文章编号:1000-5404(2008)14-1327-03

论著

Nell-1基因转染骨髓基质干细胞复合可吸收纤维蛋白胶修复犬下颌骨缺损

张 宇[1],陈 明[2],高 杰[1] ([1]南方医科大学南方医院口腔科,广州 510515;[2]解放军总医院第二附属医院口腔科,北京 100091)

摘 要:目的 探讨利用Nell-1基因转染骨髓基质干细胞(bone marrow stromal cell, BMSC)复合可吸收纤维蛋白胶(fibrin glue, FG)构建组织工程化骨组织并修复犬下颌骨缺损的可行性。**方法** 制备含Nell-1真核细胞表达载体的逆转录病毒液PT-PLNCX2- Nell-1并转染BMSC,使用免疫组织化学的方法检测Nell-1在BMSC中的表达。犬下颌骨缺损修复实验分为4组:转染组、未转染组、单纯FG组和对照组,每组4个样本。分别于术后8、16周采用大体观察、X线、组织学检测等方法对骨缺损修复情况进行对比。**结果** 免疫组织化学检测显示经Nell-1病毒液转染的BMSC中有较强的阳性结果出现。定量检测分析结果证实经转染的BMSC修复骨缺损的成骨速度和成骨量均优于未转染组,单纯FG组和对照组中均未见骨缺损得到修复。**结论** Nell-1基因转染能够提高BMSC形成组织工程化骨组织和修复骨缺损的能力,可用于以BMSC为种子细胞的组织工程化骨组织的构建。

关键词: Nell-1;骨缺损;基因转染
中图法分类号: R318.08;R329.21;R782.23 **文献标识码:** A

Nell-1 transferred BMSC combined with absorbable fibrin glue repairs mandible defect in dogs

ZHANG Yu[1], CHEN Ming[2], GAO Jie[1] ([1]Department of Stomatology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, [2]Department of Stomatology, The Second Hospital Affiliated to General Hospital of PLA, Beijing 100091, China)

Abstract: Objective To explore the effect of bone marrow stromal cells (BMSC) transferred by Nell-1 gene combined with biomaterial fibrin glue (FG) to enhance segmental bone defect healing in dog mandible. **Methods** Nell-1 gene vector was reconstructed in retroviral vector and then transfected BMSC. The protein of Nell-1 gene in transferred cells was determined by immunohistochemistry. Segmental defects were created surgically in the dog's mandible. The defect was repaired with BMSC transfected by Nell-1 retroviral granules in presence of FG, untransfected BMSC in combination with FG, and FG alone. The control group was left untreated. The defect-repairing capability for each treatment were assessed by gross observation, radiography, and histology at 8^{th} week and 16^{th} week. **Results** Cells transfected by Nell-1 retroviral granules expressed abundant Nell-1 mRNA and protein in the cytoplasm. Positive results were not found in those cells that were not transferred. The use of BMSC transferred by Nell-1 retroviral granules combined with FG materials exhibited the strongest defect-repairing ability. Gross observation, radiographical and histomorphometric analyses revealed a significantly greater total area of bone formation, increased amount of the new bone in the defects than in those treated with the untransfected BMSC. **Conclusion** Nell-1 gene transfection may be used to promote the osteogenic ability of BMSC.

Key words: Nell-1; bone defect; gene transfer

组织工程化骨组织的构建需要大量成骨表型稳定的种子细胞,但在体外培养的过程中,随着传代次数的增加,细胞的成骨能力逐渐下降,并且成骨细胞植入体内后由于局部缺乏生长因子的作用,成骨效率和修复效果并不令人满意。Nell-1是一种具有较强成骨活性的生长因子,其成骨能力已得到证实[1]。在前期研究中,含有Nell-1基因的逆转录病毒液直接复合生物材料可修复犬下颌骨缺损[2]。Nell-1基因转染的种子细胞,是否能有效促进组织工程化骨组织的新生,提高骨缺损的修复效果,本实验对此进行研究。

基金项目: 全军医学科研"十一五"计划面上项目(06MA1134)
Supported by the General Program of "Eleventh Five-Year Plan" for Medical Science Development of PLA(06MA1134)
作者简介: 张 宇,男,陕西省西安市人,博士,主治医师,主要从事骨组织工程方面的研究。电话:(020)62787941,E-mail: zyf@fimmu.com
收稿日期: 2008-03-31;**修回日期:** 2008-05-14

1 材料与方法

1.1 材料

比格犬:广东省医药工业研究所提供;逆转录病毒基因载体转移系统试剂盒:包括 $PLNCX_2$ 逆转录病毒载体、PT67 包装细胞等,均购自美国 Clontech;限制性内切酶 *Sal* Ⅰ、*Sma* Ⅰ购自美国 New England Biolab。

1.2 方法

1.2.1 Nell-1 基因转染犬骨髓基质干细胞 构建 Nell-1 逆转录病毒载体,转染包装细胞 PT67,经 G418 筛选后,制备含 Nell-1 目的基因的重组逆转录病毒液 PT-PLNCX2-Nell-1。计算病毒滴度为 $4.8\times10^5\sim3\times10^7$ CFU/ml。

取 1~1.2 岁龄健康比格犬,将骨髓与 DMEM 培养基混悬液低速离心($800\times g$,5 min),去除上清液,培养基重悬后过 90 目滤网,经 4 号针头反复抽吸,制成单细胞悬液,常规原代培养,选用 2~4 代细胞进行下一步实验。

转染前 12~18 h 以 $(1\sim2)\times10^5$/孔密度将传至第 2 代的 BMSC 接种于 6 孔板中。将细胞分为 3 组,分别为 PT-PLNCX2-Nell-1 转染组、PT-PLNCX2 转染组以及未转染病毒组。培养 24 h 后更换培养基,继续培养 48 h 后行短暂表达检测。同时使用 G418 筛选细胞至第 4 周,进行稳定表达检测。采用 SABC 法进行免疫组织化学检测 Nell-1 蛋白表达。

1.2.2 BMSC 与生物材料复合 选用可注射型纤维蛋白胶(fibrin glue,FG)为支架材料。

以纤维蛋白原溶解液磷酸二氢钾及抑肽酶溶液共约 1.5 ml 注入冻干纤维蛋白原小瓶内,使其完全溶解即为纤维蛋白原溶液。配制含氯化钙 40 mol/L、凝血酶 400 IU/ml 的混合溶液为催化剂溶液。

将经条件培养基诱导培养至第 4 代并经 PT-PLNCX2-Nell-1 转染或未转染的 BMSC 以 0.25% 胰酶消化细胞,调整细胞接种密度约为 5×10^6 ml^{-1}。上述纤维蛋白原溶液中加入 0.5 ml 种子细胞悬液,轻震荡使混合均匀,即构成溶液 a。溶液 b 为催化剂溶液。将溶液 a 与 b 分开抽入双联注射器中,控制 a 与 b 的比例为 1∶1。注入体内后约 20 s 形成黏稠果冻状凝胶。

1.2.3 实验分组 按照骨缺损修复所用材料的不同,分为 4 个组,A 组:PLNCX2-Nell-1 转染 BMSC + FG 修复组;B 组:未转染 BMSC + FG 修复组;C 组:单纯 FG 生物材料修复组;D 组:空白对照组,未加任何填充材料。

1.2.4 犬下颌骨缺损修复 Beagle 犬复合麻醉后取仰卧位,双侧下颌骨消毒后沿颌骨走向行纵行切开,于双侧下颌骨下缘中份骨皮质上造成两个长 20 mm,宽 15 mm,深 5 mm 的箱状缺损,术中应避免伤及下颌神经血管束,按分组情况将不同的细胞与生物材料复合物填充于缺损区,逐层缝合周围软组织,术后肌注青霉素 80 万单位,1 次/d,4 d,预防感染,分笼常规饲养。术后 10 d 拆线,观察动物一般状况、伤口愈合等情况。

1.2.5 检测方法 大体形态观察:术后 8、16 周取骨缺损修复标本进行大体观察,观察骨缺损部位骨组织再生情况、修复程度以及有无炎症反应。

X 线观察:分别于 8、16 周 进行全口曲面断层片检测,观察各组骨缺损区骨痂生长和骨连接情况。对骨缺损区新骨形成区和缺损近侧 1.0 cm 处下颌骨的 X 线透光度(单位面积平均灰度值)进行测定,以两者比值表示缺损区新骨平均透光度。比较各组骨缺损区骨痂生长和骨连接情况。

组织学切片观察:标本常规固定,脱钙,石蜡包埋、切片,HE 染色,显微镜下观察。A、B 组每个时间点随机取标本中心切面完整的 4 张 HE 染色切片,在显微镜下取 40 倍视野,将图像采集入计算机图像分析系统中,采用光标勾勒出新生骨组织轮廓,采用 Mapinfo 专用软件测量新骨形成面积,每张切片观测 5 个视野,按总的新骨形成面积与视野总面积比值来比较两者是否存在差异。

1.3 统计学处理

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 Nell-1 基因转染犬骨髓基质干细胞

经 PT-PLNCX2-Nell-1 转染的 BMSC 中可见有棕黄色的颗粒出现,分布于细胞质中,深浅不一。未转染的 BMSC 未见有棕黄色的颗粒出现。

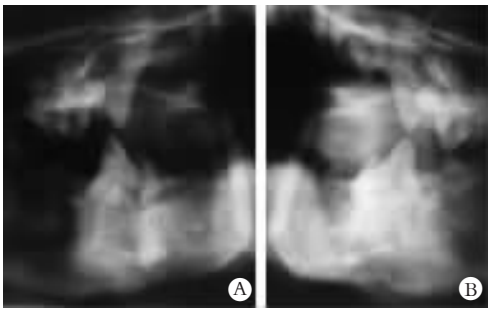
2.2 大体观察

术后 8 周在 A 组和 B 组骨缺损两断端和中心区域中见到有骨样结缔组织形成,未见明显的骨组织桥接于骨缺损区域。而 C 组和 D 组中仅见到纤维结缔组织填充于骨缺损区域,未见明显骨组织形成。

术后 16 周时在 A 组和 B 组中均可见到有骨组织桥接于骨缺损处,A 组形成的骨桥周径与正常颌骨中段类似,而 B 组虽也见到骨缺损得到初步修复,但形成的骨桥较薄,体积明显小于 A 组。C 组和 D 组在骨缺损两断端见有少量骨组织形成,缺损区大部分仍为纤维结缔组织填充,骨缺损未修复。

2.3 X 线观察

2.3.1 X 线表现 8 周时 A 组与 B 组在骨缺损两端和缺损中心区域均可见到密度增高影,显示有新生骨组织形成。16 周时新生骨量明显增多,在整个骨缺损区域见连续性新生骨组织桥接(图 1)。C 组和 D 组在 16 周时仅在骨缺损断端有少量骨组织形成,未见骨桥形成,骨缺损未被修复。



A:转染 BMSC + FG; B:未转染 BMSC + FG

图 1 BMSC + FG 修复犬下颌骨缺损 16 周 X 线观察

2.3.2 X 线图像分析 结果显示,在术后 8、16 周时 A 组形成的新生骨组织[透光度:8 周(59.74 ± 6.23)%、16 周(86.38 ± 9.07)%]明显优于 B 组[透光度:8 周(42.21 ± 4.75)%、16 周(62.74 ± 5.46)%]。A 组与 B 组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.4 组织学观察

2.4.1 组织学表现 A 组术后 8 周时可见到大量软骨细胞团块出现,并有少量不规则类骨样组织形成,在骨样组织周边

可见较多成骨细胞。16 周时新骨形成增多,骨小梁结构出现,并可见大量成熟编织骨形成(图 2)。B 组新生骨组织过程与 A 组类似(图 3)。C 组和 D 组至术后 16 周时缺损区大部分为纤维结缔组织填充,未见成熟骨组织填充于骨缺损区。

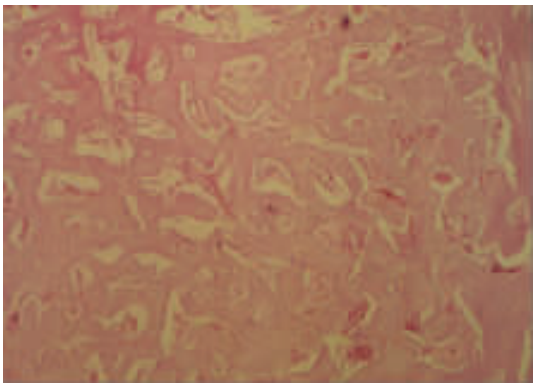


图 2　经转染 BMSC + FG 修复骨缺损 16 周组织学观察　(HE ×40)



图 3　未转染 BMSC + FG 修复骨缺损 16 周组织学观察　(HE ×40)

2.4.2　成骨情况组织学定量分析　　可见在 8、16 周时 A 组新生骨组织面积[8 周(40.11 ± 1.58)%、16 周(62.07 ± 3.94)%]与 B 组[8 周(25.27 ± 2.29)%、16 周(44.85 ± 1.97)%]比较差异有统计学意义($P < 0.01$),提示 A 组成骨能力明显高于 B 组。

3　讨论

3.1　BMSC 形成组织工程化骨组织修复骨缺损机制

术后不同时期 X 线观察和组织学切片分析表明,无论是经转染的 BMSC,还是未经转染的 BMSC,与 FG 生物材料复合后在骨缺损部位均能形成大量成熟的骨组织,其过程是在软骨细胞和软骨样组织形成同时,由成骨细胞形成的类骨样组织也出现。然后在软骨细胞聚集的区域同样出现类骨样组织,最终两者均能形成成熟的编织样骨组织。其中的机制可能在于植入体内的 BMSC 一部分已转化为成骨细胞,并分泌、合成特异性细胞外基质,最终形成骨组织;而另一部分 BMSC 则在局部环境下先分化为软骨细胞形成软骨组织,周围环境及新生血管带入的钙磷成分沉积于软骨基质形成骨组织。经转染的 BMSC 能合成、分泌外源性 Nell-1,诱导周围软组织中的间充质干细胞向软骨细胞、成骨细胞分化并最终形成骨组织可能也是原因之一。

FG 是将纤维蛋白原与氯化钙、凝血酶混合后形成的一种凝胶状物,FG 能增加 BMSC 的黏附率,是一种较好的骨修复材料载体[3]。

3.2　转染 BMSC 与未转染 BMSC 成骨能力评价

Nell-1 是在颅缝早闭患者过早闭合的骨缝连接处发现的一种分泌蛋白[4], Nell-1 诱导成骨细胞分化和骨形成的能力要优于 BMP[5]。Nell-1 的成骨活性已在动物试验中得到证实,Nell-1 复合生物材料可促进大鼠颅骨缺损的修复[6]。

本实验中 8 周时大体观察可见经转染的 BMSC 形成的骨组织要多于未经转染组,在 16 周时虽然两者形成的组织工程化骨组织均能桥接骨缺损,但经转染 BMSC 组形成的骨桥从直径和体积上都明显大于未经转染 BMSC 修复组。X 线分析在术后不同时间点经转染 BMSC 形成的骨组织面积和平均透光度均高于未转染组,两者有显著性差异。组织学切片分析也证实了这一点。由于两者的主要差别只是细胞预处理的不同,因此可以表明经转染的 BMSC 在体内表现出更强的形成骨组织和修复骨缺损的能力是由于将外源 Nell-1 基因转入的缘故。免疫组织化学证实经转染的 BMSC 可合成分泌外源性 Nell-1 蛋白,由于 Nell-1 本身具有很强的骨诱导作用,因此在 BMSC 作为骨组织工程种子细胞参与成骨的同时,其合成分泌的 Nell-1 进一步促进了骨组织的新生,并提高了骨缺损修复效果。

3.3　经转染 BMSC 体内植入的安全性问题

经基因转染细胞体内应用的安全性是其应用于临床前所必须解决的问题,尚需一系列长期、复杂的实验来证实,从现有体内植入的结果看,将转染 BMSC 植入体内 16 周后动物成活良好,组织学观察未见肿瘤样组织和明显的过量成骨现象,初步表明采用此种方法进行组织工程骨组织的构建是可行的,其远期成骨效果比较和致瘤性分析仍需进一步研究。

参考文献:

[1] Cowan C M, Cheng S, Ting K, *et al*. Nell-1 induced bone formation within the distracted intermaxillary suture [J]. Bone, 2006, 38(1): 48 – 58.

[2] 陈　明,张　宇,倪龙兴. nell-1 基因直接体内转染修复犬下颌骨的缺损 [J]. 第四军医大学学报,2007,28(13): 1211 – 1213.

[3] 崔　赓, 胡蕴玉, 雷　伟,等. 可注射型骨修复材料对兔 MSC 增殖及分化的影响[J]. 中国矫形外科杂志, 2003, 11(1): 45 – 49.

[4] Ting K, Vastardis H, Mulliken J B, *et al*. Human NELL-1 expressed in unilateral coronal synostosis [J]. J Bone Miner Res, 1999, 14(1): 80 – 89.

[5] Zhang X, Kuroda S, Carpenter D, *et al*. Craniosynostosis in transgenic mice overexpressing Nell-1 [J]. J Clin Invest, 2002, 110(6): 861 – 870.

[6] Aghaloo T, Cowan C M, Chou Y F, *et al*. Nell-1-induced bone regeneration in calvarial defects [J]. Am J Pathol, 2006, 169(3): 903 – 915.

(编辑　王小寒)