论著

文章编号:1000-5404(2011)17-1794-04

BMP-9基因修饰的骨髓基质细胞促进山羊骨缺损愈合

林春阳[1,2],罗进勇[2],汪 洋[1],马金梁[1],邓忠良[1] (400016 重庆,重庆医科大学:附属第二医院骨科[1],分子医学实验室[2])

[摘要] **目的** 观察BMP-9基因修饰的骨髓基质细胞(marrow stromal cells, MSCs)治疗山羊骨缺损的效果。**方法** 12只12~18月龄中国青山羊,股骨中段建立临界骨缺损模型,按照配对比较法随机分为2组,缺损区域明胶海绵填充,实验组加入预先准备好的BMP-9腺病毒感染的MSCs悬液,对照组加入GFP腺病毒感染的MSCs悬液,术后1 d、2、4、8、12、20周行X线片检查,20周时进行CT检查,处死动物,行大体标本、组织学染色和生物力学的检测。**结果** X线片显示实验组较对照组骨痂形成更早更多,大体标本、组织学染色显示实验组的新生骨更加成熟,CT显示实验组新生骨塑形更好,生物力学检测显示实验组新生骨痂的力学强度更强。**结论** BMP-9基因修饰的MSCs可以有效地促进山羊股骨骨缺损的愈合。

[关键词] 骨形态生成蛋白-9;骨髓基质细胞;骨缺损;山羊
[中图法分类号] R681.05; R394.2; R457.7 [文献标志码] A

BMP-9-transfected marrow stromal cells promote healing of goat femur defect

Lin Chunyang[1,2], Luo Jinyong[2], Wang Yang[1], Ma Jinliang[1], Deng Zhongliang[1] ([1]Department of Orthopaedics, Second Affiliated Hospital, [2]Molecular Medicine Laboratory, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of (bone morphogenetic protein-9, BMP-9)-transfected marrow stromal cells (MSCs) on healing of goat femur defect. **Methods** Twelve goats (12 – 18 months) were equally randomized into a control group and an experimental group. In both groups, a critical-sized bone defect model was built by resecting the femur middle segments of the goats, and the defect regions were filled with gelatin sponge. MSCs were treated by adenovirus-mediated BMP-9 transfection and then cell suspension was added to the gelatin sponge in the experimental group, while green fluorescence protein (GFP)-transfected MSC suspension was added to the gelatin sponge in the control group. X-ray examination was conducted 1 d and 2, 4, 8, 12, and 20 weeks after operation. Gross examination, CT examination, histological staining, and biomechanical testing were performed 20 weeks after operation. **Results** X-ray examination showed that the experimental group generated bone callus earlier and more than the control group. Gross examination and histological staining showed that the new bone of the experimental group was maturer than that of the control group. CT examination and biomechanical testing proved that the new bone of the experimental group had better remodeling and higher mechanical strength than that of the control group. **Conclusion** BMP-9-transfected MSCs can effectively promote the healing of goat femur defect.

[**Key words**] bone morphogenetic protein-9; marrow stromal cells; bone defect; goat

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China(863 Program,2007AA02Z4B5). Corresponding author: Deng Zhong liang,E-mail: deng7586@gmail.com

骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)属于转化生长因子-β(Transforming growth factor β,TGF-β)超家族的成员之一,目前已分离鉴定的有20余种。BMP主要的生物学作用是诱导成骨潜能细胞形成骨组织,近几年研究发现BMP具有促进软骨细胞分化成骨,血管发生,脂肪细胞分化等多种生物学功能[1-2],而且与多种肿瘤的发生转移相关[3-5]。目前发现的具有诱导成骨分化的BMP主要有BMP-2、BMP-4、BMP-6、BMP-7和BMP-9,其中rhBMP-2和rhBMP-7蛋白已经在国外临床上用于骨折不愈合、骨缺损的治疗,而且取得了一定的治疗效果[6-7],但是由于其价格极其昂贵以及成骨能力不足导致的手术失败率

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863计划,2007AA02Z4B5)
[通信作者] 邓忠良,E-mail: deng7586@gmail.com

等原因,rhBMP-2和rhBMP-7蛋白并不能完全满足临床的需要,寻找具有更强成骨能力的活性因子十分迫切。本课题组前期采用C2C12、C3H10细胞体外实验以及裸鼠皮下注射的体内实验方法对各种BMP进行研究,结果提示BMP-9具有诱导成骨能力,而且成骨能力远强于传统应用的BMP-2和BMP-7[8],但是BMP-9在更接近人类的大动物体内,特别是在大动物负重骨骨缺损的成骨能力的研究国内和国外尚少有报道。故我们设计了此实验,在山羊股骨中段建立临界骨缺损模型[9],利用BMP-9腺病毒感染的MSCs来检查BMP-9在大动物负重骨骨缺损模型中的成骨能力。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 12只雌性中国青山羊,12~18月龄,体质量30~35 kg,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要仪器和药品 AdBMP-9,AdGFP,明胶海绵由美国芝加哥大学分子肿瘤实验室Tc-HE惠赠。X线摄片机(BFG-400X线机,南京医疗设备制造厂);CT(美国GE公司16层螺旋CT),电动牙科锯(Saeshin-204),手摇钻(Hitachi DN 100SA),速眠新(吉林省华牧动物保健品有限公司),青霉素钠(华北制药厂)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 12只山羊按照配对比较法随机分组:将体质量相近的山羊进行配对,总共分为6对,再将每对随机分入对照组和实验组各1只。

1.2.2 MSCs培养和模型制备

1.2.2.1 体骨髓基质细胞的培养 全骨髓法培养MSCs,具体步骤:从山羊髂骨抽取抗凝的骨髓8~10 ml,离心去除上层油脂和红细胞,下层液体吸出分在2个细胞培养瓶中培养(75 ml),加入培养基(hyclone F-12培养基+15% hyclone FBS)10 ml培养,48 h第1次换液。5 d时MSCs密度为30%~40%,此时进行第2次换液,运用差速贴壁法去除成纤维细胞。7~8 d时细胞密度达到85%~90%,此时以1∶2传代。12~14 d时可获得4个培养瓶的MSCs,细胞密度85%左右,获得的MSCs总数约为10^7个。术前16~18 h,分别用AdGFP和Ad-BMP-9以MOI=100(即每个细胞用100个腺病毒感染)感染MSCs,术前30 min观察绿色荧光的表达情况,荧光表达率在40%~50%。0.25%胰蛋白酶消化离心收集细胞,每只山羊细胞收集为1 ml。

1.2.2.2 山羊骨缺损模型的制备 山羊适应性喂养2周,术前禁食24 h,禁水8 h。速眠新0.35~0.45 ml/kg肌注麻醉,2%利多卡因肌肉浸润麻醉,阿托品0.5 ml肌注减少腺体分泌。山羊侧卧位固定,常规消毒铺巾,外侧切口沿股骨走行约12 cm,钝性分离切开肌袖暴露股骨。开口器在转子间窝处穿破骨皮质,扩髓钻扩大通路,置入髓内针,固定好位置在瞄准定位器上置入套管以固定钻孔通道,3.5 mm钻头钻好4个孔,上紧螺钉,取出定位器。在股骨中段2个螺钉中间量取2.3 cm骨段,线锯切除中间的骨段,剪取明胶海绵填充骨缺损部位,将准备好的细胞悬液均匀打入明胶海绵中,分层缝合各层。术后1周青霉素240万单位肌注。

1.2.3 标本的取材和处理 各组到期后,过量麻醉的方法处死山羊,完整地取出术侧的股骨以及6个正常股骨,立即进行生物力学的检测。检测完毕后标本放入福尔马林中固定24 h,蒸馏水冲洗2遍后转入70%乙醇固定2 h,然后放入20% EDTA中脱钙(4 ℃),脱钙完全后,蒸馏水彻底冲洗,然后置标本于乙醇中逐级脱水,二甲苯透明,渗透液浸透、石蜡包埋、切片机纵行连续6 μm厚切片,将切片粘贴于10%多聚赖氨酸包被的载玻片上,60 ℃烤箱中烘烤12~24 h。

1.2.4 检查的项目和方法

1.2.4.1 影像学X线检查 实验组和对照组分别于术后1 d、2、4、8、12、20周进行摄片检查,均采用侧卧位。所有X线片均由同一技师采用1台X线摄片机完成,拍摄条件球管距离片盒90 cm、45 kV、50 mA、0.4"。

1.2.4.2 影像学CT检查 实验组和对照组在术后20周时进行CT检查,所有CT由同一技师采用1台CT机完成,拍摄条件保持一致,即25 cm、120 kV、300 Ma、2.5",并对股骨进行三维重建。

1.2.4.3 大体标本检查 完整取出标本,剔除肌肉筋膜等软组织,并剥除骨膜,照取大体图片。

1.2.4.4 组织学染色 处理好的切片分别行HE、Masson染色,所有的组织学染色由重庆医科大学免疫组化实验室完成。

1.2.4.5 生物力学检测 取出的新鲜山羊股骨标本将软组织和骨膜剥除干净,分为3组:1组是正常股骨,1组是实验组股骨,1组为对照组股骨。每组各5个标本,在Instron-1011试验机上进行三点弯曲试验。试验跨距为120 mm,加载速度10 mm/min,加载装置从上向下移动,加载装置在标本骨缺损新生骨部位施加载荷,计算机同步绘出负荷-位移曲线。主要观察指标:从负荷-位移曲线上获得标本的最大负荷。

1.3 统计学分析

数据采用SPSS 10.0统计分析软件处理,比较采用两样本均数的t检验分析,设定$\alpha=0.05$。

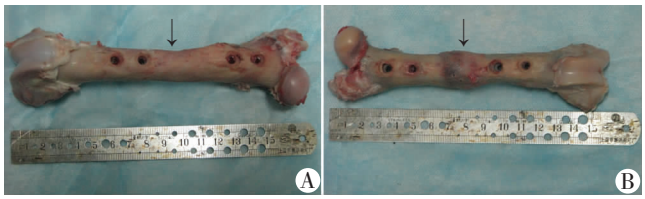
2 结果

2.1 大体观察

20周时,BMP-9基因修饰的MSCs实验组(图1A)股骨骨缺损部位已经模糊,骨折断端的位置无法分辨,骨皮质已经完全连续,新生骨为白色质地坚硬,骨痂已经改造塑形,形态和正常股骨相似。对照组(图1B)可见骨缺损部位清晰可见,骨折断端位置明显,缺损部位有向外膨出的有一定韧性和硬度的组织填充,颜色暗红,表明缺损区域血供丰富,握紧股骨两端用力,可感觉骨缺损两侧骨缺损断端有轻微分离,说明骨缺损两端并没有形成完全的骨性连接。

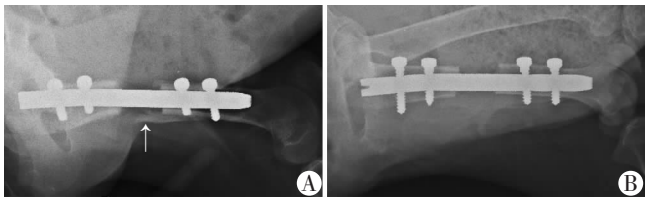
2.2 影像学检查

2.2.1 2周时X线片检查 术后2周时,实验组(图2A)已经有少量外骨痂生长,而对照组(图2B)没有任何骨痂生长,提示实验组较对照组骨痂生成更早。



A:BMP-9 基因修饰 MSCs 实验组;B:GFP 基因修饰的 MSCs 对照组(箭头指骨缺损部位)

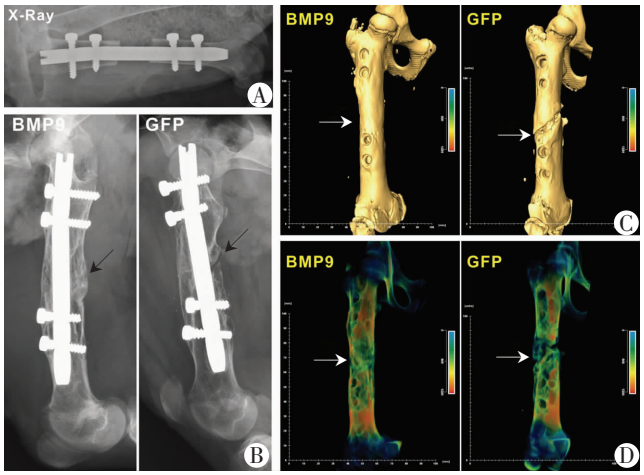
图1　20周时2组山羊股骨骨缺损修复大体形态观察



A:BMP-9 基因修饰的 MSCs 实验组;B:GFP 基因修饰的 MSCs 对照组(箭头所指为实验组2周的新生骨痂)

图2　术后2周2组X线片表现

2.2.2　20周时的影像学检查　图3显示:20周X线片显示实验组较对照组骨痂量更多,骨折线已经模糊,骨皮质连续,而对照组骨折断端清晰可见,骨痂量较少,骨皮质仅部分连续(图3B)。图3C、D为股骨CT三维重建结果,实验组骨缺损处已经不明显,皮质已经完全连续,接近于正常股骨,对照组骨缺损未完全修复,清晰可见部分缺损,骨皮质不连续。



A:术后1 d X线表现;B:术后20周实验组(左)和对照组(右)X线表现;C、D:术后20周实验组(左)和对照组(右)CT三维重建

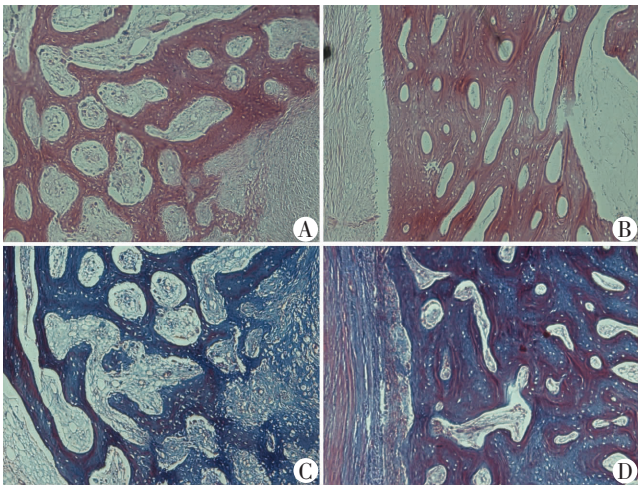
图3　2组山羊股骨骨缺损X线与三维重建影像学表现

2.3　组织学检查

HE结果提示:对照组20周时,新生骨以编织骨为主(图4A),实验组主要以板层骨为主,骨小梁之间脂肪细胞较多(图4B)。Masson染色结果提示:对照组新生骨中胶原纤维以蓝绿色为主,红染较少(图4C),实验组胶原纤维红染更多(图4D)。HE和Masson染色提示实验组新生骨塑形更好,更加成熟,同时也发现了BMP9组骨小梁之间有较多的脂肪细胞填充。

2.4　生物力学检测

通过三点试弯试验测定各组($n=6$)的最大负荷(N),正常组(3 392.5 ± 302.2),实验组(2 816.4 ± 309.7),对照组(1 014.5 ± 221.5)。运用统计软件分析,发现实验组的最大负荷远远大于对照组($t=11.59$,$P<0.01$),而实验组与正常组之间最大负荷也存在一定的差异($t=3.26$,$P<0.05$)。生物力学特性上正常组>实验组>对照组。



A,C:GFP 基因修饰的 MSCs 对照组;B,D:BMP-9 基因修饰的 MSCs 实验组;A、B:HE 染色;C、D:Masson 染色

图4　20周时2组新生骨组织切片HE染色和Masson染色结果　(×100)

3　讨论

严重创伤、肿瘤等原因引起的骨缺损、骨折不愈合是骨科治疗中的常见难题,目前认为最有效的治疗方式是组织工程人工骨的替代治疗。用于人工骨的成骨因子很多,如BMP,碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF),胰岛素样生长因子-Ⅰ(insulin-like growth factor-Ⅰ, IGF-Ⅰ)等,其中BMP是目前研究的热点。本课题组前期研究发现BMP-9具有比BMP-2、BMP-7更强的诱导成骨能力,但是研究只局限在细胞和小动物水平。本实验采用了山羊骨缺损模型,将BMP-9基因修饰的MSCs和单纯的MSCs治疗效果进行了比较,结果发现BMP-9基因修饰的MSCs能更好地促进山羊骨缺损的愈合,骨缺损部位成骨更快,塑形更好,在更接近于人类体内环境的大动物水平证实了BMP-9的成骨能力,为BMP-9进一步的临床应用以及更高效的组织工程人工骨的制备提供了实验依据。同时我们也发现BMP-9在体内存在和BMP-2、BMP-7以及另外一些成骨因子如bFGF等一样的问题:促进脂肪的分化,我们的实验与近来研究报道一致,在体内既能够促进成骨,同时也促进了脂肪的生长[13-14]。如何保证BMP-9在体内促进成骨的同时又不促进脂肪的分化将是下一步要研究的课题。BMP-9的成骨机制以及BMP-9与其他成骨因子的协同作用有待进一步的研究。

参考文献：

[1] Che J H, Zhang Z R, Li G Z, *et al*. Application of tissue-engineered cartilage with BMP-7 gene to repair knee joint cartilage injury in rabbits [J]. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2010, 18(4): 496 – 503.

[2] Zhang F, Qiu T, Wu X, *et al*. Sustained BMP signaling in osteoblasts stimulates bone formation by promoting angiogenesis and osteoblast differentiation[J]. J Bone Miner Res, 2009, 24(7): 1224 – 1233.

[3] Wang L, Park P, Zhang H, *et al*. BMP-2 inhibits the tumorigenicity of cancer stem cells in human osteosarcoma OS99-1 cell line[J]. Cancer Biol Ther, 2011, 11(5): 457 – 463.

[4] Fong S, Chan M K, Fong A, *et al*. Viral vector-induced expression of bone morphogenetic protein 2 produces inhibition of tumor growth and bone differentiation of stem cells[J]. Cancer Gene Ther, 2010, 17(2): 80 – 85.

[5] Spanjol J, Djordjevic G, Markic D, *et al*. Role of bone morphogenetic proteins in human prostate cancer pathogenesis and development of bone metastases: immunohistochemical study [J]. Coll Antropol, 2010, 34(Suppl 2): 119 – 125.

[6] Thorey F, Menzel H, Lorenz C, *et al*. Enhancement of endoprosthesis anchoring using BMP-2[J]. Technol Health Care, 2010, 18(3): 217 – 229.

[7] Kanakaris N K, Mallina R, Calori G M, *et al*. Use of bone morphogenetic proteins in arthrodesis: clinical results[J]. Injury, 2009, 40(Suppl 3): S62 – S66.

[8] Kang Q, Sun M H, Cheng H, *et al*. Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery[J]. Gene Ther, 2004, 11(17): 1312 – 1320.

[9] Schmitz J P, Hollinger J O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions[J]. Clin Orthop Relat Res, 1986, (205): 299 – 308.

[10] Xiao Y, Mareddy S, Crawford R. Clonal characterization of bone marrow derived stem cells and their application for bone regeneration[J]. Int J Oral Sci, 2010, 2(3): 127 – 135.

[11] Xing Z, Xue Y, Danmark S, *et al*. Effect of endothelial cells on bone regeneration using poly(L-lactide-co-1, 5-dioxepan-2-one) scaffolds [J]. J Biomed Mater Res A, 2010, 96(2): 349 – 357.

[12] 许建中. 骨组织工程相关研究新进展[J]. 中国修复重建外科杂志, 2010, 24(7): 769 – 773.

[13] Qu D, Li J, Li Y, *et al*. Angiogenesis and osteogenesis enhanced by bFGF ex vivo gene therapy for bone tissue engineering in reconstruction of calvarial defects[J]. J Biomed Mater Res A, 2011, 96(3): 943 – 951.

[14] David L, Feige J J, Bailly S. Emerging role of bone morphogenetic proteins in angiogenesis[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2009, 20(3): 203 – 212.

（收稿：2011-03-28；修回：2011-04-13）
（编辑 王 红）

（上接1788页）

统计，涉及20p的平衡易位携带者53例次妊娠中，20p三体（包含从症状确认）占20.75%，与以上报道的20%相近，流产儿占30.19%，携带者占20.75%，核型正常后代仅占11.32%。

估计平衡易位携带者生育活产异常儿的风险，还需要考虑携带者是父亲还是母亲[9]。本次统计20p三体先证者均由母亲平衡易位所生育，9例女性平衡易位携带者的29例次妊娠中，20p三体10例（34.48%），正常后代1人（3.45%），携带者4人（13.79%），流产、新生儿死亡等异常儿14例（48.28%）；5个家系中共4位男性携带者的正常妻子18例次妊娠中，有成年前死亡（症状似20p三体）1人（5.56%），正常后代3人（16.67%），携带者4人（22.22%），流产、新生儿死亡等异常儿10例（55.56%）。另有6例不能确认是父亲还是母亲为携带者。女性平衡易位携带者生育20p三体的比例高于男性，接近统计学意义上的显著差异（$\chi^2 = 3.69$，$P = 0.06$）。本例通过出生20p三体患儿而确认，无流产死胎等记录，说明其断裂点及非平衡片段大小对可能出生的20p三体患儿影响很小，且咨询夫妇女性为携带者，因此再生育20p三体的风险高于20%。如再生育，产前常规G带染色体检查能够识别异常核型胎儿。

参考文献：

[1] Chaabouni M, Turleau C, Karboul L, *et al*. De novo trisomy 20p of paternal origin[J]. Am J Med Genet A, 2007, 143A(10): 1100 – 1103.

[2] Fernandez T, Morgan T, Davis N, *et al*. Disruption of contactin 4 (CNTN4) results in developmental delay and other features of 3p deletion syndrome[J]. Am J Hum Genet, 2004, 74(6): 1286 – 1293.

[3] 王红英，薛永权，何亚香，等. 3号环状染色体综合征一例[J]. 中华医学遗传学杂志, 2009, 26(5): 594.

[4] 夏家辉. 医学遗传学[M]. 北京：人民卫生出版社, 2004: 140.

[5] Archidiacono N, Tecilazich D, Tonini G, *et al*. Trisomy 20p from maternal t(3;20) translocation[J]. J Med Genet, 1979, 16(3): 229 – 232.

[6] Sidwell R U, Pinson M P, Gibbons B, *et al*. Pure trisomy 20p resulting from isochromosome formation and whole arm translocation[J]. J Med Genet, 2000, 37(6): 454 – 458.

[7] 边旭明. 实用产前诊断学[M]. 北京：人民军医出版社, 2008: 301.

[8] Molina-Gomes D, Nebout V, Daikha-Dahmane F, *et al*. Partial trisomy 20p resulting from recombination of a maternal pericentric inversion: case report of a prenatal diagnosis by chorionic villus sampling [J]. Prenat Diagn, 2006, 26(3): 239 – 241.

[9] Gardner R J M, Sutherland G R. Chromosome abnormalities and genetic counseling[M]. 3rd. New York: Oxford University Press, 2004: 87 – 97.

[10] Taylor K M, Wolfinger H L, Brown M G, *et al*. Partial trisomy 20p derived from a t(18;20) translocation[J]. Hum Genet, 1976, 34(2): 155 – 162.

[11] Thomas M A, Duncan A M, Bardin C, *et al*. Lissencephaly with der(17)t(17;20)(p13.3;p12.2)mat[J]. Am J Med Genet A, 2004, 124A(3): 292 – 295.

（收稿：2011-04-15；修回：2011-05-19）
（编辑 汪勤俭）