

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00514

## 聚乙烯亚胺介导 BMP-7 基因体内转染促进老年大鼠骨折愈合

韩庆林<sup>1</sup>, 苟三怀<sup>1\*</sup>, 王良哲<sup>2</sup>, 康健<sup>1</sup>, 王琪<sup>1</sup>

1. 第二军医大学长征医院骨科, 上海 200003

2. 第二军医大学长征医院病理科, 上海 200003

**[摘要]** **目的:**观察聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)作为基因载体介导 BMP-7 基因体内转染促进骨折愈合的效果。**方法:**20月龄雄性 SD 大鼠随机分为3组: BMP-7+PEI 治疗组、生理盐水对照组及 BMP-7 对照组( $n=20$ )。所有大鼠建立右股骨干骨折模型, BMP-7+PEI 治疗组于骨折断端经皮注射 pcDNA3.1-BMP-7/PEI 混合试剂, 生理盐水及 BMP-7 对照组分别注射等量生理盐水及 pcDNA3.1-BMP-7。治疗后 2、4、8 周观察 X 线片、H-E 染色、I 型胶原免疫组化染色、生物力学和骨密度检测结果, 判断骨折愈合情况。**结果:**X 线及 H-E 染色结果表明, 3 组老年大鼠骨折后第 8 周均未获得愈合, 但 BMP-7+PEI 治疗组骨痂生长情况优于生理盐水及 BMP-7 对照组, 断端间出现部分骨性连接。I 型胶原染色表明, 与生理盐水及 BMP-7 对照组相比, BMP-7+PEI 治疗组 I 型胶原染色深、分布范围较大。抗弯曲强度和骨密度检测结果表明, BMP-7+PEI 治疗组各项指标均优于对照组, 差异有统计学意义( $P<0.05$  或  $0.01$ )。**结论:**PEI 介导 BMP-7 基因体内转染可有效促进老年大鼠骨折愈合。

**[关键词]** 聚乙烯亚胺; BMP-7; 转染; 骨折; 老年大鼠

**[中图分类号]** R 683 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)05-0514-05

### Polyethylenimine-mediated BMP-7 gene transfection promotes fracture healing in elderly rats

HAN Qing-lin<sup>1</sup>, GOU San-huai<sup>1\*</sup>, WANG Liang-zhe<sup>2</sup>, KANG Jian<sup>1</sup>, WANG Qi<sup>1</sup>

1. Department of Orthopedics, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

2. Department of Pathology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003

**[ABSTRACT]** **Objective:** To observe polyethylenimine-mediated BMP-7 gene transfection in promoting fracture healing in elderly rats. **Methods:** Male SD rats (20-month-old) were randomly divided into 3 groups: group A received BMP-7 gene therapy mediated by polyethylenimine, group B was treated with normal saline and group C was treated with BMP-7 plasmid without polyethylenimine. Right femoral shaft fracture model was established in all rats. Animals in group A received transdermal injection of pcDNA3.1-BMP-7/PEI; those in group B and C received the same volume of normal saline and pcDNA3.1-BMP-7, respectively. X-ray photography, histological observation (H-E staining), immunohistochemical staining of collagen type I, biomechanical and bone mineral density test were employed to assess the healing of fracture 2, 4, and 8 weeks after treatment. **Results:** The results of X ray and H-E staining showed no fracture healing in the 3 groups during the 8<sup>th</sup> week after fracture; however, the growth of coloboma in group A was better than that of the other 2 groups, with partial bone union between the fracture ends. Staining of collagen type I showed deeper, wider staining in group A compared with the other 2 group. Anti-bending intensity and bone mineral density tests showed that the parameters in group A were better than those of the other 2 groups ( $P<0.05$  or  $0.01$ ). **Conclusion:** Polyethylenimine-mediated hBMP-7 gene transfer can effectively promote fracture healing in elderly rats.

**[KEY WORDS]** polyethylenimine; BMP-7; transfection; fracture; old rats

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(5):514-518]

老年骨折患者术后易发生延迟愈合、骨不连、内固定失败等愈合不良的情况。骨折修复能力减弱是造成老年骨折患者预后差的主要原因, 骨折修复的多个环节发生异常均会导致骨折修复能力减弱, 包括骨膜反应迟滞、细胞分化受阻、软骨骨化反应延迟

和不完全等<sup>[1]</sup>。增强骨折修复能力是改善老年骨折预后的根本途径。骨形态发生蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)是一种可溶的低分子跨膜糖蛋白, 属于转化生长因子(transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )超家族成员, 能够在体内外诱导未

**[收稿日期]** 2007-09-12 **[接受日期]** 2007-12-17

**[作者简介]** 韩庆林, 博士, 主治医师. E-mail: 1975hanql@163.com, 现在解放军 264 医院骨科, 太原 030001.

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-63610109-73339, E-mail: goush@163.com

分化的间充质细胞、骨髓中的髓母细胞分化成软骨细胞和成骨细胞,诱导异位及常位成骨,对膜内成骨和软骨内成骨均有诱导作用,对骨组织形成、生长和损伤的修复具有促进作用<sup>[2]</sup>,是目前骨损伤修复相关研究的热点。现代分子生物学技术的发展使得应用外源性 BMPs 治疗骨缺损、改善骨折修复能力成为可能,一系列相关研究<sup>[3-5]</sup>均取得了一定的效果。但仍存在不少难点,尤其是载体的选择存在不少问题,目前的常用载体效果均不如人意。本研究选择新型的阳离子多聚物聚乙烯亚胺 (polyethylenimine, PEI) 作为基因载体<sup>[6]</sup>,介导 BMP-7 基因体内转染于骨折端,观察骨折端愈合情况,探讨此种基因治疗方法对老年大鼠骨折愈合的作用。

## 1 材料和方法

**1.1 主要材料及试剂** 人骨肉瘤细胞株 U2-OS 由中国科学院上海细胞研究所提供;大肠杆菌 TG1 由第二军医大学细胞生物学教研室提供;细胞冻存、复苏和培养按照常规方法进行。质粒 pcDNA3.1 购自 Invitrogen 公司。I 型胶原免疫组化检测试剂盒、H-E 染色试剂盒均购自武汉博士德公司。AG-20KWA 生物力学检测仪为日本 SHIMAOZU 公司产品。DPX-LS 双能 X 线骨密度仪为美国 LUNER 公司产品。

**1.2 hBMP-7 cDNA 的克隆及真核表达载体的构建** 利用 TRIzol 试剂盒抽提 U2-OS 细胞总 RNA, RT-PCR 方法扩增 hBMP-7 cDNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,在 1 293 bp 处回收目的片段。通过连接酶构建真核表达载体 pcDNA3.1-BMP-7, 质粒转化大肠杆菌,鉴定阳性克隆,取 10  $\mu$ l 酶切鉴定并测序。

**1.3 pcDNA3.1-BMP-7/PEI 混合物的配制** 50  $\mu$ g 重组质粒 (pcDNA3.1-BMP-7) 滴入 50  $\mu$ l 去离子水稀释,轻轻混匀后滴入 100  $\mu$ l PEI,总体积 250  $\mu$ l,轻轻混匀,室温孵育 15~20 min 后备用。

**1.4 大鼠分组及股骨骨折模型的制备** SPF 级 20 个月龄 SD 大鼠 60 只,雄性,由第二军医大学实验动物中心提供,饲养于清洁级动物室,自然光照周期,进食饮水不限。大鼠随机分为 3 组: BMP-7 + PEI 治疗组、生理盐水对照组及 BMP-7 对照组 ( $n=20$ )。所有大鼠按下述方法制备右侧股骨中段骨折模型: 2% 戊巴比妥钠按 35 mg/kg 体质量腹腔注射麻醉,麻醉成功后将大鼠固定在手术板上,右侧后腿术野脱毛、消毒,右后腿中段前外侧切口,切开皮肤分离肌肉显露股骨中段并锯断,造成短横行骨折。髌骨内侧作一小切口,显露股骨髁间窝,逆行穿入髓

腔 1 枚直径 1 mm 克氏针固定骨折断端。生理盐水冲洗伤口后缝合。术后大鼠允许自由活动,进食饮水不限,每日腹腔注射青霉素钠 10 万 u,连续 3 d。

**1.5 骨折愈合的干预处理** 术后 1 周摄片,选择断端无明显移位、内固定无松脱者作为实验对象。3 组大鼠分别予不同处理: BMP-7 + PEI 治疗组,骨折断端注射配制好的 pcDNA3.1-BMP-7/PEI 混合物 250  $\mu$ l;生理盐水对照组,骨折断端注射 250  $\mu$ l 生理盐水;BMP-7 对照组,注射质粒 pCDNA3.1-BMP-7,质量 50  $\mu$ g,稀释于 150  $\mu$ l 去离子水中,总体积 250  $\mu$ l。注射时将大鼠麻醉、固定。注射均使用 1 ml 注射器,75% 乙醇消毒后经皮缓慢注射于大鼠股骨骨折断端间隙及断端周围,注射时间不短于 1 min。拔出针头后局部按压片刻。

**1.6 骨折愈合指标的观察** 允许大鼠患肢负重自由活动。骨折术后每 2 周摄 X 线片观察骨折愈合情况。分别于术后第 2、4、8 周各组分别处死 3 只大鼠,收集标本行病理学观察及 I 型胶原免疫组化检测。第 8 周处死剩余大鼠,取完整右侧股骨标本,生理盐水纱布包覆,塑料袋密封, -20 $^{\circ}$ C 冰冻贮藏备用,行生物力学和骨密度检测。骨密度扫描以骨痂为中心 2.0 mm  $\times$  1.5 mm 的矩形区域。三点弯曲法检测骨痂抗弯曲强度,承载点跨距 30 mm,加载点为骨折断端,加载速度 2 mm/min。

**1.7 统计学处理** 计量指标采用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 10.0 统计软件包分析处理,采用完全随机的独立样本之间的方差分析比较 3 组样本的总体均数,采用  $q$  检验对 3 组数据之间多个样本均数多重比较,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 真核表达载体 pcDNA3.1-BMP-7 的鉴定** 构建的真核表达载体 pcDNA3.1-BMP-7 转化大肠杆菌,阳性克隆酶切鉴定结果 (图 1) 与预期一致;测序结果与 GenBank 序列一致。

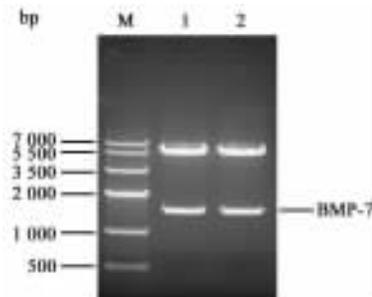


图 1 PCR 产物酶切鉴定结果

Fig 1 PCR product digestion result

M: Marker; 1, 2: PCR products

2.2 生物力学检测结果 通过三点弯曲法检测骨痂强度,结果(表 1)表明:BMP-7+PEI 治疗组大鼠各项抗弯曲力学指标优于生理盐水及 BMP-7 对照组,差异具有统计学意义( $P<0.01$ )。

2.3 影像学结果 骨折后第 2、4 周,3 组表现类似,骨折断端清晰,未见明显骨痂影(图 2A)。骨折后第 8 周,BMP-7+PEI 治疗组断端可见骨痂增生,断端间隙模糊,有部分骨性连接;而生理盐水对照组及 BMP-7 对照组断端骨痂影不明显,断端间隙清晰(图 2B、2C)。影像结果表明,3 组老年大鼠骨折后第 8 周均未获得愈合,但 BMP-7+PEI 治疗组骨痂生长情况优于生理盐水及 BMP-7 对照组,断端间出现部分骨性连接,提示骨折愈合过程加快。

2.4 H-E 染色观察结果 骨折后第 2 周,各组骨折断端间见丰富的纤维组织增生,骨膜增厚;BMP-7+PEI 治疗组骨折断端除纤维组织外可见软骨细胞增生聚集,并出现软骨基质(图 3A);而生理盐水及 BMP-7 对照组骨折端以纤维组织为主,软骨细胞数量较少(图 3B、3C)。骨折后第 4 周,BMP-7+PEI 治疗组软骨细胞肥大成熟,并分泌较多的软骨基质,软骨骨痂开始形成,成骨细胞出现并分泌类骨质,软骨基质内可见骨岛形成(图 4A),说明软骨骨化过程已开始,但骨折断端无骨小梁连接;生理盐水及 BMP-7 对照组也出现成骨细胞和软骨细胞增生,但

与 BMP-7+PEI 治疗组相比较少,没有出现毛细血管长入的现象,断端间被纤维组织连接。骨折后第 8 周,BMP-7+PEI 治疗组骨折断端间隙及周围成骨细胞成熟,类骨质被成熟的骨小梁代替(图 4B);而生理盐水及 BMP-7 对照组软骨细胞、成骨细胞的数量相对较少,骨痂面积较小,断端间开始被软骨连接,未出现成熟的骨小梁(图 4C),骨性组织明显少于 BMP-7+PEI 治疗组。骨折后不同时间点 H-E 染色观察结果与影像学观察结果基本吻合。

2.5 I 型胶原免疫组化染色结果 骨折后第 2 周,各组 I 型胶原染色基本阴性(图 5A)。骨折后第 4 周,BMP-7+PEI 组 I 型胶原较第 2 周明显增多,主要分布于成骨细胞周围的类骨质中,着色较第 2 周变深;骨折后第 8 周,I 型胶原较多分布于断端间隙及周围的骨痂组织中,染色深、面积扩大(图 5B),说明 I 型胶原数量进一步增加,成骨反应明显。相比之下,生理盐水及 BMP-7 对照组 I 型胶原的染色浅,分布面积小(图 5C),说明成骨反应相对较弱。

2.6 骨密度检测结果 BMP-7+PEI 治疗组、生理盐水及 BMP-7 对照组大鼠骨折后第 8 周骨密度( $g/cm^2$ )分别为: $0.33 \pm 0.14$ 、 $0.24 \pm 0.27$  和  $0.28 \pm 0.17$ 。BMP-7+PEI 治疗组骨密度值最高,明显高于生理盐水及 BMP-7 对照组,差异具有统计学意义( $P<0.05$ )。

表 1 老年大鼠股骨骨痂抗弯曲生物力学性能检测结果  
Tab 1 Anti-bending test of callus in elderly rats in 3 groups

Group	n	Deflection l/mm	Maximum load F/N	Bending strength $\rho$ /MPa	Breaking energy E/J
BMP-7+PEI	9	$3.175 \pm 0.51$	$130.6 \pm 4.11$	$112.3 \pm 3.9$	$0.053 \pm 0.01$
Saline control	7	$1.850 \pm 0.44^{**}$	$110.2 \pm 3.01^{**}$	$85.7 \pm 4.0^{**}$	$0.022 \pm 0.04^{**}$
BMP-7 control	8	$1.900 \pm 0.31^{**}$	$115.3 \pm 1.21^{**}$	$92.6 \pm 3.5^{**}$	$0.030 \pm 0.07^{**}$

\*\*  $P<0.01$  vs BMP-7+PEI group



图 2 大鼠骨折后第 2、8 周 X 线摄片结果

Fig 2 X-ray results of rats 2,8 weeks after fracture

A; In BMP-7+PEI group: 2 weeks after fracture there was no osseous callus and the fracture gap was clear. The other 2 groups were similar; B; In BMP-7+PEI group: fracture gap was connected by callus 8 weeks after fracture; C; Eight weeks after fracture there was no osseous callus around fracture site in BMP-7 group and saline group

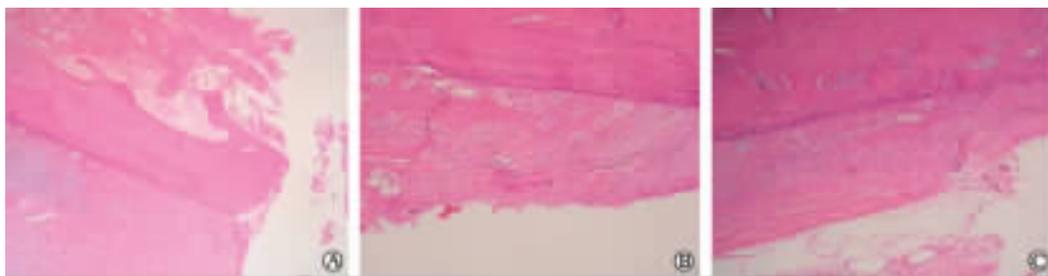


图 3 大鼠骨折后第 2 周骨折断端 H-E 染色结果

Fig 3 H-E staining of broken bone 2 weeks after fracture

A; In BMP-7+PEI group: more chondrocytes appeared and periosteum reaction was strong; B; In saline control group: chondrocytes were hardly seen; C; In BMP-7 control group: periosteum reaction was not so strong as that in the BMP-7+PEI group. Original magnification:  $\times 200$



图 4 大鼠骨折后第 4、8 周骨折断端 H-E 染色结果

Fig 4 H-E staining of broken bone 4, 8 weeks after fracture

A; In BMP-7+PEI group: bone island appeared in the callus 4 weeks after fracture; B; In BMP-7+PEI group: fracture gap was connected by osseous callus gradually 8 weeks after fracture; C; In BMP-7 contrast groups: there was no osseous callus between gap, showing a slow ossification 8 weeks after fracture. Original magnification:  $\times 200$



图 5 大鼠骨折后第 2、8 周骨折断端 I 型胶原免疫组化染色结果

Fig 5 Type I collagen staining of broken bone 2, 8 weeks after fracture

A; In BMP-7+PEI group: 2 weeks after fracture the staining was negative in all 3 groups; B; In BMP-7+PEI group: the positive area was larger and with deeper color 8 weeks after fracture; C; In saline contrast group: the positive area was smaller and with light color. Original magnification:  $\times 200$

### 3 讨论

Lu 等<sup>[1]</sup>认为老年动物骨折修复过程异常的机制包括骨折后骨膜反应延迟发生、细胞分化延迟、软骨内血管生成减少、软骨成骨过程延迟、骨形成面积下降、骨重建塑形的变化减弱等,同时指出老年骨折愈合的障碍主要发生在软骨成骨过程中,因为骨折愈合早期软骨的形成面积并未明显减少。老年骨折

修复异常发生在骨折愈合的多个阶段,不能用某个单一因素的异常加以解释。上述因素使得老年患者骨折愈合更加复杂,处理更加棘手。通过生物学方法可以增强骨折修复能力、改善骨痂质量、缩短愈合时间。这些方法有多种,其中基因治疗是以基因工程技术为基础,通过增强骨折局部一种或多种骨诱导因子基因的表达,提高骨修复能力、缩短愈合时间。与应用重组蛋白相比,基因治疗有诸多优越

性<sup>[7]</sup>。目前基因治疗较多采用病毒载体,由于病毒载体存在安全隐患,基因治疗的实际应用受到很大限制<sup>[1,8]</sup>,由此也催生了非病毒载体的研究,其中阳离子多聚物 PEI 是相关研究的热点。

PEI 是水溶性的高分子多聚物,具有低毒高效、操作简单、来源广泛、易于修饰等特点<sup>[6]</sup>。其优异的转基因能力主要来自两方面:(1)PEI 有较强的结合浓缩 DNA 的能力。PEI 表面带有正电荷,与带负电的 DNA 分子通过静电吸引相互结合。与 PEI 结合后 DNA 分子发生结构改变,其二、三级结构打开与 PEI 形成球形的分子结构,但 DNA 一级结构不受影响,因此其遗传信息可以完整传递。PEI 分子的支链越多,越容易浓缩 DNA 形成类球形颗粒。而且 PEI 具有的酸缓冲作用弱化了核酸酶的反应条件,可保护 DNA 不受核酸酶的破坏;其在分子空间结构上形成位阻效应,阻碍了核酸酶的作用<sup>[9]</sup>。(2)质子海绵(proton-sponge)作用。PEI 浓缩 DNA 形成复合物,通过 PEI 表面多余的阳离子正电荷,与细胞表面的负电荷吸附,经过细胞的内吞作用形成内吞小体进入细胞。在内吞小体内,PEI 分子中大量 N 原子吸纳质子,质子通过内吞小体膜上的 ATP 酶-质子泵作用内流进入内吞小体,同时引发氯离子协同流入,导致内吞小体因渗透压过大破裂。PEI 的这种作用被称为质子海绵作用。在此作用下,DNA 可以成功从内吞小体逃逸,避免遭受溶酶体酶的裂解,提高了转染效率。其他非病毒载体如脂质体由于没有质子海绵作用,容易被细胞内的溶酶体酶破坏而丧失作用。胞质中被释放的核酸分子具有“核趋向性”,可以自动进入细胞核而表达。我们的前期实验也证实,PEI 介导绿色荧光蛋白基因体外转染成纤维细胞,基因转染效率高于 60%。Bieber 等<sup>[10]</sup>研究发现 PEI/DNA 复合物进入细胞核后可解聚释放 DNA,实现基因表达。Ye 等<sup>[11]</sup>研究证实,非病毒载体介导的基因治疗能够有效促进哺乳动物的骨组织再生,避免了病毒载体的安全隐患。Yockman 等<sup>[12]</sup>通过对 PEI 的修饰,显著提高了非病毒载体对哺乳动物细胞基因的转染效率。Huang 等<sup>[6]</sup>研究亦证实 PEI 载体技术能明显增强基因治疗的效果。

本研究采用 PEI 作为基因载体,经皮注射至骨折断端,通过影像学、组织学和 I 型胶原免疫组化检测,发现应用 PEI 组大鼠骨折愈合速度加快;通过骨密度和生物力学检测,发现应用 PEI 组大鼠骨痂质量得到改善,效果优于未用 PEI 组及生理盐水对照组。本研究结果表明,利用 PEI 介导 BMP-7 基因体

内转染的基因治疗方法,可以增强老年大鼠的骨折修复能力、促进骨折愈合过程、改善骨痂质量,且本研究采用经皮注射的方法,实现了简化实验步骤、减轻动物创伤的目的。

(志谢 本研究得到第二军医大学细胞生物学教研室何志颖博士的大力支持和帮助,在此表示衷心感谢!)

## [参考文献]

- [1] Lu C, Miclau T, Hu D, Hansen E, Tsui K, Puttlitz C, et al. Cellular basis for age-related changes in fracture repair[J]. *J Orthop Res*, 2005, 23: 1300-1307.
- [2] Bessa P C, Casal M, Reis R L. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts)[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2008, 2: 1-13.
- [3] Rickert M. BMP-14 gene therapy increases tendon tensile strength in a rat model of achilles tendon injury[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2008, 90: 445.
- [4] Kirker-Head C, Karageorgiou V, Hofmann S, Fajardo R, Betz O, Merkle H P, et al. BMP-silk composite matrices heal critically sized femoral defects[J]. *Bone*, 2007, 41: 247-255.
- [5] Saito A, Suzuki Y, Kitamura M, Ogata S, Yoshihara Y, Masuda S, et al. Repair of 20-mm long rabbit radial bone defects using BMP-derived peptide combined with an alpha-tricalcium phosphate scaffold[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2006, 77: 700-706.
- [6] Huang Y C, Simmons C, Kaigler D, Rice K G, Mooney D J. Bone regeneration in a rat cranial defect with delivery of PEI-condensed plasmid DNA encoding for bone morphogenetic protein-4 (BMP-4)[J]. *Gene Ther*, 2005, 12: 418-426.
- [7] Simpson A H, Mills L, Noble B. The role of growth factors and related agents in accelerating fracture healing[J]. *J Bone Joint Surg Br*, 2006, 88: 701-705.
- [8] Check E. Gene-therapy trials to restart following cancer risk review[J]. *Nature*, 2005, 434: 127.
- [9] Parker A L, Oupicky D, Dash P R, Seymour L W. Methodologies for monitoring nanoparticle formation by self-assembly of DNA with poly(l-lysine)[J]. *Anal Biochem*, 2002, 302: 75-80.
- [10] Bieber T, Meissner W, Kostin S, Niemann A, Elsasser H P. Intracellular route and transcriptional competence of polyethyleneimine-DNA complexes[J]. *J Control Release*, 2002, 82 (2-3): 441-454.
- [11] Ye L, Haider H Kh, Esa W B, Law P K, Zhang W, Su L, et al. Nonviral vector-based gene transfection of primary human skeletal myoblasts[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2007, 232: 1477-1487.
- [12] Yockman J W, Kim W J, Chang C W, Kim S W. Non-viral delivery of interleukin-2 and soluble Flk-1 inhibits metastatic and primary tumor growth in renal cell carcinoma[J]. *Gene Ther*, 2007, 14: 1399-1405.

[本文编辑] 贾泽军