

## · 基础研究 ·

## 慢病毒介导 BMP-2 过表达质粒转染骨髓间充质干细胞联合丝素蛋白支架向成骨细胞转化的实验研究

范少鹏<sup>1,2</sup>, 李晓辉<sup>2</sup>, 时彩霞<sup>3</sup>, 范春霞<sup>2</sup>, 叶发刚<sup>4</sup>

(1. 青岛大学医学部, 山东 青岛 266000; 2. 高密市中医院骨科, 山东 高密 261500; 3. 青岛大学附属医院崂山院区手术室, 山东 青岛 266003; 4. 青岛大学附属医院, 山东 青岛 261500)

**【摘要】** 目的: 探究慢病毒介导 BMP-2 过表达质粒转染骨髓间充质干细胞联合丝素蛋白支架向成骨细胞转化的作用效果。方法: 构建慢病毒 BMP-2 过表达载体, 培养骨髓间充质干细胞, 构建细胞核支架的联合培养体系, 体外实验利用茜素红染色和碱性磷酸酶染色检测骨髓间充质干细胞的成骨转化。选择 10 只新西兰大白兔, 体重 3.2~4.5 kg, 平均 3.9 kg; 年龄 (2.89±0.45) 岁; 使用口腔钻在兔子胫骨钻孔 (长度 5 mm、宽度 2 mm、深度 3 mm 的锥形胫骨缺损) 构建兔子胫骨骨缺损模型, HE 染色观察动物模型内骨缺损的修复。实验组造模后植入丝素蛋白支架+转染 BMP-2 过表达载体骨髓间充质干细胞复合物, 阴性对照组造模后植入丝素蛋白支架+未转染骨髓间充质干细胞复合物。结果: 实验组 (丝素蛋白支架+转染 BMP-2 过表达载体骨髓间充质干细胞复合物) 中支架表面黏附的细胞与对照组 (丝素蛋白支架+未转染骨髓间充质干细胞) 相比, 细胞数明显增多。实验组细胞外基质分泌与对照组相比, 支架间细胞外基质含量明显增多。对照组支架表面元素 EDX 分析显示钙离子含量为 0.22%, 实验组支架表面元素 EDX 分析显示钙离子含量为 0.86%, 可见实验组诱导钙离子形成的能力要比对照组强。钙结节茜素红染色结果显示, 对照组肉眼观无明显变化, 镜下观察可见少量钙结节点。实验组肉眼观可见明显红色区域染色, 镜下观察可见大量钙结节点。碱性磷酸酶染色结果显示, 对照组肉眼观无明显变化, 镜下观察未见明显变化。实验组肉眼观可见紫色区域染色, 镜下观察可见 ALP 染色呈强阳性。丝素蛋白支架与骨髓间充质干细胞联合培养体系可以对软骨缺损有较好的修复作用, 转染 BMP-2 骨髓间充质干细胞后修复作用明显优于未转染组。HE 染色结果显示, 对照组炎性细胞减少, 支架略有消失。实验组炎性细胞明显减少, 支架消失, 血管生成。结论: 慢病毒介导 BMP-2 过表达质粒可以促进 BMSC 向骨细胞的分化作用, 并且分泌更多的含 Ca<sup>2+</sup> 成分的细胞外基质, 从而发挥其促进骨缺损修复的作用。

**【关键词】** 丝素蛋白支架; 骨髓间充质干细胞; 骨形态发生蛋白; 骨缺损

中图分类号: R336

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2019.09.016

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



### Lentivirus-mediated BMP-2 overexpression plasmid transfection into bone marrow mesenchymal stem cells combined with silk fibroin scaffold for osteoblast transformation

FAN Shao-peng, LI Xiao-hui, SHI Cai-xia, FAN Chun-xia, and YE Fa-gang\*. \*The Medical Department of Qingdao University, Qingdao 266000, Shandong, China

**ABSTRACT Objective:** To explore the effect of lentivirus-mediated BMP-2 overexpression plasmid transfection into bone marrow mesenchymal stem cells and silk fibroin scaffold on osteoblast transformation. **Methods:** The lentivirus BMP-2 overexpression vector was constructed, bone marrow mesenchymal stem cells were cultured, and the combined culture system of nuclear scaffolds was constructed. Alizarin red staining and alkaline phosphatase staining were used to detect the osteogenic transformation of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro. Ten New Zealand white rabbits, weighing 3.2 to 4.5 kg (averaging 3.9 kg), aged (2.89±0.45) years old, were selected to construct the rabbit tibial defect model by drilling a conical tibial defect (5 mm in length, 2 mm in width and 3 mm in depth) with an oral drill. The repair of the tibial defect in the animal model was observed by HE staining. The experimental group was implanted with silk fibroin scaffold + BMP-2 overexpression vector bone marrow mesenchymal stem cell complex, while the negative control group was implanted with silk fibroin scaffold+non-transfected bone marrow mesenchymal stem cell complex. **Results:** Compared with the control group (silk fibroin scaffold+non-

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81672197)

Fund program: National Natural Science Foundation of China (No. 81672197)

通讯作者: 叶发刚 E-mail: Yefagangqygk@163.com

Corresponding author: YE Fa-gang E-mail: Yefagangqygk@163.com

transfected bone marrow mesenchymal stem cells), the number of adherent cells on the surface of the scaffold in the experimental group (silk fibroin scaffold+transfected BMP-2 overexpression vector BMP-2 complex) increased significantly. Compared with the control group, the ECM secretion in the experimental group increased significantly. EDX analysis showed that the content of calcium ion was 0.22% in the control group and 0.86% in the experimental group, which showed that the ability of inducing calcium ion formation in the experimental group was stronger than that in the control group. Alizarin red staining of calcium nodules showed that there was no obvious change in the naked eye of the control group, and a small amount of calcium nodules could be seen under the microscope. In the experimental group, obvious red area staining was observed by naked eye, and a large number of calcium nodules were observed by microscopy. The results of alkaline phosphatase staining showed that there was no obvious change in the naked eye of the control group, and no obvious change in the microscopic observation. In the experimental group, purple area staining was observed by naked eyes, and ALP staining was strongly positive by microscopy. The combined culture system of silk fibroin scaffold and bone marrow mesenchymal stem cells can repair cartilage defects. The repair effect of BMP-2 bone marrow mesenchymal stem cells after transfection is obviously better than that of non-transfection group. HE staining showed that inflammatory cells decreased and scaffolds disappeared slightly in the control group. In the experimental group, inflammatory cells were significantly reduced, scaffolds disappeared and angiogenesis was observed. **Conclusion:** Lentivirus-mediated BMP-2 overexpression plasmid can promote BMSC to differentiate into osteocytes and secrete more extracellular matrix containing  $Ca^{2+}$  to promote bone defect repair.

**KEYWORDS** Silk fibroin scaffold; Bone marrow mesenchymal stem cells; Bone morphogenetic protein; Bone defect

骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 具有多向分化潜能, 在特定诱导条件下, 可以分化成人体内的各种细胞<sup>[1]</sup>。比如骨髓间充质干细胞可以分化成骨细胞, 软骨细胞以及神经细胞等<sup>[2-3]</sup>。新近研究表明, BMSCs 可以在特定诱导条件下可以转化成成骨细胞, 进而能促进骨与软骨损伤的修复, 而且 BMSCs 来源于患者自体, 移植后可以避免排斥反应, 这为临床上的骨缺损的修复提供了一个新的思路<sup>[4-5]</sup>。骨形态发生蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 在骨的形成中各个阶段均起到一定的作用<sup>[6-7]</sup>。其中, BMP-2 是骨形态发生蛋白家族中的一员<sup>[8]</sup>。近年来基因重组的骨形态发生蛋白-2 和骨形态发生蛋白-7 的安全性和有效性得到了充分的证实, 美国 FDA 也于 2002 年 7 月批准重组骨形态发生蛋白-2 用于脊柱融合<sup>[9]</sup>。有研究表明, 利用多孔丝素蛋白支架有利于修复骨缺损<sup>[10]</sup>。也有研究表明多孔丝素蛋白支架联合骨髓间充质干细胞也是可以促进骨缺损的修复<sup>[11]</sup>。然而尚未有相关研究利用骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 为种子细胞, 将 BMP-2 基因过表达质粒转染 BMSC, 并结合丝素蛋白支架构建组织工程支架。利用基因工程和组织工程原理, 充分利用两者技术优势, 探究对骨缺损的修复作用, 是本研究的特色。本研究自 2017 年 10 月至 2018 年 4 月利用盐沥滤法制备天然活性多孔丝素蛋白支架, 体外培养兔来源的骨髓间充质干细胞, 构建细胞核支架的联合培养体系, 体外检测骨髓间充质干细胞的成骨转化研究, 构建兔子胫骨骨缺损模型, 探究慢病毒介导 BMP-2 过表达质粒可以促进 BMSC 向骨细胞的分化作用, 并且分泌更多的含  $Ca^{2+}$  成分的外基

质, 从而发挥其促进骨缺损修复的作用。以期为临床上复杂骨缺损的治疗提供思路与方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

胎牛血清购自 Gibco 公司; DMEM 及 0.25% 胰酶 Trypsin 购自美国 Invitrogen 公司; TRIZOL 购自美国 Invitrogen 公司; 氯仿、乙醇 (浓度为 75%) 及逆转录试剂盒购自美国 ABI Applied Biosystems 公司; Real-time PCR 仪购自美国 Bio-rad 公司。实验动物为 10 只新西兰大白兔, 雌雄不限, 体重 3.2~4.5 kg, 平均 3.9 kg; 年龄 (2.89±0.45) 岁; 饲养于 SPF 级动物房, 无遗传病史, 所有动物购买自具有质量合格证书的公司。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 兔来源骨髓间充质干细胞的分离和培养** 将兔子麻醉后, 消毒, 铺巾, 利多卡因 20 ml 局部麻醉, 利用骨穿穿刺针提取兔的新鲜骨髓, 按照 1:3 体积比加入含 0.01 mol/L 的胎牛血清、100 U/ml 青霉素的 DMEM 细胞培养液, 充分混匀后, 移入 25 cm<sup>2</sup> Hank 培养瓶中, 差速培养法培养, 3 d 后去掉培养瓶中的油脂等杂质, 之后每 3 d 换 1 次细胞培养液。BMSCs 细胞融合率达 70%~80% 后进行传代培养。

**1.2.2 骨髓间充质干细胞的鉴定** 采用流式细胞仪检测 BMSCs 的表面蛋白, CD29, CD44, CD71, CD90 和 CD106 等表面蛋白的表达可以为 BMSCs 的鉴定提供依据。另外, 采用倒置光学显微镜也可以观察 BMSCs 的细胞形态。

**1.2.3 慢病毒 BMP-2 过表达载体的构建** 慢病毒 BMP-2 过表达载体是由上海吉凯公司合成, 选择 pHBLV-U6-ZsGreen-PGK-Puro 作为质粒的克隆载

体。慢病毒 BMP-2 过表达载体的克隆切入点是 XhoI/BamHI, 编号为 ENST00000012784。经过基因测序, 从而证明序列的正确性。

**1.2.4 慢病毒细胞转染** 取第 2 代 BMSCs 进行实验, 将细胞接种到 6 孔板, 待融合率为 50% 时进行慢病毒转染, 根据转染说明书, MOI=50, 慢病毒滴度为  $3 \times 10^7$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

**1.2.5 丝素蛋白支架的制备和检测与细胞分组** 利用盐析法将 2 ml 浓度为 10% 的丝素蛋白溶液灌入 24 孔板中, 加入 450~600  $\mu\text{m}$  NaCl 颗粒, 室温风干 3 d, 盐析法成型后将丝素蛋白支架晾干, 修建成 10 mm $\times$ 10 mm 大小圆柱状丝素蛋白多孔支架, 消毒后备用。利用扫描电镜技术检测丝素蛋白支架的结构以及细胞共培养体系的检测。细胞分成 2 组: 实验组造模后植入丝素蛋白支架+转染 BMP-2 过表达载体骨髓间充质干细胞, 阴性对照组造模后植入丝素蛋白支架+未转染骨髓间充质干细胞。

**1.2.6 RT-PCR 检测** 细胞培养 14 d 后, 去掉培养基, 用 PBS 冲洗 3 次, 加入 1 ml 的 Trizol RNA iso (Takara, 日本), 提取总 RNA, 检测总 RNA 的纯度在 1.9~2.0 的范围, 利用逆转录试剂盒进行逆转录 cDNA, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存, 采用 20  $\mu\text{l}$  反应体系进行荧光定量 PCR 检测。采用 FS2000 系统进行分析, 反应条件为: 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s; PCR: 95  $^{\circ}\text{C}$  5 s; 60  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 40 个循环。溶解曲线: 95  $^{\circ}\text{C}$  5 s; 60  $^{\circ}\text{C}$  1 min。降温: 50  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 1 个循环。内参基因 GAPDH, BMP-2 引物由上海生工公司设计(表 1)。采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  的方法计算相对表达量。

表 1 目的基因的引物序列  
Tab.1 Primer sequences for target genes

引物名称	引物序列
BMP-2	正义链 5'-GTGATAAAGGTTTCGGTTGCTG-3'
	反义链 5'-TGTTTTCTGTGGCTCCTCTCTGG-3'
hGAPDH	正义链 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'
	反义链 5'-TGGTGAAGACCCAGTGA-3'

**1.2.7 茜素红染色** 细胞培养 14 d 后, 去培养基, PBS 冲洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 冲洗 3 次, 按茜素红染色试剂盒说明, 将配制好的茜素红染液加入培养孔中, 每孔 1 ml, 孵育 15 min, PBS 冲洗 2 次, 干燥, 封片。倒置光学显微镜下观察。

**1.2.8 碱性磷酸酶染色** 细胞培养 7 d 后, 去培养基, PBS 冲洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 冲洗 3 次, 按茜素红染色试剂盒说明, 将配制好的碱性磷酸酶显色缓冲液加入培养孔中, 每孔 1 ml, 孵育 15 min, PBS 冲洗 2 次, 适量 BCIP/NBT 染色工作液

加入培养孔中, 每孔 1 ml, 孵育 15 min, PBS 冲洗 2 次, 干燥, 封片。倒置光学显微镜下观察。

**1.2.9 构建兔胫骨骨缺损模型** 利用 3 ml/kg 的 15% 水合氯醛静脉内麻醉兔。常规消毒铺无菌单, 取胫骨前面正中侧切口, 长约 2 cm, 逐层切开皮肤, 皮下软组织, 浅深筋膜, 显露胫骨, 使用口腔钻在兔子胫骨钻孔(长度 5 mm、宽度 2 mm、深度 3 mm 的锥形胫骨缺损), 制成胫骨骨缺损模型, 生理盐水冲洗, 加入干预措施后逐层缝合。取 10 只成年健康新西兰大白兔, 随机分 2 组, 每组 5 只: 实验组造模后植入丝素蛋白支架+转染 BMP-2 过表达载体骨髓间充质干细胞复合物, 阴性对照组造模后植入丝素蛋白支架+未转染骨髓间充质干细胞复合物。

**1.2.10 骨缺损部位 HE 染色** 术后 1 周切取骨缺损组织, 4% 多聚甲醛固定 30 min; 脱钙处理 4 周; 过二甲苯 I 处理 15 min, 二甲苯 II 10 min, 二甲苯 III 10 min; 100%、95%、90%、85% 乙醇梯度处理各 5 min; 二甲苯 I 15 min, 二甲苯 II 10 min, 二甲苯 III 10 min, 100%、95%、90%、85% 乙醇各处理各 5 min, 自来水冲洗 5 min, 苏木素-伊红染液染色 5 min; 封片; 倒置光学显微镜观察。

**1.3 统计学处理**

应用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析, 定量资料用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 采用成组设计定量资料 *t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 骨髓间充质干细胞的培养和鉴定**

接种 48 h 后, 原代 BMSCs 开始贴壁, 细胞成梭形或者多角形; 培养至第 2 代后, 呈旋涡状或者辐射状生长, 细胞增殖迅速; 流式细胞仪检测第 2 代 BMSCs 的表面蛋白, CD44 和 CD29 在第 2 代 BMSCs 的表达为 60.2% 和 58.3%; CD34 和 CD45 在第 2 代 BMSCs 的表达为 3.4% 和 2.6%。见图 1。

**2.2 慢病毒转染 BMSC 的转染效率结果**

慢病毒转染骨髓间充质干细胞, 转染效率见图 2, 慢病毒转染效率较高。慢病毒滴度的检测结果: 慢病毒转染滴度为  $3 \times 10^8$  TU/ml。

**2.3 扫描电镜下丝素蛋白支架与骨髓间充质干细胞共培养的细胞外基质结构**

两组扫描电镜下不同视窗的结构, 发现细胞外基质(ECM)充满支架间孔。实验组(丝素蛋白支架+转染 BMP-2 过表达载体骨髓间充质干细胞复合物)中支架表面黏附的细胞与对照组(丝素蛋白支架+未转染骨髓间充质干细胞)相比, 细胞数明显增多。实验组细胞外基质分泌与对照组相比, 支架间细胞外基质含量明显增多。对照组支架表面元素 EDX 分析

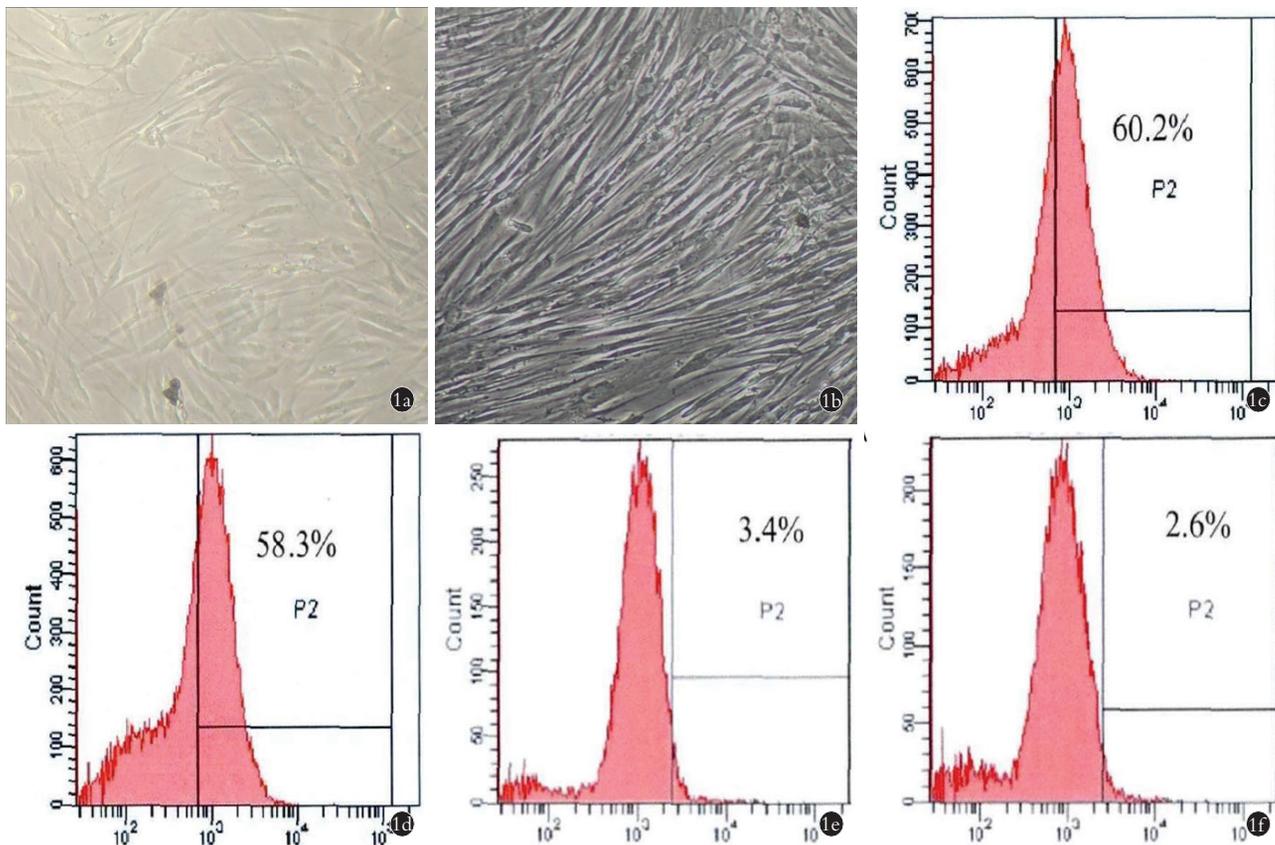


图 1 人骨髓间充质干细胞的培养和鉴定 1a. 原代骨髓间充质干细胞 1b. 第 2 代骨髓间充质干细胞 1c. 第 2 代骨髓间充质干细胞表面蛋白 CD44 的表达 1d. 第 2 代骨髓间充质干细胞表面蛋白 CD29 的表达 1e. 第 2 代骨髓间充质干细胞表面蛋白 CD34 的表达 1f. 第 2 代骨髓间充质干细胞表面蛋白 CD45 的表达

Fig.1 Culture and identification of human bone marrow mesenchymal stem cells 1a. Primary bone marrow mesenchymal stem cells 1b. Second-generation bone marrow mesenchymal stem cells 1c. Expression of CD44 on the surface of second-generation bone marrow mesenchymal stem cells 1d. Expression of CD29 on the surface of second-generation bone marrow mesenchymal stem cells 1e. Expression of CD34 on the surface of second-generation bone marrow mesenchymal stem cells 1f. Expression of CD45 on the surface of second-generation bone marrow mesenchymal stem cells

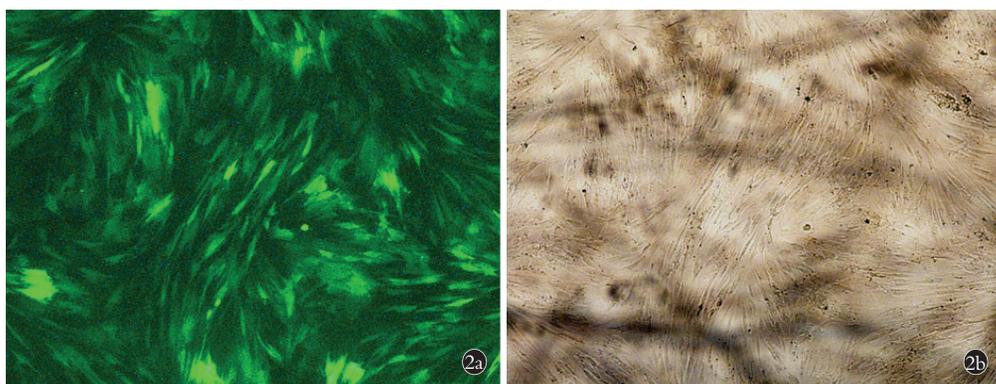


图 2 慢病毒转染骨髓间充质干细胞的转染效率

Fig.2 Transfection efficiency of lentivirus transfected bone marrow mesenchymal stem cells

显示钙离子含量为 0.22%，实验组支架表面元素 EDX 分析显示钙离子含量为 0.86%，可见实验组诱导钙离子形成的能力要比对照组强。见图 3。

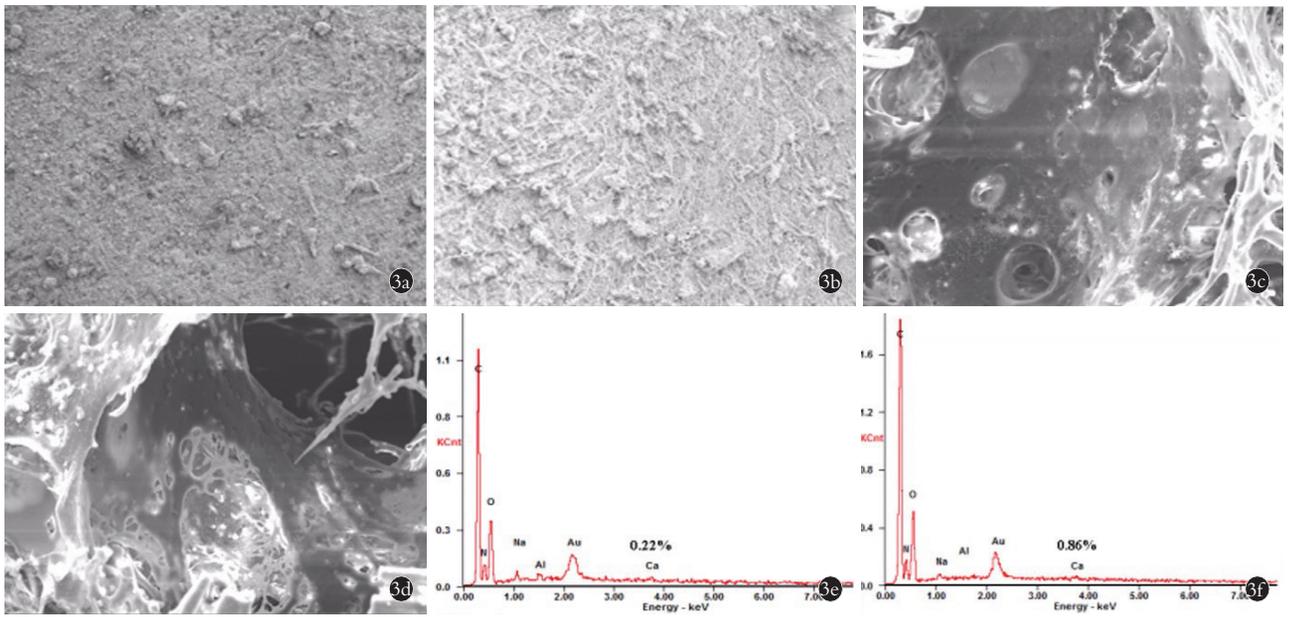
2.4 RT-PCR 检测 BMP-2 基因的表达含量

BMP-2 mRNA 的相对表达量对照组为 1.01±

0.02, 实验组为 5.37±2.89, 两组比较差异有统计学意义 ( $t=2.738; P=0.0174 < 0.05$ )。

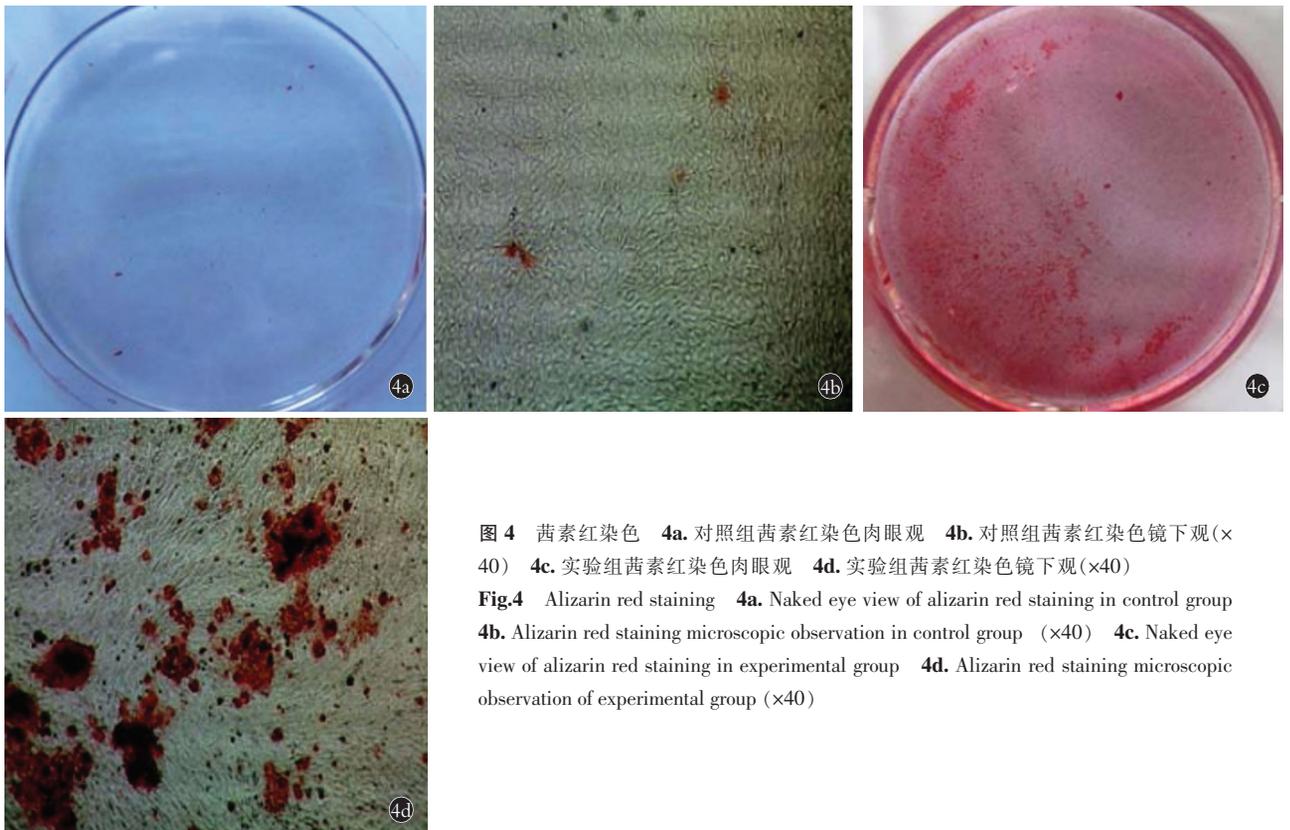
2.5 体外共培养体系骨髓间充质干细胞向骨细胞分化茜素红染色结果

两组细胞钙结节茜素红染色后见图 4, 对照组



**图 3** 丝素蛋白支架与骨髓间充质干细胞联合培养体系的结构 **3a.** 对照组 400 μm 视窗下骨髓间充质干细胞均匀生长在丝素蛋白支架表面 **3b.** 实验组 400 μm 视窗下骨髓间充质干细胞均匀生长在丝素蛋白支架表面, 可见骨髓间充质干细胞数量与对照组相比, 细胞数量较多 **3c.** 对照组 100 μm 视窗下细胞外基质 (ECM) 分泌于支架间 **3d.** 实验组 100 μm 视窗下细胞外基质 (ECM) 分泌于支架间 **3e.** 对照组支架表面元素 EDX 分析 **3f.** 实验组支架表面元素 EDX 分析

**Fig.3** Structure of a co-culture system of silk fibroin scaffold and bone marrow mesenchymal stem cells **3a.** Bone marrow mesenchymal stem cells grew uniformly on the surface of silk fibroin scaffold under 400 μm window in control group **3b.** The bone marrow mesenchymal stem cells grew uniformly on the surface of silk fibroin scaffold under 400 μm window in the experimental group. The number of bone marrow mesenchymal stem cells was more than that of the control group **3c.** The control group secreted extracellular matrix (ECM) between scaffolds under 100 μm window **3d.** Extracellular matrix (ECM) secreted between scaffolds under 100 μm window in experimental group **3e.** EDX analysis of scaffold surface elements in control group **3f.** EDX analysis of surface elements of scaffolds in experimental group



**图 4** 茜素红染色 **4a.** 对照组茜素红染色肉眼观 **4b.** 对照组茜素红染色镜下观 (×40) **4c.** 实验组茜素红染色肉眼观 **4d.** 实验组茜素红染色镜下观 (×40)

**Fig.4** Alizarin red staining **4a.** Naked eye view of alizarin red staining in control group **4b.** Alizarin red staining microscopic observation in control group (×40) **4c.** Naked eye view of alizarin red staining in experimental group **4d.** Alizarin red staining microscopic observation of experimental group (×40)

肉眼观无明显变化,镜下( $\times 40$ )观察可见少量钙结节点;实验组肉眼观可见明显红色区域染色,镜下( $\times 40$ )观察可见大量钙结节点。

### 2.6 体外共培养体系骨髓间充质干细胞向骨细胞分化碱性磷酸酶(ALP)染色结果

两组体外共培养体系骨髓间充质干细胞向骨细胞分化细胞碱性磷酸酶染色后见图 5, 对照组肉眼观无明显变化,镜下( $\times 40$ )观察未见明显变化;实验组肉眼观可见紫色区域染色,镜下( $\times 40$ )观察可见 ALP 染色呈强阳性。



图 5 碱性磷酸酶染色 5a. 对照组碱性磷酸酶染色肉眼观 5b. 对照组碱性磷酸酶染色镜下观( $\times 40$ ) 5c. 实验组碱性磷酸酶染色肉眼观 5d. 实验组碱性磷酸酶染色镜下观( $\times 40$ )

Fig.5 Alkaline phosphatase staining 5a. Control group alkaline phosphatase staining naked eye view 5b. Alkaline phosphatase staining microscopy in control group ( $\times 40$ ) 5c. Naked eye view of alkaline phosphatase staining in experimental group 5d. In the experimental group, alkaline phosphatase staining was observed under microscope ( $\times 40$ )

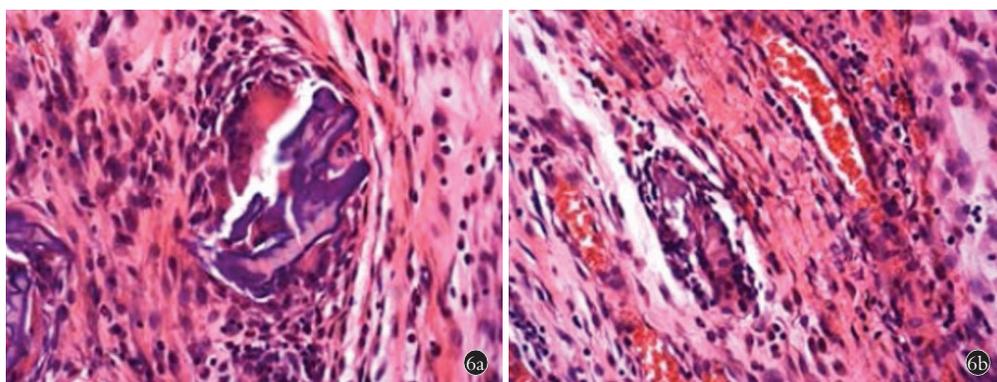
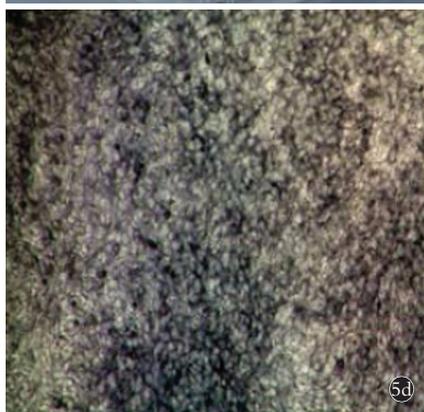


图 6 骨缺损组织 HE 染色( $\times 100$ ) 6a. 对照组 HE 染色显示炎性细胞减少,支架略有消失 6b. 实验组 HE 染色,炎性细胞明显减少,支架消失,血管生成

Fig.6 HE staining of bone defect tissue( $\times 100$ ) 6a. In control group, HE staining showed that the number of inflammatory cells decreased and the stent disappeared slightly 6b. In experiment group, HE staining, inflammatory cells significantly reduced, stent disappearance, angiogenesis

### 2.7 兔骨缺损组织的 HE 染色结果

14 d 后将实验动物处死,取 2 组兔子骨缺损组织行 HE 染色(见图 6),对照组炎性细胞减少,支架略有消失;实验组炎性细胞明显减少,支架消失,血管生成。

## 3 讨论

### 3.1 后基因组工程和组织工程相结合的科研思路

组织工程是以往的研究热门,但是随着基因组学的发展,针对组织支架材料的热情逐渐褪去,主要存在以下问题<sup>[12-13]</sup>:(1)组织工程支架材料构建门槛

低,效果不明显。(2)生物相容性不强,针对于骨科材料而言,相较于临床上普通钢板治疗没有很显著的差别,而且造价较高,不利于向临床转化。(3)细胞相容性不强,细胞的成熟和发育受到组织工程支架的影响较大,容易老化而失去功能。后基因组时代的标志是利用 siRNA 或者 snRNA 基因沉默或者过表达,从而增强或者沉默目的基因的功能,本实验应用基因工程和组织工程原理,充分利用两者技术优势,体外培养兔子来源的骨髓间充质干细胞,构建丝素蛋白支架的联合骨髓间充质干细胞培养体系,探究对骨缺损的修复作用,是本研究的特色。本研究利用盐沥滤法制备天然活性多孔丝素蛋白支架,体外检测骨髓间充质干细胞的成骨转化,构建兔胫骨骨缺损模型,修复骨缺损,以期为临床上复杂骨缺损的治疗提供思路与方法。

### 3.2 以干细胞为种子细胞转染慢病毒过表达质粒结合组织工程支架在骨缺损方面的应用

利用骨髓间充质干细胞复合异种骨基质明胶可以有效修复大鼠桡骨缺损,可见在组织支架的诱导作用下,可以促进骨髓间充质干细胞向骨细胞转化,进而修复骨缺损。但是这种方法需要符合特定条件的组织工程支架,也就是需要特殊的“土壤”,而骨髓间充质干细胞这个“种子”才能更好地在其内生长并且分化,临床应用的安全性有待调查<sup>[14]</sup>。有的学者发现,利用慢病毒构建基因载体,转染骨髓间充质干细胞后,不影响骨髓间充质干细胞的表型<sup>[15]</sup>。可见利用基因工程原理,构建基因过表达的骨髓间充质干细胞也是提高“种子”有效分化的一种手段。本研究正是立足于这一点,构建 BMP-2 基因过表达质粒慢病毒载体的骨髓间充质干细胞,制作新型“基因种子”,为下面骨缺损的研究做准备。

另外,也有研究证明,抗生素/ $\beta$ -磷酸三钙/多孔丝素蛋白支架可以修复兔桡骨骨缺损<sup>[16]</sup>。可以发现,多孔丝素蛋白支架具有良好的生物相容性和抗菌性。本研究采用多孔丝素蛋白支架联合骨髓间充质干细胞共培养体系,利用扫描电镜显微镜观察丝素蛋白支架的表面结构,发现在不同的视镜中,支架表面凹凸不平,可以为骨髓间充质干细胞提供良好的黏附部位。这种发现与新近研究<sup>[17-18]</sup>相似,可以证明研究设计方案的可行性。从本研究的结果来看,不仅骨髓间充质干细胞可以很好黏附在丝素蛋白支架表面,而且可以分泌细胞外基质,填充与支架间孔,为临床上骨缺损提供良好的自体来源的细胞基质,这也是本研究的特色之一。另外,本研究发现,转染 BMP-2 基因过表达载体后,干细胞分泌的细胞外基质要多,而且经 EDX 分析发现,转染 BMP-2 基因

过表达载体后,骨髓间充质干细胞分泌的  $\text{Ca}^{2+}$  成分比较多。另外,本研究体外实验中采用茜素红染色和碱性磷酸酶染色发现,转染 BMP-2 基因过表达载体后,骨髓间充质干细胞向骨细胞分化的效率明显提高。而且,本研究利用兔子胫骨骨缺损模型,将丝素蛋白支架+转染 BMP-2 过表达载体骨髓间充质干细胞复合物(实验组),丝素蛋白支架+未转染骨髓间充质干细胞复合物(对照组)植入骨缺损部位,利用 HE 染色探究对骨缺损的修复作用,发现丝素蛋白支架+转染 BMP-2 过表达载体骨髓间充质干细胞复合物可以更好的发挥修复作用。

### 3.3 本研究的优缺点

本研究是将后基因组工程和组织工程相结合的思路,利用干细胞的生物相容性强的特点与组织工程支架相结合,以期为临床上骨缺损治疗提供新的思路,具有一定的临床应用意义<sup>[19-20]</sup>。然而本研究也存在相关缺点:(1)转染方法的选择问题。因为慢病毒载体是一种灭活的 HIV 病毒,虽然转染效率较高,但是安全性方面还需要进一步改进。(2)丝素蛋白支架的生物强度问题。因为支架材料都是有一定的使用强度和寿命的,如何根据骨缺损的力学条件调整材料的强度和韧度问题需要进行研究,这也是本课题组以后所要研究的方向。

综上所述,丝素蛋白支架+转染 BMP-2 过表达载体骨髓间充质干细胞复合物可以促进 BMSC 向骨细胞的分化作用,并且分泌更多的含  $\text{Ca}^{2+}$  成分的细胞外基质,从而发挥其促进骨缺损修复的作用。

#### 参考文献

- [1] Laudes M. Role of WNT signalling in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes[J]. J Mol Endocrinol, 2011, 46(2): R65-72.
- [2] Li D, Zhang D, Tang B, et al. Exosomes from human umbilical cord mesenchymal stem cells reduce damage from oxidative stress and the epithelial-mesenchymal transition in renal epithelial cells exposed to oxalate and calcium oxalate monohydrate[J]. Stem Cells Int, 2019, 2019: 6935806.
- [3] Wu YJ, Dong Q, Li SF, et al. Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into Leydig or steroidogenic cells in vitro[J]. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2012, 43(4): 493-497, 506.
- [4] Karimaghani N, Tamadon A, Rahmanifar F, et al. Spermatogenesis after transplantation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in busulfan-induced azoospermic hamster[J]. Iran J Basic Med Sci, 2018, 21(7): 660-667.
- [5] Zhang W, Zhang F, Shi H, et al. Comparisons of rabbit bone marrow mesenchymal stem cell isolation and culture methods in vitro[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e88794.
- [6] Drago JL, Choi JY, Lieberman JR, et al. Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat[J]. J Orthop Res, 2003, 21(4): 622-629.

- [7] Huang H, Dou L, Song J, et al. CBFA2T2 is required for BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 496(4): 1095-1101.
- [8] Zhang X, Zhang Z, Shen G, et al. Enhanced osteogenic activity and anti-inflammatory properties of Lenti-BMP-2-loaded TiO<sub>2</sub> nanotube layers fabricated by lyophilization following trehalose addition[J]. *Int J Nanomedicine*, 2016, 11: 429-439.
- [9] Kim J, Kim HD, Park J, et al. Enhanced osteogenic commitment of murine mesenchymal stem cells on graphene oxide substrate[J]. *Biomater Res*, 2018, 22: 1.
- [10] Zhang H, Ma X, Zhang L, et al. The ability to form cartilage of NPMSC and BMSC in SD rats[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(4): 4989-4996.
- [11] Yuan C, Gou X, Deng J, et al. FAK and BMP-9 synergistically trigger osteogenic differentiation and bone formation of adiposederived stem cells through enhancing Wnt- $\beta$ -catenin signaling[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 105: 753-757.
- [12] Asparuhova MB, Caballé-Serrano J, Buser D, et al. Bone-conditioned medium contributes to initiation and progression of osteogenesis by exhibiting synergistic TGF- $\beta$ 1/BMP-2 activity[J]. *Int J Oral Sci*, 2018, 10(2): 20.
- [13] 杨自权, 门亚勋. 等轴牵张应变对骨间充质干细胞成软骨分化早期的影响[J]. *中国骨伤*, 2018, 31(9): 846-852.  
YANG ZQ, MEN YX. Effect of equiaxial tensile strain in early differentiation of mesenchymal stem cells into cartilage cells[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2018, 31(9): 846-852. Chinese with abstract in English.
- [14] Wang S, Hu S, Wang J, et al. Conditioned medium from bone marrow-derived mesenchymal stem cells inhibits vascular calcification through blockade of the BMP2-Smad1/5/8 signaling pathway[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 160.
- [15] 刘欣伟, 柳云恩, 张玉彪, 等. 抗生素/ $\beta$ -磷酸三钙/多孔丝素蛋白支架修复兔桡骨缺损的实验研究[J]. *创伤外科杂志*, 2017, 19(2): 114-117.  
LIU XW, LIU YE, ZHANG YB, et al. Experimental study on repairing rabbit radius bone defect with antibiotic/ $\beta$ -tricalcium phosphate/porous silk fibroin scaffold[J]. *Chuang Shang Wai Ke Za Zhi*, 2017, 19(2): 114-117. Chinese.
- [16] 梁长生, 向川, 魏增永, 等. LMP-1 基因慢病毒重组体对大鼠骨髓间充质干细胞的增殖影响及其表达[J]. *中国骨伤*, 2013, 26(12): 1023-1027.  
LIANG CS, XIANG C, WEI ZY, et al. Effects of recombinant gene lentivirus containing LIM mineralization protein-1 on proliferation effect and expression of bone marrow mesenchymal stem cells in rats[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2013, 26(12): 1023-1027. Chinese with abstract in English.
- [17] 王震, 梁大川, 白洁玉, 等. 慢病毒介导的 Sox9 基因在兔骨髓间充质干细胞的过表达促进软骨损伤修复[J]. *中国骨伤*, 2015, 28(5): 433-440.  
WANG Z, LIANG DC, BAI JY, et al. Overexpression of Sox9 gene by the lentiviral vector in rabbit bone marrow mesenchymal stem cells for promoting the repair of cartilage defect[J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2015, 28(5): 433-440. Chinese with abstract in English.
- [18] 孟飞, 吕成昱, 张海宇, 等. 转化生长因子- $\beta$ 3 与基质金属蛋白酶抑制剂-2 联合转染兔骨髓间充质干细胞复合丝素蛋白/壳聚糖生物支架修复兔软骨缺损[J]. *中华实验外科杂志*, 2015, 32(7): 1522-1526.  
MENG F, LYU CY, ZHANG HN, et al. Transforming growth factor-beta 3 and matrix metalloproteinase inhibitor-2 combined transfection of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells with silk fibroin/chitosan scaffold for repairing rabbit cartilage defects[J]. *Zhonghua Shi Yan Wai Ke Za Zhi*, 2015, 32(7): 1522-1526. Chinese.
- [19] Kang N, Liu X, Guan Y, et al. Effects of co-culturing BMSCs and auricular chondrocytes on the elastic modulus and hypertrophy of tissue engineered cartilage[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(18): 4535-4544.
- [20] Liu PC, Liu K, Liu JF, et al. Transfection of the IHH gene into rabbit BMSCs in a simulated microgravity environment promotes chondrogenic differentiation and inhibits cartilage aging[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(39): 62873-62885.  
(收稿日期: 2018-11-20 本文编辑: 王玉蔓)