中国骨质疏松杂志 2012 年 8 月第 18 卷第 8 期 Chin J Osteoporos, August 2012, Vol 18, No. 8
Published online www. wanfangdate. com. cn doi:10. 3969/j. issn. 1006-7108. 2012. 08. 006

·论著·

骨形态生发蛋白 2 基因修饰脂肪干细胞对去卵巢骨质疏松性大鼠骨缺损的修复作用

赵铭 李博

中图分类号：R58 **文献标识码**：A **文章编号**：1006-7108(2012)08-0706-03

摘要：**目的** 构建人骨形态生发蛋白 2(hBMP-2)基因真核表达载体,转染脂肪干细胞(ADSCs)后,将其转入去卵巢骨质疏松性大鼠骨缺损模型体内,观察其成骨、修复骨缺损能力。**方法** ①选择雌性未孕 Wistar 大鼠 40 只,行双侧卵巢切除,术后定期检测骨密度、骨形态计量学指标及血、尿生化指标,以监测去卵巢骨质疏松性大鼠模型的成功建立;②通过噬菌斑原位杂交筛选人混合细胞 cDNA 文库获得人骨形态生发蛋白 2 基因,与真核表达载体 pcDNA3. 1-连接,构建重组质粒 pcDNA3. 1 - hBMP - 2,利用脂质体 Lipofectamine™2000 介导 hBMP - 2 基因转染第 4 代脂肪干细胞,并经 G418 筛选;③将 40 只模型兔随机分成 4 组后,于股骨中下段钻孔造成骨缺损,后分别将 hBMP2 + pcDNA3. 1、ADSCs + pcDNA3. 1、pcDNA3. 1 - hBMP - 2 + ADSCs 注入前 3 组兔的骨缺损处,最后 1 组为对照组;④定期抽静脉血检测 Ca^{+}、P 及碱性磷酸酶(ALP)等生化指标,X 线观察成骨情况;8 周后处死动物取骨缺损区组织,HE 染色观察成骨情况及炎症反应。**结果** 术后实验组的检测指标较对照组有明显不同,pcDNA3. 1 - hBMP - 2 + ADSCs 组的血清 Ca^{+}、P 及 ALP 水平明显升高,X 线检查可看到有明显的成骨、骨缺损得到修复,HE 染色可见到大量的成骨细胞生成,较对照组有明显的差异,有统计学意义($P<0.05$)。**结论** hBMP - 2 基因修饰的脂肪干细胞对去卵巢大鼠骨质疏松性骨缺损有很好的修复作用,为绝经后所致的骨质疏松性骨缺损提示了新的治疗思路。

关键词：骨形态生发蛋白 2；脂肪干细胞；骨质疏松；成骨

The repairing effect of BMP 2 gene-modified adipose stem cells on the bone defects in ovariectomized osteoporotic rats

ZHAO Ming, *LI Bo*. *The* 309 *Hospital of PLA* , *Beijing* 100091, China
Corresponding author: LI Bo, Email: li000bo000@ sohu. com

Abstract: **Objective** We built a eukaryotic expression vector with hBMP-2 gene, then we transfected it into ADSCs. Finally we transplanted the cells to the bone defect model of ovariectomized rats to observe the osteogenesis and the capacity of bone defect repair. **Methods** 1) Forty female Wistar rats were undergone bilateral ovariectomy. Bone mineral density, bone histomorphometry indexes, and blood and urine biochemical indicators were monitored to establish the ovariectomized rat model. 2) Germinal plaque in situ hybridization was used to screen the hBMP\2 gene in the human hybrid cell cDNA library. The gene was connected to the eukaryotic expression vector pcDNA3. 1. hBMP-2 gene was transfected into the 4th generation of fat stem cells using liposome Lipofectamine TM2000, and it was selected with G418. 3) Forty rabbits randomly divided into 4 groups. The distal femurs of all the rabbits were drilled to make bone defects. Then hBMP2 + pcDNA3. 1, ADSCs + pcDNA3. 1, or pcDNA3. 1 - hBMP - 2 + ADSCs were injected into the bone defects of the rabbits in the first three groups, respectively. The last group was control group. 4) Serum Ca, P, ALP, and other biochemical indicators were detected regularly. Bone formation was observed using X-ray. The animals were sacrificed 8 weeks later. Bone formation and inflammation were observed using HE staining. **Results** Indicators in the experimental group was significantly different comparing to those in the control group postoperatively. Ca, P, and ALP levels in the serum of the pcDNA3. 1 - hBMP - 2 + ADSCs group increased significantly. Osteogenesis was seen in the X - ray

作者单位：100091 北京,解放军第 309 医院
通讯作者：Email: li000bo000@ sohu. com
万方数据

examination. The bone defects were fixed. Proliferation of osteoblasts was seen in HE staining. All of the differences were statistically significant comparing to the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** hBMP-2 gene-modified fat stem cells have good effect on bone defect repairing in ovariectomized osteoporotic rats. This provides a new idea for treatment of bone defects induced by postmenopausal osteoporosis.

Key words: BMP-2; ADSCs; Osteoporosis; Osteogenesis

在整个生命周期中,骨质在不停地形成和破坏,维持着一种动态平衡,骨质疏松的病理机制就是在骨代谢与骨形成的偶联中出现缺陷,骨吸收大于骨形成,导致骨质疏松发生,好发于老年人和绝经后妇女,发病多缓慢,个别较快,以骨骼疼痛、易于骨折为特征。雌性大鼠卵巢切除造成的骨质疏松模型正确模拟了女性雌激素低落引起的骨质疏松特征,是研究绝经后骨质疏松症的优秀模型[1]。骨形态发生蛋白(BMP)由 Urist 等[2]于 1965 年在骨基质中发现,BMP 家族的每一个成员均有诱导成骨活性且无种属特异性,一般认为 BMP-2 的诱骨活性最强,单独应用时即可诱导软骨和骨组织形成[3]。我们构建去卵巢骨质疏松性骨缺损模型,利用基因工程技术将重组人 BMP-2 基因导入脂肪干细胞内,然后用其对模型的骨缺损进行修复,观察成骨及修复骨缺损作用的效果。

1 材料和方法

1.1 去卵巢骨质疏松性骨缺损模型的建立

选择鼠龄 6 个月清洁级雌性未孕 Wistar 大鼠 40 只,体重 220 ~ 260 g,所有动物在同等条件下饲养,自由饮水和摄食。大鼠乙醚吸入麻醉,在严格的无菌操作下,取腰椎后侧正中切口,椎旁钝性分离肌肉组织,切开腹膜,进入腹腔。完整切除双侧卵巢后撒上青霉素粉,缝合皮肤,消毒伤口。在去势后的 4、6、8 周分别进行骨密度测定;8 周时,腰椎、股骨骨密度均出现了显著性改变($P < 0.05$)。用电动高速牙科钻以 20000 r/min 在股骨中下段钻孔(直径 0.4 cm)。以 0.5 cm^3 医用无菌凝胶海绵作为细胞植入载体。

1.2 构建 pcDNA3.1 - hBMP - 2 + ADSCs

用噬菌斑原位杂交筛选人混合细胞 cDNA 文库,获得 5 个阳性克隆。分别以 5 个阳性克隆为模板,编码区附近的上下游序列为引物,用高保真聚合酶 Golden Taq 进行扩增,将产物与 Promega Easy-T 载体连接。用蓝白斑法筛选[4]。挑起白斑克隆,摇菌提取质粒,用 *Bam*HⅠ/*Eco*RⅠ酶切,连接到 pcDNA3.1 的 *Bam*HⅠ/*Eco*RⅠ位点。取生长良好的第 4 代脂肪干细胞,经过胰酶-EDTA 消化后制备浓度为 4×10^8 L^{-1} 细胞悬液。用脂质体 2000 进行转染[5]。转染 48 h 后,使用 G418 以浓度 4 00 mg/L 进行抗性细胞筛选。

1.3 实验动物分组及细胞植入

40 只模型大鼠随机分成 4 组,每组 10 只,按下列方案植入骨缺损处。A 组:去卵巢骨质疏松性骨缺损大鼠 + hBMP2 + pcDNA3.1,B 组:去卵巢骨质疏松性骨缺损大鼠 + ADSCs + pcDNA3.1,C 组:去卵巢骨质疏松性骨缺损大鼠 + pcDNA3.1 - hBMP - 2 + ADSCs,D 组:单纯去卵巢骨质疏松性骨缺损大鼠。

1.4 标本采集和检测

分别在 2、4、8 周采集各组实验大鼠静脉血标本,进行血清 Ca^+、P 及碱性磷酸酶(ALP)生化指标检测;定期行 X 线片检查观察植入区植入物变化及骨生长情况;8 周后处死各组实验动物,切取修复区组织进行 HE 染色,观察成骨情况。

1.5 统计学方法

数据均以均数 ± 标准差表示,采用多个样本均数比较的方差分析,应用 SPSS 11.0 统计软件分析。

2 结果

实验组血清 Ca^+ 测定值较空白对照组低,P 测定值较空白对照组高,ALP 较空白对照组均有不同的升高,和空白对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),其中 C 组的变化水平更加明显,ALP 水平有明显的升高,高于其他实验组。

X 线检查示实验组骨缺损随着时间的进展均有不同程度的修复,骨道边缘模糊,C 组较其他实验组的 X 线改变更为明显,骨缺损的修复较为迅速。

8 周后处死各组实验动物,分别取骨缺损区骨组织标本,HE 染色见缺损区有大量的成骨细胞生成,并可见到骨细胞及软骨细胞生成,中间可见到部分 ADSCs,C 组中的成骨细胞、骨细胞及软骨细胞含量更高,并可见到不同分裂相的 ADSCs。

3 讨论

绝经后骨质疏松是指由于雌激素低落导致骨吸

万方数据

收、形成均增强,骨吸收大于骨形成最终导致骨量减少,骨组织微结构退行性变、松质骨骨小梁变细、断裂、数量减少;皮质骨多孔、变薄为特征,以致骨的脆性增高及骨折危险性增加的一种全身代谢性骨病[6]。目前多数研究证实脂肪干细胞在体内、外条件下可以向成骨细胞分化,然而其成骨分化并不能完全自发,尚需某些细胞因子或体内外环境的共同参与。脂肪干细胞经成骨诱导液体外培养数周后能够表达出一定量的碱性磷酸酶、Ⅰ型胶原蛋白、骨钙素、骨桥蛋白等成骨标志物[7],但将这种经诱导后的脂肪干细胞种子细胞直接植入体内修复骨质缺损,其骨化过程较慢,耗时长且修复效果并不十分理想[8]。BMP-2 是已知成骨诱导活性最强的细胞因子之一,它主要通过诱导未分化的间充质细胞向成软骨细胞或成骨细胞分化,最终形成软骨或骨组织[9]。但 BMP-2 外源性应用局限众多,难以充分发挥成骨效应。利用基因转染技术通过 BMP-2 基因修饰种子细胞的方式,可解决外源性应用引起的种种弊端[10]。

综合以上考虑,本实验设计了利用载有经 hBMP-2 基因修饰的脂肪干细胞修复去卵巢的骨质疏松性大鼠骨缺损模型的实验,以探讨成骨能力,实验结果证实了其良好的成骨细胞分化、促进骨质形成能力,及修复骨缺损的良好效果,为我们治疗绝经后妇女骨质疏松性骨折提供了新的思路。

【 参 考 文 献 】

[1] 刘忠厚. 骨质疏松学. 北京:科学技术出版社,1998: 508.

[2] Urist MR. Bone: formation by autoinduction. Science, 1965, 150(698): 893-899.

[3] Wu ZY, Hu XB. Separation and purification of porcine bonemorphogenetic protein. Clin Orthop Relat Res. 1988, (230): 229-236.

[4] Xian XH, Dong XB, Qin Z, et al. Cloning and sequence analysis of MHC Ⅱ Exon 2 of DQA gene in cricetulus barabensis. Qufu Shifan Daxue Xuebao, 2009, 35(2):98-103.

[5] Duan XH, He XH, Cui PC, et al. Preliminary study of primarily cultured C57 articular cartilage transfected with plamid IDO-EGFP by lipofectamine. Xibao yu Fenzi Mianyixue Zazhi, 2007, 23(12):1110-1116.

[6] [No authors listed] Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. Am J Med, 1993, 94(6):646-50.

[7] Bunnell BA, Estes BT, Guilak F, et al. Differentiation of adipose stem cells. Methods Mol Biol, 2008, 456:155-171.

[8] Hsu WK, Wang JC, Liu NQ, et al. Stem cells from human fat as cellular delivery vehicles in an athymic rat posterolateral spine fusion model. J Bone Joint Surg Am, 2008, 90(5):1043-1052.

[9] 胡蕴玉. 骨诱导及骨愈合分子生物学研究进展. 中华骨科杂志, 1997, 17(1):17-19.

[10] Li H, Dai K, Tang T, et al. Bone regeneration by implantation of adipose-derived stromal cells expressing BMP-2. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 356(4):836-842.

(收稿日期:2012-03-19))

(上接第 727 页)

【 参 考 文 献 】

[1] 王谦,刘光军,许硕贵. 各类抗骨质疏松药物的临床研究进展. 实用医药杂志,2010, 27(4):368-371.

[2] 招丽娟. 治疗骨质疏松症药物的应用. 中国中医药现代远程教育,2010,8(2):78-79.

[3] Fogelman I, Blake GM. The future of bone density measurements. Eur J Nucl Med, 1998, 25(1):1-2.

[4] 纪云国,张义珍. 密盖息治疗骨质疏松性疼痛的疗效评价. 中国实用医药, 2010,5(11):146-147.

[5] 卢冰,于荭. 降钙素治疗骨质疏松性疼痛的疗效观察. 中国药房,2010,21(48):4556-4557.

[6] 张志刚. 卢婷利. 赵雯,等. 二膦酸盐类药物的研究进展. 广东药学院学报,2009,25(6):643-647.

[7] 陈群,王治伦,刘忠厚. 雷尼酸锶治疗骨质疏松症的研究进展. 中国骨质疏松杂志,2009,15(11):844-848.

[8] 马庆芬,姚珍薇,单体欣. 雌激素与辛伐他汀序贯法干预对去势大鼠骨质疏松的治疗作用. 中国组织工程研究与临床康复,14(20):3629-3632.

[9] 王秋荣. 他汀类药物的临床新应用概述. 中国药师,2010,13(3):431-432.

(收稿日期:2012-03-21)

万方数据

骨形态生发蛋白2基因修饰脂肪干细胞对去卵巢骨质疏松性大鼠骨缺损的修复作用

万方数据 WANFANG DATA 文献链接

作者： 赵铭， 李博， ZHAO Ming， LI Bo
作者单位： 解放军第309医院,北京,100091
刊名： 中国骨质疏松杂志 ISTIC
英文刊名： CHINESE JOURNAL OF OSTEOPOROSIS
年，卷(期)： 2012,18(8)

参考文献(10条)

1. 刘忠厚 骨质疏松学 1998

2. Urist MR Bone:formation by autoinduction[外文期刊] 1965(698)

3. Wu ZY;Hu XB Separation and purification of porcine bonemorphogenetic protein 1988(230)

4. Xian XH;Dong XB;Qin Z Cloning and sequence analysis of MHCⅡ Exon 2 of DQA gene in cricetulus barabensis[外文期刊] 2009(02)

5. Duan XH;He XH;Cui PC Preliminary study of primarily cultured C57 articular cartilage transfected with plamid IDO-EGFP by lipofectamine 2007(12)

6. Consensus development conference:diagnosis,prophylaxis,and treatment of osteoporosis 1993(06)

7. Bunnell BA;Estes BT;Guilak F Differentiation of adipose stem cells 2008

8. Hsu WK;Wang JC;Liu NQ Stem cells from human fat as cellular delivery vehicles in an athymic rat posterolateral spine fusion model[外文期刊] 2008(05)

9. 胡蕴玉 骨诱导及骨愈合分子生物学研究进展[外文期刊] 1997(01)

10. Li H;Dai K;Tang T Bone regeneration by implantation of adipose-derived stromal cells expressing BMP-2 2007(04)

本文链接：http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201208006.aspx