

· 短篇论著 ·

人骨形态发生蛋白 7 重组腺病毒的制备及在骨髓基质干细胞中的表达

Construction of recombinant adenovirus carrying human bone morphogenetic protein-7 and its expression in bone marrow stromal cells

毕霞¹, 徐卫东^{2*}, 吴岳嵩², 龚德军³, 袁扬³, 黄盛东³

(1. 第二军医大学长海医院康复医学科, 上海 200433; 2. 长海医院骨科; 3. 长海医院胸心外科)

[摘要] **目的:** 构建骨形态发生蛋白 7(BMP-7)和绿色荧光蛋白(GFP)融合基因的重组腺病毒载体, 并检测其在骨髓基质干细胞(BMSCs)的表达。**方法:** RT-PCR 法获得 BMP-7 基因。将其克隆至 pcDNA3.1/CT-GFP 质粒中, PCR 扩增 hBMP-7/GFP 融合基因片段, 与线性化 pAxCawt 腺病毒载体连接, 转染大肠杆菌 LE392, 筛选重组腺病毒黏粒, 大量扩增后与 DNA-TPC 共转 HEK293 细胞, 获得重组腺病毒 Ad. hBMP-7/GFP。用重组病毒液转染兔 BMSCs 细胞, 免疫组化方法检测 BMP-7 的表达。**结果:** 经过多聚酶链反应及酶切鉴定证明获得了 BMP-7 重组腺病毒基因组, 并包装出重组腺病毒, 滴度为 4.4×10^8 pfu/ml。荧光显微镜和免疫组织化学证明 BMP-7 在重组腺病毒转染后的 BMSC 细胞中得到了表达。**结论:** 成功制备 BMP-7 重组腺病毒, 为骨缺损局部基因治疗研究奠定基础。

[关键词] 骨形态发生蛋白质类; 重组腺病毒; 骨髓祖代细胞**[中图分类号]** R 349.6 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2006)09-1023-03

骨形态发生蛋白 7(bone morphogenetic protein-7, BMP-7) 又称成骨蛋白 1(osteogenic protein-1, OP-1), 属转化生长因子 β 超家族成员之一。1990 年由 Ozkaynak 等^[1] 和 Celeste 等^[2] 首先发现。BMP-7 具有很强的骨诱导作用, 能促进各种骨及软骨缺损的修复和重建^[3], 在骨科、口腔科及整形外科均具有重要临床应用价值。Stryker Biotech 公司拥有 BMP-7 重组蛋白专利, 并于 1992 年进入用于治疗骨缺损的临床试验, 取得满意效果^[4]。但是, 重组 BMP-7 因子制备过程复杂、价格昂贵、体内半衰期短以及关键技术被大公司垄断等缺点限制了其在临床的进一步推广应用。本研究拟制备 BMP-7 和绿色荧光蛋白(GFP)融合基因的重组腺病毒。为进一步构建 BMP-7 基因修饰的组织工程骨治疗骨缺损奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂 质粒 pcDNA3.1/CT-GFP、脂质体 Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司。限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶购自 NEB 公司; DNA 分子量标准品, PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司。胎牛血清: Gibco 公司产品。兔抗人 BMP-7 多克隆抗体: 美国 R&D 公司。

1.2 菌株、黏粒及细胞株 大肠杆菌 TG1 菌株由复旦大学遗传学研究所提供, 黏粒载体 pAxCawt 及菌株 LE392; 日本 TaKaRa 公司; 人胚肾细胞株 293(ATCC CRL-1573): 中国科学院上海细胞生物学研究所提供。

1.3 PCR 引物 根据 GenBank(登录号: NM001719) 中报道 BMP-7 序列设计上游引物, 根据载体 pcDNA3.1/CT-GFP 中 GFP 序列设计下游引物, 扩增表达融合蛋白 BMP-7/GFP 的开放阅读框, 其中上游引物: ATG TCC ACG GGG AGC AAA CAG CGC。下游引物(GFP 的反向引物): TTA TTT GTA GAG CTC ATC CAT G。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.4 质粒 pUC118. BMP-7 的构建 抽取人胚肾组织总 RNA, RT-PCR 方法合成 BMP-7 基因。扩增产物以 1% 琼脂凝胶电泳, 割胶回收纯化目的基因后, 经 *Kpn* I、*Xba* I 双酶切产物定向插入同样双酶切的 pUC118 质粒, T₄ DNA 连接酶 16℃ 过夜。

1.5 重组质粒 pcDNA3.1 BMP-7/GFP 的构建 重组质粒 pUC118. BMP-7 经 *Kpn* I、*Xba* I 双酶切, 割胶回收的长 430 bp 的 BMP-7 基因片段, 与同样用 *Kpn* I、*Xba* I 双酶切的质粒 pcDNA3.1/CT-GFP 连接, 用 BMP-7 上游引物和 GFP 下游引物对转化子进行 PCR 鉴定, 有 1.1 kb 条带的为阳性克隆, 获得重组质粒 pcDNA3.1/BMP-7/GFP, 挑选一阳性克隆送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.6 BMP-7 重组腺病毒载体的构建 以重组质粒 pcDNA3.1/BMP-7/GFP 为模板扩增 BMP-7. GFP 开放阅读框, PCR 条件为: 94℃ 变性 2 min, 随后 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 68℃ 1 min, 反应 30 个循环, 回收 PCR 产物, 与 *Swa* I 酶切的 pAxCawt 黏粒连接, 用 pAxCawt 上游引物和 GFP 下游引物对转化子进行 PCR 鉴定, 有 1.3 kb 条带的为正向插入阳性克隆, 获得重组黏粒 pAxCawt. BMP-7/GFP。

1.7 重组腺病毒的制备和鉴定 采用脂质体 Lipofectamine2000 将 8 μ g 重组腺病毒黏粒与 5 μ g DNA-TPC 共转染 293 细胞, 获得重组腺病毒 Ad. BMP-7/GFP。转染 10 d 后, 收集转染的 293 细胞, 反复冻融数次, 细胞破碎后收集上清。再以上清重复转染 293 细胞, 同上收集病毒液, 保存于 -80℃。用病毒液感染 293 细胞及 HeLa 细胞, 293 细胞受病毒感染而 HeLa 细胞无明显病毒感染现象的克隆初步判

[基金项目] 上海市科委基金(024119111)。Supported by Foundation of Shanghai Science and Technology Committee(024119111)。

[作者简介] 毕霞, 博士, 主治医师。E-mail: bx1123@online.sh.cn

* Corresponding author. E-mail: weidongxu@smmu.edu.cn

定为重组腺病毒。测定重组腺病毒滴度, 抽提重组腺病毒株 DNA 后进行 PCR 鉴定。

1.8 兔骨髓基质干细胞(BMSCs)的培养和转染 取4周龄左右大小新西兰大白兔, 雌雄不限。按文献方法^[2]分离, 培养 BMSCs, 传代至第3代以后的细胞以 $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 接种于直径 60 mm 培养皿, 将重组腺病毒 Ad. BMP-7/GFP 以 MOI 10~20 感染细胞, 48 h 后观察 GFP 蛋白产生。

1.9 BMP-7 蛋白的免疫细胞化学染色检测 第3代的骨髓基质干细胞按 $1 \times 10^5/\text{孔}$ 接种细胞于置有盖玻片的六孔板中, 以制备细胞盖玻片爬片, 细胞生长达 70%~80% 融合时, 以 MOI 10~20 感染细胞。72 h 后分别取出 Ad. BMP-7、GFP 基因转染和未转染的 BMSCs 爬片, 检测 BMP-7 蛋白的表达, 设空白对照。本实验的一抗用兔抗人 BMP-7 多克隆抗体(1:100), 二抗用生物素化羊抗兔 IgG(1:500), DAB 显色。

2 结果

2.1 BMP-7 基因的获得 重组质粒 pUC118. BMP-7 用 *Kpn*I、*Xba*I 双酶切, 1% 琼脂凝胶电泳检测可见 2 条带, 略小于 500 bp 的条带是长度为 430 bp 的 BMP-7 基因, 略大于 2.5 kb 的条带是长度约为 2.6 kb 的 pUC118, 结果见图 1。

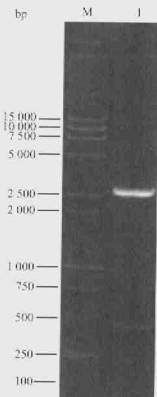


图1 重组质粒 pUC118. BMP-7 酶切鉴定
M: DNA 标记物(DL15600); 1: pUC118. BMP-7

2.2 重组质粒 pcDNA3.1/BMP-7/GFP 的构建 经 PCR 鉴定, 1% 琼脂凝胶电泳检测可见所挑选的 5 个转化子均可见略大于 1 kb 的条带, 全为阳性克隆, 结果见图 2。进一步测序结果证实, BMP-7/GFP 融合基因片段中 BMP-7 基因片段与 GenBank 中登录的序列一致。

2.3 重组黏粒 pAxCaWT. BMP-7/GFP 的构建 经 PCR 鉴定, 1% 琼脂凝胶电泳检测可见所挑选的 5 个转化子中 2 个可见大于 1 kb 的条带, 为正向插入的阳性克隆, 结果见图 3。

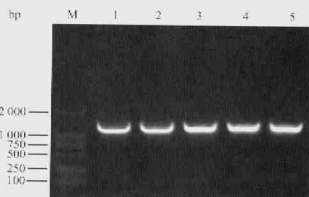


图2 重组质粒 pcDNA3.1/BMP-7/GFP PCR 鉴定
M: DNA 标记物(DL2000); 1~5: pcDNA3.1/BMP-7. GFP PCR

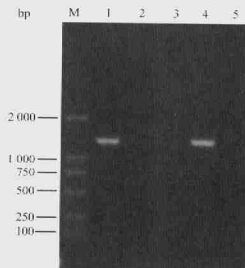


图3 重组黏粒 pAxCaWT. BMP-7. GFP PCR 鉴定
M: DNA 标记物(DL2000); 1~5: pAxCaWT. BMP-7. GFP PCR

2.4 重组腺病毒 Ad. BMP-7/GFP 的获得和鉴定 重组腺病毒黏粒与 5 μg DNA-TPC 共转染 293 细胞 72 h 后, 细胞变圆、肿大, 7 d 后细胞开始大量脱落并成串状, 出现病毒噬斑, 表明转染成功, 滴度为 4.4×10^8 pfu/ml。重组腺病毒株抽提 DNA 后进行 PCR 反应, 产物凝胶电泳分析可见 1.3 kb 处有高度特异性条带, 结果见图 4。

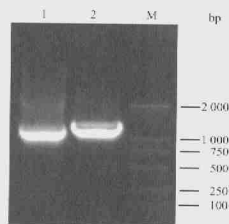


图4 Ad. BMP-7/GFP PCR 结果
1, 2: Ad. BMP-7/GFP PCR; M: DNA 标记物(DL2000)

2.5 重组腺病毒 Ad. BMP-7/GFP 转染兔 BMSCs 后的表达
2.5.1 重组腺病毒 Ad. BMP-7/GFP 转染兔 BMSCs 细胞后荧光镜检测 重组腺病毒 Ad. BMP-7/GFP 转染 BMSC 细胞后 48 h, 在荧光显微镜下观察到感染细胞表达绿色荧光蛋白表达, 报告基因 GFP 的表达说明有感染能力的病毒颗粒包

装成功,结果见图5。



图5 绿色荧光蛋白在BMSC中的表达

2.5.2 免疫细胞化学检测BMP-7蛋白的表达 重组腺病毒BMP-7转染的兔BMSCs细胞可有效表达BMP-7蛋白,细胞质中可见较多的棕黄色阳性染色颗粒并多聚集分布于细胞核的周围,正常的BMSCs中未检测到BMP-7蛋白的阳性表达。结果表明Ad-BMP-7/GFP能在BMSCs细胞中有效表达BMP-7蛋白。结果见图6。

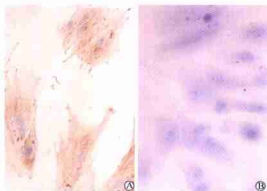


图6 BMP-7蛋白在转染细胞中的表达

A:阳性表达; B:阴性表达

3 讨论

创伤或骨病所致的骨缺损一直是骨科领域亟待解决的难题之一。目前临床常用的治疗方法包括自体骨移植、异体骨移植及人工骨填充等,由于各自存在一定局限性,难以完全满足临床治疗需要。近年来出现的基因修饰组织工程骨(gene enhanced tissue engineering)研究为解决这一难题提供了新的思路。由支架材料、种子细胞和细胞因子复合构建的组织工程骨兼有骨诱导性和骨传导性,且可根据需要制成不同的形状,为临床治疗骨缺损带来希望,已被公认为最有前途和最有可能在临床取得实际效益的研究领域之一。

BMP基因是目前基因修饰组织工程骨研究中应用最多的目的基因,已在兔、鼠、羊和犬模型中证实其对骨缺损的修复作用^[1-4]。BMP-7与其他的BMP一样,属于转化生长因子 β 超家族中的成员,具有很强的骨诱导作用,能促进各种骨及软骨缺损的修复和重建,因其成骨能力强而备受关

注^[5-6]。

GFP蛋白是目前唯一能在活细胞中表达的发光蛋白,由于其产生荧光是一个特异性的独立过程,不需要任何协同因子,底物,因此只要有足够的绿色荧光蛋白表达,就能在活体内通过荧光显微镜进行实时观察。

为便于观察目的基因的表达,本研究构建了BMP-7和GFP融合基因的重组腺病毒载体。其优点在于通过实时观察细胞内荧光蛋白产生的时间、强度和分布,达到在活体细胞内对目的基因进行动态研究的目的。

本研究成功构建制备了BMP-7和GFP融合基因的重组腺病毒载体,并在兔BMSCs细胞中实现了高效表达。为进一步研究BMP-7基因修饰BMSCs后的成骨作用和构建基因修饰的组织工程骨建立了前提条件。

【参考文献】

- [1] Ozkaynak E, Rueger DC, Drier EA, et al. OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF-beta family[J]. J Embryol, 1990, 91: 2085-2093.
- [2] Celeste AJ, Imazgi JA, Taylor RC, et al. Identification of transforming growth factor beta family members present in bone inductive protein purified from bovine bone[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 8843-8847.
- [3] Eichner A, Brock J, Heldin CH, et al. Bone morphogenetic protein-7 (OP7) and transforming growth factor beta1 modulate 1,25(OH)₂-vitamin D₃-induced differentiation of human osteoblasts[J]. Exp Cell Res, 2002, 275: 132-142.
- [4] Service RF. Tissue engineers build new bone[J]. Science, 2000, 289: 1498-1500.
- [5] Rutherford RB, Mouli M, Franceschi RT, et al. Bone morphogenetic protein-transduced human fibroblasts convert to osteoblasts and form bone *in vivo*[J]. Tissue Eng, 2002, 8: 441-452.
- [6] Dumont RJ, Dayoub H, Li JZ, et al. *Ex vivo* bone morphogenetic protein-9 gene therapy using human mesenchymal stem cells induces spinal fusion in rodents[J]. Neurosurgery, 2002, 51: 1239-1244.
- [7] Lee JY, Peng H, Usas A, et al. Enhancement of bone healing based on *ex vivo* gene therapy using human muscle derived cells expressing bone morphogenetic protein 2[J]. Hum Gene Ther, 2002, 13: 1201-1211.
- [8] McGee MA, Findlay DM, Howie DW, et al. The use of OP-1 in femoral impaction grafting in a sheep model[J]. J Orthop Res, 2001, 22: 1069-1075.
- [9] den Boer FC, Wipperfurth BW, Blokhuys TJ. Healing of segmental bone defects with granular porous hydroxyapatite augmented with recombinant human osteogenic protein-1 or autologous bone marrow[J]. J Orthop Res, 2003, 21: 521-528.
- [10] 侯树勋,孙大铭,杜桂鑫. 骨形成蛋白-7直核表达质粒的构建及在骨髓间充质干细胞中的表达[J]. 中华外科杂志, 2003, 41: 445-448.

【收稿日期】 2006-01-14

【修回日期】 2006-06-07

【本文编辑】 晋 静