论著·基础研究

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*

陈佳滨，李 强△，茹 嘉，武成聪，宁寅宽，蔡伟良
（桂林医学院附属医院四肢创伤手外科，广西桂林 541001）

摘 要：目的 体外培养兔骨髓间充质干细胞（BMSCs）并观察其生物学特性，通过腺病毒介导人骨形态发生蛋白-2（hBMP-2）和 EGFP 基因转染兔 BMSCs 后，观察 BMP-2 和 EGFP 的表达情况。**方法** 通过密度梯度离心联合贴壁法，分离、培养兔 BMSCs，流式细胞仪检测细胞周期和表面标记，体外诱导兔 BMSCs 向成骨细胞方向分化。转染后，免疫细胞化学染色及蛋白质印迹法（Western blot）检测外源基因的表达。**结果** 兔 BMSCs 周期约有 56.84% 处于 G_1 期；CD44 表达阳性，CD45 表达阴性；经成骨细胞诱导后，Ⅰ型胶原免疫组织化学染色阳性，茜素红染色阳性。转染后，Western blot 及免疫细胞化学染色显示细胞内 BMP-2 有较强的表达。**结论** 成功分离、培养兔 BMSCs，并鉴定其具有成骨分化能力；构建的 Ad-BMP-2/EGFP 可高效转染兔 BMSCs，并能稳定表达 BMP-2 目的基因。

关键词：骨形态发生蛋白质类；腺病毒科；骨髓；充质干细胞；基因；转染
doi：10.3969/j.issn.1671-8348.2014.02.023 **文献标识码：**A **文章编号：**1671-8348(2014)02-0193-03

Study of BMP2 and EGFP recombinant adenovirus transfection on rabbit bone marrow derived mesenchymal stem cells in vitro*

Chen Jiabin，Li Qiang△，Ru Jia，Wu Chengcong，Ning Yingkuan，Cai Weiliang
（*Department of Limb Trauma Hand Surgery，Affiliated Hospital of Guilin Medical University，Guilin，Guangxi* 541001，*China*）

Abstract：Objective To culture the rabbit bone marrow derived mesenchymal stem cells（BMSCs），and to observe their biological characteristics in vitro and the expression of BMP2 and EGFP after Ad-EGFP-BMP2 infected on them. **Methods** To isolate and cultivate BMSCs by density gradient centrifugation and adherent culture in vitro；the cell cycle and the surface marks were detected by flow cytometer；rabbit BMSCs were differentiated into the direction of osteogenetic cells by in vitro induction. After transfection，the expression of exogenous gene in the cells was detected by the immunocytochemical staining and Western blot. **Results** About 56.84% of rabbit BMSCs cell cycle was in the G1 phase；the D44 expression was positive and the CD45 expression was negative；after induction by osteogenetic cells，the Ⅰ type collagen immunohistochemical staining was positive and the alizarin red staining was positive. After transfection，the strong expression of BMP2 and EGFP in cells was showed by Western blot and the immunocytochemical staining. **Conclusion** rabbit BMSCs are successfully isolated，cultured and identified to have the ability of osteogenetic differentiation；the structured Ad-BMP-2/EGFP can efficiently transfected rabit BMSCs and stably express the target gene of BMP2.

Key words：bone morphogenetic proteins；adenoviridae；bone marrow；mesenchymal stem cells；gene；transfection

骨髓间充质干细胞（BMSCs）属于多能造血干细胞，具有很强的成骨分化能力，已成为组织工程骨研究中最热门、最理想的种子细胞。骨形态发生蛋白（BMPs）是转化生长因子-β（TGF-β）超家族的成员之一，具有很强的诱导间叶细胞向成骨分化的能力，并能够在体内外诱导成骨的形成，促进 BMSCs 向成骨细胞方向分化[1-4]。有文献报道，外源性植入 BMP-2 虽可以诱导骨形成，但存在效价低、持续时间短的缺点[5-6]。目前，基因治疗以促进成骨的研究方法较为热门。本实验在腺病毒介导下，将 BMP-2 和 EGFP 基因导入兔 BMSCs，现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 腺病毒载体 携带 BMP-2 和 EGFP 基因的腺病毒载体（Ad-BMP-2/EGFP）、携带 EGFP 基因的腺病毒对照载体（Ad-EGFP）由 invitrogen 公司提供。

1.1.2 实验动物 两三个月龄新西兰大白兔 5 只，体质量 1.0～1.5 kg，购自桂林医学院实验动物中心，实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。

1.1.3 主要试剂 DMEM 细胞培养基（Hyclone），胎牛血清（Gibco），胰蛋白酶（四季青），BMP-2 单克隆抗体（Biowold 公司），Ⅰ型胶原单克隆抗体（武汉博士德），二抗 FITC 标记 IgG（北京中杉金桥），碱性磷酸酶检测试剂盒（南京建成生物工程公司），流式一抗小鼠抗兔 CD44、CD45（Antigenix 公司），同型对照小鼠抗兔 IgG1 K（eBioscien 公司），流式二抗 PerCT 标记（jackson 公司），二甲基亚砜（Amresco 公司），茜素、地塞米松、β-磷酸甘油、维生素 C（Sigma 公司）。

1.1.4 主要仪器 SW-CJ-2F 型超净工作台（苏州净化），CO_2 培养箱、－80 ℃超低温冰箱、液氮罐（Thermo 公司），FACSAriaTM Ⅲ流式细胞仪（BD 公司），倒置相差显微镜（Olympus 公司），MLDEL680 型酶标仪（BIO-RAD 公司）。

* **基金项目：**国家自然科学基金资助项目（31160199）。 **作者简介：**陈佳滨（1988－），在读硕士，主要从事骨组织工程研究。 △ **通讯作者**，Tel：（0773）2827759；E-mail：li.q12251970@163.com。

1.2 方法

1.2.1 兔 BMSCs 的分离培养 用 1 mL/kg 剂量的戊巴比妥钠注射兔子的耳缘静脉,将其麻醉。在无菌条件下,用 12 号骨穿针穿刺兔股骨粗隆,抽取骨髓约 5.0 mL。用 L-DMEM 培养基 1∶1 稀释,离心(1 500 r/min) 5 min,倒掉液体,用 3 mL L-DMEM 培养基重悬所得细胞,加入等体积 Percoll(1.073 g/mL) 分离,2 500 r/min 离心 20 min 后,取中间絮雾状细胞悬液层,再加入 5 mL L-DMEM 培养基混匀后,1 500 r/min 离心 5 min;倒掉液体,重悬细胞,然后接种于含体积分数为 15% 胎牛血清的 L-DMEM 培养液中,放置 37 ℃、5%CO_2 饱和湿度下培养。孵育 48 h 后更换培养液。4～5 d 后细胞基本铺满培养瓶,用 0.25% 胰蛋白酶(含 0.02%乙二胺四乙酸) 消化后 1∶2传代培养,平均每 2～3 天传代,细胞传至第 25 代。

1.2.2 兔 BMSCs 的鉴定 取第 10 代兔 BMSCs 约 1.5×10^6 个,胰酶消化,1 500 r/min 离心 5 min,PBS 洗涤 2 次,加入 100 μL 的 PBS 重悬细胞;分别加一抗鼠抗兔 CD44、CD45,室温放置 30 min;用 PBS 洗涤 2 次,100 μL PBS 重悬细胞,F 加入相应二抗山羊抗小鼠 PerCP 标记单克隆抗体,室温避光放置 30 min;加 PBS 洗涤 3 次,以 300 μL PBS 重悬细胞,上机。

1.2.3 细胞周期 胰酶消化收集第 10 代细胞,每 EP 管细胞约 1×10^6 个,用 1 mL PBS 制成单细胞悬液,加入 70%冰乙醇 9 mL 固定 12 h,RNA 酶处理,水浴 30 min,PI 避光染色 30 min,震荡混匀,上机检测。

1.2.4 兔 BMSCs 向成骨分化 取第 10 代兔 BMSCs 以 $1\times10^4/cm^2$ 的密度接种于无菌培养皿中,当细胞长满 50%～60%时,实验组更换为成骨诱导培养基(含地塞米松 10^{-8} mol/L、维生素 C 50 mg/L、β-磷酸甘油 10 mmol/L、体积分数为 15%胎牛血清的 L-DMEM 培养液),以后每 3 天换成骨诱导液,诱导 1 周后行Ⅰ型胶原免疫组织化学染色,未诱导组作为对照诱导 3 周后行茜素红染色。

1.2.5 Ad-BMP-2/GFP 转染兔 BMSCs 取第 10 代铺满培养皿体积 80%左右的细胞,更换无血清的培养液孵育 24 h 后吸出培养液,根据病毒滴度以感染复数(MOI)50、100、200 感染兔 BMSCs,加含体积分数为 15%胎牛血清的完全培养基继续培养。于转染 48 h 后荧光显微镜下观察转染 Ad-BMP-2/EGFP 的兔 BMSCs 绿色荧光蛋白的表达,确定最适 MOI。

1.2.6 免疫组织化学 取 Ad-BMP-2 转染 48 h 后的细胞消化后爬片,4%多聚甲醛固定,按 SP 免疫组织化学试剂盒进行操作,DAB 显色,封片,倒置显微镜观察,未转染组当对照。

1.2.7 蛋白质印迹法(Western blot)检测转染后细胞 BMP-2 的表达 转染后 48 h,Ad-BMP-2/EGFP 组及 Ad-EGFP 组分别取约 2×10^6 个细胞用裂解液提取蛋白;蛋白定量按 BCA 蛋白浓度测定试剂盒;取 30 μg 上样,煮沸 10 min,离心 10 s,10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰氨凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,浓缩胶中 80 V,电泳 60 min,分离胶中 120 V,电泳 30 min;常规转膜,90 A 电流转印 50 min;4 ℃封闭过夜;使用一抗稀释液按比例稀释一抗(BMP-2 单克隆抗体),置于摇床中摇荡 1 h,以封闭液按比例稀释二抗(辣根酶标记抗体),置于摇床中摇荡 1 h;加 TBST 后在摇床中摇荡各洗涤 3 次,每次 10 min;ECL 发光液(A 液 200 μL,B 液 200 μL) 室温中孵育 1 min,装暗盒暗室中胶片曝光 5 min,取同样数量的未转染细胞蛋白作为对照。

2 结 果

2.1 兔 BMSCs 的形态 原代兔 BMSCs 均表现为长梭形,呈涡旋状、放射状排列,见图 1。传代细胞形态仍呈长梭形,细胞密集排列,单个细胞轮廓较清楚。

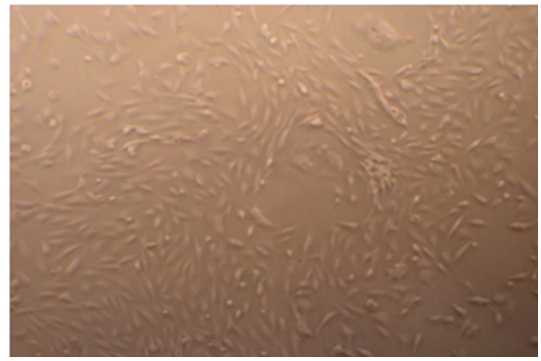


图 1 原代兔 BMSCs 形态(×40)

2.2 兔 BMSCs 表面标志物的鉴定 流式细胞仪分析结果显示,第 20 代细胞 CD44 阳性表达,荧光表达量(93.95±0.71)%;CD45 呈阴性表达,荧光表达量(0.29±0.10)%,见图 2。

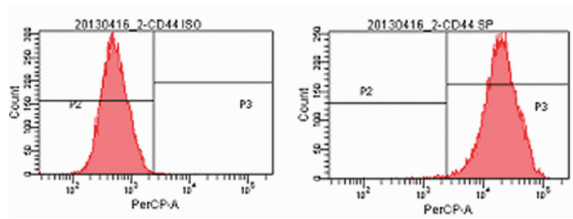


图 2 流式细胞仪检测细胞表面分子标志物 CD44

2.3 兔 BMSCs 增殖 细胞周期分析 G_1 期(56.84±2.27)%,G_2 期(8.93±2.41)%,S 期(34.20±0.94)%。

2.4 诱导 BMSCs 向成骨细胞分化 Ⅰ型胶原染色免疫组织化学检测结果显示兔 BMSCs 胞浆呈阳性表达,有棕黄色染色,而未诱导细胞呈阴性。茜素红染色阳性,可形成形态各异的矿化结节,染色后为红色,见图 3。

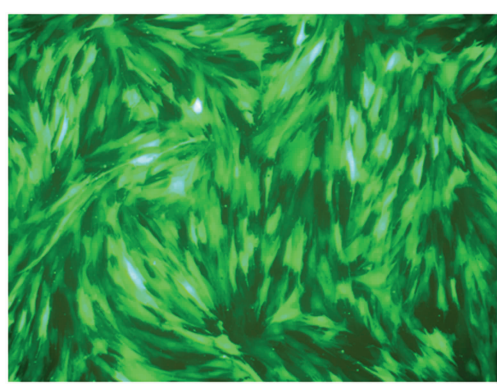


图 3 MOI 为 100 的 Ad-BMP-2 转染兔 BMSCs 48 h(×100)

2.5 感染 Ad-BMP-2/EGFP 后兔 BMSCs 中绿色荧光蛋白的表达 Ad-BMP-2/EGFP 转染 48 h 后,荧光显微镜下观察,可见 MOI 为 100 转染的细胞,转染效率达 95%以上,见图 3。MOI 为 50 转染的细胞状态良好,但细胞内出现绿色荧光蛋白相对比较少,转染效率约为 60%;当感染倍数为 200 时的感染效率较感染倍数为 100 时的感染效率无明显增加,但光镜下见细胞形态发生变化,由长梭形变成扇形状分布,并见少许漂浮

细胞可能与腺病毒对细胞毒性作用有关。

2.6 免疫组织化学检测 BMP-2 的表达 转染后 BMP-2 的免疫组织化学检测结果显示兔 BMSCs 细胞胞浆呈阳性表达，可见棕黄色染色，见图 4。而未转染细胞呈阴性。

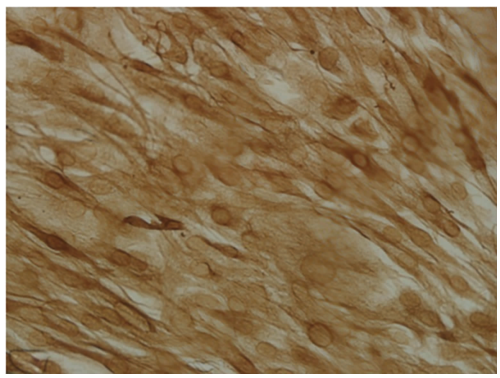
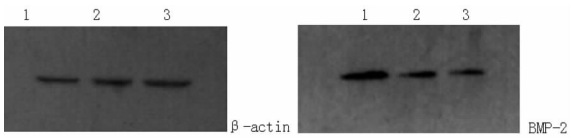


图 4 转染 24 h BMP-2 免疫组织化学染色(DAB×200)

2.7 Western blot 检测分泌 BMP-2 蛋白表达 分别提取转染 48 h 后及未转染的细胞蛋白，Western blot 检测到约 30×10^3 大小的阳性条带，而 Ad-EGFP 组及未转染组的条带较弱，见图 5。



1：Ad-BMP-2/EGFP 组；2：Ad-EGFP 组；3：未转染组。

图 5 Western blot 检测 BMP-2 蛋白的表达

3 讨 论

BMSCs 是一类存在于骨髓内的非造血干细胞，具有多向分化的潜能，可以向成骨系细胞、内皮细胞、成纤维系细胞、成软骨系细胞等方向分化。BMSCs 不仅具有取材方便、容易分离培养、植入动物体内不易引起免疫排异反应，而且没有伦理学争议等优点，被认为是骨组织工程中较理想的种子细胞之一[7-8]。

原代培养的 BMSCs 混有较多杂质细胞，形态较多样，接种 1 d 后贴壁细胞中较少短小梭形和多角形细胞散在或集落生长，接种 3 d 后，出现较多的长梭形细胞散在或集落生长，随后细胞长满瓶底时呈现漩涡或辐射状排列生长。原代细胞生长较慢，传至第 1 代需 4～5 d，传代后生长加快，2～3 d 可传 1 代。细胞表面标记 CD44 表达阳性，而 CD45 表达阴性，可以初步判断为兔 BMSCs[9]。细胞周期分析 G_1 期(56.84±2.27)%，G_2 期(8.93±2.41)%，S 期(34.20±0.94)%，表明较多数细胞处于静止期与 DNA 合成前期，处于活跃的增殖期的细胞较少。

Ⅰ型胶原蛋白是骨组织中重要的细胞外基质成分，也是成骨细胞的标志物之一，主要由成熟的成骨细胞合成和分泌，并且能为 BMSCs 的生长提供自源性支架，对于维持骨的正常结构和功能起到至关重要的作用[10]。碱性磷酸酶具有提高 BMSCs 成骨分化的潜能，为成骨细胞标志酶之一[11]。本实验兔 BMSCs 经成骨诱导后，细胞胞浆内Ⅰ型胶原蛋白含量较未诱导组有明显提高。结果证明，兔 BMSCs 具有向成骨细胞分化的潜能。

大量实验结果表明，BMP 具有诱导未分化的 BMSCs 向成骨细胞方向分化的作用以及在骨缺损修复过程中发挥重要作用[12-13]。目前认为 BMP-2 是最具有前途的骨诱导蛋白，将其单纯植入动物体内易被稀释和蛋白酶分解，其诱导成骨能力难以得到的发挥。利用转基因技术将 BMP-2 基因转移至兔 BMSCs 中，为上述问题的解决提供了新的思路和方法。腺病毒表达载体具有高效的转染效率，可感染处于静止期和分裂期的细胞，目的基因不整合到宿主细胞基因组中，免疫排斥反应低，较高的安全系数等优点故成为基因治疗的主要载体。

本实验利用腺病毒介导 BMP-2 和 EGFP 体外转染兔 BMSCs，在不影响细胞生长的情况下保证转染效率高于 95%。重组腺病毒载体同时携带了 BMP-2 和 EGFP 两种基因，其中 EGFP 作为报告基因，既可监测病毒包装是否成功，检测病毒滴度及感染效率，同时也可作为细胞标记，指示 BMP-2 在干细胞内的准确位置[14]。经 Ad-BMP-2 转染后，细胞免疫组织化学检测结果显示兔 BMSCs 细胞胞浆呈阳性表达，Western blot 检测结果显示目的条带较对照组粗。因此根据实验结果可认为，腺病毒介导 BMP-2 和 EGFP 基因转染兔 BMSCs 可使 BMP-2 目的基因在细胞内高效表达，进而诱导兔 BMSCs 向成骨细胞方向分化。

综上所述，利用重组腺病毒载体可将 hBMP-2 和 EGFP 基因高效导入兔 BMSCs，转染后的兔 BMSCs 提供 BMP-2 目的蛋白的来源，还提供了 BMP-2 自身效应的靶细胞。在不影响细胞生长的前提下，成功实现了兔 BMSCs 向成骨细胞的定向分化的目的，将来有望成为骨组织工程中最理想的种子细胞，从而为动物模型骨缺损的治疗奠定基础。至于 Ad-BMP-2 转染兔 BMSCs 植入动物体内后，目的基因能否在局部根据需要持续高效的表达、并诱导成骨、促进骨折愈合等问题尚需进一步研究[15]。

参考文献：

[1] Heino TT. Differentiation of osteoblasts and osteocytes from mesenchymal stem cells[J]. Curr Stem Cell Res Ther,2008,3(2):131-145.

[2] Maegawa N,Kawamura K,Hirose M,et al. Enhancement of osteoblastic differentiation of mesenchymal stromal cells cultured by selective combination of bone morphogenetic protein-2(BMP-2) and fibroblast growth factor-2(FGF-2)[J]. J Tissue Eng Regen Med,2007,1(4):306-313.

[3] Yokoyama M,Miwa H,Maeda S,et al. Influence of fetal calf serum on differentiation of mesenchymal stem cells to chondrocytes during expansion[J]. J Biosci Bioeng,2008,106(1):46-50.

[4] Lecanda F,Avioli LV,Cheng SL. Regulation of bone matrix protein expression and induction of differentiation of human osteoblasts and human bone marrow stromal cells by bone morphogenetic protein-2[J]. J Cell Biochem,1997,67(3):386-396.

[5] 何春耒，姬广林，刘午阳，等. 人骨形态发生蛋白 2 基因重组腺病毒表达载体转染兔骨髓间充质干(下转第 199 页)

fection[J]. Lancet Infect Dis,2002,2(7):395-403.
[2] Sun Z,Ming L,Zhu X,et al. Prevention and control of hepatitis B in China[J]. J Med Virol,2002,67(3):447-450.
[3] Wursthorn K,Wedemeyer H,Manns MP. Managing HBV in patients with impaired immunity[J]. Gut,2010,59(10):1430-1445.
[4] Hu SJ,Xing JL. An experimental model for chronic compression of dorsal root ganglion produced by intervertebral foramen stenosis in the rat[J]. Pain,1998,77(1):15-23.
[5] Durham PL,Cady R,Cady R. Regulation of calcitonin gene-related peptide secretion from trigeminal nerve cells by botulinum toxin type A:implications for migraine therapy[J]. Headache,2004,44(1):35-42.
[6] Blumenfeld A. Botulinum toxin type A as an effective prophylactic treatment in primary headache disorders[J]. Headache,2003,43(8):853-860.
[7] Bang G,Kim KH,Guarnieri M,et al. Effect of mutating the two cysteines required for HBe antigenicity on hepatitis B virus DNA replication and virion secretion[J]. Virology,2005,332(1):216-224.
[8] 龙昭华,朱薏,苏杭,等. 乙型肝炎病毒携带孕妇外周血 T 淋巴细胞亚群水平分析[J]. 国际医药卫生导报,2009,15(13):4-5.
[9] 毛卫林,陈瑜. T 细胞亚群对乙型肝炎发病机制的作用[J]. 国际流行病学传染病学杂志,2007,34(2):128-130.
[10] Milich DR. Influence of T-helper cell subsets and cross-regulation in hepatitis B virus infection[J]. J Viral Hepat,1997,4 Suppl 2:48-59.
[11] 王媛媛,韩涛. 慢性乙型肝炎患者的细胞免疫[J]. 武警医学院学报,2008,17(4):341-343.
[12] Djukanmic R. The role of co-stimulation in airway inflammation[J]. Clin Exp Allerg,2000,30 Suppl 1:46-50.
[13] 蔡洁,刘源,韩亚萍,等. 慢性乙肝患者外周血淋巴细胞表面 CD28 的表达[J]. 放射免疫学杂志,2008,21(5):467-468.
[14] 刘翠雪,陈群伟,赵国根,等. 慢性乙型重型肝炎患者外周血单个核细胞 B7/CD28 分子的表达及意义[J]. 中华肝脏病杂志,2005,13(12):943-944.
[15] 蒋敏,刘冬梅,史进方,等. 强直性脊柱炎患者外周血单个核细胞中共刺激分子的表达及其意义[J]. 广东医学,2011,32(22):2988-2990.
[16] 周树录,李幼姬,叶任高. SLE 患者 Th1/Th2 平衡状态及与外周血淋巴细胞 CD28 及 CTLA-4 分子表达的关系[J]. 中国病理生理杂志,2010,26(8):1610-1615.

(收稿日期:2013-09-05 修回日期:2013-10-03)

(上接第 195 页)

细胞[J]. 中国组织工程研究,2012,16(10):1817-1821.
[6] He CL,Ji GL,Liu WY,et al. Human bone morphogenetic protein-2 recombinant adenovirus expression vector transfection of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Chin J Tissue Eng Res,2012,16(10):1817-1821.
[7] Sandhu HS,Kanim LE,Kabo JM,et al. Effective doses of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in experimental spinal fusion[J]. Spine(Phila Pa 1976),1996,21(18):2115-2122.
[8] Carlo Stella C,Giann MA. Biology and clinical applications of marrow mesenchymal stem cells[J]. Pathol Biol(Paris),2005,53(3):162-164.
[9] Li X,Yu X,Lin Q,et al. Bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into functional cardiac phenotypes by cardiac microenvironment[J]. J Mol Cell Cardiol,2007,42(2):295-303.
[10] Gronthos S,Zannettino AC,Hay SJ,et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow[J]. J Cell Sci,2003,116(Pt 9):1827-1835.
[11] Hosoi TB. Bone and collagen related metabolites. Structure and metabolisms of collagen[J]. Clin Calcium,2006,16(6):971-977.
[12] 李建军,许晓军,杨军,等. 骨形态发生蛋白 2 基因转染对人骨髓间充质干细胞成骨分化的影响[J]. 中国医科大学学报,2006,35(1):69-70.
[13] Li JJ,Xu XJ,Yang J,et al. Effect of bone morphogenetic protein-2 gene transfection on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells[J]. J China Med Univ,2006,35(1):69-71.
[14] McCullough KA,Waits CA,Garimella R,et al. Immunohistochemical localization of bone morphogenetic proteins (BMPs) 2,4,6,and 7 during induced heterotopic bone formation[J]. J Orthop Res,2007,25(4):465-472.
[15] Zhang Y,Song J,Shi B,et al. Combination of scaffold and adenovirus vectors expressing bone morphogenetic protein-7 for alveolar bone regeneration at dental implant defects[J]. Biomaterials,2007,28(31):4635-4642.

(收稿日期:2013-09-08 修回日期:2013-10-05)