细胞密度为每毫升 2×10^5 个并接种于50 mL的一次性塑料培养瓶中培养。加入4~5 mL含 1×10^5 U/L青霉素、0.1 g/L链霉素、50 μ mol/L β -巯基乙醇、100 ml/L胎牛血清、2 mmol/L L-谷氨酰胺的高糖DMEM培养液。置含5%CO₂的37 °C培养箱中培养。培养96 h后换液,以去除未贴壁血细胞,每3 d换液1次。

1.3 重组质粒pSecTag2/B-OPG鉴定

取冻存的重组质粒pSecTag2/B-OPG菌液200 μ L铺板,37 °C温箱培养振荡14 h,挑取单个白色菌落接种于3 mL氨苄西林抗性的LB培养基中,37 °C,240 r/min培养12 h。以碱裂解法小提质粒,分别用Hind III单酶切及EcoRI、BamHI双酶切37 °C,2 h。并将少量质粒送大连宝生物公司,用通用引物T7从上游及下游同时进行测序,并将其测序的结果与GeneBank中的OPG序列[gi:33878056]进行比对。

1.4 pSecTag2/B-OPG瞬时转染

取10 μ L质粒和12 μ L脂质体进行转染,收集样品分别进行RT-PCR鉴定和Western blot分析。细胞转染分为2组。实验组:脂质体Lipofectamine 2000进行pSecTag2/B-OPG转染;对照组:未转染的细

胞,其余步骤相同。

1.5 RT-PCR鉴定OPG转录

转染72 h后,收获2组细胞,提取细胞总RNA。上下游引物见本课题组^[9]前期研究文章:通过RT-PCR检测OPG的表达。PCR扩增条件为:95 °C预变性3 min,94 °C变性1 min,55 °C 2 min,72 °C 1 min,循环30次,72 °C延伸10 min。2组PCR产物进行1.0%琼脂糖凝胶电泳分析。

1.6 Western blot检测OPG蛋白表达

OPG转染BMSC消化传代分别在第3、7、14、28、35、39、42天时收获细胞1次,每次用预冷的PBS洗2次,每次清洗时4 °C,2 000 r/min,5 min去上清。并与100 μ L细胞裂解液混匀,反复冻融3次,12 000 g,5 min。取上清,-80 °C冻存。在第49天时取6周内所有样品加等体积 $2 \times$ 上样Buffer 100 °C,10 min煮沸。进行SDS-PAGE电泳后,转膜,用OPG多抗进行Western blot分析。一抗为兔抗人OPG的多克隆抗体(1:400),二抗为HRP标记的羊抗兔IgG(1:50 000)。用SuperSignal West Femto Trial Kit试剂盒检测,暗室内用X线片曝光并显影和定影。以未转染的BMSC为对照组。

2 结果

2.1 骨髓基质细胞的形态学特征

刚接种的骨髓细胞悬液中细胞呈圆形,大小不一,不能辨认细胞核。第2天时,大部分细胞都沉淀在瓶底,此时由于红细胞较多,仅可隐约看到少量细胞开始贴壁,变成椭圆形。第5天首次更换培养液时,可见散在分布的贴壁梭形细胞和悬浮的红细胞。第8天首次传代后细胞加速生长,细胞形态基本呈同质性(图1)。

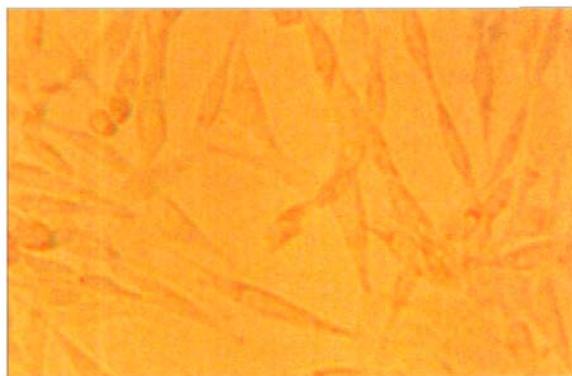
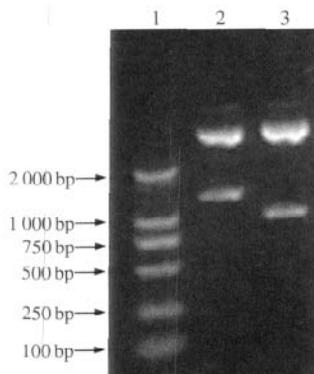


图1 首次传代骨髓基质细胞第3天,成纤维细胞呈集落样方式生长 倒置相差显微镜 $\times 400$

Fig 1 BMSC of Beagle dog in passage culture at 3 days expanded in colony formatting unit-fibroblastoid inverted phase contrast microscope $\times 400$

2.2 重组质粒酶切鉴定及序列分析

取少量提取质粒，分别用HindⅢ单酶切及EcoRⅠ、BamHⅠ双酶切，结果显示，单、双酶切片段与预期的918、1 205 bp片段大小相符(图2)。基因测序结果与GeneBank中提供的序列[gi:33878056]一致。



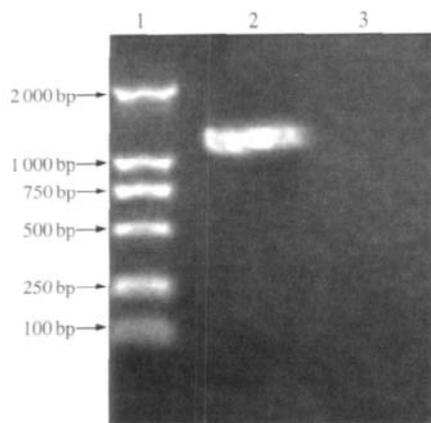
1: DL 2000 DNA Marker; 2: EcoRⅠ、BamHⅠ双酶切，切出1 205 bp片段; 3: HindⅢ单酶切，切出918 bp片段

图2 重组质粒pSecTag2/B-OPG酶切鉴定电泳图

Fig 2 Identification of recombinant plasmid pSecTag2/B-OPG

2.3 RT-PCR结果

2组细胞的总RNA经RT-PCR扩增后，用1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测发现：转染组细胞在约1 205 bp处有特异条带，提示目的基因有转录。而对照组细胞未见特异扩增条带(图3)，提示无目的基因转录。



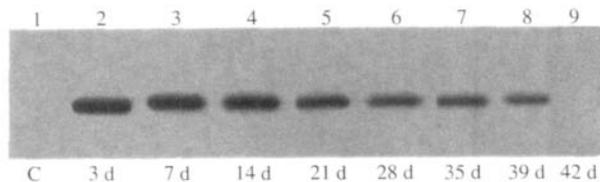
1: DL 2000 DNA Marker; 2: RT-PCR结果; 3: PCR扩增细胞总RNA(阴性对照)

图3 RT-PCR检测OPG转录

Fig 3 RT-PCR products of OPG

2.4 Western blot检测结果

X线片曝光并显影2 min和定影20 min后，Western blot检测结果显示：对照组未见任何条带，重组载体转染的BMSC的裂解液在39 d内有针对OPG抗体的特异性条带表达(相对分子质量约为63 000)，直到第42天时才未见明显条带表达。此时对照组亦无明显蛋白表达(图4)。



1: 对照组(C); 2-9: pSecTag2/B-OPG转染BMSC的裂解液，分别在3、7、14、21、28、35、39、42 d的表达情况

图4 OPG转染的BMSC Western blot分析

Fig 4 The expression of OPG gene in BMSC analyzed by Western blot

3 讨论

本研究分离培养的原代BMSC呈克隆性生长，形态类似成纤维细胞，与多数文献报道的结果相近。BMSC作为基因工程细胞有如下优越性：1)BMSC来源广泛，易于分离培养，有增殖趋势，生命周期长，体内外均能保持多向分化的潜能，遗传背景相当稳定；2)离体细胞较易受外源遗传物质转染，并能长期稳定表达该遗传物质；3)BMSC经过转染和一定时间的体外培养后再输回体内仍能存活，并能迁移到病变部位；4)BMSC移植中使用的BMSC从接受者自体获得，属同种移植，无免疫排斥反应，不涉及伦理问题。在组织工程方面：以BMSC作为种子细胞，利用组织工程技术修复犬等动物下颌骨缺损方面做了大量研究，且取得一定的进展^[4-5]。

牙周病是口腔领域中的多发病之一，是造成我国成年人拔牙的主要原因。目前临床上通过基础治疗结合牙周手术治疗手段对控制炎症、阻止组织破坏有一定效果而对恢复牙周再生难度较大。如：牙周引导组织再生技术(guided tissue regeneration, GTR)是近年来兴起的诱导牙周组织再生疗法，可使牙周膜、牙骨质和牙槽骨获得一定程度的再生。GTR通过屏障膜阻挡牙龈上皮和结缔组织与根面接触，延缓上皮的根向移位，使牙周组织前体细胞聚集于根面，并迁移、分化、增殖，建立新附着。但在技术上并不能获得牙周组织前体细胞在根面的优先附着，临床不易操作。牙周组织再生受限的原因是缺乏足够的活性细胞，残余的牙周膜及骨组织依靠其本身固有的修复能力较弱亦较慢。王勤涛等^[6]临床实验观察，引导膜材料与骨形成蛋白联合应用，增加骨形成的速度，促进牙周组织不同细胞的分化、新生，丰富和发展了GTR理论和技术。目前研究较多的是单纯的种子细胞局部移植，其对促进组织形成有一定作用。如：欧龙等^[7]在GTR技术的基础上结合牙周局部自体细胞移植修复犬牙周缺损取得了一定效果。但牙周病导致的牙槽骨的吸收、附着的丧失，其基本的分子机制是各种刺激因素导致破骨细

胞活化,抑制了成骨细胞的作用,使得仅凭牙周组织工程修复效果难尽人意。近年来研究表明,生长因子是作为机体细胞生物反应和功能的重要调节因子,能促进组织修复和再生^[8],由此考虑先通过基因工程手段,尝试建立基因修饰的骨髓基质细胞瞬时表达体系,然后联合应用组织工程手段,基因修饰的骨髓基质细胞与支架复合物回植已构建好的牙周病的动物模型缺损的牙槽骨局部,达到共同修复牙槽骨缺损的目的。

目的基因的转染有瞬时和稳定转染。稳定转染是指目的基因的序列稳定整合于基因组DNA中,目的基因可长期发挥作用,该途径适合临床上系统性疾病的基因治疗。而瞬时转染中,目的基因序列不整合到宿主基因组中,常随细胞的分裂而消失,表达时间一般为数周的时间^[9]。瞬时表达系统对于快速获得一定量靶基因产物,研究外源基因在哺乳动物细胞中的表达是一个方便快捷的方法。细胞获得DNA后暂时表达基因后数天到数周,最终DNA在细胞内被降解而消失。为获得期待的结果,有必要选择最短且适宜的观察时间。研究认为在犬牙周病模型,6周时大多数的新牙骨质和新骨已形成。

因为骨的再生主要发生在起始的6周左右,所以本实验采用瞬时转染的策略,并通过Western blot方法来检测骨保护素基因修饰的骨髓基质细胞在6周内表达目的蛋白的情况。结果显示此瞬时表达体系在39 d内皆持续有明显目的蛋白表达,同时对照组无明显目的蛋白表达。说明此瞬时表达体系表达目的蛋白的时间与骨再生所需要的时间基本一致,完全可以应用于后期的动物实验。

【参考文献】

[1] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density [J]. Cell, 1997, 89(2): 159-161.
[2] Mogi M, Otagoto J, Ota N, et al. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of pa-

tients with periodontitis[J]. J Dent Res, 2004, 83(2): 166-169.
[3] 梅陵宣,曹寅,吴迪,等.骨保护素基因修饰的Cos-7细胞系的培养与鉴定[J].实用口腔医学杂志,2005,21(3): 322-326.
MEI Ling-xuan, CAO Yin, WU Di, et al. Transfection of osteoprotegerin gene into Cos-7 cells[J]. J Pract Stomatol, 2005, 21(3): 322-326.
[4] 袁捷,祝联,王敏,等.自体骨髓基质干细胞-珊瑚羟基磷灰石修复下颌骨节段缺损的实验研究[J].中华口腔医学杂志,2006,41(2): 94-97.
YUAN Jie, ZHU Lian, WANG Min, et al. Repair of canine segmental mandibular defects using autogenous bone marrow stromal cells and coralline hydroxyapatite[J]. Chin J Stomatol, 2006, 41(2): 94-97.
[5] 王敏,翁雨来,胡晓洁,等.组织工程技术修复犬牙槽骨缺损的实验研究[J].中华医学杂志,2003,83(15): 1339-1344.
WANG Min, WENG Yu-lai, HU Xiao-jie, et al. Repair of alveolar bone defect with tissue engineered bone: An experimental study of dogs[J]. Chin J Med, 2003, 83(15): 1339-1344.
[6] 王勤涛,吴织芬,史俊南,等.骨形成蛋白促进牙周组织再生的动物实验研究[J].中华口腔医学杂志,1998,33(1): 27-29.
WANG Qin-tao, WU Zhi-fen, SHI Jun-nan, et al. Periodontal regeneration enhanced by BMP and GTR technique[J]. Chin J Stomatol, 1998, 33(1): 27-29.
[7] 欧龙,马良,王东胜,等.自体骨髓干细胞移植狗牙周缺损处引导组织再生的实验观察[J].现代口腔医学杂志,2005,19(4): 390-393.
OU Long, MA Liang, WANG Dong-sheng, et al. Effects of autogenous bone marrow stem cell transplantation on periodontal tissue regeneration in dogs[J]. J Modern Stomatol, 2005, 19(4): 390-393.
[8] Nakahara T, Nakamura T, Kobayashi E, et al. Novel approach to regeneration of periodontal tissues based on in situ tissue engineering: Effects of controlled release of basic fibroblast growth factor from a sandwich membrane[J]. Tissue Eng, 2003, 9(1): 153-162.
[9] 胡静,戚孟春,邹淑娟,等.重组质粒pEGFP-BMP7的构建及在大鼠骨髓间充质干细胞中的表达[J].华西口腔医学杂志,2005,23(6): 463-466.
HU Jing, QI Meng-chun, ZOU Shu-juan, et al. Construction of recombinant plasmid pEGFP-BMP7 and its expression in rat bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro*[J]. West China J Stomatol, 2005, 23(6): 463-466.

(本文编辑 汤亚玲)

《广东牙病防治》杂志征稿及征订启事

由广东省口腔医院·南方医科大学附属口腔医院主办的月刊《广东牙病防治》杂志1993年创刊以来一直坚持面向临床、面向基层、面向预防,迅速反映口腔新技术、新进展的办刊宗旨,受到读者的好评。本刊设有专家论坛、热点访谈、医案精粹、百花齐放、基础和应用研究、预防与社会医学、防治实践、口腔颌面外科、修复与正畸、新技术应用、护理、病例报告、综述、讲座、短讯、小知识等栏目。欢迎广大作者来稿,欢迎广大读者订阅。全国各地邮局均可订阅,邮发代号46-225。每月20日出版,定价为每册5.00元,全年60元。如错过邮局订阅时间,编辑部可办邮购。来款寄:广州市江南大道南366号《广东牙病防治》杂志编辑部(邮编510280),请写明订阅者邮政编码、详细地址、姓名、订阅年度和份数。编辑部电话:020-84403311,传真:020-84445386, E-mail: ybfzzz@pub.guangzhou.gd.cn 或 bjb1993@21cn.com。

《广东牙病防治》编辑部