技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)08-1227-05

LMP-1 与 LMP-3 真核双表达质粒的构建及体外表达

唐春晖,倪卫东,高仕长
(重庆医科大学附属第一医院骨科,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建真核双表达质粒 pBudCE4.1-LMP-1-LMP-3,并检测其在体外的表达。方法:采用人工设计合成人 LIM 矿化蛋白 -1(LIM mineralization protein-1,LMP-1)和 LIM 矿化蛋白 -3(LIM mineralization protein-3,LMP-3)基因片段,分别连接于中介质粒 Puc57,经酶切、测序鉴定后,LMP-1 和 pBudCE4.1 先连接,经酶切鉴定,再连接 LMP-3,重组双表达质粒行酶切、测序鉴定。用脂质体包裹转染骨髓间充质干细胞(Mesenchymal stem cells,MSCs),按转染情况分为 5 组:未转染组(A 组)、转染空载体组(B 组)、转染 LMP-1 基因组(C 组)、转染 LMP-3 基因组(D 组)、转染 LMP-1 和 LMP-3 双基因组(E 组)。采用 RT-PCR 和 Western blot 检测 LMP-1 和 LMP-3 的表达。结果:酶切及测序证实质粒 Puc57-LMP-1、Puc57-LMP-3 及其 pBudCE4.1-LMP-1-LMP-3 真核双表达质粒构建成功。该双表达质粒在体外转染骨髓 MSCs 后可表达 LMP-1 和 LMP-3 分子。对 RT-PCR 及 Western blot 检测结果行灰度值测量显示:LMP-1 mRNA 及蛋白水平的表达,A、B 组与 C、D、E 组间差异有统计学意义($P<0.05$),C 组与 E 组差异无统计学意义($P>0.05$);LMP-3 mRNA 及蛋白水平的表达,A、B 组与 C、D、E 组间差异有统计学意义($P<0.001$),D 组与 E 组差异有统计学意义($P<0.05$),C 组及 D 组在 LMP-1 及 LMP-3 的表达上的差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:成功构建真核双表达质粒 pBudCE4.1-LMP-1-LMP-3,证实转染的骨髓 MSCs 能在体外同时表达 LMP-1 和 -LMP-3 分子。

【关键词】LIM 矿化蛋白 -1;LIM 矿化蛋白 -3;质粒 Puc57;质粒 pBudCE4.1;间充质干细胞
【中国图书分类法分类号】R683.42 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-11-25

Construction of co-expression plasmid pBudCE4.1-LMP-1-LMP-3 and its expression in vitro

TANG Chun-hui, et al
(*Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct the mammalian CO-expression plasmid pBudCE4.1- LMP-1-LMP-3, and to detect the expression of the plasmid in vitro. *Methods*: Fragments of LMP-1 gene and Fragments of LMP-3 gene were gained from the Company, and were constructed respectively into the plasmid vector Puc57, The

作者介绍:唐春晖(1978-),男,主治医师,硕士,研究方向:骨折创伤。
通讯作者:倪卫东,男,教授,E-mail:niweidong18@163.com。

肽链,此肽链可与 DNA 分子的脱氧鸟嘌呤发挥特异性相互作用,使 ACT 嵌入 DNA 双螺旋的小沟中,与 DNA 形成复合体,阻碍 RNA 多聚酶的功能,抑制 RNA 的合成,特别是 mRNA 的合成。ADM 抗肿瘤作用机理主要是嵌入 DNA 而抑制核酸的合成,两者抗肿瘤具有相似的作用机理,考虑 ADM 与 ACT 形成交叉耐药,因此 RI 最高。RT-PCR 检测示耐药细胞 MDR1b mRNA 表达是亲本细胞的 2.8 倍。流式细胞术检测发现耐药细胞 P-gp 是亲本细胞排出药物的能力的 6.7 倍。本动物模型可用于化疗后肿瘤继发性耐药机制、了解体内各器官变化及多药耐药逆转机制研究。

参 考 文 献

[1] Bush JA, Li G.Cancer chemoresistance: the relationship between p53 and Multidrug resistance[J].Int J Cancer, 2002, 98(3): 323-330.
[2] Ueda K, Yoshida A, Amachi T, et al.Recent progress in p-glycoprorein research[J].Ami cancer Drug Res, 2002, 14(2): 115-121.
[3] Han K, Kahng J, Kim M, et al. Expression of functional markers in acute nonlymphoblastic leukemia[J].Acta Haematol, 2000, 104(4): 174-180.
[4] Diestra J E, Condom E, Del Muro X G, et al. Expression of multidrug resistance proteins P-glycoprotein, multidrug resistance protein 1, breast cancer resistance protein and lung resistance related protein in locally advanced bladder cancer treated with neoadjuvant chemotherapy: biological and clinical implications [J].J Urol, 2003, 170(4): 1383-1387.
[5] A M Calcagno, J M Fostel, K K W To, et al.Single-step doxorubicin -selected cancer cells overexpress the ABCG2 drug transporter through epigenetic changes[J]. British Journal of Cancer, 2008, 98: 1515-1524.
[6] 王熙才,蒋永新,伍治平,等.恶性肿瘤化疗多药耐药动物模型的实验研究[J].临床肿瘤学杂志,2006,11(4):283-285.
[7] Dong Z, Radinsky R, Fan D, et al.Organ specific modulation of steady-state mdr gene expression and drug resistance in murine colon cancer cells[J].Journal of the National Cancer Institute, 1994, 86(12): 913 -920.
[8] 范维珂.现代肿瘤学基础[M].北京:人民卫生出版社,2005.217 -218.
[9] Snow K, Judd W.Characterization of adriamycin and amsacrineresistant human leukaemic T cell lines[J].British Journal of Cancer, 1991, 63(1): 17-28.

(责任编辑:关蕴良)

inserted target genes in plasmid were verified by nucleotide sequencing and enzymes. fragments of LMP-1 gene were constructed firstly into the plasmid vector pBudCE4.1, fragments of LMP-3 gene were constructed into the plasmid vector pBudCE4.1-LMP-1 after identification with nucleotide sequencing and enzymes. MSCs cell line was transfected with this Co-expression plasmid using lipofectin reagent. according to the transfect situation, the MSCs were divided into 5 groups, the non-transfected group (Group A), the group transfected by empty vector (Group B), the group transfected by LMP-1 (Group C), the group transfected by LMP-3 (Group D) and the group transfected both LMP-1 and LMP-3 (Group E). the expression of LMP-1 and LMP-3 were detected by RT-PCR and Western blot technique. *Results*: The plasmids Puc57-LMP-1、Puc57-LMP-3 and pBudCE4.1-LMP-1-LMP-3 were obtained successfully and verified by nucleotide sequencing and enzymes. After transfection with this mammalian Co-expression plasmid, the LMP-1 and LMP-3 molecules were expressed in MSCs cells. The results of RT-PCR and Western Blot were measured with the grey value. To the expression of mRNA and protein of LMP-1, the diferences between groups A、B and groups C、D、E were significant ($P<0.05$). the diferences between groups C and E were not significant ($P>0.05$); To the expression of mRNA and protein of LMP-3, the diferences between groups A、B and groups C、D、E were significant ($P<0.001$). the diferences between groups D and E were significant ($P<0.05$); the expression of LMP-1 or LMP-3 between groups C and D were not significant ($P>0.05$). *Conclusion*: the constructed mammalian Co-expression plasmid pBudCE4.1-LMP-1-LMP-3 can express LMP-1 and LMP-3 molecules in vitro at the same time.

【Key words】 LMP-1; LMP-3; Puc57 plasmid; pBudCE4.1 plasmid; MSCs

LIM 矿化蛋白(LIM mineralization protein, LMP)是一个细胞内非分泌的骨生成诱导蛋白,1998 年由 Boden 等[1]在研究糖皮质激素促骨髓间充质细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)向成骨细胞分化机制中发现,是成骨细胞分化的正性调节因子。现已发现 3 种亚型,LMP-1、LMP-2、LMP-3,其中 LMP-1 和 LMP-3 具有成骨作用。本实验采用 pBudCE4.1 真核双表达质粒携带 LMP-1 及 LMP-3 双基因并转染骨髓 MSCs,检测其在体外的表达,以证实携带 LMP-1 和 LMP-3 双基因的骨髓 MSCs 作为种子细胞表达目的基因的有效性并比较与携带 LMP-1 或 LMP-3 单基因的骨髓 MSCs 差别。

1 材料和方法

1.1 主要材料

纯种新西兰大白兔 2 只由重庆医科大学动物中心提供;含 *Hind* Ⅲ/*BamH* Ⅰ 酶切位点的人 LMP-1 基因片段及含 *Xhol/kpn* Ⅰ 酶切位点的人 LMP-3 基因片段由南京金思特科技有限公司设计合成;质粒 Puc57 购于百奥迈科生物技术有限公司;真核双表达载体 pBudCE4.1 及转染试剂 Lipofectamine2000 购于美国 Invitrogen 公司;质粒抽提试剂盒购于 Promega 公司;一抗:兔多克隆抗体购于 santa cruz 公司;二抗:羊抗兔 HRP 标记购于北京中彩公司。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 Puc57-LMP-1 和 Puc57-LMP-3 的构建 将含 *Hind* Ⅲ/*BamH* Ⅰ 酶切位点的人 LMP-1 基因片段以 3:1(摩尔比)的比例与质粒 Puc57 进行连接反应,并转化 DH5a 感受态细菌扩增,提取质粒 Puc57-LMP-1 行 *EcoR* Ⅰ/*SaL* Ⅰ 酶切鉴定。用同样方法构建 Puc57-LMP-3 质粒,经 *EcoR* Ⅰ/*Hind* Ⅲ 酶切,再进一步分别进行序列分析,序列测定由南京金思特科技有限公司协助完成。

1.2.2 重组质粒 pBudCE4.1-LMP-1-LMP-3 的构建 回收 Puc57-LMP-1 和 Puc57-LMP-3 的酶切产物,LMP-1 与真核双表达质粒 pBudCE4.1 进行连接反应,连接液转化 DH5a 感受态细菌,提取质粒经酶切鉴定及序列分析证实 pBudCE4.1-LMP-1 构建成功后,再进行与 LMP-3 的连接,步骤同前,同样对重组双表达质粒 pBudCE4.1-LMP-1-LMP-3 进行酶切及测序鉴定。

1.2.3 pBudCE4.1-LMP1-LMP3 的体外表达 新西兰大白兔 2 只,采用骨髓密度梯度离心并结合贴壁筛选法[2],分离骨髓 MSCs。取兔骨髓 MSCs 以 $1\times10^5\sim2\times10^5$ 个/孔的密度接种于 6 孔板后置于 37℃,5%CO_2,温箱孵育 18~24 h。待细胞生长融合达约 70%时进行转染。将用质粒 DNA 抽提试剂盒抽得的质粒 pBudCE4.1-LMP1-LMP3, 重新沉淀并用双蒸水溶解使其浓度达到 1 μg/μl。

将质粒 pBudCE4.1-LMP1-LMP3、pBudCE4.1-LMP-3、pBudCE4.1-LMP-1、pBudCE 4.1 分别与脂质体按 1:3(μg:μl)比例混匀并加入无血清的 RPMI1640 培养基中,室温静置 30 min,并分别加入 6 孔板的 4 个孔中,另外 1 孔设为空白对照,每孔无血清的 RPMI1640 培养基的总体积为 2 ml。置于 37℃,5%CO_2 温箱孵育 4 h,按 10%的比例加入小牛血清继续培养。于第 72 h 收集细胞备用。

收集用 pBudCE4.1-LMP-1-LMP-3、pBudCE4.1-LMP-3、pBudCE4.1-LMP-1 及其 pBudCE4.1 转染的骨髓 MSCs(分别为 E、D、C、B 组)及其骨髓 MSCs(A 组)各 $5\times10^6\sim10\times10^6$ 个,按 Invitrogen 公司操作说明提取总 RNA,采用 Takara 一步法试剂盒行 RT-PCR 检测 LMP-1 和 LMP-3 的表达。

同时收集转染后的各组骨髓 MSCs 约 3×10^6 个,采用 PBS 漂洗,加入冰预冷的裂解液后,收集细胞裂解物于 EP 管

中。超声波粉碎细胞,4℃下,离心半径 15 cm,12 000 r/min,离心 10 min;收集上清液,取 5 l 测定蛋白浓度。以每泳道 10 μl (3 μg/μl)加入 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳槽中进行电泳;电泳完毕后转移至醋酸纤维素薄膜;室温下脱脂奶粉封闭 3 h 后加入一抗兔多克隆抗体(1:800),4℃过夜,TBST 洗膜 3 次;室温下二抗羊抗兔 HRP 标记(1:2 000)孵育 2 h,TBST 洗膜后,将膜浸入 DAB 显色液中,室温闭光显色 20 min,蒸馏水终止反应。

1.3 统计学方法

利用软件 Quantity One 测定 RT-PCR 及 Western Blot 条带的灰度值,并与内参照 GAPDH 灰度值进行比较,计算其比值,采用 SPSS12.0 统计软件包进行分析,组间比较采用方差分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,P 值<0.05 为有统计学意义。

2 结 果

2.1 重组质粒 pBudCE4.1-LMP-1-LMP-3 的构建与鉴定

质粒 Puc57-LMP-1 经 *EcoR* Ⅰ/*SaL* Ⅰ双酶切后回收、纯化约 1 380 bp 片段(图 1),与真核双表达质粒 pBudCE4.1 进行连接反应,并转化 DH5a 感受态细菌扩增,随机挑选并提取质粒。对重组质粒再行 *Hind* Ⅲ/*BamH* Ⅰ酶切鉴定(图 3)。命名为 pBudCE4.1-LMP-1。pBudCE4.1- LMP-1 序列分析显示重组质粒 pBudCE4.1-LMP-1 中插入基因长 1 380 bp,与 GenBank 中公布的人 LMP-1cDNA 序列完全相符,说明所获的 LMP-1 基因的正确性。

质粒 Puc57-LMP-3 经 *EcoR* Ⅰ/*Hind* Ⅲ双酶切后回收、纯化 462 bp 片段(图 2),与 pBudCE 4.1-LMP-1 连接,并转化 DH5a 感受态细菌扩增,随机挑选并提取质粒。行 *Xhol/kpn* Ⅰ双酶切鉴定(图 4),命名为 pBudCE4.1-LMP-1-LMP-3。测序结果显示重组质粒 pBudCE 4.1-LMP-1 -LMP-3 插入基因长 462 bp,与 GenBank 中公布的人 LMP-3cDNA 序列完全相符,说明所获的 LMP-3 基因的正确性。证实构建重组质粒 pBudCE4.1-LMP1-LMP3 成功。

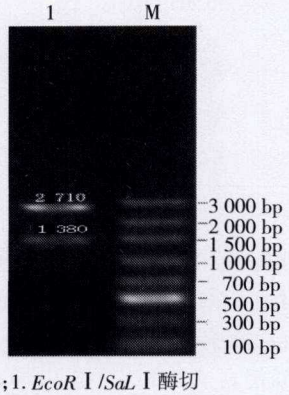
2.2 LMP-1 和 LMP-3 在骨髓 MSCs 中的表达

2.2.1 RT-PCR 检测 LMP-1 mRNA 和 LMP-3 mRNA 的表达 LMP-1 mRNA 表达:A、B 组和 C、D、E 组组间差异有统计学意义(P<0.05);LMP-1 mRNA 的表达,E 组表达稍多,条带较强,C 组次之,但二者差别无统计学意义(P>0.05),A、B、D 组仅微弱表达(图 5,表 1);LMP-3 mRNA 的表达,A、B 组和 C、D、E 组组间差异有统计学意义(P<0.001);E 组条带最强、表达最多,D 组次之,且二者差异有统计学意义(P<0.05),C 组较 A、B 组表达稍强(图 6,表 1)。C 组和 D 组在 LMP-1 mRNA 及 LMP-3 mRNA 的表达上差异均无统计学意义(P>0.05)。

2.2.2 Western blot 检测 LMP-1 和 LMP-3 蛋白的表达 pBudCE4.1-LMP-1-LMP-3 在阳离子脂质体的介导下转染 MSCs 细胞,扩大培养,收集细胞裂解产物经 100 g/L SDS-PAGE 蛋白电泳后,Western blot 检测结果发现,细胞中有针对 LMP-1 及 LMP-3 抗体的特异性条带。说明重组质粒 pBudCE4.1-LMP-1-LMP-3 转染骨髓 MSCs 后可表达 LMP-1 和 LMP-3蛋白。LMP-1 蛋白的表达,E 组表达稍多,C 组其次,两组间差别无统计学意义 (P>0.05);LMP-3 蛋白的表达,E 组较其他各组明显增强、浓聚,表达水平明显升高,D 组次之,两组间差异有统计学意义(P<0.05),C 组和 D 组在 LMP-1 及 LMP-3 蛋白水平表达上的差异均无统计学意义(P>0.05)(见图 7、图 8、表 1)。

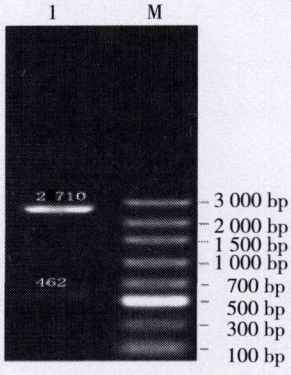
3 讨 论

LMP 是骨诱导信号通路中一个早期细胞内因子,可以促进多种骨诱导因子的分泌, 如 BMP-2,BMP-4,BMP-7 等[3],使成骨信号放大,启动骨形成的激联反应。近年来有研究表明,LMP-1 和 LMP-3 属于同源蛋白有着相似但却不同的生化作用。LMP-1 主要在骨骼中表达,它促进成骨细胞骨钙素的分泌及骨结节的形成,主要在骨的钙化阶段起作用[4]。Boden S D 等[5]应用 LIM 矿化蛋白 -1(LMP-1)对 14 个无胸腺大鼠进行单节段胸椎和腰椎后路融合实验,行局部融合的基因治疗,发现应用 LMP-1cDNA 转染的骨髓细胞组均获得成功融合,结果证明在鼠活体局部应用 LMP-1 cDNA 可以获得良好的脊椎融合。Pola E 等[6]利用转基因技术,借助于质粒和腺病毒载体将 hLMP-3 导入体内或真核细胞,可以诱导骨特异性基因表达,如骨钙素和硅铝蛋白。同时也发现可诱导 MSCs 中骨特异基因的表达,如 BMP-2,碱性磷酸酶等,hLMP-3 诱



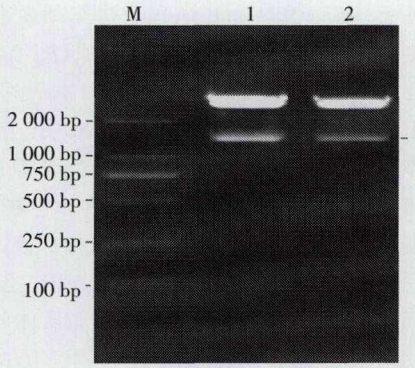
M. Marke; 1. *EcoR* Ⅰ/*SaL* Ⅰ酶切

图 1 Puc57-LMP-1 质粒酶切鉴定



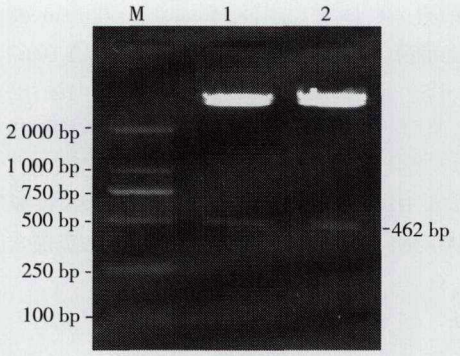
M. Marker; 1. *EcoR* Ⅰ/*Hind* Ⅲ 酶切

图 2 Puc57-LMP-3 质粒酶切鉴定



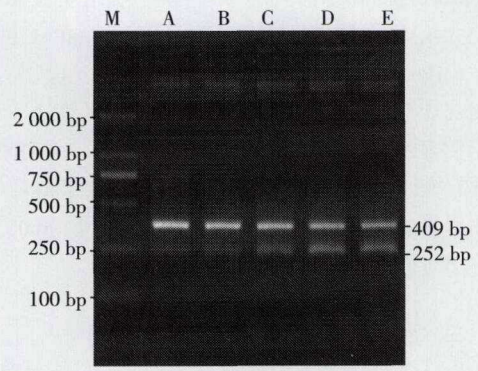
M. Marker 1 和 2 *Hind* Ⅲ/*BamH* Ⅰ酶切

图 3 pBudCE4.1-LMP-1 质粒酶切鉴定



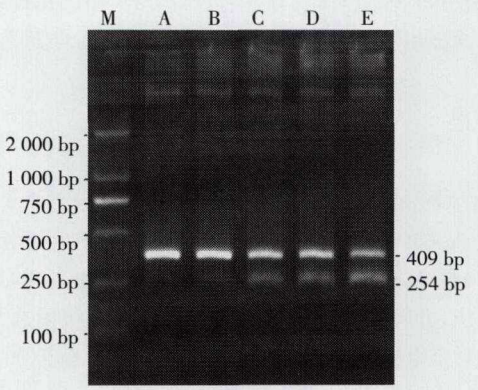
M. Marker 1 和 2 *Xhol/kpn* Ⅰ酶切

图 4 pBudCE4.1-LMP-1-LMP-3 质粒酶切鉴定



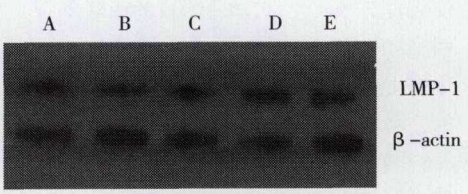
M. DNA Maker A. MSCs ;B. pBudCE4.1 ; C. pBudCE4.1-LMP-1;
D. pBudCE4.1-LMP-3 ; E. pBudCE4.1-LMP-1-LMP-3

图 5 RT-PCR 检查 LMP-1mRNA 的表达



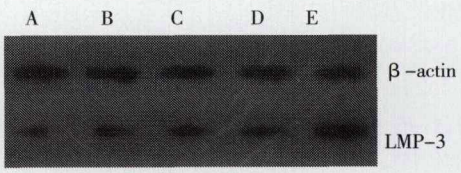
M. DNA Maker; A. MSCs B. pBudCE4.1 ; C. pBudCE4.1-LMP-1 ;
D. pBudCE4.1-LMP-3 ; E. pBudCE4.1-LMP-1-LMP-3

图 6 RT-PCR 检查 LMP-3mRNA 的表达



A. MSCs ; B. pBudCE4.1 ; C. pBudC-E4.1-LMP-1
D. pBudCE4.1-LMP-3 ; E. pBudCE4.1-LMP-1-LMP-3

图 7 LMP-1 蛋白的表达



A. MSCs ; B. pBudCE4.1 ; C. pBudCE4.1-LMP-1 ;
D. pBudCE4.1-LMP-3 ; E. pBudCE4.1-LMP-1-LMP-3

图 8 LMP-3 蛋白的表达

表 1 LMP-1 和 LMP-3 mRNA 及蛋白的表达（n=4，$\bar{x} \pm s$）

组别	LMP-1		LMP-3	
	LMP-1 mRNA	LMP-1 蛋白	LMP-3 mRNA	LMP-3 蛋白
A 组	0.306 ± 0.070	0.362 ± 0.117	0.305 ± 0.098	0.384 ± 0.029
B 组	0.423 ± 0.138	0.419 ± 0.030	0.361 ± 0.113	0.523 ± 0.074
C 组	0.926 ± 0.180*	0.540 ± 0.081*	0.457 ± 0.087	0.611 ± 0.047
D 组	0.729 ± 0.221	0.850 ± 0.366	0.631 ± 0.038#	0.672 ± 0.037#
E 组	1.020 ± 0.013	0.748 ± 0.119	0.962 ± 0.148	1.060 ± 0.131

*：与 E 组比较 P 值>0.05，#：与 E 组比较 P 值<0.05

导骨矿化的能力呈剂量依赖性。为全面认识 LMP-1 与 LMP-3 在修复骨缺损，促进骨融合等方面是否有协同效应，需要将基因转导入细胞内进行研究，但在此之前证实两者在细胞内的一定水平的表达是必要的前提。

杨渝勇等[7]已成功构建 LMP-3 功能区真核表达质粒。而本实验选用 pBudCE4.1 则是真核双表达质粒载体，其含有 CMV 和 EF-1α 双启动子，可以实现两个基因的同时表达。利用该质粒这种特性我们构建了一个含有 LMP-1 和 LMP-3 双基因的重组真核双表达质粒 pBudCE4.1-LMP-1- LMP-3，并观察其在体外表达情况。动物实验之前，必须验证重组质

粒是否可以在骨髓 MSCs 中同时表达。我们选择骨髓 MSCs，是因为骨髓 MSCs 具有多向分化潜能，是组织工程常用的种子细胞，其本身亦可向成骨细胞分化，具有来源广泛，取材方便、增殖和分化能力强、能与宿主骨良好结合的优点。研究表明利用 MSCs 作为种子细胞，在骨与软骨组织工程的应用中得到了令人满意的结果[8]。当今组织工程技术中，将诱导因子基因导入骨髓 MSCs，将其作为种子细胞置入局部，以期获得该因子的持续释放从而诱导骨的生成，这成为修复骨缺损、促进脊柱融合等的理想方法[9]。

本研究中 LMP 由于在骨诱导信号通路中的关键作用，作为目的基因，不需要转染每一个受体细胞，也不需要长时间的表达就可以产生较强的成骨效应，故 LMP 较其他骨诱导因子更适合于基因治疗。实验首先从人工设计合成并含有酶切位点的人 LMP-1 和 LMP-3 基因片段与中介质粒 Puc57 连接反应开始，并经酶切及测序鉴定正确，先后导入真核双表达质粒 pBudCE4.1 多克隆位点中，LMP-1 和 LMP-3 分别连接在 CMV 启动子与 EF-1a 启动子之后的多克隆位点，构建真核双表达质粒 pBudCE4.1-LMP-1-LMP-3。该质粒经限制性核酸内切酶酶切鉴定及 DNA 序列证实：目的基因LMP-1 和 LMP-3 序列正确；目的基因 LMP-1 和 LMP-3 正确构建于真核双表达质粒 pBudCE4.1 的多克隆位点中。进而将重组质粒体外转染骨髓 MSCs，通过 RT- PCR 及 Western blot 检测 LMP-1 和 LMP-3 表达情况，结果显示转染后的骨髓 MSCs 可表达 LMP-1 和 LMP-3，表达的 LMP-1 和 LMP-3 能被一抗兔多克隆抗体和二抗羊抗兔 HRP 标记特异性的识别，说明 pBudCE4.1-LMP-1-LMP-3 转染 MSCs 细胞后可表达LMP-1 和 LMP-3 蛋白。实验也从 mRNA 和蛋白水平上检测各组目的基因和蛋白的表达量，双基因转染组(E 组)与 LMP-1 基因转染组(C 组)的 LMP-1 基因和蛋白表达均高于未转染组(A 组)和转染空载体组(B 组)，但 E 组和 C 组的表达差异无统计学意义，同时见 LMP-3 基因转染组(D 组)也较高水平表达了 LMP-1。对于 LMP-3 基因和蛋白的表达：双基因转染组(E 组)较 LMP-3 基因转染组(D 组)表达水平明显增高，且差异有统计学意义，LMP-1 基因转染组(C 组)也较高水平表达了 LMP-3。单基因 C 组和 D 组在 LMP-1 及 LMP-3 的表达上的差异无统计学意义。对于实验 A、B 组均有微弱、少量的双基因表达作者认为与骨髓 MSCs 的生物学特性及其具备多样分化能力有关。我们的研究认为：双基因转染显著提高了 LMP-3 的表达水平，LMP-1 与 LMP-3 之间存在互表达作用。该实验为进一步研究和比较双基因与单基因转染的骨髓 MSCs 在体外、体内成骨能力上的差异打下基础。

参 考 文 献

[1] Boden S D, Liu Y, Hair G A, et al. LMP-1, a LIM-domain protein, mediates BMP-6 effects on bone formation [J]. Endocrinology, 1998, 139 (12): 5125-5234.

[2] Majumdar M K, Thiede M A, Mosca J D, et al. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells[J]. J Cell Physiol, 1998, 176(1): 57-66.

[3] Minamide A, Boden S D, Viggeswarapu M, et al. Mechanism of bone formation with gene transfer of the cDNA encoding for the intracellular protein LMP-1[J], J Bone Joint Surg Am, 2003, 85-A(6): 1030-1039.

[4] Pola E, Gao W, Zhou Y, et al. Efficient bone formation by gene transfer formation by gene transfer of human LIM mineralization protein-3[J]. Gene The, 2004, 11(8): 683-693.

[5] Kim H S, Viggeswarapu M, Boden S D, et al. Overcoming the immune response to permit ex vivo gene therapy for spine fusion with human type 5 adenoviral delivery of the LIM mineralization protein-1 cDNA[J]. Spine, 2003, 28(3): 219-226.

[6] 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.

[7] 杨渝勇，倪卫东. LMP-3 功能区真核表达质粒的构建[J]. 重庆医科大学学报，2008，5(33)：596-599.

[8] Zhang Q, Wang X, Chen Z, et al. Semi-quantitative RT-PCR analysis of LIM mineralization protein-1 and its associated molecules in cultured human dental pulp cells[J]. Arch Oral Biol, 2007, 52(8): 720-726.

[9] 李修洋，邓忠良，徐希彦，等. 人 LMP-1 基因腺病毒重组体构建及其在骨髓间充质干细胞的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复，2008，12(21)：4084-4088.

(责任编辑：关蕴良)