

非病毒载体 Lip2000 介导 BMP2 基因转染 BMSCs 促进大鼠骨折愈合

方志辉¹, 周鹰飞²

1. 湖北医药学院附属东风医院创伤外科, 湖北 十堰 442000; 2. 湖北医药学院附属人民医院骨科, 湖北 十堰 442000

摘要: **目的** 探讨非病毒载体 Lipofectamine™ 2000(Lip2000)介导人骨形态发生蛋白 2(BMP2)基因体内转染骨髓间充质干细胞(BMSCs)促进大鼠骨折愈合的效果。**方法** 20 只大鼠建立股骨骨折模型,根据随机抽签原则分为观察组与对照组大鼠各 10 只。观察组大鼠股骨骨折断端间隙局部注射 Lip2000 转染 BMP2;注射 Lip2000 后取大鼠红骨髓,将传代培养后生长旺盛的红骨髓细胞与 BMP2 转染试剂的混合物(聚乙烯亚胺和 BMP2 基因质粒的混合液)在细胞培养液中培养以转染 BMSCs,转染后再植入骨折部位。对照组骨折断端注射相同体积生理盐水。观察骨折愈合情况,回滴定法测定骨密度,Western blot 法检测 BMP2 在骨折间软组织中的相对表达水平。**结果** 大体标本观察发现观察组骨痂生成量多于对照组。X 线显示观察组基因转染处的骨折线较对照组明显模糊。观察组大鼠的骨密度随基因转染的时间增加(转染后 1 周→转染后 8 周)而增加[(0.32±0.09) mg/cm³ vs (0.39±0.11) mg/cm³, P<0.05],但在转染后 1 周[(0.32±0.09) mg/cm³ vs (0.26±0.11) mg/cm³, P<0.01]和转染后 8 周[(0.39±0.11) mg/cm³ vs (0.22±0.21) mg/cm³, P<0.01]观察组的骨密度均高于对照组。Western blot 检测分析显示基因转染 1 周与 8 周后,观察组的 BMP2 相对表达水平均明显高于对照组。**结论** Lip2000 介导 BMP2 基因进入大鼠的 BMSCs 中可诱导其向成骨细胞分化,促进骨折后骨小梁形成和缩短骨折愈合时间。

关键词: 非病毒载体; Lip2000; 人骨形态发生蛋白 2; 大鼠; 骨折愈合; 成骨细胞

中图分类号: R 683 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2017)03-0310-04

Effects of non viral vector Lip2000 mediated-BMP2 transfection of BMSCs on promoting fracture healing in rats

FANG Zhi-hui*, ZHOU Ying-fei

* Department of Trauma surgery, Dongfeng Hospital Affiliated to Hubei Medical College, Shiyan, Hubei 442000, China

Abstract: Objective To investigate the effects of human bone morphogenetic protein 2 (BMP2) transfection of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) mediated by non viral vector Lip2000 on promoting fracture healing of rats.

Methods Establishing rat femoral fracture model, the rats were divided into observation group and control group (n = 10 each) according to the principle of drawing. In observation group, Lip2000 was injected into the local space between femoral fractured ends to transfect BMP2; taking rat bone marrow after injecting Lip2000, the eugonic red bone marrow cells after subculture were cultured with the mixture of BMP2 transfection reagent contenting polyethyleneimine and BMP2 gene plasmid in cell culture medium to transfect BMSCs and transplanted back to the fractured site after transfection. In control group, the normal saline of same volume was injected into the space between femoral fractured ends. Fracture healing status was observed. Back titration method was used to detect bone density. Western blot method was used to detect the relative expression level of BMP2 in the soft tissues between fractured ends. **Results** Gross specimen observation showed that the amount of callus formation in observation group was more than that in control group. X-ray displayed that the fracture line in transfection site in observation group was obvious indistinct than that of control group. Bone density values in observation group increased with the increase of transfection time [(0.32±0.09) mg/cm³ (at 1w) vs (0.39±0.11) mg/cm³ (at 8w), P<0.05] and the bone density values at 1- and 8- week after transfection in observation group were significantly higher than those at 1- and 8- week after modeling in control group [(0.32±0.09) mg/cm³ vs (0.26±0.11) mg/cm³, P<0.01; (0.39±0.11) mg/cm³ vs (0.22±0.21) mg/cm³, P<0.01]. Western blot result showed that the relative ex-

pression levels of BMP2 one week and eight weeks after transfection in observation group were significantly higher than those in control group (all $P < 0.05$). **Conclusion** BMSCs trasfected by Lip2000 mediated-BMP2 can be induced to differentiate into osteoblasts, promote the formation of bone trabecula and shorten the healing time of fracture.

Key words: Non viral vector; Lip2000; Human bone morphogenetic protein 2; Rats; Fracture healing; osteoblast

因为老年群体骨折愈合能力衰退,患者骨折难以愈合、愈合迟缓或者内固定失效的机率明显高于其他年龄段。由于长期卧床或局部制动使各种并发症增多,甚至导致患者死亡^[1-2]。近年来组织工程学及分子生物学快速发展且不断完善,采用组织工程技术治疗骨组织损伤可提高老年骨损伤患者的骨折愈合能力,使骨折损伤更好愈合、缩减修复时间,从根本上治疗老年患者骨折^[3]。组织工程学方法促进骨折修复及其骨折为目前骨科研究的热点及趋势^[4-6]。骨发生形态蛋白(BMP)是 β 超家族成员,属于转化生长因子的一种,它的主要功能为诱导成骨及成软骨,而BMP中的人骨形态发生蛋白2(BMP2)一直以来受到各界的普遍关注与研究^[7-11],它对骨折的愈合治疗意义重大。当前在骨折治疗、关节融合、骨不愈合治疗等临床实践中得到广泛应用^[12]。我们通过动物实验探讨 Lipofectamine™ 2000(Lip2000)将BMP2基因转染至骨髓间充质干细胞(BMSCs)后对大鼠骨折愈合的影响,验证其修复骨折的能力。现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 选用健康大鼠 20 只,28~32 周龄,体质量 320~350 g,标准喂养,雌雄不限,由我院动物饲养中心提供,许可证号:2010-0222。饲养室温度 23℃左右,定时杀菌、消毒,相对湿度为 65%左右。根据随机抽签原则分为观察组与对照组大鼠各 10 只。

1.2 动物模型建立与分组 所有实验大鼠采用 3%戊巴比妥钠耳缘静脉麻醉,制作右侧股骨中段骨折模型^[4]。观察组大鼠股骨骨折断端间隙局部注射 Lip2000,转染 BMP2 与转染试剂的混合物;对照组骨折断端注射相同体积生理盐水。关闭切口,依次缝合。

1.3 非病毒载体 Lip2000 介导 BMP2 基因体内转染 BMSCs 方法 PCR 技术构建带 BMP2 基因的质粒,在质粒基因中启动子与 BMP2 基因间加入荧光基因序列作为标记。在细胞培养中,取大鼠红骨髓,标准环境下培养并传代。倒置显微镜观察细胞的形态和生长情况。将传代后生长旺盛的细胞与聚乙烯亚胺和 BMP2 基因质粒的混合液(不同比例)培养。一定

时间后采用钙钴法测定细胞碱性磷酸酶(ALP)活性,四甲基偶氮唑蓝比色(MTT)法分析细胞存活和增殖能力,找到最佳混合浓度,用最佳浓度 Lip2000 和 BMP2 基因质粒的混合液转染 BMSCs。转染后再植入骨折部位。

1.4 观察指标 (1)X 线分析:骨折第 1 周与第 8 周,每只大鼠行 X 射线检查,X 线评估内容包括骨折的部位、类型、形态及骨折线模糊程度,所有评估均由三位研究人员同时观察、讨论并统一意见后进行判定。(2)骨标本采集与检测:拍摄 X 线片后,各组大鼠予静脉注射过量空气栓塞处死(每组 1 周、8 周各处死 5 只),完整取下股骨,清除各种软组织,用三氯乙酸 0.1 g/ml 脱钙,回滴定法测定骨密度。(3)Western blot 检测:选择获取的股骨标本,取骨折间软组织采用 Western blot 法检测 BMP2 蛋白相对表达水平。

1.5 统计学方法 用 Excel 软件整理原始数据结果,分析时应用软件 SPSS 19.00。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间对比采用成组 t 检验,组内比较采用配对 t 检验;计数资料以百分数表示,采用 χ^2 检验。检验水准取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结 果

2.1 大体标本观察 基因转染后 1 周骨折区被不规则、断续的暗褐色物质填充,对照组骨折间填充物稍低于观察组。基因转染后 8 周对照组缺损部位形成弧形凹槽,观察组两端骨痂间多形成较细的弓形骨桥,断端骨痂亦呈向心性生长,形成下凹槽。

2.2 X 线分析 实验所用所有大鼠均无明显骨骼畸形,未发现除手术部位以外的新发生骨折。基因转染后 1 星期观察组骨折线变得模糊,能够看见骨性连接的图像,8 周后观察组骨折线更为模糊,影像中骨性连接特征明显。对照组生理盐水骨折断端注射后 1 周影像中丝毫没有骨性连接特征,8 周后骨折线仍清晰可见,能够看见很细微的骨性连接特征影像。

2.3 骨密度对比 观察组大鼠的骨密度均随基因转染时间的增加而增加($P < 0.05$),但在各个时间段,观察组的骨密度均高于对照组(P 均 < 0.01)。见表 1。

2.4 BMP2 蛋白表达情况对比 Western blot 检测分

析显示基因转染后 1 周与 8 周,观察组的 BMP2 蛋白相对表达水平均明显高于对照组。见图 1。

表 1 两组不同时期的骨密度值对比 ($\text{mg}/\text{cm}^3, \bar{x} \pm s$)

组别	只数	转染后 1 周 [#]	转染后 8 周 [#]
观察组	5	0.32 ± 0.09	0.39 ± 0.11 *
对照组	5	0.26 ± 0.11	0.22 ± 0.21
P 值		<0.05	<0.05

注:与转染后 1 周比较, * $P < 0.05$; [#]表示对照组为注射后 1 周、注射后 8 周。

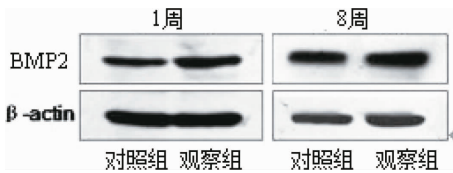


图 1 两组不同时间点的 BMP2 蛋白相对表达水平对比

3 讨论

成骨细胞是组织工程技术中骨的种子细胞,它一般存在于骨髓、骨外组织、骨外膜及骨中,而骨髓中不仅有造血干细胞,同时还包括 BMSCs。造血干细胞有着分化发育各种血细胞的能力,BMSCs 是一群有着基质细胞系的干细胞,主要位于骨髓的支持结构,能够为造血干细胞的生长提供养分^[13]。它的可塑性强,也就是在特定环境与诱导因素下,能够转化成体内三个胚层来源的细胞,尤其是神经外胚层来源和中胚层来源的组织细胞。BMSCs 同时也是造血支持细胞,作为滋养层支持造血干细胞的生长。BMSCs 可在体外进行分享培养,可塑性强,遗传背景单纯,体外培养后植入受损部分不会发生免疫排斥现象,即使是异体植入,其免疫排斥也非常小,因此它是组织工程学中比较理想的种子细胞,同时由其培育成的自体细胞组织工程化成骨作用已进入临床实验阶段。骨折的愈合过程依赖于多种生长因子及细胞因子的参与,而近年来研究最多的为有关 BMP2 的骨相关生物学^[14-17]。相关研究表明 BMP2 不仅能直接调节源自骨外膜分化的细胞的生物学功能,同时能对源自 BMSCs 分化的细胞的生物学功能进行直接调节,BMSCs 过量表达的 BMP 在骨折愈合和脊柱融合过程中能够由旁分泌诱导功能细胞群,如成骨细胞、纤维细胞等发生成骨作用。BMP 有 20 种亚型,目前研究热点为 BMP2,天然 BMP2 提取困难,重组人 BMP2 不能耐受 37 °C 的体内环境、释放半衰期过短,不能持续足够时间;易被代谢流失,不能在局部形成有效浓度。故目前通过病毒转染技术使 BMP 基因在种子细胞内获得表达,并植入骨折部位研究众多。Lip2000 具有高效、低毒、操作简单、价格低廉等优点,已广泛应用于

基因治疗上。本课题组前期实验中使用非病毒载体聚乙烯亚胺介导 BMP2 质粒进入骨髓干细胞中,并取得了成功。现使用转染效率更高的 Lip2000 转染大鼠 BMSCs 是第一次尝试,而使用非病毒载体 Lip2000 转染 BMP2 基因对大鼠骨折的修复能力的影响的研究在国内外尚未见报道。本研究显示 Lip2000 介导的 BMP2 转染 BMSCs 基因对修复大鼠骨折有促进作用,较对照组可明显促进骨折骨小梁形成和缩短骨折愈合时间。

本研究显示观察组大鼠的骨密度随基因转染时间的增加而增加,同时在各个时间段,观察组的骨密度均高于对照组。Western blot 检测分析显示基因转染后 1 周与 8 周,观察组的 BMP2 蛋白相对表达水平均明显高于对照组,说明 Lip2000 能有效转染 BMSCs,并能在自带 BMP2 基因表达的情况下,分化成为成骨细胞。相关研究也表明在分子学水平,老年动物骨折后由于其相应的基因表达下降或表达时序发生改变导致局部 BMP2 的合成较正常大鼠明显减少^[18]。将大鼠 BMSCs 中的 BMP2 清除后,长骨骨干骨折修复停滞,由此软骨内成骨或成骨膜不会被激活。

综上所述,Lip2000 介导 BMP2 基因进入大鼠的 BMSCs 中能诱导其向成骨细胞分化,促进骨折骨小梁形成和缩短骨折愈合时间。

参考文献

- [1] 姜旭,李宁,吴成爱,等. 重组人甲状旁腺素在骨折愈合过程中促进 Osterix 蛋白表达的实验研究[J]. 中华骨科杂志,2016,36(7):437-442.
- [2] 朱新炜,李云恺,韩建龙,等. 人脐带间充质干细胞体外成骨分化对骨折局部 BMP-2 表达的影响[J]. 中国矫形外科杂志,2016,24(4):362-367.
- [3] 沈业彤,张学斌,吴丽红,等. 重组人骨保护素 Fc 融合蛋白对骨质疏松性骨折早期愈合的影响[J]. 中国老年学杂志,2016,36(10):2327-2329.
- [4] Refaat M, Klineberg EO, Fong MC, et al. Binding to COMP reduces the BMP2 dose for spinal fusion in a rat model[J]. Spine,2016,41(14):E829-E836.
- [5] Lee EJ, Kim HE. Accelerated bony defect healing by chitosan/silica hybrid membrane with localized bone morphogenetic protein-2 delivery[J]. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl,2016,59:339-345.
- [6] 杨雷,郭岱琦,柳海峰,等. 阿魏酸对大鼠成骨细胞增殖、碱性磷酸酶活性及骨保护素与骨活素 mRNA 表达的影响[J]. 中国中医药科技,2016,23(4):428-430.
- [7] Xu MT, Sun S, Zhang L, et al. Diabetes mellitus affects the biomechanical function of the callus and the expression of TGF-beta1 and BMP2 in an early stage of fracture healing[J]. Braz J Med Biol Res,

- [6] 汪义胜. 脑脊液 CRP 及 TNF- α 水平检测诊断化脓性脑膜炎的临床意义[J]. 现代医药卫生, 2016, 32(10): 1531 - 1532.
- [7] 肖忠英. 醒脑静对化脓性脑膜炎患者肿瘤坏死因子- α 、神经元特异性烯醇化酶、C 反应蛋白及乳酸脱氢酶的影响[J]. 实用临床医药杂志, 2013, 17(13): 15 - 16, 36.
- [8] Gamaletsou MN, Sipsas NV, Kontoyiannis DP, et al. Successful salvage therapy of refractory HIV-related cryptococcal meningitis with the combination of liposomal amphotericin B, voriconazole, and recombinant interferon- γ [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2012, 74(4): 409 - 411.
- [9] Jarvis JN, Meintjes G, Rebe K, et al. Adjunctive interferon- γ immunotherapy for the treatment of HIV-associated cryptococcal meningitis: a randomized controlled trial[J]. *AIDS*, 2012, 26(9): 1105 - 1113.
- [10] 王焕荣. 脑脊液 CRP、NSE 及 IFN- γ 在中枢神经系统感染中的诊断意义[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(5): 1256 - 1257, 1258.
- [11] 徐宏斌, 盛小娟, 马建党, 等. 不同类型脑膜炎感染患儿脑脊液 C-反应蛋白与乳酸相关指标变化分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(11): 2596 - 2598.
- [12] 陆迪雅, 陈澍, 高有方, 等. 外周血结核感染 T 淋巴细胞斑点试验和脑脊液 γ 干扰素检测诊断结核性脑膜炎的价值[J]. 中华传染病杂志, 2014, 32(6): 338 - 342.
- [13] 母发光, 何海兰, 谭泰昌, 等. γ -干扰素释放试验对儿童结核性脑

膜炎的诊断价值[J]. 临床儿科杂志, 2015, 33(3): 242 - 246.

- [14] 钱福初, 何建方, 沈轶群, 等. γ -干扰素体外释放试验在结核性脑膜炎诊断中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(5): 1037 - 1038.
- [15] 文安, 吴晓牧, 张昆南. 运用腺苷脱氨酶、 γ 干扰素释放试验及临床运算法则诊断结核性脑膜炎的研究进展[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2014, 21(6): 434 - 437.
- [16] 黄锡坤, 欧结艳. 脑脊液 γ -干扰素检测在结核性脑膜炎中的临床价值[J]. 中国感染与化疗杂志, 2014, 14(5): 429 - 431.
- [17] Qin L, Zhang L, Zhang Y, et al. Diagnostic value of T-cell interferon- γ release assays on cerebrospinal fluid for tuberculous meningitis[J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0141814.
- [18] Yu J, Wang ZJ, Chen LH, et al. Diagnostic accuracy of interferon-gamma release assays for tuberculous meningitis: a meta-analysis[J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2016, 20(4): 494 - 499.
- [19] Pettini E, Fiorino F, Cuppone AM, et al. Interferon- γ from brain leukocytes enhances meningitis by type 4 streptococcus pneumoniae[J]. *Front Microbiol*, 2015, 6: 1340.
- [20] Too LK, Ball HJ, McGregor IS, et al. The pro-inflammatory cytokine interferon-gamma is an important driver of neuropathology and behavioural sequelae in experimental pneumococcal meningitis[J]. *Brain Behav Immun*, 2014, 40: 252 - 268.

收稿日期: 2016 - 11 - 23 编辑: 周永彬

(上接第 312 页)

2016, 49(1): e4736.

- [8] Jing D, Hao X, Xu F, et al. Effects of local delivery of BMP2, zoledronate and their combination on bone microarchitecture, biomechanics and bone turnover in osteoporotic rabbits[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 28537.
- [9] Gibbs DM, Black CR, Hulsart-Billstrom G, et al. Bone induction at physiological doses of BMP through localization by clay nanoparticle gels[J]. *Biomaterials*, 2016, 99: 16 - 23.
- [10] 刘光源, 田发明, 张柳, 等. BMP2 信号通路经典 Wnt 信号通路及相互交联对成骨分化的调控[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(5): 551 - 556, 561.
- [11] Ray S, Thormann U, Sommer U, et al. Effects of macroporous, strontium loaded xerogel-scaffolds on new bone formation in critical-size metaphyseal fracture defects in ovariectomized rats[J]. *Injury*, 2016, 47 Suppl 1: S52 - S61.
- [12] 叶握球, 冯奕鑫. 髋关节置换围术期血清 PCT、BMP2 水平与术后髋关节功能恢复的关系[J]. 中国骨科临床与基础研究杂志, 2015, 7(5): 275 - 280.
- [13] Fernandes G, Wang C, Yuan X, et al. Combination of controlled re-

lease platelet-rich plasma alginate beads and bone morphogenetic protein-2 genetically modified mesenchymal stem cells for bone regeneration[J]. *J Periodontol*, 2016, 87(4): 470 - 480.

- [14] 朱小萌, 王翀, 宋兴华, 等. 基因枪介导的骨形态发生蛋白 2 基因转染治疗陈旧性骨缺损[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(11): 1680 - 1686.
- [15] 蒋清, 胡懿邵, 魏利成, 等. 复合 BMP2 同种异体深冻骨联合钢板治疗复杂胫骨平台骨折的研究[J]. 创伤外科杂志, 2010, 12(1): 44 - 46.
- [16] 刘亮, 王东. 大段同种异体骨移植复合 BMP2 和 TGF- β_2 对兔桡骨中段骨缺损愈合的影响[J]. 中国矫形外科杂志, 2007, 15(9): 702 - 705.
- [17] Hankenson KD, Gagne K, Shaughnessy M. Extracellular signaling molecules to promote fracture healing and bone regeneration[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, 94: 3 - 12.
- [18] 黄有荣, 高冠群, 杨丽平, 等. 白脉软膏对家兔桡骨骨折愈合过程及骨痂骨形态发生蛋白 2、碱性成纤维细胞生长因子水平的影响[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2012, 6(13): 112 - 114.

收稿日期: 2016 - 10 - 18 修回日期: 2016 - 11 - 22 编辑: 周永彬