

Ad-hBMP-2/GFP 转染兔骨髓间充质干细胞体外骨生成的实验研究

宁寅宽 李强* 蔡伟良 武成聪 陈佳滨 石正松

桂林医学院附属医院四肢创伤手外科,广西 桂林 541001

中图分类号: Q7;R68 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2015) 03-0264-05

摘要: **目的** 观察 Ad-hBMP-2/GFP 转染兔骨髓间充质干细胞(BMSCs)体外骨生成中钙化斑形成,并对钙化斑元素构成进行研究。**方法** 用携带 hBMP2 和 GFP 基因的腺病毒转染细胞,通过 RT-PCR 检测转染后 BMSCs hBMP-2 基因的表达,通过倒置荧光显微镜、钙结节茜素红染色观察转染后细胞形态改变和钙化斑的形成,结合扫描电镜和 X 线能谱分析(SEM/EDS)技术观测钙化斑表面微观形貌及其元素构成。**结果** RT-PCR 检测转染后 BMSCs 表达 hBMP-2 目的基因,细胞形态向成骨方向分化,钙结节茜素红染色见红色矿化结节,电镜下见钙化灶点状散布于细胞中,细胞重叠生长,分泌基质旺盛。X 射线能谱分析显示其表面为钙、磷沉积物,其钙磷比(Ca/P)为 1.53。**结论** Ad-hBMP-2/GFP 能成功转染兔 BMSCs,体外诱导 BMSCs 向成骨方向分化,并具备较好的骨生成能力。

关键词: 重组腺病毒;骨形态发生蛋白;骨髓间充质干细胞;扫描电镜;能谱分析

The Experimental study on the osteogenesis of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells transfected by Ad-hBMP-2/GFP in vitro

NING Yingkuan, LI Qiang, CAI Weiliang, WU Chengcong, CHEN Jiabin, SHI Zhengsong

Department of Extremity Trauma Surgery, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001, China

Corresponding author: LI Qiang, Email: li.q12251970@163.com

Abstract: Objective To observe the calcified plaque formation of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) transfected by Ad-hBMP-2/GFP in vitro and to study the element composition of calcified plaque. **Methods** Rabbit BMSCs were transferred by adenovirus carrying hBMP-2/GFP gene. RT-PCR was used to detect the expression of hBMP-2 gene. Morphological change of the cells after transfection and calcified plaque formation were observed using inverted fluorescence microscope and Alizarin red staining, respectively. Surface microstructure and element composition of calcified plaque were studied using SEM and X-Ray spectroscopy (SEM/EDS). **Results** RT-PCR showed hBMP-2 target gene expression in BMSCs transfected by Ad-hBMP-2/GFP. The cell morphology showed osteogenic differentiation. Alizarin red staining showed red mineralized nodules. SEM image demonstrated that mineralized calcium nodules were scattered in cells, and the growth of cells overlapped with strong matrix secretion. X-ray spectroscopy showed that the surface of calcified plaque consisted of calcium and phosphorus sediment with a calcium to phosphorus ratio (Ca/P) of 1.53. **Conclusion** Rabbit BMSCs can be successfully transfected by Ad-BMP-2/GFP which can induce osteogenic differentiation, with a preferable osteogenic capability.

Key words: Adenovirus; Bone morphogenetic protein; Bone marrow mesenchymal stem cells; Scanning electron microscopy; Spectrum analysis

BMSCs 具有多向分化潜能,能在特定的环境下能分化为成骨细胞,再生为骨组织,并且取材方便、增殖和分化能力强、随机体衰老后仍能保持良好的

干细胞特性以及具有独特的免疫耐受性,因而成为骨组织工程首选种子细胞^[1]。但是,人们在观察 BMSCs 体外诱导成骨时,通常检测所培养 BMSCs 内碱性磷酸酶活性、I 型胶原、骨钙蛋白和骨桥蛋白等,这些生物化学检测方法,仅能间接地反映 BMSCs 在体外的生物学特性,而对骨生成的直接观

察测量较少。本实验以腺病毒为表达载体,介导 hBMP-2 和绿色荧光蛋白(GFP)基因转染兔 BMSCs,诱导兔 BMSCs 形成钙化斑,结合扫描电镜和 X 线能谱分析(SEM/EDS)技术直接观察钙化灶表面微观形貌并测量其钙化灶内钙、磷元素含量,研究体外骨生成中钙化灶元素组成。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 腺病毒载体:Ad-hBMP-2/GFP、Ad-GFP 表达载体由英潍捷基(上海)贸易有限公司(Invitrogen 公司)构建、鉴定和提供,采用免疫法检测腺病毒滴度,病毒滴度为 2×10^{10} pfu/ml。

1.1.2 兔骨髓间充质干细胞:本课题组前期实验已完成了兔 BMSCs 的原代获取、传代培养及鉴定,并取第 5 代细胞液氮冻存备用^[2]。本次实验细胞为第 5 代冻存细胞复苏后传代至第 10 代的 BMSCs。

1.1.3 主要仪器和试剂:低糖 DMEM、胰蛋白酶、胎牛血清(美国 Hyclone 公司),总 RNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司),HiFi-MMLV 逆转录 cDNA 合成试剂盒(上海英俊生物技术有限公司), $2 \times$ Es Taq Mastermix PCR 试剂盒(北京康为世纪生物技术公司),DNA Marker(北京艾德莱生物科技有限公司),RNASE-FREE ddH₂O(美国 AMRESCO 公司), $2 \times$ Tap PCR Mix(北京艾德莱生物科技有限公司),茜素(美国 Sigma 公司),戊二醛(美国 Sigma 公司),二氧化碳细胞培养箱(美国 Thermo Scientific 公司),生物安全柜(中国苏净安泰公司),倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司),场发射扫描电镜(荷兰飞利浦公司),X 射线能谱仪(英国牛津公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 兔 BMSCs 的复苏、传代培养:将待复苏的兔 BMSCs 冻存管迅速解冻、离心、重悬,吹打均匀,以含 15% 血清的 L-DMEM 完全培养基(含 100 IU/ml 青霉素、100 IU/ml 链霉素)接种于 25cm² 塑料培养瓶,置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度环境中培养。各代 BMSCs 体外培养至单层细胞汇合 80% 左右,用 0.25% 胰蛋白酶消化,行 1:2~3 传代培养,细胞传至第 10 代细胞进行实验。

1.2.2 兔 BMSCs 的转染及实验分组:取兔第 10 代对数生长期兔 BMSCs 进行实验,以感染复数(MOI = 100)转染细胞,实验分为 3 组:第一组:未转染组;第二组:空载体组,转染不携带目的基因的空病毒(Ad-GFP);第三组:Ad-hBMP-2/GFP 组,转染携

带目的基因的病毒(Ad-hBMP-2/GFP)。转染 24h 后换液,在倒置荧光显微镜下逐日观察转染后细胞形态及生长情况。

1.2.3 RT-PCR 检测转染后兔 BMSCs hBMP-2 基因的表达:根据实验分组,转染后 72 h 提取 3×10^6 细胞总数的总 RNA,按照总 RNA 提取试剂盒(离心柱型)操作步骤操作,计算出 RT-PCR 反应体系(20 μ l 体系)中所需 1 μ g RNA 所需的体积量。按照 MMLV 逆转录 cDNA 合成试剂盒说明书合成第一条链 cDNA。按照 $2 \times$ Taq PCR MasterMix 试剂盒说明书进行 PCR 扩增。PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳鉴定。设计引物为:GAPDH 引物(Forward primer:5'-CCAGAACATCCCCTGCCTC-3'; Reverse primer:5'-TAGCCAAATTCGTTGTCATACCA-3'),hBMP-2 引物(Forward primer:5'-ACTACCAGAAACGAGTGGGAA-3'; Reverse primer:5'-GCATCTGTTCCGAAAACCT-3)。

1.2.4 钙结节茜素红染色观察钙化斑的形成:按实验分组,每组以 1×10^5 个/孔接种 6 孔板进行细胞爬片处理,接种前每孔预先放置已消毒的 20 mm 盖玻片。在倒置显微镜下观察矿化钙结节的形成,并于第 21 天随机细胞爬片,固定后行茜素红染色,镜下观察。

1.2.5 电镜扫描观察和 X 线能谱分析:按实验分组,第 21 天随机取细胞爬片,用 2.5% 戊二醛固定,梯度丙酮脱水,真空干燥,喷金镀膜,在 Quanta 200 FEG 场发射环境扫描电镜和 X-射线能谱仪上进行测试。在扫描电镜下观察细胞及钙结节微表面微观形貌。然后获取检测微区,用 X 射线能谱分析仪测定微区主要元素(碳、氮、氧、钙、硫、磷元素)的重量百分比和原子百分比百分含量,重复 3 次。能谱仪技术指标:电压 10 kV,电子束 6.0,工作距离 10.0 mm。

2 结果

2.1 RT-PCR 检测转染后兔 BMSCs hBMP-2 基因的表达

本课题组前期实验通过 SP 免疫组织化学和 Western Blot 分别从细胞水平和蛋白质水平证实转染后兔 BMSCs 内表达 hBMP-2 目的蛋白^[3],本实验从 RNA 基因水平检测 hBMP-2 的表达。反转录-聚合酶链反应凝胶电泳图显示结果见图 1,未转染组及转染空载体组未见任何条带,说明无 hBMP-2 基因的表达;而转染 Ad-hBMP-2/GFP 组见明显目的基因条带,结果符合扩增片段长度,证实有目的基因表达。

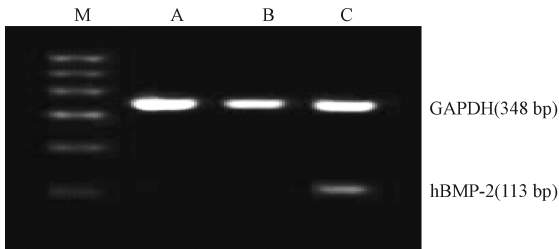


图1 RT-PCR 检测转染后 72 h 兔 BMSCs hBMP-2 基因的表达

M: marker; A: 未转染组; B: 空载体组; C: Ad-hBMP-2/GFP 组

Fig. 1 hBMP-2 mRNA detected by RT-PCR after 72h of transfection by BMSCs

M: marker; A: BMSCs; B: BMSCs transfected by Ad-GFP; C: BMSCs transfected by Ad-hBMP-2/GFP



图2 转染后 14 天, Ad-hBMP-2/GFP 组细胞形态 (×200)

Fig. 2 The cell morphology after 14 days transfection in Ad-hBMP-2/GFP group (×200)

2.2 转染后兔 BMSCs 形态学观察及钙结节茜素红染色

转染后未见明显细胞死亡,转染后 48h, Ad-hBMP-2/GFP、空载体组细胞在荧光显微镜下观察到荧光,转染效率高达 90%,说明目的基因成功转入靶细胞中。转染后第 14 天,Ad-hBMP-2/GFP 组细胞为梭形、三角形或多角形,旋涡状排列,胞质丰富,内有高折射性空泡和深色颗粒,细胞核明显,折光性强有明显的胞浆突起,细胞分泌基质,见图 2。随时间延长,细胞逐渐变为多层,重叠生长,无接触抑制现象,并形成结节状,最终形成不透光的矿化结节。而未转染组、空载体组与 Ad-hBMP-2/GFP 组在相同培养条件下不传代培养,细胞分裂繁殖,长满整个培养空间,出现接触性抑制,生长速度减慢甚至停止。第 21 天细胞爬片 Ad-hBMP-2/GFP 组钙结节茜素红染色后为红色,显示细胞集落形成红色矿化结节,见图 3。而未转染组和空载体组钙结节茜素红染色无钙结节形成。

2.3 电镜扫描观察和 X 线能谱分析

Ad-hBMP-2/GFP 组电镜下见钙化灶点状散布于细胞中,相互连接成小片状,稍凸出于重叠细胞层之上,细胞重叠生长,分泌基质旺盛,钙化斑结构疏松、粗糙,呈水泥状,钙化斑块间见明显空隙。而未转染组和空载体组在相同培养条件下不传代培养,细胞出现接触性抑制,逐渐衰老死亡,电镜下见少量细胞单层贴壁爬行生长。用 X 射线能谱分析仪检测电镜扫描微区得出分析图谱,同时计算机由谱峰强度自动换算为所测主要元素(碳、氮、氧、硫、钙、磷元素)的相对含量。数据显示钙化斑微区钙磷比

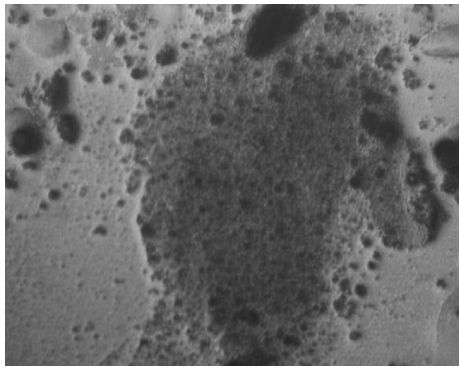


图3 茜素红染色显示细胞集落形成红色矿化结节 (×100)

Fig. 3 Alizarin red S staining showed red mineralized nodules (×100)

(Ca/P) 为 1.53,接近羟基磷灰石钙磷比 1.67,说明钙化斑块表面有钙、磷沉积物产生,可能为磷酸钙盐。钙化斑元素分析未见硫、氮元素。而未转染组和空载体组元素分析见硫、氮元素,有少量钙元素,不含磷元素,可能是因为细胞发生接触性抑制导致细胞死亡、蛋白质团块堆积引起的元素变化。实验组 and 对照组电镜下见密集的颗粒,可能是蛋白质与钙络合的矿物质。电镜及能谱分析图谱见图 4。

3 讨论

BMSCs 其体外高增殖能力为多种载体携带目的基因的转染奠定了基础,以 BMSCs 为基础的基因治疗是近年来骨组织工程研究的热点^[4]。本实验用腺病毒介导 hBMP-2 和 GFP 基因转染兔 BMSCs,诱导兔 BMSCs 成骨分化,形成钙化斑,通过 SEM/EDS 技术直接测量其钙化灶内钙、磷元素含量,定量

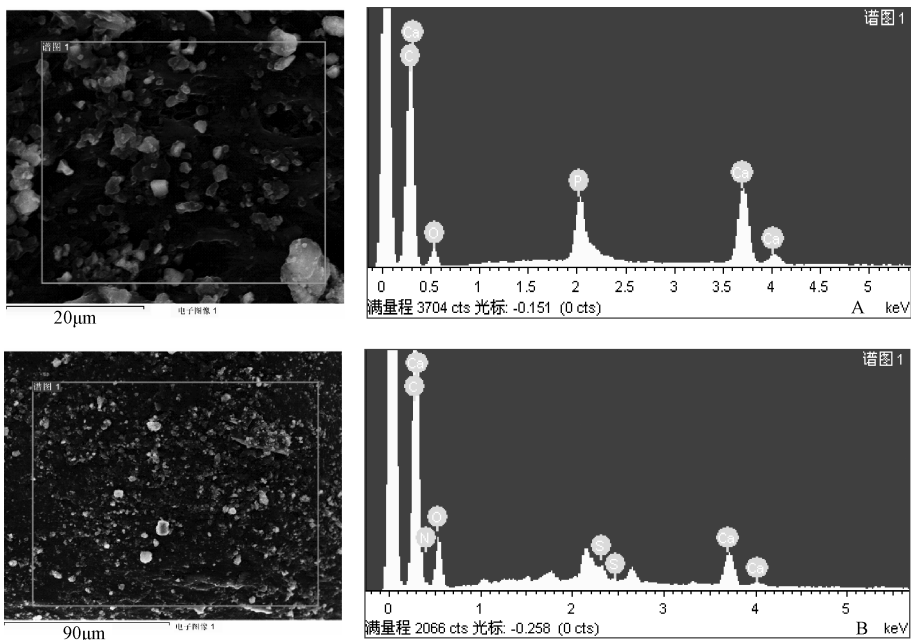


图 4 A Ad-hBMP-2/GFP 组钙化斑扫描电镜照片和 X 射线能谱分析图谱;
B 空载体组扫描电镜照片和 X 射线能谱分析图谱

Fig. 4 A: SEM and X-Ray photoelectron spectrum of the calcified plaque in Ad -hBMP-2/GFP group; B: SEM and X-Ray photoelectron spectrum of the calcified plaque in Ad -GFP group

研究体外骨生成中钙化斑元素组成,进一步证明 hBMP-2 体外诱导 BMSCs 的成骨组织的能力。

骨的钙化是指在有机质内有序的沉积无机盐,经过一系列细胞化学过程,使钙和磷产生集结现象,结合成羟基磷灰石簇。骨的钙化是骨形成的基础,首先是成骨细胞沉积为类骨质,然后类骨质钙化沉积的前缘矿质化,有机质插入核矿质化前缘间形成清晰边界,象征矿质化前缘形成,在矿质化前缘水平上,成骨细胞和其它基质成分与羟基磷灰石簇混合在一起,形成钙化斑^[5]。有研究表明,达到矿质化前缘之前,新鲜沉积的类骨质成熟大约需 10d。体内骨形成主要包括成骨细胞分化增殖,骨基质分泌,钙盐沉积和骨组织结构改建成熟等过程^[6]。本实验结果显示,兔 BMSCs 在腺病毒介导的 hBMP-2 下诱导 21d 后,BMSCs 向成骨方向分化,首先经过细胞增殖,大量分泌细胞基质,随后被自身分泌的基质所包绕,磷酸钙盐沉积在细胞基质局部,最终形成钙化斑。X 线能谱分析数据显示钙化斑微区钙磷比 (Ca/P) 为 1.53,接近羟基磷灰石钙磷比 1.67,说明钙化斑块可能为磷酸钙盐沉积结晶所致,为类羟基磷灰石,从而说明 BMSCs 体外诱导成骨过程与体内骨生成过程相同。随着钙化斑的改建和骨基质中有机胶原成分的增加,体外所生成骨组织将逐渐趋向

成熟,钙磷比值将会回复到成熟骨组织比值水平。然而,细胞如何具有生成可钙化基质的能力以及控制矿质化发生的能力,其发生机制并不清楚,尚且需进一步研究^[6]。

扫描电镜与 X 射线能谱分析技术 (SEM/EDS) 在观察样品表面微观形貌的同时还能进行元素分析,因而得知样品微观结构变化与其元素组成变化的关系。这是一种高度灵敏的超微量表面分析技术,国内外有大量学者已将其运用于各科研领域的研究^[7]。本实验将 SEM/EDS 技术应用于体外骨生成中钙化斑元素构成的定量研究,并观测其表面微观形貌,直接反应 BMSCs 的成骨能力。本实验结果显示,兔 BMSCs 在腺病毒介导的 hBMP-2 诱导 21d 后,扫描电镜下见细胞被自身分泌的基质所包绕,磷酸钙盐局部沉积,形成钙化斑。能谱分析显示钙化斑碳、氧、钙、磷元素,未见硫、氮元素。但是,对照组在扫描电镜下见大量死亡细胞团块和少量细胞单层贴壁爬行生长。能谱分析显示钙化斑碳、氧、钙、硫、氮元素,不含磷元素。对照组与实验组进行元素比较,对照组含硫、氮元素,不含磷元素。因此,考虑可能是由于死亡细胞蛋白质团块堆积、蛋白质与钙络合的矿物质引起的元素变化。结合倒置荧光显微镜下观察转染后细胞形态的变化,可以证明明

BMSCs 在腺病毒介导的 hBMP-2 体外诱导下能向成骨方向分化,分化后的细胞能重叠生长,不出现接触抑制现象,最终局部细胞矿化形成钙化斑块。

基因治疗的出现给骨组织工程研究者提供了全新的思路^[8]。BMP-2 生长因子作为骨组织形成的启动因子之一,在 BMSCs 的趋化及有丝分裂过程中发挥重要的作用,同时 BMP-2 还在刺激 BMSCs 的分化、加强细胞外基质的合成及维持成骨细胞表型等各个阶段具有诱导骨组织形成的多重效应^[9]。本实验利用腺病毒载体介导 hBMP-2 策略,经转基因技术将编码 hBMP-2 的目的基因导入兔 BMSCs 内,使之连续释放 hBMP-2 蛋白,从而诱导 BMSCs 向成骨细胞持续分化。RT-PCR 检测到转染后兔 BMSCs 高效表达 hBMP-2 目的基因。说明腺病毒介导的 hBMP-2 能诱导兔 BMSCs 向成骨方向分化,并使 BMSCs 具备较好的骨生成能力。

综上所述,Ad-hBMP-2/GFP 成功对 BMSCs 进行了基因修饰,修饰后的细胞高效表达 hBMP-2 目的基因,SEM/EDS 技术显示成骨分化后 BMSCs 表现出较好的骨生成能力。Ad-hBMP-2/GFP 转染兔骨髓间充质干细胞(BMSCs)体外骨生成过程与体内骨生成过程相同。

【 参 考 文 献 】

[1] Salamon A, Toldy E, Nagy L, et al. The role of adult bone marrow derived mesenchymal stem cells in the repair of tissue injuries[J]. Orvosi hetilap, 2012,153(46):1807-1815.
[2] 武成聪,李强,陈佳滨,等. 短期冻存兔骨髓间充质干细胞对其生物特性的影响[J]. 重庆医学,2014,43(4):459-461 +

464.
Wu CC, Chen JB, Li Q, et al. The effects of short-term cryopreservation on the bio-characteristics of rabbit BMSCs[J]. Chongqing Medical Journal, 2014,43(4):459-461 + 464.
[3] 陈佳滨,李强,茹嘉,等. BMP-2 和 EGFP 重组腺病毒体外转染兔骨髓间充质干细胞的研究[J]. 重庆医学,2014,43(2):193-195 + 199.
Chen JB, Li Q, Ru J, et al. Study of BMP2 and FGFP recombinant adenovirus transfection on rabbit bone marrow derived mesenchymal stem cells in vitro[J]. Chongqing Medical Journal, 2014,43(2):193-195 + 199.
[4] Jin H, Zhang K, Qiao C, et al. Efficiently engineered cell sheet using a complex of polyethylenimine-alginate nanocomposites plus bone morphogenetic protein 2 gene to promote new bone formation [J]. International Journal of Nanomedicine, 2014,9(10):2179-2190.
[5] Fukumoto S. Ectopic calcification[J]. Clinical Calcium, 2014, 24(2):185-189.
[6] Bonucci E. Bone mineralization [J]. Frontiers in Bioscience, 2012,17(1):100-128.
[7] Chang HH, Cheng CL, Huang PJ, et al. Application of scanning electron microscopy and X-ray microanalysis: FE-SEM, ESEM-EDS, and EDS mapping for studying the characteristics of topographical microstructure and elemental mapping of human cardiac calcified deposition [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014,406(1):359-366.
[8] Myon L, Ferri J, Chai F, et al. Oro-maxillofacial bone tissue engineering combining biomaterials, stem cells, and gene therapy [J]. Revue de Stomatologie et de Chirurgie Maxillo-faciale, 2011,112(4):201-211.
[9] Evans CH. Gene therapy for bone healing[J]. Expert Reviews in Molecular Medicine, 2010,12(18):1010-1017.
(收稿日期:2014-07-02,修回日期:2014-08-08)