基础研究 文章编号:0253-3626(2010)10-1449-05

支架载体在 BMP-9 转导干细胞成骨基因治疗中特性的研究

陈 亮[1],刘 渤[2],罗小辑[2],陈 富[1],柯珍勇[1],尹良军[1],HE Tongchuan[3],蒋电明[2],邓忠良[1]

(1. 重庆医科大学附属第二医院骨科,重庆 400010;2. 重庆医科大学附属第一医院骨科,重庆 400010;3. 芝加哥大学医学中心外科 分子肿瘤实验室,伊利诺伊州 60637)

【摘 要】目的:比较 3 种可能的支架载体在以骨形态发生蛋白 9(Bone morphogenetic protein 9,BMP-9)介导细胞为基础的裸鼠成骨基因治疗模型中的不同促成骨特性。方法:4~6 周龄雌性裸鼠 40 只,体重 15~20 g,随机分为 4 组。3 种支架载体分别为:I 型胶原纤维,羟基磷灰石—磷酸三钙,脱钙基质骨(Demineralized bone matrix,DBM)。分别将表达 BMP-9 重组腺病毒 Ad-BMP-9 感染后的小鼠成肌细胞系 C_2C_{12} 细胞注入埋植于皮下一侧的 3 种载体。将表达绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein,GFP)重组腺病毒 Ad-GFP 感染后的 C_2C_{12} 细胞分别注入埋置于其对侧皮下的 3 种载体作为对照。第 4 组仅在双侧皮下分别注入 Ad-BMP-9 或 Ad-GFP 感染后的 C_2C_{12} 细胞。4 周后处死实验裸鼠,行 X 线检查和组织学分析。结果:X 线检测显示:Ⅰ型胶原纤维组 90%样本出现新骨形成,HA-TCP 组、DMB 组和皮下注射组的新骨形成率分别为 89%、50%和 44%。组织学分析显示:Ⅰ型胶原纤维组和 HA-TCP 组新骨质量和数量更佳;Ⅰ型胶原纤维组样本中干细胞及新骨分布较其它组更趋均匀;DBM 组样本中存活干细胞数量少于其它组。结论:在以 BMP-9 基因转导细胞为基础的基因治疗中,使用Ⅰ型胶原纤维或 HA-TCP 载体较脱钙基质骨载体可更有效成骨。同时,Ⅰ型胶原纤维和 HA-TCP 载体可为基因治疗中使用的细胞提供更好的组织工程环境。

【关键词】BMP-9;骨再生;支架载体;基因治疗

【中国图书分类法分类号】R68 【文献识别码】A 【收稿日期】2010-01-07

Characterization of scaffold carriers for bmp-9 transduced cell-based gene therapy in bone regeneration

CHEN Liang, et al

(*Department of Orthopedics, the Second Affilliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To compare the ability of three carriers to promote osteogenesis in a mouse model of cell-based gene therapy using BMP-9. *Methods*: Forty athymic nude mice were randomized into four groups for subcutaneous implantation of carrier and C_2C_{12} cells transfected with adenovirus expressing BMP-9. Each mouse also had a control consisted of carrier with cells infected with adenovirus expressing green fluorescence protein (GFP). One of the four groups had only transfected cells injected subcutaneously with no carrier. The following groups were defined: ① collagen type Ⅰ sponge, ② Tri-calcium-phosphate/hydroxy-apatite (HA-TCP), ③Demineralized bone matrix (DBM), and ④ the subcutaneous injection group.The mice were sacrificed at 4 weeks and plain radiographs obtained. Histologic evaluation of the implantation sites were performed. *Results*: In the collagen sponge group, 9 of 10 (90%) had radiographic evidence of new bone formation, 8 of 9 (89%) in the HA-TCP group, 3 of 6 (50%) in the DBM group, and 4 of 9 (44%) in the cell-only group. Histologic findings from selected samples included the following: better quality and larger amounts of bone were found in the collagen sponge and HA-TCP samples; a more uniform distribution of cells and bone were noted throughout the collagen sponge samples when compared to the other carriers; a decreased number of cells were noted in DBM samples when compared to the other carriers. *Conclusion*: Collagen type Ⅰ sponge and HA-TCP carriers consistently produce more bone than DBM carrier in cell-based gene therapy using BMP-9. Addtionally, collagen sponge and HA-TCP provide a better environment for cell based gene therapy as evidenced in the histologic data.

【Key words】BMP-9; Bone regeneration; Scaffold carriers; Gene therapy

作者介绍:陈 亮(1979-),男,讲师,主治医师,博士,研究方向:成骨相关组织工程。

基金项目:国家高技术研究发展项目计划(863 计划项目,编号:2008AA02Z443);国家自然科学基金(编号:30772211)。

自 1965 年 Urist 发现骨形态发生蛋白(Bone morphogenetic proteins, BMPs)以来[1],人们对其结构、功能进行了深入的研究。BMPs 最初被用于诱导成骨。BMP-2、BMP-7 相继被证实成骨效果明显,并已广泛应用于临床。然而,其成骨效果因用药局部浓度的波动而参差不齐,治疗效果因给药局部成骨内环境的不同而差异显著[2-6]。为解决上述问题,以细胞为基础的成骨基因治疗受到关注[7-12]且动物实验效果良好[13-17]。近期研究显示:作为基因治疗中的细胞因子,BMP-9 的诱导成骨作用较 BMP-2 及 BMP-7 更强[7,18-22]。同时,在成骨基因治疗中使用支架载体,可有效维持患处局部 BMPs 高浓度状态、改善局部成骨内环境,促进成骨。但其种类繁多、特性各异,如何选择尚无定论[5,23-25]。目前,在以 BMP-9 介导细胞为基础的基因治疗中不同载体成骨特性的研究尚无报道。本研究拟将成肌细胞系 C_2C_{12} 细胞(该细胞具有向成骨前体细胞转化的潜力)[26]感染 Ad-BMP-9 后加载至不同载体并作用于裸鼠皮下成骨模型,观察其效果,了解不同载体间促成骨特性的差异。

1 材料与方法

1.1 实验动物

40 只雌性裸鼠(Athymic nude-foxnl^{nu}, Harlan Laboratories, Inc., Madison, Wisconsin, USA),4~6 周龄,体重 15~20 g。

1.2 主要材料与仪器

1.2.1 小鼠间充质干细胞系 C_2C_{12} 细胞 C_2C_{12} 细胞来自 ATCC (American type culture collection, Manassas, VA)。此细胞系来源于小鼠骨骼肌成肌细胞,在适当条件刺激下具有向成骨前体细胞转化的能力[26]。

1.2.2 支架载体材料 本实验选择使用的支架载体材料分别为:① Ⅰ型胶原纤维(Medtronic sofamordanek, Minneapolis, Minnesota, USA);②HA-TCP (Biomet, warsaw, Indiana, USA);③脱钙基质骨(Wright medical, Arlington, Tennessee, USA)。

1.2.3 Ad-BMP-9 重组腺病毒的构建 人骨形态发生蛋白 9 (Bone morphogenetic protein 9, BMP-9)编码序列(Coding sequence, CDS)经 HF-PCR(High Fidelity PCR)方法扩增后克隆至 pAdTrack-CMV 载体,构建形成 pAdTrack-BMP-9 质粒,通过在细菌 BJ5183 中进行同源重组,产生重组腺病毒载体,转染 HEK293 细胞,产生重组腺病毒 Ad-BMP-9 并制备高滴度病毒[7]。

1.2.4 化学药品

本研究中使用的所有化学药品均来自 Sigma-Aldrich 公司(St. Louis, MO, USA)或 Fischer Scientific 公司(Pittsburgh, PA, USA)。

1.3 实验方法

1.3.1 间充质干细胞系 C_2C_{12} 细胞的培养 将 C_2C_{12} 细胞置于含 10%胎牛血清(FBS, Mediatech, herndon, VA),100 U/ml 青霉素,100 μg/ml 链霉素的完全培养基(Dulbecco modified eagle medium, DMEM)中,于 37℃,5%CO_2 环境下培养。

1.3.2 Ad-BMP-9 重组腺病毒的转染 将 C_2C_{12} 细胞接种于 24 孔板,细胞密度为 30%左右,细胞贴壁后使用上述扩增所得高滴度 Ad-BMP-9 进行感染 16 h,病毒感染滴度为 MOI=50~200。感染 5 d 后,组织化学染色观察细胞碱性磷酸酶活性以反映感染细胞的成骨活性(图 1)。

1.3.3 实验动物分组及动物模型制备

1.3.3.1 实验动物分组 40 只裸鼠随机平均分为 4 组。其中 3 组分别在其背部双侧皮下分别植入: Ⅰ型胶原纤维、HA-TCP 及 DBM 支架载体,命名为:① Ⅰ型胶原纤维组、②HA-TCP 组、③DBM 组。各组右侧载体内注入 BMP-9 介导的 C_2C_{12} 细胞作为实验侧,左侧注入仅经 Ad-GFP 感染的 C_2C_{12} 细胞,作为对照侧。Ad-GFP 为带有 GFP 荧光蛋白标记的空载体腺病毒,未携带目的基因片段。第 4 组仅使用 BMP-9 介导的 C_2C_{12} 细胞于裸鼠背部皮下一侧进行注射,未加入载体,命名为:皮下注射组,其对侧使用仅经 Ad-GFP 感染的 C_2C_{12} 细胞作为对照。3 只皮下注射组裸鼠作为预实验动物,用于明确 BMP-9 的成骨作用(图 1)。

1.3.3.2 动物模型制备 将 C_2C_{12} 细胞接种至 100 mm 培养皿中,细胞密度为 30% 左右,待细胞贴壁后分别使用上述高滴度 Ad-BMP-9 或 Ad-GFP 进行感染,病毒感染滴度为 MOI=50~200,感染 24 h 后,使用 0.25%胰酶消化细胞,800 g 离心 3 min 收集细胞,使用 PBS 重悬细胞,并以血细胞计数板计数、定容,使重悬后细胞密度为 3×10^7 个/ml。

裸鼠腹腔内注射氯胺酮、甲苯噻嗪混合麻醉剂,待麻醉起效后,将其俯卧位放置于动物手术台上。观察并维持裸鼠的麻醉状态与存活。在裸鼠背部,肋臀连线中点水平与背正中线交点两侧 1 cm 处分别作纵切口切开皮肤、皮下筋膜,长约 1 cm,向两侧皮下适当分离并以丝线将皮下筋膜与肌筋膜缝合成内径约 1 cm 的袋形腔隙。使用电动牙科锯将载体切割成 5 mm × 5 mm × 5 mm 大小并分别置入两侧腔隙内;随后,以带 32 号微量注射针头的 Hamilton 微量注射器(规格:100 μl, Hamilton Company, Reno, Nevada, USA)直接刺入载体内部,在左侧载体内注入 100 μl(3×10^6 个细胞)Ad-BMP-9 转染后的 C_2C_{12} 细胞重悬液作为实验侧,以相同方法在右侧载体内注入 100 μl (3×10^6 个细胞)Ad-GFP 转染后的 C_2C_{12} 细胞重悬液作为对照侧。待细胞重悬液浸润后,缝合、观察,术中无明显出血;待麻醉苏醒后将裸鼠回笼,常规饲养。皮下注射组裸鼠麻醉后仅在切口相应部位皮下分别注射 3×10^6 个 Ad-BMP -9 或 Ad-GFP 转染的 C_2C_{12} 细胞重悬液,苦味酸标记注射部位。

4 周后处死实验裸鼠。已成骨处理组,以切口或注射点为中心,剥离皮下成骨包块;未成骨处理组,以切口或注射点为中心划定直径为 1 cm 的圆形区域,切取相应皮下及肌肉组织用于检测,以组织学检查结果确定准确的载体植入或注射部位。

1.3.4 检测指标

1.3.4.1 X 线放射学检测 所有术后存活裸鼠在术后第 4 周

处死前行载体植入处 X 线检测。

1.3.4.2 组织学检测 将所取得标本行固定、石蜡包埋、切片及伊—红染色(Hematoxylin and eosin staining,HE)后进行分析。

2 结 果

2.1 预实验组

X 线及组织学检测显示:所有预实验组裸鼠的 Ad-BMP-9 转染 C_2C_{12} 细胞注射部位均有新骨形成,而其对侧 Ad-GFP 转染 C_2C_{12} 细胞注射部位未见成骨。说明单独使用 C_2C_{12} 细胞皮下注射不能有效的将 C_2C_{12} 细胞转化为成骨前体细胞并成骨,而 Ad-BMP-9 则有很强的诱导 C_2C_{12} 细胞转化成骨的能力(图 1)。

2.2 Ⅰ型胶原纤维组

X 线检测显示:术后第 4 周,该组 90%的裸鼠在实验侧载体植入部位出现新骨形成,而对照侧的载体植入部位未见成骨(图 2)。组织学检测显示:实验侧载体被新生正常骨小梁结构完全取代,样本中可见层状骨结构,成骨细胞数量也显著增加。而对照侧载体植入部位未发现成骨证据(图 3)。

2.3 HA-TCP 组

该组 X 线检测显示:89%的裸鼠实验侧载体植入部位有新骨形成(图 2)。组织学检测显示:该侧大部分植入载体被新生正常骨小梁所取代,仅有少量残余。样本中可见少量层状骨形成及成骨细胞数量的增加。对照侧载体内无类似成骨证据(图 3)。

2.4 DBM 组

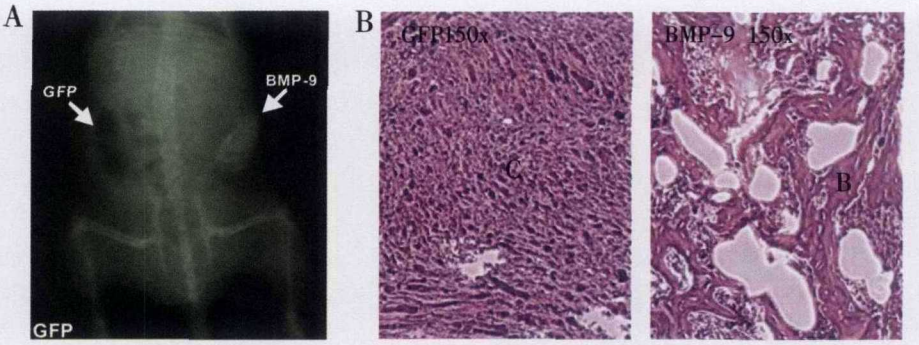
X 线检测显示:与 GFP 对照侧相比,该组 50%的裸鼠在实验侧载体植入部位出现新骨形成(图 2)。组织学检测显示:与对照侧相比,实验侧 DBM 载体在结构上出现了细微改变(图 3),可见未成熟骨、Wormian 骨及少量成骨细胞,未见新生正常结构骨小梁及层状骨。

2.5 皮下注射组

该组 38%裸鼠在皮下注射 BMP-9 介导细胞的部位出现新骨形成(图 1)。组织学检测显示这些部位存在未成熟骨、Wormian 骨及少量成骨细胞。对照侧则无上述发现(图 1)。

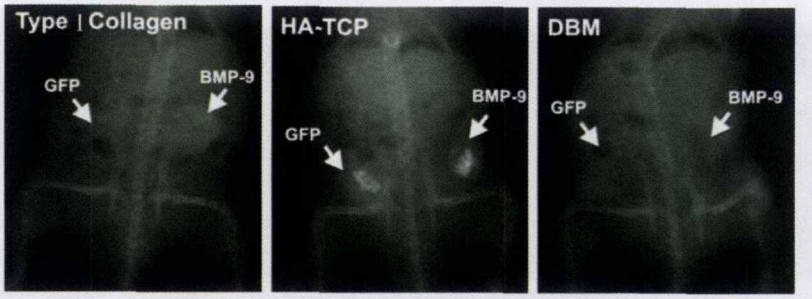
3 讨 论

35 年前,Urist 发现 BMPs。最早,这一发现被用于动物实验以期建立一种可行的诱导成骨技术[1]。随着研究的深入,BMP-2 和 BMP-7 被证实在诱导成骨动物实验中具有良好的效果。人工合成的重组 BMP-2 及 BMP-7 亦通过 FDA 认证而广泛应用于临床治疗之中。然而,其融合效果因用药局部浓度的波动而参差不齐,治疗效果因给药部位成骨内环境的不同而有很大的差异[2-6]。为获得局部持续的高浓度 BMPs 表



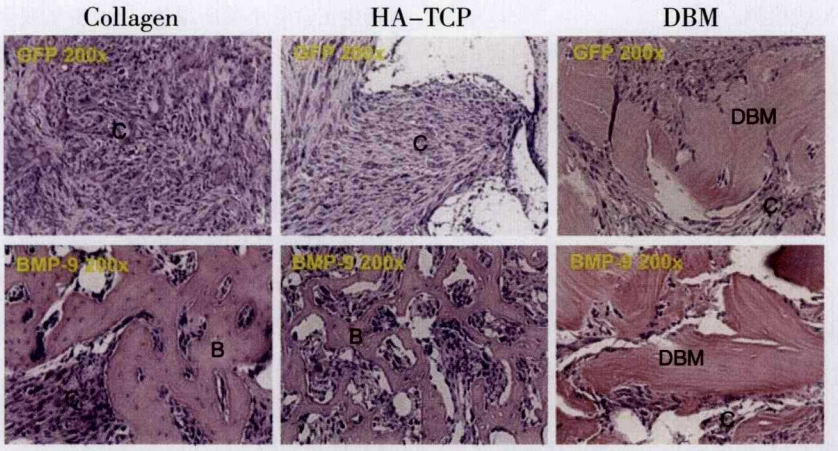
A. X 线检测显示:皮下注射 Ad-BMP-9 转染 C_2C_{12} 细胞部位的异位成骨作用明显;B.皮下注射 Ad-BMP-9 转染 C_2C_{12} 细胞部位的碱性磷酸酶染色显示局部成骨分化明显

图 1 BMP-9 在 C_2C_{12} 中的成骨作用



在添加转染 Ad-BMP-9 细胞Ⅰ型胶原纤维植入部位出现新骨形成,而其对侧添加转染 Ad-GFP 细胞Ⅰ型胶原纤维植入部位未见明显成骨;HA-TCP 载体中,Ad-BMP-9 转染 C_2C_{12} 细胞注射侧有新骨形成,而其对侧添加转染 Ad-GFP 细胞 HA-TCP 植入部位未见明显成骨;在添加转染 Ad-BMP-9 细胞 DBM 植入部位异位成骨少,而其对侧添加转染 Ad-GFP 细胞 DBM 植入部位未见明显成骨

图 2 Ad-BMP-9 转染 C_2C_{12} 细胞介导成骨基因治疗中载体成骨情况的 X 线检测



Ad-BMP-9 转染 C_2C_{12} 细胞注入侧Ⅰ型胶原纤维被新生正常骨小梁结构完全取代，可见层状骨结构，成骨细胞数量显著增加。对照侧无明显成骨；Ad-BMP-9 转染 C_2C_{12} 细胞注入侧 HA-TCP 被新生正常骨小梁结构部分取代，可见部分层状骨结构，成骨细胞数量增加。对照侧无明显成骨；Ad-BMP-9 转染 C_2C_{12} 细胞注入侧 DBM 新生正常骨小梁结构少，可见少量层状骨结构及成骨细胞。对照侧无明显成骨

图 3 Ad-BMP-9 转染 C_2C_{12} 细胞介导成骨基因治疗中载体成骨情况的组织化学染色检测

达、改善成骨内环境，人们对以细胞为基础的基因治疗技术的关注日益增加[7-12]。

最初，人们将关注点集中于与成骨相关的细胞因子，试图寻找和使用成骨效果更强的因子作用于细胞来促进成骨。BMP-2、BMP-7 及 LMP-1(LIM mineralization protein)等因子相继被用于多项诱导成骨动物实验且效果明确[16]。其中，BMP-2 及 BMP-7 被认为诱导分化成骨效果最强。但近期研究[7-12,18-22,26]显示，BMP-9 作为 BMP 蛋白家族中的成员之一，不仅可以促使成骨前体细胞及骨母细胞等的增殖，还可促进上述细胞向成骨细胞及骨细胞分化，其诱导成骨及促进成骨的作用甚至强于 BMP-2 及 BMP-7。

本实验使用的 C_2C_{12} 细胞系是一种在目前成骨基因治疗研究中常用的细胞系，来源于骨骼肌成肌细胞，具有潜能干细胞特性，主要向肌细胞(如：骨骼肌细胞、心肌细胞等)分化。研究显示[7,8,26]，在动物皮下单纯注射 C_2C_{12} 细胞仅可形成纤维样或类肌肉样包块，但在特定条件刺激下 C_2C_{12} 细胞可由成肌细胞转化为成骨前体细胞并定向分化、成骨。作者所在实验室前期研究[7,26]显示：BMP9 有很强的诱导 C_2C_{12} 细胞由成肌细胞向成骨前体细胞转化的作用。本实验中 Ad-GFP 感染 C_2C_{12} 细胞皮下注射部位均无成骨包块形成，部分动物所形成的包块经组织学检测鉴定为纤维样细胞包块(图 1)，而 Ad-BMP-9 感染 C_2C_{12} 细胞预实验组皮下注射部位成骨包块(图 1-B)形成率可达到 100%，与本实验室前期发表文章[7,26]结论一致。因此我们认为：C_2C_{12} 细胞系和 BMP9 组合可有效解决成骨基因治疗中种子细胞和成骨细胞因子的选择问题。

随着技术的发展，如何为整合了上述因子的种子细胞提供良好的生存环境既支架载体的选择受到重视。选择适当的载体可有效延长成骨因子的作用时间、保持种子细胞的活性及传递作用，促进新骨形成[5,16,17,23-26]。数种不同的载体被用于重组 BMP 介导的基因治疗实验，如：HA-TCP、Ⅰ型胶原纤维、多乳酸聚合物等[23]。

研究显示，Ⅰ型胶原纤维及陶瓷促进成骨效果明显。Viggeswarapu 等[17]将转导了 LMP-1 的细胞分别加载至陶瓷，DBM 及明胶海绵载体进行对比研究，并最终选择一种明胶陶瓷复合物作为主要推荐材料。这种复合材料既能有效延缓载体材料的吸收速度，持续作用较长时间，又有很强的成骨作用。其全部实验动物均显示有新骨形成。另有研究认为 DBM 是一种优良的组织工程支架载体。Boden 等[16]通过将 DBM 作为支架载体，在注入转染 AdLMP-1 的骨髓细胞后用于裸鼠脊柱融合模型，获得 100%的融合率，载体材料被完全吸收。Wang 等[13]则将转染 AdBMP-2 的骨髓细胞作用于裸鼠脊柱融合模型，对 DBM 和明胶海绵等载体进行了对比研究。该研究显示：与单纯注射 AdBMP-2 相比，所有注入转染 AdBMP-2 细胞的载体(包括明胶海绵和 DBM)在其植入局部新骨形成量更大、骨小梁形态更成熟。

上述研究均认为，在以细胞为基础的成骨基因治疗中，载体的加入可有效促进新骨的形成，不同载体间的促进成骨效果相差不大。然而我们认为，不同载体间促进成骨作用的差异明显。在本次以转染 Ad-BMP-9 细胞为基础的基因治疗载体成骨效果的比较实验中，X 线及组织学检测数据均显示：Ⅰ型胶原纤维和 HA-TCP 支架载体相较 DBM 载体而言新骨成骨质量及数量更佳。

实验显示，加载 BMP-9 处理细胞的Ⅰ型胶原和HA-TCP 载体实验组的成骨数量及新骨成熟度均较其对侧 GFP 对照组高。DBM 载体组所有样本无论加载 BMP-9 或 GFP 处理细胞，其成骨数量及新骨成熟度均不及上述 2 载体(图 3)。DBM 组样本中成骨细胞数量最少，皮下注射组次之，Ⅰ型胶原组和 HA-TCP 组最多(图 3)。以上实验结果说明：相较 DBM 而言，Ⅰ型胶原纤维和 HA-TCP 在以转染 Ad-BMP-9 细胞为基础的成骨基因治疗中更为有效。这可能与 DBM 在植入部位产生的某些作用有关。分析本实验中数据，我们认为可能因素如下：①DBM 使用甘油作为粘合剂。当局部甘油浓度过高

时可产生细胞毒性，导致移植细胞及邻近组织细胞死亡，BMP-9 的成骨作用在局部未能有效发挥，最终导致 DBM 支架载体中成骨细胞数量偏少。②与Ⅰ型胶原纤维和 HA-TCP 载体相比，DBM 载体内成骨细胞生长条件较差。③DBM 载体中成骨细胞数量偏少将导致其成骨数量及新骨成熟度均不及Ⅰ型胶原纤维和 HA-TCP。

综上所述，在以转导 BMP-9 细胞为基础的成骨基因治疗中，Ⅰ型胶原纤维和 HA-TCP 较 DBM 载体有更多的新骨形成，更好的成骨质量。这一结论与以往使用其它成骨蛋白所进行的研究所得结论不同，其认为不同载体的成骨效果并无明显差异。这可能是由于 DBM 中使用具有细胞毒性的甘油作为粘合剂所致。

参 考 文 献

[1] Urist M R. Bone: Formation by autoinduction[J].Science, 1965, 150 (698): 893-899.

[2] Boden A D, Kang J, Sandhu, et al. Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to achieve posterolateral lumbar spine fusion in humans[J]. Spine, 2002, 27(23): 2662-2673.

[3] David S M, Gruber H E, Meyer R A, et al. Lumbar spinal fusion using recombinant human bone morphogenetic protein in the canine[J].Spine, 1999, 24(19): 1973-1979.

[4] Hecht B P, FIschgrund J S, Herkowitz H N, et al. The use of recombinent human bone morphogenetic protein-2 to promote spinal fusion in a non-human primate anterior interbody fusion model [J].Spine, 1999, 24 (7): 629-636.

[5] Boden S D, Martin G J, Morone M A, et al. Posterolateral lumbar intertransvese process spine arthrodesis with recombinant human bone morphogenetic protein 2/hydroxyapatite-tricalcium phosphate after laminectomy in the non-human primate[J]. Spine, 1999, 24(12): 1179-1185.

[6] Burkus J K, Heim S E, Gornet M F, et al. Is INFUSE bone graft superior to autograft bone? An integrated analysis of clinical trials using the LT-CAGE lumbar tapered fusion device[J]. Spinal Disord Tech, 2003, 16 (12): 113-122.

[7] Cheng H, Jiang W, Phillips F, et al. Osteogenic activity of fourteen types of bone morphogenetic proteins [J].J Bone Joint Surg, 2003, 85-A (8): 1544 -1552.

[8] Varady P, Li J Z, Cunningham M, et al. Morphologic analysis of BMP-9 gene therapy-induced osteogenesis[J]. Hum Gene Ther, 2001, 12 (6): 697-710.

[9] Helm G A, Alden T D, Beres E J, et al. Use of bone morphogenetic protein-9 gnee therapy to induce spinal arthrodesis in the rodent[J]. Neurosurg, 2000, 92(2s): 191-196.

[10] Dayoub H, Dumont R J, Li J Z, et al. Human mesenchymal stem cells transduced with recombinant bone morphogenetic protein-9 adenovirus promote osteogenesis in rodents[J].Tissue Eng, 2003, 9(2): 347-356.

[11] Dumont R J, Hayan D, Li J Z, et al. Ex-vivo bone morphogenetic protein-9 gene therapy using human mesenchymal stem cells induces spinal fusion in rodents[J]. Neurosurgery, 2002, 51(5): 1239-1244.

[12] Li J Z, Hankins G R, Kao C, et al. Oseogenesis in rats induced by a novel recombinant helper-dependant bone morphogenetic protein-9 adenovirus[J]. Gene Med, 2003, 5(9): 748-756.

[13] Wang J C, Kanim L E, Yoo S, et al. Effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2 producing bone marrow cells on spinal fusion in rats[J]. J Bone Joint Surg, 2003, 85-A(5): 905-911.

[14] Riew K D, Wright N M, Cheng S L, et al. Induction of bone formation using a recombinant adenoviral vector carrying the human BMP-2 gene *in a rabbit spinal fusion model* [J].Calcif Tissue Int, 1998, 63 (4): 357-360.

[15] Cheng S L, Lou J, Wright N M, et al. In vitro and in vivo induction of bone formation using a recombinant adenoviral vector carrying the human BMP-2 gene[J]. Calci Tissue Int, 2001, 68(2): 87-94.

[16] Boden S D, Titus L, Hair G, et al. Lumbar spine fusion by local gene therapy with a CDNA encoding a novel osteoinductive protein (LMP-1) [J]. Spine, 1998, 23(23): 2486-2492.

[17] Viggeswarapu M, Boden S, Liu Y S, et al. Adenoviral delivery of LIM mineralization protein-1 induces new-bone formation in vitro and in vivo[J]. J Bone Joint Surg, 2001, 83-A(3): 364-376.

[18] Seeherman H, Wozney J, Li R. Bone morphogenetic protein delivery systems[J]. Spine, 2002, 27(6s): 16-23.

[19] Minamide A, Kawakami M, Hashizume H, et al. Evaluation of carriers of bone morphogenetic protein for spinal fusion [J].Spine, 2001, 26 (8): 933-939.

[20] Suh D Y, Boden S D, Louis-Ugbo J, et al. Delivery of recombinant human bone morphogenetic protein-2 using a compression resistant matrix in postero-lateral spine fusion in the rabbit and it the non-human primate [J]. Spine, 2002, 27(4): 353-360.

[21] David S M, Gruber H E, Meyer R A. Lumbar spinal fusion using recombinant human bone morphogenetic protein in the canine [J].Spine, 1999, 24(19): 1973-1979.

[22] Yee A J, Bae H W, Friess D, et al. Augmentation of rabbit posterolateral spondylodesis using a novel demineralized bone matrix-hyaluronan putty[J]. Spine, 2003, 28(21): 2435-2440.

[23] Partridge K, Yang X, Clark N M, et al. Adenoviral BMP-2 gene transfer in mesenchymal stem cells: in vitro and in vivo bone formation on biodegradable polymer scaffolds[J].Biochem Biophys Res Commun, 2002, 292(1): 144-152.

[24] He T C, Zhou S, da Costa L T, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses[J].Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(5): 2509-2514.

[25] Wang J C, Kaminim L E, Nagakawa I S, et al. Dose-dependent toxicity of a commercially available demineralized bone matrix material [J]. Spine, 2001, 26(13): 1429-1436.

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

（责任编辑：冉明会）