基础研究 文章编号：0253-3626(2009)05-0532-05

骨保护素的克隆及对骨髓间充质干细胞分化的影响

陈 富，徐希彦，柯珍勇，尹良军，郭常辉，王雪燕，林春阳，邓忠良
（重庆医科大学附属第二医院骨科，重庆 400010）

【摘 要】目的：克隆人骨保护素（Osteoprotegerin，OPG）基因并构建其重组腺病毒，观察其对 BMSCs 分化的影响. 方法：RT-PCR 方法从人肝克隆 OPG 基因全长 cDNA，利用穿梭质粒将 OPG 基因重组获得复制缺陷型重组腺病毒 AdOPG；分离培养兔骨髓间充质干细胞，使用 AdOPG 感染兔 BMSCs，以 RT-PCR 及 Western Blot 的方法鉴定 BMSCs 对 OPG 的表达。比色测定和细胞碱性磷酸酶染色法观察 AdOPG 感染 BMSCs 后 5 d 时碱性磷酸酶（ALP）的表达。结果：克隆获得人 OPG 基因，测序与 Gene bank 一致，构建的重组腺病毒 AdOPG 滴度达 10^9 efu/ml，AdOPG 感染 BMSCs 5 d 后 ALP 活性值为（21 024 ± 507）IU，AdGFP 对照组为（3 079 ± 89）IU，空白对照组为（2 156 ± 78）IU。结论：骨保护素有利于骨髓间充质干细胞向成骨细胞方向分化。

【关键词】腺病毒；人骨保护素；骨髓间充质干细胞
【中国图书分类法分类号】R336 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-04-01

作者介绍：陈 富（1968- ），男，讲师，
研究方向：骨质疏松性骨折治疗。
通讯作者：邓忠良，男，教授，E-mail：deng7586@gmail.com。
基金项目：国家自然科学基金（30672121）；重庆市教委科研课题（渝教科 2002-27）。

参 考 文 献

[1] Chen D Q，Zhu L L. Dynamic change of serum protein S100b and its clinical significance in patients with traumatic brain injury[J]. Chinese Journal of Traumatology，2005，8(4)：245-248.

[2] 刘海鹏，尹志勇，王正国，等.颅脑局部冲击伤——种新的颅脑损伤模型[J]. 中华实验外科杂志，1999，16(1)：91-93.

[3] Hoyt D B，Ozkan A N，Hansbrough J F，et al.Head injury：an immunology deficit inT cell activity [J] .Trauma，1990，30(7)：759-763.

[4] Gnllon P J，Davies M J.Biological variation in the development of sepsis after Surgery or trauma[J]. Lancet，1993，342(8865)：217-220.

[5] Rodriguez J L，Miller C G，Garner W L，et al. Correlation of the local and system rylokine response with clinical outcome following thernal injury [J]. Trauma，1994，34(5)：684-689.

[6] Hofsteter H H，Sewell D L，Liu F，et al.Autoreactive T cells promote post-traumatic healing in the central nervous system[J]. J Neuroimmunol，2003，134(1-2)：25-34.

[7] Miao Y L，Zhang M X，Nie Y L，et al.Changes in T lymphocyte subsets after severe traumatic brain injury[J]. Neural Regeration Research，2007，2(2)：126-128.

[8] McLare C A，Williom son J F，Stewart B J，et al. Indels and imperfect duplication have driven the evolution of human complement receptor I (CR1)and CR1-like from their precursor CR1 alpha：Importance of functional sets[J]. Hum Immunol，2005，66(3)：258-273.

[9] 沈关心，周汝麟.现代免疫学实验技术[M].武汉：湖北科学技术出版社，1998.232-340.

[10] 魏建军，周义英，王 敬.SD 和 Wistar 大鼠红细胞免疫功能测定[J]. 四川动物，1999，18(1)：41-42.

[11] 丁素菊，李永生，侯晓军，等.急性脑梗死患者红细胞免疫调控因子对红细胞免疫粘附功能的影响[J]. 中国神经精神疾病杂志，2003，29(2)：120-121.

[12] 章文斌，卜 博，周定标.脑出血患者红细胞免疫及 T 细胞亚群的变化[J]. 中国临床康复，2004，19(8)：3790-3791.

[13] 朱新波，王菊香，林 丹. 纳洛酮对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤血浆 β-EP 和 VIP 的影响[J]. 中国药理学通报，2005，21(6)：760-761.

[14] 洪新如，李 明，高建章，等.大鼠创伤后血浆 β-内啡肽的动态变化及意义[J]. 中华外科杂志，1994，32(4)：220-223.

[15] 王玉龙，杨文东，安振国，等.红细胞 CR1 在急性颅脑损伤患者表达及免疫功能的探讨[J]. 细胞与分子免疫学杂志，2003，19(2)：206-208.

[16] 孙志阳，赵孟尧，郭 峰，等.脑损伤红细胞免疫功能变化及临床意义[J]. 中华神经外科，1995，11(3)：138-141.

（责任编辑：冉明会）

The clone of OPG and its effects on the differentiation of bome morrow stem cells

CHEN Fu, et al

(*Department of Orthopaedics, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To clone the OPG gene of human being and construct its recombinant adenovirus and then observe its effects on the differentiation of bone marrow stem cells(BMSCs). *Methods*: The cDNAs of human OPG in hepatic tissue were obtained by using RT-PCR method.The cDNAs then were recombined with competent homologous cells to form the AdOPG and the shuttle vector was used during this stage. The rabbit BMSCs were isolated and cultured in vitro, and were infected with AdOPG. The OPG expression of BMSCs was identified by RT-PCR and Western blot. The expression of ALP was detected by chromatometry and ALP dyeing five days after the infection. *Results*: The OPG gene of human being was successfully cloned and its sequence consistent with the Gene bank. The titre of constructed AdOPG can reach 109 efu/ml. The ALP activity of BMSCs was (21 024 ± 507) IU five days after the infection of AdOPG, whereas the value was (3 079 ± 89) IU in the control group and (2 156 ± 78) IU in the blank control group. *Conclusion*: The OPG can induce the osetogeinc differentiation of BMSCs.

【Key words】Adenovirus; Human OPG; Bone marrow stem cells

克隆人骨保护素(Osteoprotegerin, OPG)是 1997 年在大鼠小肠表达序列标签 cDNA 计划中克隆得到的蛋白质,最初因其可以增加松质骨骨量,具有拮抗去卵巢 Fisher 大鼠骨丢失的作用,故称为骨保护蛋白[1]。它是可溶性肿瘤坏死因子受体超家族的成员,人 OPG 的 mRNA 序列为 1 356 bp(Gene bank accession No. U94332),cDNA 序列为 1 206 bp。OPG 以单体和二聚体两种形式存在,OPG 常以单体形式在胞内合成,通过二硫键连成二聚体分泌至胞外[2]。OPG 基因敲除动物表现严重的骨质疏松; 转 OPG 基因鼠由于表达超过生理水平的 OPG 可导致明显的骨质硬化,敲除 RANKL 和 RANK 基因的鼠也表现为骨质硬化[3]。采用重组人骨保护素蛋白治疗卵巢切除雌激素下降鼠,可预防骨丢失[4]。近年研究明确了 OPG 抑制破骨细胞分化和成熟的作用,显示了 OPG 用于治疗骨质疏松的良好前景。

基于间充质干细胞具有能大量增殖、分化为多种组织细胞和表达外源目的基因等优点,可能成为用于临床的组织工程化骨种子细胞,故本实验采用了兔 BMSCs。

将成骨作用较强的诱骨因子基因导入骨髓间充质干细胞而发挥其成骨作用是目前基因治疗及组织工程技术较理想的方法。到目前未见有关 OPG 对 BMSc 成骨分化影响的研究报道。我们利用 AdEasy 腺病毒表达系统介导 OPG 转导骨髓基质干细胞并观察其体外表达,并初步研究其对碱性磷酸酶的影响,为进一步的体内局部基因治疗奠定良好基础[5]。

1 材料和方法

1.1 材料

AdEasy 腺病毒表达由美国 Tong-Chuan He 博士惠赠,人胚肾 293 细胞、pGEM-T 测序载体、大肠杆菌 DH5α 由重庆医科大学检验系王宏兵硕士惠赠,PCR 试剂盒、RT-PCR 试剂盒、细胞总 RNA 提取试剂、转染试剂 LipofectAMINE2 000, TRIzol 购自 Gibco 公司,抗 OPG 抗体、抗 HRP 抗体为 Invitrogen 公司产品,各种限制性内切酶购自 TaKaRa 公司,*Pme* Ⅰ, *Pac* Ⅰ为 New England Biolabs 公司产品,小量质粒提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、T4 DNA 连接酶均购自 Promega 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 人肝总 RNA 的提取及反转录采用 TRIzol 试剂一步法提取肝总 RNA。设计并合成与 OPG 基因引物,并引入 *Kpn* Ⅰ和 *Hind*Ⅲ酶切位点,使用 Gibco 公司的反转录试剂盒反转录得 cDNA。

1.2.2 PCR 扩增人 OPG 基因 根据 GenBank 中报道的人 OPG 序列,设计合成一对扩增引物,其上游引物为: 5'-GGGGTACCATGGATTCCCAAGTTGCTGTGC-3',含 *Kpn* Ⅰ酶切位点; 下游引物为: 5'-CCCAAGTTTCACACTTATAAGCAGCTTA-3',含 *Hind*Ⅲ酶切位点。以上述反转录产物为模板进行常规 PCR 反应后,取 4 μl PCR 产物在琼脂糖凝胶(15 g/L)中电泳分析。

1.2.3 人 OPG 基因测序及腺病毒穿梭载体的构建 取 PCR 产物及约 4 μg 的 pGEM-T 测序载体分别经 *Kpn* Ⅰ和 *Hind*Ⅲ双酶切,各自回收并纯化片段及载体后进行连接、转化,筛选获得阳性克隆。经 *Kpn* Ⅰ和 *Hind*Ⅲ双酶切及前述特异性引

物 PCR 扩增反应对重组质粒进行鉴定后，重组质粒命名为 pGEM-T-OPG 由上海生工公司测序，测序正确克隆扩大培养后低温保存，将测序正确的 OPG 基因亚克隆至 pAdTrack-CMV 穿梭质粒的 *Kpn* Ⅰ和 *Hind*Ⅲ位点间，经连接、转化并经双酶切进行鉴定，重组穿梭质粒命名为 pAdTrack-OPG。

1.2.4 细菌内同源重组 hBMP27 腺病毒质粒 用 20%冰浴冷的无菌甘油制备 AdEasier-1 Cells 及 E.coli DH5α 电穿孔感受态菌，提取重组质粒 pAdTrack-OPG 用 *Pme* Ⅰ酶切线性化，电泳回收片段取约 1 μg 与 20 μl 腺病毒骨架质粒感受态细胞 AdEasier-1 Cells 混合，$CaCl_2$ 法共转化感受态菌，卡那霉素(60 mg/L)固体 LB 培养基筛选，16 h 后随机挑取 15 个克隆，提质粒。挑选电泳鉴定大小与 pAdEasy-1 相似的质粒，$CaCl_2$ 法转化 *E.coli* DH5α 感受态菌，大量提取重组腺病毒质粒并 *Pac* Ⅰ酶切鉴定，命名为 pAd-OPG。

1.2.5 OPG 重组腺病毒的制备及滴度测定 转染前 24 h 将 293 细胞以接种于 60 mm 培养皿待细胞密度生长至 60%～80%时，将 pAd-OPG 质粒用 *Pac* Ⅰ(NEB)酶切回收后取 3 μg 线性化质粒，取 Lipofectamine2000 试剂按照说明书转染 293 细胞，24 h 后更换含 10%胎牛血清的新鲜培养液，24 h 后通过荧光显微镜观察 GFP 的表达。9 d 后收集 293 细胞于液氮和 37℃水浴中反复冻融 4 次，超声波粉碎细胞，离心取病毒上清再次感染 293 细胞进行扩增，4 d 后收集细胞，1 500 r/min 离心 5 min 小心弃上清以 PBS 重悬，反复冻融 4 次；重复感染、收集步骤，将最终收集的 PBS 重悬病毒上清用氯化铯(CsCl)梯度离心纯化。将 293 细胞接种于 96 孔板，于次日待细胞生长约 70%～80%后，将病毒上清倍比稀释分别感染细胞，24 h 后荧光显微镜下计算表达 GFP 细胞个数，测定 AdOPG 滴度。

1.2.6 兔骨髓间充质干细胞的取材培养及 OPG 基因的转导

按照文献[6,7]的方法分离兔骨髓间充质干细胞。由于兔 BMSc 缺乏特有的表面标记物，因此其鉴定是通过培养过程中出现 2 的分化表型如 ALP 染色、钙染色、HE 染色及电镜观察及三系分化等来证实[8]。取生长良好的兔骨髓间充质干细胞以 5×10^5 个/皿接种于 60 mm 培养皿，将 Ad-OPG 病毒以 MOI 为 50、100、150、250 的腺病毒感染 BMSCs，每组设置 2个孔，同时设立不加腺病毒的对照孔。感染细胞，3 d 后观察 GFP 的表达，确定感染效率。

1.2.7 RT-PCR 和 Western 检测 BMSCs 中 OPG 基因的表达

以最佳 MOI 值感染体外培养的 BMSCs，同时设立不含任何基因的腺病毒对照组，3 d 后以 Trizol 试剂盒提取转染细胞总 RNA 后，逆转录反应同前，取 4 μl PCR 产物，在含溴化乙锭的琼脂糖凝胶中电泳分析，紫外观测仪观察结果.同时亦提取蛋白，测定其浓度后，用 OPG 的特异性抗体行 Western Blot 检测。

1.2.8 磷酸酶检测 用比色法检测感染 OPG 腺病毒重组体 3 d 后的 BMSCs 的碱性磷酸酶活性，并同时进行细胞的碱性磷酸酶染色，观察其与感染未携带基因的腺病毒 BMSCs 组的差异。

2 结 果

2.1 RT-PCR 产物的鉴定

RT-PCR 产物在溴化乙锭的琼脂糖凝胶中电泳分析，紫外观测仪观察结果，可见在 1 200 bp 左右出现 1 条较淡的扩增条带，将此条带回收再次 PCR，电泳可见特异性条带，与目的基因大小相符。

2.2 pGEM-T-OPG 序列测定及重组质粒 pAdTrack-OPG 的酶切鉴定

对 pGEM-T-OPG 序列测定分析表明该序列与 GenBank 中序列比较，虽有 2 个核苷酸的变异，但所编码氨基酸序列完全一致。重组质粒 pAdTrack-OPG 经 *Kpn* Ⅰ和 *Hind*Ⅲ双酶切后，行琼脂糖凝胶电泳鉴定可见清晰地切出与 OPG 基因大小相符的片段并与 DNA marker 相符。

2.3 重组腺病毒质粒 pAd-OPG 质粒的酶切鉴定

Pac Ⅰ酶切 pAd-LMP1 质粒，理论上应出现分别约为 33 kb 和 4.5 kb；实际切出 1 条大于 23 kb 的亮带和前方 1 条 4.5 kb 的亮带(图 2~6)，提示同源重组获得成功。

2.4 OPG 腺病毒重组体的滴度测定及感染 BMSCs 的效率

按下列公式计算病毒滴度：

病毒滴度(efu/ml)= GFP 阳性细胞数×病毒稀释倍数/0.2 ml，结果为 3.5×1 098 efu/ml。

病毒在以最佳 MOI(MOI=150)感染 BMSCs 3 d 后，获得 50%~70%的感染率。

2.5 RT-PCR 检测 OPG 基因的 mRNA 表达

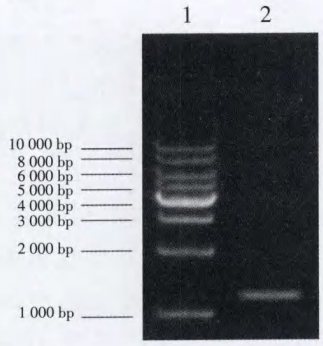
取 Ad-OPG 感染组及对照组细胞于感染后 72 h 提取细胞总 RNA，进行 RT-PCR 检测，以 β-actin 为内参，结果显示外源 OPG 基因在兔的 BMSCs 中在 mRNA 水平得到表达，而对照组没有检测到相应大小的特异性片段。

2.6 Western Blot 检测 OPG 蛋白的表达

取 Ad-OPG 感染组及对照组细胞于感染后 72 h 提取细胞蛋白，结果显示 AdOPG 感染组出现 60 kD 左右的目的蛋白带。这说明获得的高滴度 AdOPG 在体外感染 BMSCs 后能有效地表达 OPG 蛋白。

2.7 感染 Ad-OPG 后 BMSCs 的碱性磷酸酶检测

在 24 孔培养皿中培养 3 组不同处理的兔骨髓



1. DNA Ladder Marker；2. hOPG

图 1　PCR 克隆 hLMP-1 电泳图



1. DNA Marker；2. pAdTrack-OPG；
3. pAdTrack-OPG(*Hind* Ⅲ+*Kpn* Ⅰ)

图 2　重组质粒 pAdTrack-OPG 的酶切鉴定



1. λ－*Hind* Ⅲ degest Marker；2. pAd-OPG；3. pAd-OPG (*Pac* Ⅰ)

图 3　重组腺病毒质粒 pAd-OPG 的酶切鉴定

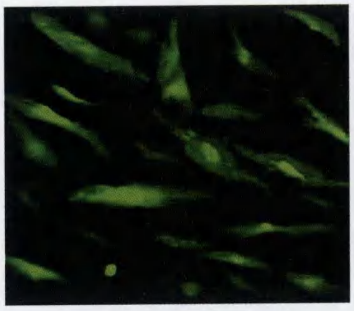
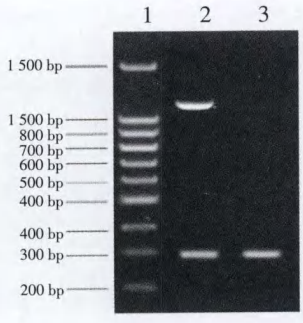
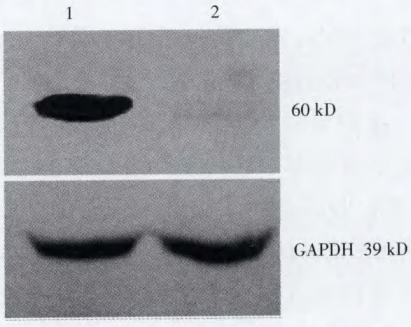


图 4　腺病毒 Ad-OPG 感染兔 BMSCs 3 d 后在荧光显微镜下的图像



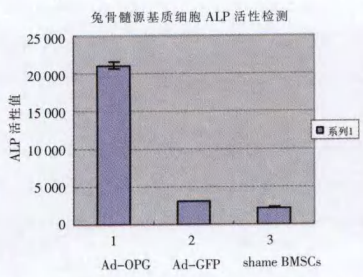
1. Marker；2. AdOPG 感染 BMSCs；3. AdGFP 感染 BMSCs

图 5　BMSCs 表达 OPG

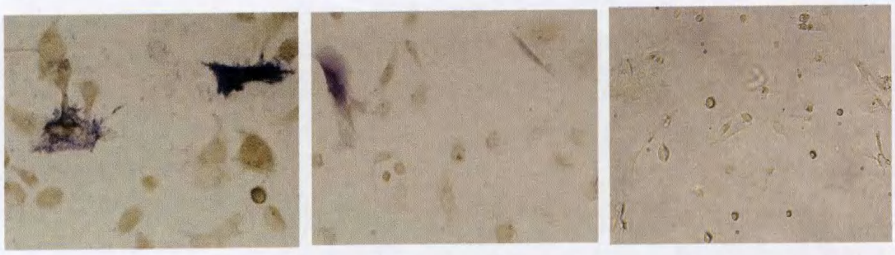


1. Ad-OPG-infected group；2. Ad-GFP-infected group

图 6　实验组间 OPG 蛋白表达的 Western Blot 检测



A.兔 BMSCs 的碱性磷酸酶活性比色法检测



B. Ad-OPG-infected group；C. Ad-GFP-infected group；D. shame BMSCs group

图 7　BMSCs 的碱性磷酸酶染色图片

源基质细胞,每组 3 孔,并用比色法检测感染 5 d 时 OPG 腺病毒重组体的 BMSCs 的碱性磷酸酶活性,并同时进行细胞的碱性磷酸酶染色,重复实验 5 次。结果显示,OPG 腺病毒重组体的感染组碱性磷酸酶活性值为 (21 024±507)IU,Ad-GFP 组的 ALP 活性值为(3 079±89)IU,未处理的 BMSCs 组的 ALP 活性均值为(2 156±78)IU。经统计学分析证明 Ad-OPG 组的 ALP 活性明显高于其它两组,而未处理组和 Ad-GFP 组的 ALP 活性没有明显区别。证实携带 OPG 基因的腺病毒重组体感染兔 BMSCs 后,可以增强 ALP 的分泌及活性。

3 讨 论

2001 年 Becker 等首先报道采用人骨保护素蛋白经皮下注射的临床应用[9]。但如何提高 OPG 的浓度和量以满足研究的需要是未解决的问题。

传统的细胞内同源重组腺病毒载体制备方法[10]是先将目的基因亚克隆至穿梭质粒中构建成转移质粒,再与腺病毒基因组质粒共转 293 细胞,两质粒借所带的部分同源序列细胞内发生同源重组而形成重组体,并进一步包装成重组腺病毒颗粒。该方法要求两种质粒的共转染及同源重组必须同时发生 293 细胞内,才有可能形成重组体并包装成病毒,涉及的步骤较多、成功率较低、工作量大、实验周期长。我们采用新型的细菌内同源重组法[4]来制备重组腺病毒载体,与细胞内同源重组法的不同之处在于,质粒共转染和同源重组均在细菌内完成,我们采用的 pAdEasy 系统具有明显优点:①腺病毒质粒的同源重组在大肠杆菌中高效进行,且细菌繁殖快,同源重组能力强,因而从根本克服细胞内同源重组率低的缺陷。②腺病毒中可插入10 000 bp 的基因片段或同时插入多个基因片段。③由于在腺病毒骨架中含有的 GFP 报告基因,非常便于我们监测病毒包装成功与否、检测病毒滴度及感染效率等。所有这些都避免了病毒的空斑克隆纯化过程,大大减少了病毒的制备时间。因此,细菌内同源重组法是一种快速、高效、简便、可行的重组体腺病毒载体制备方法,值得进一步推广应用。

骨质疏松的病理表现为一方面由于破骨细胞活性增高和数量增多导致的骨吸收增加,另一方面为成骨细胞的成骨能力下降。因此治疗骨质疏松应从两方面入手,即抑制破骨细胞活性的同时应采取措施增加成骨细胞数量和增强其成骨活性。OPG 能否对成骨细胞的形成发挥作用的问题就需要我们进行回答。

我们通过采用新型高效腺病毒表达系统成功包装出 OPG 重组腺病毒并转染兔 BMSc,RT-PCR 及 Wesern Blot 证实 OPG 在靶细胞中的有效表达。带 OPG 基因的腺病毒重组体感染 BMSCs 后,增强了早期成骨分化标志基因 ALP 的表达及活性。说明 OPG 具有利于骨髓间充质干细胞成骨分化的作用,但机制尚需进一步研究。

参 考 文 献

[1] Simonet W S,Lacey D L,Dunstan C R,et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density[J]. Cell, 1997,89(2): 309-319.

[2] Demers L M. Bone markers in management of patients with skeletal metastases[J]. Cancer,2003,97(3): 874-879.

[3] Kong Y Y. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis,lymphocyte development and lymph node organogenesis[J]. Nature,1999,397(6717): 315-323.

[4] Aubin J E,Bonnelye E. Osteoprotegerin and its ligand:A new parad igm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption[J]. Women's Health,2000,5(2):5.

[5] Lopez-Coviella I,Berse B,Krauss R,et al. Induction and maintenance of the neuronal cholinergic phenotype in the central nervous system by BMP-9[J]. Science,2000,289 (5477):313-316.

[6] Boden S D,Liu Y S,Gregory A H,et al. A LIM-domain protein, mediates BMP-6 effects on bone formation[J]. Endocrinokogy,1998,139 (12):5125-5134.

[7] Lv T,Tian J,Zhu J,et al. The abstraction and cultivation of bone morrow stromal cells[J]. Journal of Chongqing Medical University,2004,6 (29):715-717.

[8] Minamide A,Boden S D,Viggeswarapu M,et al. Mechanism of bone formation with gene therapy of the cDNA encoding for the intracelular protein [J]. Journal of Bone and Joint Surgery,2003,85(6):1030-1039.

[9] Bekker P J,Holloway D,Nakanishi A,et al. The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women[J]. J Bone Miner Res, 2001,16(2):348-360.

[10] Bett A J,Haddara W,Prevec L,et al. An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1994,91 (19):8802-8806.

(责任编辑:冉明会)