

· 论 著 ·

hBMP-2 基因转染兔骨髓间充质干细胞体内移植后 hBMP-2 的活性检测

石正松 李强* 宁寅宽 蔡伟良 李诗鹏

桂林医学院附属医院急诊创伤外科, 桂林 541001

中图分类号: R687.34 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2015) 11-1333-05

摘要: **目的** 探究人骨形态发生蛋白-2(human bone morphogenetic protein-2, hBMP-2) 基因植入兔股骨头坏死模型体内后的活性, 为后续实验奠定理论基础。 **方法** 1. 采用髓芯减压联合液氮冰冻法制备兔股骨头坏死模型; 2. 将造模成功的兔子随机分为 A、B、C 组 (n=12), A 组不植入材料, 为对照组, B、C 组分别植入 DBM/BMSCs、hBMP-2/BMSCs/DBM; 3. 术后第 1、第 2、第 3 周各组分别处死 4 只兔子, 分别运用 PCR、RTFQ-PCR、Western Blot 检测股骨头内 hBMP-2 基因和蛋白的表达量, 评估 hBMP-2 基因在兔体内的活性。 **结果** 植入后, 在第 1、第 2、第 3 周, PCR 结果示: A、B 两组 hBMP-2 基因呈阴性表达, C 组 hBMP-2 基因呈阳性表达; RTFQ-PCR 示: C 组相对表达量分别为 1, 0.947 ± 0.025 , 0.895 ± 0.059 , $P = 0.081$; Western blot 示: A、B 两组 hBMP-2 蛋白在兔体内呈阴性表达, C 组 hBMP-2 蛋白呈阳性表达; 凝胶成像系统分析显示: C 组 hBMP-2 蛋白表达灰度值 (目的/内参) 分别为: 0.530 ± 0.056 , 0.507 ± 0.066 , 0.475 ± 0.086 , 且两两之间比较 $P > 0.05$ 。 **结论** hBMP-2 基因转染 BMSCs 植入兔股骨头坏死模型体内后能够稳定表达, 进而能够持续诱导 BMSCs 向骨细胞分化, 达到修复股骨头坏死的目的。

关键词: 骨组织工程; 人骨形态发生蛋白 2; 股骨头坏死; PCR; 荧光定量 PCR; 免疫印迹

Detection of hBMP-2 activity after transplantation of hBMP-2 gene-transfected bone marrow mesenchymal stem cells in rabbits

SHI Zhengsong, LI Qiang, NING Yinkuan, CAI Weiliang, LI Shipeng

Department of Emergency Traumatic Surgery, the Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001, China

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

Abstract: **Objective** To explore the activity of hBMP-2 after transfection to BMSCs in rabbit femoral neck necrosis model, and to lay the theoretical foundation for the subsequent experiments. **Methods** 1) Rabbit femoral head necrosis model was established by core decompression combined with liquid nitrogen frozen. 2) After the model establishment, animals were randomly divided into 3 groups (n = 12 per group), Group A as control group, Group B with implant of DBM/BMSCs, Group C with implant of hBMP-2/BMSCs/DBM. 3) Four rabbits of each group were killed at 1, 2, and 3 weeks after surgery. hBMP-2 gene and protein were detected using PCR, RTFQ-PCR, and Western blotting. **Results** After 1-, 2-, and 3-week implant, PCR results showed that the expression of hBMP-2 gene in group A and group B were negative, and the expression of hBMP-2 gene in C group was positive. RTFQ-PCR showed that the relative expression in group C was 1, 0.947 ± 0.025 , and 0.895 ± 0.059 , $P = 0.081$. Western blotting showed that the expression of hBMP-2 protein in group A and group B were negative, and the expression in group C was positive. Gel imaging system analysis showed that hBMP-2 protein expression gray values (objective/reference) in group C was 0.530 ± 0.056 , 0.507 ± 0.066 , and 0.475 ± 0.086 , respectively ($P > 0.05$). **Conclusion** The hBMP-2 can be stably expressed in transfected BMSCs after implant into the femoral head necrosis rabbit model and it can induce the differentiation of BMSCs to bone cells, and repair the necrosis of the femoral head.

Key words: Bone tissue engineering; Human bone morphogenetic protein-2; ONFH; PCR; RTFQ-PCR; Western Blot

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31160199), 广西区自然科学基金资助项目 (2014jjAA40064)

* 通讯作者: 李强, Email: li.q12251970@163.com

股骨头坏死 (osteonecrosis of femoral head, ONFH) 是一种髋关节复杂病变, 已跃居髋关节疾病首位^[1] 且有了年轻化趋势^[2]。其病因不明, 公认的致病因素有 13 种^[3], 目前有多重治疗方式^[4-5], 但

结果均不理想。有研究表明骨组织工程通过骨传导和骨诱导方式共同完成骨的修复和重建,被认为是最有潜能的治疗方式^[6]。BMP-2 是 TGF- β 家族一员,基础研究已经证实具有强大的成骨诱导能力^[7-9]。国内外学者将 hBMP-2 基因转染入 BMSCs,体外培养后通过 PCR 和 Western Blot 技术检测发现 hBMP-2 基因均有较高活性^[10],但是关于 hBMP-2 基因植入体内后的活性情况,目前国内外鲜有报道。本实验通过腺病毒介导 hBMP-2 基因转染 BMSCs 复合 DBM 的方式构建组织工程材料,将其植入兔 ONFH 模型,旨在探讨 hBMP-2 基因在植入体内后的活性情况,为将来骨组织工程的临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 组织工程骨(hBMP-2/BMSCs/DBM):本课题组经过前期研究,已利用腺病毒介导 hBMP-2 转染 BMSCs 复合脱钙松质骨(demineralized bone matrix, DBM)的方式成功构建了组织工程骨^[11]。

1.1.2 实验动物:新西兰大白兔 36 只,雌雄不拘,体重约 3.2 kg,清洁级,购于桂林医学院动物实验中心,实验过程中对动物的处理符合伦理学精神。

1.1.3 主要试剂及器材:水合氯醛(天津大茂化学试剂厂),凝胶海绵(江西祥恩医疗科技发展有限公司),注射用青霉素钠(华北制药公司),总 RNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司),M-MLV First Strand Kit 试剂盒(上海沪峰生物科技有限公司),DNA Marker(北京天根生化科技有限公司),2 $\times$ Taq Master Mix(大连宝生物工程有限公司),总蛋白提取盒(北京博奥森生物技术有限公司),BCA 蛋白定量试剂盒(北京碧云天生物公司),抗 hBMP-2 单克隆抗体(BD 公司),抗 GAPDH 多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗及山羊抗小鼠二抗(北京中杉金桥生物公司),Western blot 化学发光试剂盒(Thermo 公司),JS-780 全自动凝胶成像分析仪(上海培清公司),Chemi DOC XRS + 凝胶成像系统分析仪(美国 BIO-RAD 公司),7500Fast 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

1.2 方法

1.2.1 造模:实验动物均选取右侧参与实验,参照李海冰等髓芯减压术联合液氮冰冻的操作步骤^[12]实验动物取俯卧位,10% 水合氯醛水溶液耳缘静脉注射(3 ml/kg)麻醉。由臀大肌与阔筋膜张肌的间

隙进入,暴露臀小肌及髓关节外旋肌群,并贴骨面将其切断,暴露关节囊以后小十字口切开,外旋股骨头,使股骨头暴露而不使其脱位,在大转子下约 1 cm 处,用无菌钻头,从外背侧向股骨头方向打孔,直至关节软骨下,孔径大约 3 mm,用小刮匙刮除股骨头内骨质,然后用液氮持续冷冻股骨头,约 5 分钟。

1.2.2 实验分组并植入材料:实验动物术后行 X 线检测,确认造模成功后随机分为 A、B、C、3 组,每组 12 只。A 组为造模组,不做处理,复温后立即逐层关闭切口;B、C 各组动物在造模复温后沿钻孔方向分别填塞 DBM、DBM/BMSCs、hBMP-2/BMSCs/DBM,然后用医用凝胶海绵封闭隧道口,逐层关闭切口;术后各组实验动物臀大肌处注射青霉素钠注射液预防感染(40 万单位/只·天,连续 3 天)。

1.2.3 PCR 检测 hBMP-2 基因的表达:术后 1、2、3 周各组分别处死 4 只兔子,取部分股骨头样品放入研钵,加入液氮,研磨成粉末后加入 1.5 ml EP 管,然后按照总 RNA 提取试剂盒(离心柱型)操作步骤操作,并通过凝胶电泳进行质量检测,使用分光光度计进行纯度浓度测定,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。使用 PCR 仪与 M-MLV First Strand Kit 试剂盒合成 cDNA。根据 hBMP-2 的基因序列利用 primer 5.0 合成引物,使用 PCR 仪与 2 $\times$ Taq PCR Master Mix 试剂盒进行 PCR 扩增,扩增产物采用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,用培清 JS-780 全自动凝胶成像分析系统进行拍照、分析。

1.2.4 RTFQ-PCR 技术检测 hBMP-2 基因的表达:取 1.2.3 中 C 组 1、2、3W RNA 1 μ g,逆转录合成为 cDNA。逆转录产物用 7500Fast 实时荧光定量 PCR 仪检测分析。

1.2.5 Western Blot 检测 hBMP-2 蛋白的表达:术后 1、2、3 周各组分别处死 4 只兔子,取部分股骨头样品放入研钵,加入液氮,研磨成粉末后按照总蛋白提取盒步骤提取总蛋白。提取物用 BCA 蛋白定量试剂盒进行蛋白定量,转膜,一抗,二抗,显影,Bio-Rad Chemi Doc XRS + 化学发光成像系统曝光,以内参为标准,计算出每组蛋白的相对表达量。

1.2.6 统计学分析:采用统计软件 SPSS 18.0 进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组之间比较时,首先进行 Levene 检验,方差齐者,采用 ANOVA 法检验,两两比较采用 LSD-t 检验;方差不齐者,进行非参数检验,两两比较采用 Mann-Whitney U 法。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 PCR 检测 hBMP-2 基因表达结果

凝胶成像分析系统显示:DNA Marker 大小为 100-600bp, GAPDH 大小为 221bp, 目的条带 (hBMP-

2) 大小为 180bp。术后 1、2、3 周, A 组和 B 组 hBMP-2 目的基因均为阴性表达, C 组在植入后第 1、2、3W 后 hBMP-2 目的基因均为阳性表达 (如图 1)。

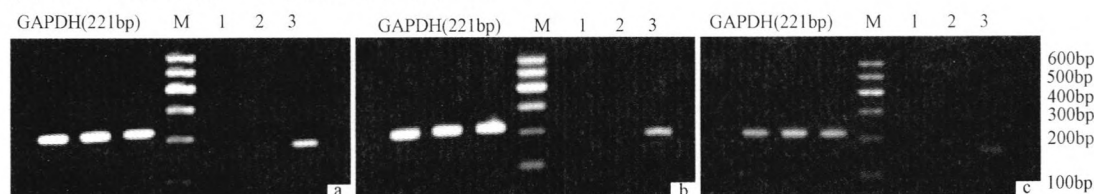


图 1 PCR 检测各组 hBMP-2 基因的表达

M: DNA Marker, 1: A 组, 2: B 组, 3: C 组; a: 1 周, b: 2 周, c: 3 周

Fig. 1 The hBMP-2 gene expression in each group detected using PCR.

M: DNA Marker, 1: Group A, 2: Group B, 3: Group C, a: 1w, b: 2w, c: 3w

2.2 RTFQ-PCR 检测 hBMP-2 基因表达结果

RTFQ-PCR 结果显示: C 组兔子植入 hBMP-2/BMSCs/DBM 后, 第 1、2、3 周时 hBMP-2 基因均有表达, 如图 2。设 C 组术后 1 周时 hBMP-2 基因的相对

表达量为 (RQ) = 1, 2、3W RQ 值分别为 0.947 ± 0.025 、 0.895 ± 0.059 。1 周与 2 周比较 $P = 0.072 > 0.05$, 2 周与 3 周比较 $P = 0.081 > 0.05$, 无统计学差异。

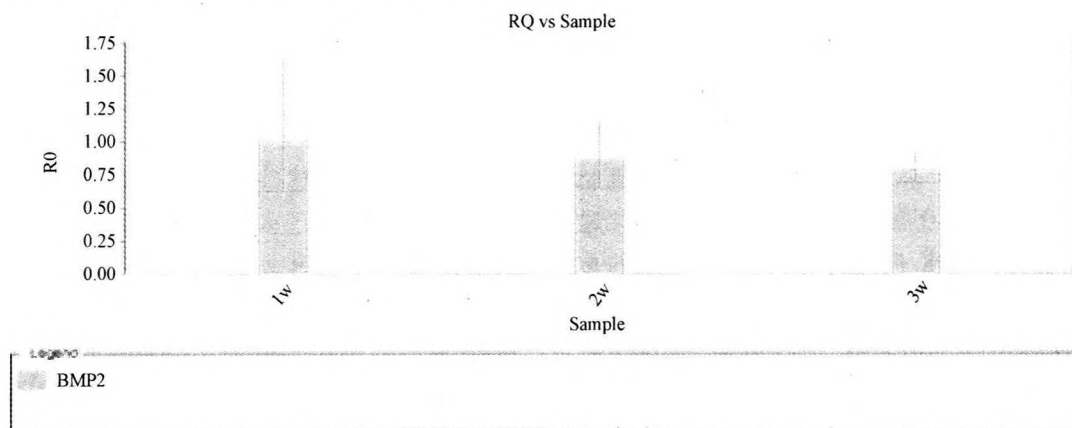


图 2 RTFQ-PCR 检测 C 组术后各时间点 hBMP-2 基因的表达

Fig. 2 The hBMP-2 gene expression in Group D at each time detected using RTFQ-PCR.

2.3 Western Bolt 检测 hBMP-2 蛋白表达结果

蛋白凝胶成像系统显示: 术后 1、2、3 周 A 组和 B 组 hBMP-2 蛋白均为阴性表达, C 组 hBMP-2 蛋白均为阳性表达, 如图 3。C 组术后各时间点 hBMP-2 蛋白均成阳性表达, 表达量依次有所衰减, 如图 4。凝胶成像系统灰度分析显示: C 组术后 1、2、3 周 hBMP-2 蛋白目的/内参表达量的值分别为 0.530 ± 0.056 、 0.507 ± 0.066 、 0.475 ± 0.086 , 且 1 周与 2 周、1 周与 3 周、2 周与 3 周两两比较的 P 值分别为: 0.702、0.382、0.607, 均大于 0.05, 无统计学差异, 如表 1。

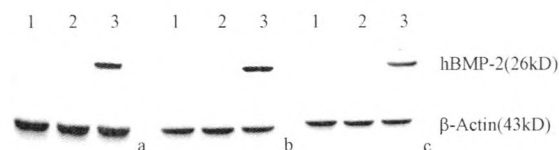


图 3 Western Bolt 检测各组 hBMP-2 蛋白的表达

1: A 组, 2: B 组, 3: C 组; a: 1 周, b: 2 周, c: 3 周

Fig. 3 The hBMP-2 protein expression in each group detected using Western bolting.

1: Group A, 2: Group B, 3: Group C, a: 1w, b: 2w, c: 3w



图 4 Western Bolt 检测 C 组各时间点 hBMP-2 蛋白的表达
1:1 周,2:2 周,3:3 周

Fig. 4 The expression of hBMP-2 protein in Group C detected using Western boltting.
1: 1w, 2: 2w, 3: 3w

表 1 C 组术后各时间点 hBMP-2 蛋白表达量
(目的/内参, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 The expression of hBMP-2 protein in Group C after surgery (objective/reference, $\bar{x} \pm s$)

时间点	1 周 [△]	2 周 ^{*△}	3 周 ^{*△}	F 值
灰度值	0.530 ± 0.056	0.507 ± 0.066	0.475 ± 0.086	0.448

$\alpha = 0.05$, * 与 1 周比较, Δ 与 2 周比较, # 与 3 周比较。

$\alpha = 0.05$, * compared with 1w, Δ compared with 2w, # compared with 3w.

3 讨论

国内外大量基础实验及临床研究均证明 BMP-2 在促进骨再生、治疗骨缺损方面有较理想的效果^[13-15]。谢在春等^[16]通过研究认为 BMP-2 的机制可能为其诱导间充质干细胞向软骨方向分化,并通过 Smad 通路及 MAPK 通路传导,并对骨组织的形成、生长和损伤的修复具有促进作用。局部直接注射 BMP-2 蛋白不仅价格昂贵、来源有限,而且注射后蛋白容易降解等问题一直是临床大规模应用 BMP-2 蛋白的最大瓶颈,因此根据基因工程原理构建包含 BMP-2 基因的载体,促进 BMP-2 在局部持续表达这一方式受到了国内外广大学者的青睐。本研究根据基因工程和组织工程原理采用腺病毒介导 hBMP-2 基因转染兔 BMSCs 复合 DBM 的方法体外构建组织工程骨,再将该组织工程骨植入兔 ONFH 模型中,对 hBMP-2 基因及蛋白进行检测,探讨 hBMP-2 基因在活体内的活性,为下一步的实验研究奠定理论基础。

PCR 技术可以在短时间内扩增出足量的 DNA 以供研究,具有特异性强、敏感度高、易自动化等优点,是组织工程中重要的检测手段^[17]。PCR 和凝胶成像系统显示 hBMP-2/BMSCs/DBM 植入活体 1、2、3 周后, hBMP-2 基因均成阳性表达,提示 hBMP-2 基因植入活体兔模型后能够稳定存在并表达。RTFQ-

PCR 是目前在基因工程研究中使用最广泛且灵敏度和特异性较高的检测手段。国内外许多学者研究已经证实, BMP-2 必须在局部保持一定的浓度,并且这种浓度在局部至少要维持 2 周的情况下, BMP-2 才能发挥诱导和启动成骨的作用。本实验通过对 RTFQ-PCR 检测结果的统计分析发现, C 组在植入 hBMP-2/BMSCs/DBM 后随着时间的推移, hBMP-2 基因的表达量成梯度慢慢降低,但是降低程度没有统计学差异。提示 hBMP-2 基因在植入活体后的 3 周内都有较高且较稳定的表达,为下一步诱导和启动骨修复奠定的基础。

Western Bolt 是根据抗原抗体特异性结合原理,对凝胶电泳处理过的蛋白进行着色标记,然后通过分析着色的位置和着色深度来评估目的蛋白在细胞或组织中的表达情况,现已广泛应用于基因在蛋白水平的表达情况研究方面。Western Blot 结果显示: C 组在植入 hBMP-2/BMSCs/DBM 后的 1、2、3 周 hBMP-2 蛋白均有阳性表达,表明 hBMP-2 基因在局部已经开始表达相应的蛋白;植入后的 1、2、3 周表达量虽然有所衰减,但是经过统计学分析其衰减量均大于 0.05,没有统计学差异,提示 hBMP-2 基因能够在局部稳定存在并表达相关蛋白,进而诱导和启动骨修复和再生。

hBMP-2 基因已经成为骨组织工程研究中比较热门的细胞因子,国内外学者都对其进行了大量的研究,并取得突破性成果。之前学者在研究 hBMP-2 基因时,通常采用体外培养转染 hBMP-2 基因的干细胞,然后在细胞上清液或细胞中对 hBMP-2 基因的活性进行定性或半定量的检测,以此来评估 hBMP-2 基因的活性。陆斌^[18]等曾运用 ELISA 法对细胞上清液中的 hBMP-2 基因进行了精确的定量研究,证明了其在离体细胞中有较高的活性。hBMP-2 基因在离体细胞这种简单环境中具有较高的活性,但是将其植入复杂的活体环境后,其活性情况如何,目前尚缺相关的直接研究。本研究在前期离体细胞研究的基础上,将负载 hBMP-2 基因的组织工程材料植入活体,然后对 hBMP-2 基因的活性进行研究,在基因和蛋白水平证实了 hBMP-2 基因在异种活体内有较高的活性,并且能够在相当长一段时间内能够维持这种活性,这为后续骨修复和再生实验提供了更为直观理论依据,也是本研究的一大特色和创新。虽然 BMP-2 蛋白在骨再生和骨修复方面有值得肯定得作用,但是其应用的安全性,例如 BMP-2 对局部或全身的影响等问题,仍然值得进一步商榷。

和研究。

综上所述,hBMP-2 基因转染兔骨髓间充质干细胞植入活体后,hBMP-2 基因在局部能够稳定表达并保持较长时间的活性,为后续进一步研究其对股骨头坏死的实验奠定了理论基础。

【参 考 文 献】

- [1] Chamberlain J R, Schwarze U, Wang P R, et al. Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta [J]. Science. 2004, 303(4): 1198-1201.
- [2] Coll R, Aguirre M, Hernandez A, et al. Mesenchymal stromal cells for osteonecrosis of the femoral head (ONFH): data from ongoing clinical trial [J]. Cytotherapy, 2014, 16(4): S97-S98.
- [3] Kim S Y, Kim T H. Genetic Studies in Osteonecrosis of the Femoral Head [M]. Osteonecrosis. Springer Berlin Heidelberg, 2014: 61-69.
- [4] Wang C J, Huang C C, Wang J W, et al. Long-term results of extracorporeal shockwave therapy and core decompression in osteonecrosis of the femoral head with eight-to nine-year follow-up [J]. Biomedical journal, 2012, 35(6): 481.
- [5] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SL, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. Science, 1999, 284(5411): 143-147.
- [6] 符来想. 负载 BMP-2 组织工程骨修复骨缺损的研究进展 [J]. 医学综述, 2013, 19(4): 590-593.
Fu LX. Research Progress of Repairing Bone Defects with BMP-2 Loaded Tissue Engineered Bone [J]. Medical Recapitulate, 2013, 19(4): 590-593.
- [7] Riley EH, Lane JM, Urist MR, et al. Bone morphogenetic protein-2: biology and applications [J]. Clin Orthop Relat Res, 1996, (324): 39-46.
- [8] Boden SD, Kang J, Sandhu HS, et al. Use of recombinant bone morphogenetic protein-2 to achieve posterolateral lumbar spine fusion in humans: a prospective randomized clinical pilot trial: 2002 Volvo Award in clinical studies [J]. Spine, 2002, 27: 2662-2673.
- [9] Yoshito Katayama, Yukihiro Matsuyama, Hisatake oshihara, et al. Clinical and radiographic outcomes of posterolateral lumbar spine fusion in humans using recombinant human bone morphogenetic protein-2: an average five-year follow-up study [J]. Int Orthop. 2009, 33(4): 1061-1067.
- [10] 宁寅宽, 李强, 蔡伟良, 等. Ad-hBMP-2/GFP 转染兔骨髓间充质干细胞体外成骨的实验研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(3): 264-268.
Ning YK, Li Q, Cai WL, et al. The Experimental study on the osteogenesis of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells transfected by Ad-hBMP-2/GFP in vivo [J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 2015, 21(3): 264-268.
- [11] 陈佳滨, 李强, 茹嘉, 等. 腺病毒介导 BMP-2 和 EGFP 基因转染兔骨髓基质干细胞及种植脱钙骨的体外观察 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(8): 869-874.
Chen JB, Li Q, Ru J, et al. Construction of tissue engineering bone with Ad-BMP-2- and EGFP-transfected bone marrow stromal cells and DBM in vitro [J]. Chinese Journal of Osteoporosis, 2014, 20(8): 869-874.
- [12] 李海冰, 瞿向阳, 李明, 等. 应用软骨下钻孔结合液氮冷冻制作兔股骨头缺损坏死模型 [J]. 第三军医大学学报, 2014, 19: 023.
Li HB, Qu XY, Li M, et al. Produce the necrosis of femoral head defect of rabbit by using the combined application of cartilage and liquid nitrogen [J]. Journal of Third Military Medical University, 2014, 19: 023.
- [13] Betz Oliver B, Betz Volker M, Schröder Christian, et al. Repair of large segmental bone defects: BMP-2 gene activated muscle grafts vs. autologous bone grafting. [J]. BMC biotechnology, 2013, 13(1): 66.
- [14] Yoshito Katayama, Yukihiro Matsuyama, Hisatake oshihara, et al. Clinical and radiographic outcomes of posterolateral lumbar spine fusion in humans using recombinant human bone morphogenetic protein-2: an average five-year follow-up study [J]. Int Orthop. 2009, 33(4): 1061-1067.
- [15] 张雁儒, 马辉, 张辉, 等. BMP-2 转染 BMSCs 修复兔股骨头坏死模型的实验研究 [J]. 中国临床解剖学杂志, 2013, 31(4): 447-452.
Zhang YR, Ma H, Zhang H, et al. The experimental study on the repair of ANFH in rabbit with the BMP-2 gene transfected autologous BMSCs [J]. Chinese Journal of Clinical Anatomy, 2013, 31(4): 447-452.
- [16] 谢在春, 郭卫真, 卢东荣, 等. BMP2 诱导 C3H10T1/2 细胞成软骨分化的分子机制研究 [J]. 广州医学院学报, 2012, 40(2): 11-15.
Xie ZC, Guo WZ, Lu DR, et al. Molecular mechanism of BMP2-induced chondrogenic differentiation of C3H10T1/2 cells [J]. Academic Journal of Guangzhou Medical College, 2012, 40(2): 11-15.
- [17] 程谷, 李祖兵. 骨组织工程中的检测方法及其效果评估展望 [J]. 国际口腔医学杂志, 2010, 37(5): 593-596.
Cheng G, Li ZB. Detection methods in bone tissue engineering and evaluation of their effects [J]. International Journal of Stomatology, 2010, 37(5): 593-596.
- [18] 陆斌, 汤亭亭, 岳冰, 等. BMP-2 基因给药修复实验性羊股骨头坏死 [J]. 中华骨科杂志, 2005, 25(10): 603-607.
Lu B, Tang TT, Yue B, et al. Repairing experimental femoral head necrosis of goat with BMP-2 gene medicine [J]. Chin J Orthop, October, 2005, 25(10): 603-607.

(收稿日期: 2015-05-28)