DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.05.007
第24卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 5
2002年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2002

文章编号:1000-5404(2002)05-0513-03

论著

骨形态发生蛋白3基因转染成纤维细胞后细胞形态及生物学变化

谭祖键[1],胡蕴玉[2] ([1]第三军医大学附属西南医院骨科,重庆 400038;[2]第四军医大学西京医院全军创伤骨科研究所,西安 710032)

提 要:目的 通过基因转染方法,用骨形态发生蛋白3(BMP_3)基因转染成纤维细胞(NIH-3T3细胞),观察转染不同时期被转染细胞的形态学改变及细胞内碱性磷酸酶含量的变化,初步探讨骨组织工程种子细胞来源的另一途径。方法 定向克隆法将BMP_3基因构建于PcDNA3表达载体,脂质体介导法转染NIH-3T3细胞,G418筛选获得稳定转化体,观察不同时期被转染细胞的形态学变化,钙钴法染色转染细胞不同时相的碱性磷酸酶并作图像分析。结果 转染细胞培养筛选6周提取的总RNA用Dot blot可以检出有明显的BMP_3 mRNA表达。转染细胞第1周细胞形态由长梭形变为杆状,转染后2周细胞由长梭形变为多角形,转染后4周细胞变为多边形,类似成骨细胞,钙钴法碱性磷酸酶染色示转染组细胞胞浆内有大量染成黑色的碱性磷酸酶颗粒,及图像分析示转染细胞内碱性磷酸酶明显高于同期对照组,两组间有显著性差异($P<0.01$)。结论 通过向NIH-3T3细胞内转染BMP_3基因,可以使NIH-3T3细胞形态向成骨细胞形态发生转化,被转染细胞内碱性磷酸酶水平明显增高,已具有成骨细胞的某些特性。

关键词:骨形态发生蛋白3 基因转染 细胞形态
中图法分类号:R329.2;R394-33 文献标识码:A

Morphological and biological changes of fibroblasts after bone morphogenetic protein 3 transfection *in vitro*

TAN Zu-jian, HU Yun-yu (Department of Orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To explore the morphology, phenotype, biological characters and alkaline phosphatase (ALP) level of fibroblast cell line NIH-3T3 transfected with bone morphogenetic protein 3 (BMP_3) gene. **Method** A recombined BMP_3-PcDNA3 cDNA was obtained by using gene recombination technique to clone the BMP_3 cDNA into PcDNA3 vector directly, and then introduced into NIH-3T3 cells by means of lipofectamine transfer. Cell morphology was observed with microscopy and biological characters with Gomori-Takamatsu method to check ALP activity in the cells. **Results** BMP_3 mRNA expression was found in the transfected NIH-3T3 cells 6 weeks after transfection with the cell shape changed from fusiform to bacilliform in the first week, bacilliform to multiangular in the second week, and multiangular to polygonal, as osteoblast, in the fourth week. ALP levels was significantly higher in NIH-3T3 cells with BMP_3 transfection than normal NIH-3T3 cells cultured in the same periods ($P<0.01$). **Conclusion** The phenotype of NIH-3T3 cells change to osteoblasts gradually after BMP_3 gene transfection with some osteoblast characters and higher ALP Levels than the cells without transfection.

Key words: bone morphogenetic protein 3; gene transfection; phenotype

种子细胞是骨组织工程的研究重点之一。目前种子细胞的主要来源为取自活体组织,经体外培养后再与支架材料复合。本研究尝试用已建立标准细胞系的成纤维细胞(NIH-3T3细胞)为靶细胞,通过基因转染方式,改变被转染细胞的生物学特性,使其具有被转染基因的特性,从而达到从其它途径来大量获取骨组织工程种子细胞和使其具有合成及分泌内源性骨形态发生蛋白(Bone morphogenetic protein, BMP)的目的。

BMP确实的诱导成骨作用已在大量的实验研究和临床应用中得到证明。但因机体自身合成和分泌BMP能力有限,往往不能满足骨损伤修复的需要。而外源性的BMP由于异种蛋白的免疫性及其生物活性受到一定的影响,其诱导成骨活性是不能和内源性BMP相比的。因此,最理想的方法是使机体自身产生内源性的BMP来满足骨损伤修复的需要,且BMP的产生量可以随骨损伤的修复而相应减少。本研究探索将BMP_3基因转入NIH-3T3细胞,通过体外培养使被转染细胞获得成骨细胞的某些特性,为组织工程种子细胞的来源研究作一初步探讨,现报告如下。

收稿日期:2002-02-04;修回日期:2002-04-19

1 材料与方法

1.1 材料来源

BMP_3基因(构建于pSP64之上)、PcDNA3载体和BMP_3探针由第四军医大学生化教研室提供,NIH-3T3细胞购于第四军医大学口腔医学院生物教研室。脂质体转染试剂盒(Lipofectamine)购于Gibco BRL,总RNA提取试剂盒购于北京博大科技公司。

1.2 方法

1.2.1 扩增、碱裂解法提取BMP_3和$PcDNA_3$质粒 BMP_3、$PcDNA_3$两者均用*Eco*RI和*Xba*I(华美公司产品)双酶切,分别用凝胶电泳切下1.48 kb和5.4 kb片断,DNA快速回收试剂盒回收,采用定向克隆法将BMP_3构建于$PcDNA_3$表达载体,凝胶电泳鉴定,大量扩增提取BMP_3-$PcDNA_3$重组DNA备用。

1.2.2 用含有10%小牛血清(Hyclone产品)的DMEM(Gibco产品)培养NIH-3T3细胞,加入不同浓度的G_{418}(每毫升培养液中含有50~600 μg的G_{418},以50 μg/ml递增)筛选1周,找出正常NIH-3T3细胞的G_{418}最低杀伤浓度。

作者简介:谭祖键(1963-),男,重庆市人,博士,副教授,主要从事关节外科、骨组织工程方面研究,发表论文9篇。电话:(023)65349812

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3 BMP_3-PcDNA3 转染 NIH-3T3 细胞

1.3.1 取 2 个消毒的 1.5ml Eppendorf 管，各加入无血清 DMEM 培养液 100 μl，其中一管 DMEM 中加入 Lipofectamine 20 μl，另一管中加入 BMP_3-$PcDNA_3$ 重组 DNA 10 μl（含 BMP_3 基因约 2 μg），混合两管，轻轻摇动混匀，室温下放置 40 min，使之形成 DNA-脂质体复合物，加入无血清培养基 770 μl，使总体积为 1 ml。

1.3.2 培养至铺满 35 mm 培养瓶底约 70% ~ 80% 的 NIH-3T3 细胞用无血清的 DMEM 洗涤两次，将 DNA-脂质体复合物 1 ml 倒入 NIH-3T3 表面，轻轻摇晃，使之均匀与细胞接触，置 37 ℃的 CO_2 培养箱中培养 5 h。

1.3.3 加入无血清 DMEM 培养基 800 μl，再加入小牛血清 200 μl，使血清浓度为 10%，置 37 ℃的 CO_2 培养箱中继续培养 18 h。

1.3.4 弃含脂质体的培养液，加入正常含有 10% 小牛血清的 DMEM 培养液 3 ml，细胞贴壁后加入 10 μg/μl 的 G_{418} 109 μl，使 G_{418} 终浓度为 350 μg/ml（正常 NIH-3T3 细胞的最低杀伤浓度）。每 3 ~ 4 d 更换培养液，细胞进行正常培养传代，每次换液后均加入相同浓度的 G_{418} 进行筛选。

收集约 10^8 已筛选 6 周的被转染 NIH-3T3 细胞，用总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA，采用 Dot blot 检测 BMP_3 的 mRNA 表达，用未转染 NIH-3T3 细胞提取的总 RNA 作对照。

取已筛选 5 ~ 8 周的转染细胞爬片采用改良钙钴法（Gomori-Takamatsu 法）检测细胞内的碱性磷酸酶，取同期未转染 NIH-3T3 细胞作对照。

1.4 统计学处理

采用 t 检验。

2 结果

本研究采用定向克隆法成功地将 1.48 kb 的 BMP_3 基因片段构建于 5.4 kb 的 $PcDNA_3$ 表达载体，获得了 BMP_3-$PcDNA_3$ 重组 DNA。

转染细胞培养筛选 6 周提取的总 RNA 用 Dot blot 可以检出有明显的 BMP_3 mRNA 表达，而未转染细胞的总 RNA 则无 BMP_3 的基因表达，见图 1。

未转染细胞呈长梭形，转染细胞第 1 周细胞形态由长梭形变为杆状，转染后 2 周细胞由长梭形变为多角形，转染后 4 周细胞变为多边形，类似成骨细胞，见图 2，而未转染 NIH-3T3 细胞培养 6 周后细胞仍为长梭形。

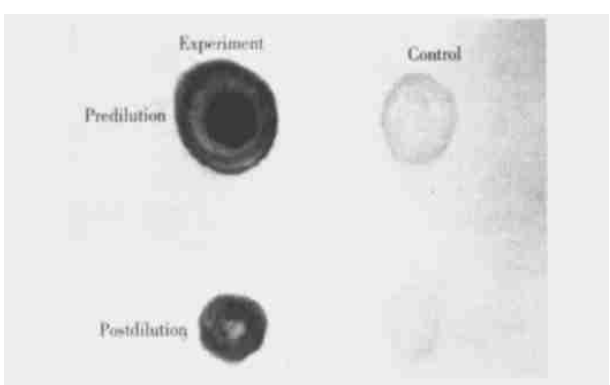


图 1 转染 NIH-3T3 细胞内 BMP_3 mRNA 斑点杂交，转染组表达阳性，而对照组为阴性

Fig 1 Positive BMP_3 mRNA expression in transfected NIH-3T3 cells and negative in control

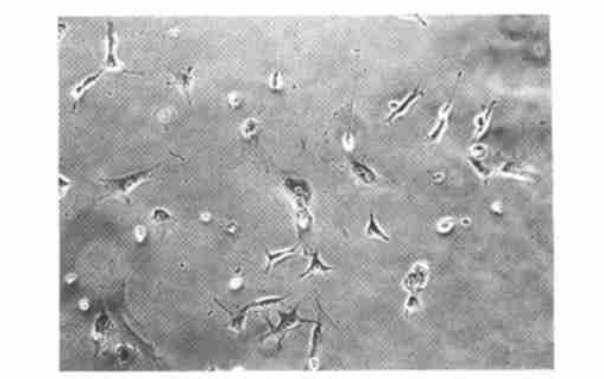


图 2 转染后 4 周，转染组细胞呈多边形，类似成骨细胞 （×160）

Fig 2 NIH-3T3 cells showing polygonal shape as osteoblast 4 weeks after BMP_3 transfection （× 160）

转染后第 5 ~ 8 周 NIH-3T3 细胞爬片钙钴法染色见细胞内有明显染成黑色的碱性磷酸酶颗粒出现，见图 3，第 6 周达高峰，之后维持在一相对高水平，而对照细胞内则未见明显染成黑色的碱性磷酸酶颗粒出现，图像分析见表 1。

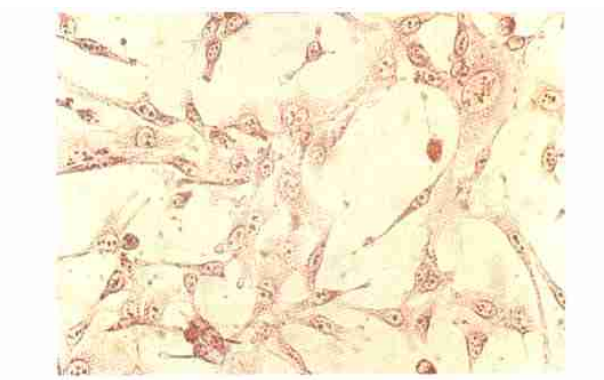


图 3 转染细胞内有大量染成黑色的碱性磷酸酶 （钙钴法染色× 250）

Fig 3 Massive black ALP granules in the BMP_3-transfected NIH-3T3 cells （Gomori-Takamatsu method× 250）

表 1 转染和未转染 NIH-3T3 细胞内碱性磷酸酶生成图像分析（像素）

Tab 1 Imagine analysis of ALP in the transfected and nontransfected NIH-3T3 cell

	4 weeks	5 weeks	6 weeks	7 weeks	8 weeks
Transfected group	6 738	8 052	9 736	8 547	8 286
Control group	1 749 *	2 065 *	2 694 *	2 158 *	2 773 *

*: $P < 0.01$ *vs* transfected group

3 讨论

虽然目前 BMP 的应用大多为将其复合入一定载体后手术植入，但这种方法存在几方面的不足，一是使用的载体与机体间存在一定的组织相容性差异及载体降解与新骨生成不同步；另一是虽然 BMP 的种属差异性较小，但作为一种蛋白质，它可能会引起一定程度的炎症反应和免疫反应，从而影响 BMP 诱导成骨的质量

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

和数量[1]；再一就是手术植入所致的创伤也不利于骨诱导的发生。因此，临床上 BMP 应用的最有效方法是增加内源性 BMP 的形成及分泌。

BMP_3（又称成骨素）是 BMP 家族中成骨能力较强的成骨因子。第四军医大学生物化学教研室及全军创伤骨科研究所对这种蛋白的研究已取得了较大成绩[2,3]，而国内外其它地方对 BMP_3 的研究报道则很少。刘建等[4]在骨损伤修复研究中，观察到在骨折愈合早期，BMP_3 基因表达水平明显增高，表明 BMP_3 在骨损伤修复中有重要作用。第四军医大学生物化学教研室及全军创伤骨科研究所通过 BMP_3 在大肠杆菌中表达研究，获得了 $rhBMP_3$ 纯化产品，小鼠肌袋试验证明其具有良好的异位诱导成骨活性，且效果稳定。

BMP 无明显的种属差异性，即不同种属的 BMP 诱导成骨效果差异不明显，这还表现为不同种属的 BMP 分子结构基本相同[5,6]。但是，无论何种属来源的 BMP，也不管其活性及纯度如何，其诱导成骨活性都是不能和机体自身产生的内源性 BMP 相比的。然而，由于多种因素的影响，某些病人机体自身产生的 BMP 不能满足骨损伤修复的需要，导致骨折延迟愈合及骨不连的发生。所以，提高内源性 BMP 的量对于治疗骨不连及一些难治性骨病将有很大的实验和临床意义。本研究通过将 $rhBMP_3$ 基因定向插入 $PcDNA_3$ 高效表达载体，通过脂质体介导转入性能稳定、易于培养、具有潜在向骨系细胞转化的 NIH-3T3 靶细胞内，经培养筛选后检测到细胞内有 BMP_3 的基因表达，细胞形态也由成纤维细胞的梭形转变为具有和成骨细胞类似的多角形。

碱性磷酸酶可以间接地反映细胞的成骨活性及能力，本研究在细胞培养筛选过程中，转染细胞内的碱性磷酸酶含量明显高于同期对照组，且与细胞内的 BMP_3 生成量呈正比。从形态学上看，此时的被转染细胞也由长梭形变为类似成骨细胞的多角形。

虽然本研究通过 BMP_3 基因转染 NIH-3T3 细胞后使被转染细胞获得了成骨细胞的某些特性，但是，作为骨组织工程的种子细胞，它必须具有细胞性能稳定，具有和宿主细胞组织相容性好，能与支架材料很好复合等物性，因此，通过基因转染方式来获取性能稳定的种子细胞工作仍有待于进一步研究。

参考文献：

[1] Niederwanger M, Urist M R. Demineralized bone matrix supplied by bone banks for a carrier of recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2): a substitute for autogeneic bone grafts[J]. J Oral Implantol, 1996, 22(3~4): 201—205.

[2] Chen D, Feng J Q, Feng M, *et al*. Sequence and expression of bone morphotenetic protein 3 mRNA in prolonged cultures of fetal rat calvarial osteoblasts and in rat prostate adenocarcinoma PA III cells[J]. DNA and cell Biology, 1995, 14(3): 235—239.

[3] 崔有宏, 陈苏明, 刘新平, 等. 重组人骨形成蛋白-3 羧基端肽在大肠杆菌中表达及其诱骨活性[J]. 生物化学杂志, 1997, 13(5): 513—516.

[4] 刘　建, 胡蕴玉. 骨折愈合过程中 BMP_3 基因表达的实验研究[J]. 中华外科杂志, 1996, 34(10): 585—588.

[5] Tabas J A, Zasloff M, Wasmuth J J, *et al*. Bone morphogenetic protein: chromosomal localization of human gene for BMP1, BMP2A and BMP_3[J]. Genomics, 1991, 9(2): 283—289.

[6] Takeda K, Oida S, Ichijo H, *et al*. Molecullar cloning of rat bone morphogenetic protein (BMP) type IA receptor and its expression during ectopic bone formation induced by BMP[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 204(1): 203—209.

（编辑　王　红）

（上接 512 页）

位的积血渗液得以充分引流，防止了感染的形成及肿胀的发生。开放引流期间需保持引流管通畅，观察引流量及性质，妥善固定引流管，防止引流管脱落，防引流液倒流。伤肢肿胀应注重预防，一旦形成则消退较慢。因此，此仍优良的防止肿胀的方法之一，为患者早期功能锻炼创造了良好的条件。

3.2.3　局部冷敷　　冷敷可使血管收缩而减少局部血流，减轻局部充血、出血，从而减少切口引流量[3]并减轻膝关节肿胀，冷敷还可通过冷刺激抑制细胞活动，使神经末梢的敏感性降低而减轻疼痛[3]，因此术后用冰袋置于切口处间断冷敷 24~48 h。

3.2.4　功能锻炼　　伤肢麻醉过后即可进行股四头肌等长收缩，当天或次日起使用 CPM 装置被动活动膝关节，活动范围从 30° 开始递增，速度极慢，以患者感觉不到患肢在做运动为佳，逐日逐渐加大活动强度。术后 1 周，膝关节能屈曲越过 90°。术后 2 周时可达到完全伸膝，屈曲达 115° 以上。下地负重和行走：疼痛缓解后，即可使用助行器或拄拐下地。根据使用假体的固定方法和患者的骨质条件，决定是否适于早期负重训练。对使用骨水泥固定的假体，在膝关节骨性条件正常的情况下，创伤反应期过后，即可在保护下进行部分或完全负重的行走训练，而对于非骨水泥固定的假体和进行了植骨的病例，则要延迟完全负重的时间。嘱出院后继续循序渐进的（即递进式）锻炼。

结论：膝关节表面置换可有效解除膝部疼痛，增加关节活动度，矫正畸形，提高患者生活质量。精心、细致、有效的护理可降低了手术并发症，减轻局部创伤反应，系统有序的功能锻炼可获得良好的关节伸屈功能和帮助其尽快恢复正常步态，为治疗效果和提高患者生活质量提供了保障。

关键词：膝关节；人工假体置换；围手术期护理
中图法分类号：R473.6　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 王菊吾. 手术前备皮方法的研究进展[J]. 中华护理杂志, 2000, 35(12): 471—472.

[2] 杜　克, 王守志 主编. 骨科护理学[J]. 北京: 人民卫生出版社, 1995. 701.

[3] 丁丽荣, 曹　颖. 冷敷应用于人工全髋关节术后的临床观察[J]. 实用护理杂志, 1996, 12(2): 73.

（编辑　王　红）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net