

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.08.011

hBMP-7 基因转染对原代培养兔髓核细胞生物学活性的影响*

王庆锋 马宁 温鹏 马涛 王真

(宁夏人民医院骨科 宁夏银川 750002)

摘要 目的:探讨原代培养的兔髓核细胞转染腺病毒载体介导的人骨形态发生蛋白-7(hBMP-7)基因后对其生物学活性的影响。**方法:**根据兔髓核细胞转染方式的不同,分为 hBMP7 组、LacZ 组、未转染组三组,hBMP7 组采用腺病毒载体介导的 hBMP7 进行转染,LacZ 组转染 LacZ 基因,未转染组不转染任何基因。比较三组细胞增殖、硫酸糖胺多糖(GAG)产量、II 型胶原产量有无差异。**结果:**处理方式和转染后时间对细胞增殖、GAG 产量、II 型胶原产量有交互作用($P < 0.05$),hBMP7 组细胞增殖、GAG 产量、II 型胶原产量高于 LacZ 组、未转染组,差异有统计学意义($P < 0.05$),LacZ 组和未转染组细胞增殖、GAG 产量、II 型胶原产量差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论:**hBMP-7 基因转染可提高髓核细胞增殖能力,促进其产生细胞外基质。

关键词:人骨形态发生蛋白;髓核细胞;细胞增殖;硫酸糖胺多糖;II 型胶原

中图分类号:Q95-3,Q75,R681.53 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)08-1442-04

Effect of hBMP-7 Gene Transfection on Biological Activity of Primary Cultured Rabbit Nucleus Pulposus Cells*

WANG Qing-feng, MA Ning, WEN Peng, MA Tao, WANG Zhen

(Department of Orthopedics, Ningxia People's Hospital, Yinchuan, Ningxia, 750002, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the primary cultured rabbit nucleus pulposus cells transfected with adenovirus vector mediated human bone morphogenetic protein-7 effect on its biological activity after (hBMP-7) gene. **Methods:** Depending on nucleus pulposus cells transfected way, into hBMP7 group, LacZ group, untransfected three groups, hBMP7 group using adenoviral vector-mediated transfection hBMP7, LacZ transfected with LacZ gene, not transfected genes without any transfection. Comparison of the three groups of cell proliferation, sulfate glycosaminoglycan ((GAG) production, whether the difference in type II collagen production. **Results:** After treatment and transfection time on cell proliferation, GAG production, type II collagen production had interaction ($P < 0.05$), hBMP7 cell proliferation, GAG production, type II collagen production is higher than LacZ group, the non-transfected group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$), cell proliferation LacZ group and untransfected group, GAG production, II collagen production was no significant difference ($P > 0.05$). **Conclusion:** hBMP-7 gene transfection can increase the proliferation of nucleus pulposus cells and promote their produce extracellular matrix.

Key words: Human bone morphogenetic protein; Nucleus pulposus cells; Cell proliferation; Sulfated glycosaminoglycan; Collagen type II

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, Q75, R681.53 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)08-1442-04

前言

BMP-7 重组蛋白可以促进椎间盘细胞产生细胞外基质,从而逆转椎间盘退变^[1]。但重组蛋白半衰期短、生物活性低、不易获得,使得重组蛋白难以在临床应用推广^[2]。分子生物学技术的突飞猛进,为 BMP-7 基因疗法治疗椎间盘退变提供了可能。但是 BMP-7 基因在髓核细胞中能否表达、BMP-7 基因转染对髓核细胞能否产生和 BMP-7 重组蛋白相似的生物学效应尚不明确^[3]。为了探讨兔原代培养的髓核细胞作为 hBMP-7 基因疗法的靶细胞治疗椎间盘退变的可能性,本研究采用兔原代培养髓核细胞作为靶细胞进行体外培养,转染腺病毒载体介导的

hBMP7,研究 hBMP-7 基因转染对髓核细胞增殖和产生细胞外基质能力的影响,为在临床上的推广应用提供实验依据。现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

体重 450~500g 的 4 周龄新西兰大白兔 1 只,取髓核细胞进行体外培养至 70%~80%融合,根据兔髓核细胞转染方式的不同,分为 hBMP7 组、LacZ 组、未转染组三组,hBMP7 组采用腺病毒载体介导的 hBMP7 进行转染,LacZ 组转染 LacZ 基因,未转染组不转染任何基因。试剂包括:MTT、DMSO、碘化丙

* 基金项目:宁夏自然科学基金项目(NZ13183)

作者简介:王庆锋(1978-),男,硕士,副主任医师,主要从事脊柱外科方向的研究,E-mail:748563001@qq.com

(收稿日期:2013-08-16 接受日期:2013-09-10)

啶染色液、硫酸软骨素、木瓜蛋白酶、碘乙酸、三羟甲基氨基甲烷、牛血清白蛋白(Sigma 公司),二甲基亚甲蓝(Aldrich 公司),Ⅱ型胶原抗体(博士德公司),RT-PCR 试剂盒(Takara 公司),蛋白标准分子量(BioLab 公司),二氨基联苯胺(AMRESCO 公司),TriZol(Gibco 公司),羊抗小鼠二抗(晶美生物公司)。

1.2 方法

1.2.1 MTT 比色法测定吸光值比较细胞增殖能力 转染后第 3、7、10、14 天, 各组分别取出一块 96 孔细胞培养板, 加入 MTT 染色, 再培养 4 h, 取上清加入 DMSO, 37℃ 振荡 20 min 充分溶解沉淀物后, 使用酶联仪波长 570nm 下测定每孔吸光值(OD 值)。

1.2.2 DMB 显色法测定 GAG 含量 转染后第 3、7、10、14 天, 各组分别取出 1 mL 上清液置于 -70℃ 冰箱中待测, 取 100 μL 细胞上清液加入 1 mL 木瓜蛋白酶消化液, 60℃ 孵育 1 h 后加入碘乙酸、羟甲基氨基甲烷, 再使用 Tris/HCL 扩容至 5 mL。波长 525nm 下测定不同细胞上清液的吸光度, 再根据 DMB 标准曲线计算消化液中的硫酸 GAG 含量, 再按 [硫酸 GAG 含量(μg/cm²)=消化液中硫酸 GAG 含量(mg/L)* 消化液总量(mL)/ 培养瓶底面积(cm²)]计算细胞外基质硫酸 GAG 含量。

1.2.3 测定Ⅱ型胶原含量 转染后第 3、7、10、14 天, 各组分别

取上清液离心后置于 -70℃ 冰箱中待测, 在 96 孔板上包被Ⅱ型胶原单克隆抗体, 加入 50 μL 检测稀释液 RD1A, 再加入 100 μL 按比例稀释的标准品或待检样本 37℃ 下避光孵育 90 min, 再加入 100 μL 生物素标记的Ⅱ型胶原单克隆抗体 37℃ 下避光孵育 30 min, 再加入 100 μL 底物 37℃ 下避光孵育 15min, 再加入 100 μL 阻断液, 使用酶联仪波长 490 nm 下测定每孔吸光值(OD 值), 再根据标准曲线计算Ⅱ型胶原含量。

1.3 数据分析

采用 SPSS20.0 统计软件, 计量资料如 MTT、GAG 和Ⅱ型胶原的检测数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用两因素方差分析, 两两比较采用 SNK-q 检验, 组内不同时间比较采用配对 t 检验。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 hBMP-7 基因转染对髓核细胞增殖能力的影响

采用 MTT 比色法测定各组吸光值(OD 值), 结果显示: 处理方式和转染后时间有交互作用(P<0.05), 随着时间的变化, 各组的细胞数均有增加, hBMP7 组细胞增殖能力高于 LacZ 组、未转染组, 差异有统计学意义(P<0.05), LacZ 组和未转染组细胞增殖能力差异无统计学意义(P>0.05)。见表 1。

表 1 各组髓核细胞增殖能力比较(OD 值)($\bar{x} \pm s$, n=4)

Table 1 Comparison of proliferation ability of nucleus pulposus cell in each group($\bar{x} \pm s$, n=4)

转染后时间 After transfection time	第 3 天 The third day	第 7 天 The seventh day	第 10 天 The tenth day	第 14 天 The fourteenth day
hBMP7 组 hBMP7 Groups	0.164± 0.0293	0.477± 0.0332	0.812± 0.0529	0.942± 0.0325 ^a
LacZ 组 LacZ Groups	0.147± 0.0403	0.323± 0.0336	0.368± 0.0424	0.564± 0.0534 ^b
未转染组 Untransfected Groups	0.186± 0.0343	0.374± 0.0316	0.528± 0.0396	0.613± 0.0302 ^b

注: 相同字母间差异无统计学意义(P>0.05), 不同字母间差异有统计学意义(P<0.05)。

Note: The difference was not statistically significant between the same letter(P>0.05),

The difference was statistically significant between different letter(P<0.05).

2.2 hBMP-7 基因转染对髓核细胞产生 GAG 的影响

采用 DMB 显色法测定 GAG 含量, 结果显示: 处理方式和转染后时间有交互作用(P<0.05), 在转染后第 3 天, GAG 含量无明显增加(P>0.05), 随着时间的延长, 各组的 GAG 含量

均有增加, hBMP7 组 GAG 含量高于 LacZ 组、未转染组, 差异有统计学意义(P<0.05), LacZ 组和未转染组 GAG 含量差异无统计学意义(P>0.05)。见表 2。

表 2 各组髓核细胞产生 GAG 比较(mg/cm², $\bar{x} \pm s$, n=4)

Table 2 Comparison of GAG of nucleus pulposus cell in each group(mg/cm², $\bar{x} \pm s$, n=4)

转染后时间 After transfection time	第 3 天 The third day	第 7 天 The seventh day	第 10 天 The tenth day	第 14 天 The fourteenth day
hBMP7 组 hBMP7 Groups	41.5± 4.0	53.7± 4.4	87.1± 7.3	82.3± 2.8 ^a
LacZ 组 LacZ Groups	33.3± 4.5	32.6± 8.6	40.3± 4.4	45.5± 5.4 ^b
未转染组 Untransfected Groups	34.5± 3.3	37.4± 6.8	43.2± 5.1	41.7± 4.3 ^b

注: 相同字母间差异无统计学意义(P>0.05), 不同字母间差异有统计学意义(P<0.05)。

Note: The difference was not statistically significant between the same letter(P>0.05),

The difference was statistically significant between different letter(P<0.05).

2.3 hBMP-7 基因转染对髓核细胞产生 II 型胶原的影响

结果显示:处理方式和转染后时间与交互作用($P < 0.05$),在转染后第 3 天,hBMP7 组 II 型胶原含量较对照组就有所增加($P < 0.05$),随着时间的延长,各组的 II 型胶原含量均有增

加,hBMP7 组 II 型胶原含量高于 LacZ 组、未转染组,差异有统计学意义($P < 0.05$),LacZ 组和未转染组 II 型胶原含量差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 各组髓核细胞产生 II 型胶原比较 (mg/L, $\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Table 3 Comparison of collagen II of nucleus pulposus cell in each group (mg/L, $\bar{x} \pm s$, $n=4$)

转染后时间 After transfection time	第 3 天 The third day	第 7 天 The seventh day	第 10 天 The tenth day	第 14 天 The fourteenth day
hBMP7 组 hBMP7 Groups	4.74 $\pm$ 0.64	7.70 $\pm$ 0.45	8.92 $\pm$ 1.22	8.63 $\pm$ 0.86 ^a
LacZ 组 LacZ Groups	3.15 $\pm$ 0.34	3.07 $\pm$ 0.58	3.79 $\pm$ 1.48	4.03 $\pm$ 1.72 ^b
未转染组 Untransfected Groups	3.38 $\pm$ 0.25	3.82 $\pm$ 1.14	3.24 $\pm$ 0.84	4.34 $\pm$ 0.56 ^b

注:相同字母间差异无统计学意义($P > 0.05$),不同字母间差异有统计学意义($P < 0.05$)。

Note: The difference was not statistically significant between the same letter($P > 0.05$),

The difference was statistically significant between different letter($P < 0.05$).

3 讨论

腰椎间盘突出性疾病导致的下腰痛给人们带来了沉重的经济负担和精神负担,它包括髓核突出、小关节退变、椎管狭窄和脊柱节段不稳等一系列病变^[4-7]。腰椎退变的实质是关节软骨发生退变,继发以关节边缘和软骨下骨质以增殖性新形成的一种关节病变^[8-9]。目前国内外治疗腰椎间盘突出退变疾病的主要措施有药物、激素、物理疗法及外科手术等治疗方法,这些疗法虽然可以缓解腰椎间盘突出退变,但不可以根治,甚至促进腰椎间盘突出退变^[10-13]。因此 hBMP7 基因疗法成为腰椎间盘突出退变性疾病治疗研究的热点。

本研究发现:随着时间的变化,各组的细胞数均有增加,hBMP7 组细胞增殖能力高于 LacZ 组、未转染组,差异有统计学意义,这说明 hBMP7 基因转染有促进细胞增殖的功能。有研究发现,当浓度为 50~200 ng/ml 时 BMP-7 重组蛋白具有促进髓核细胞增殖的能力^[14,15]。因此,转染 hBMP-7 基因可以促进细胞增殖可能是因为细胞产生 hBMP-7 蛋白逐渐积累,使细胞培养液中 hBMP-7 浓度升高,最终使髓核细胞增殖能力增强。

蛋白多糖和 II 型胶原是椎间盘组织内涵养水分的主要物质,二者含量的增加有利于逆转椎间盘退变^[16]。本研究发现,随着时间的延长,各组的 GAG 含量、II 型胶原含量均有增加,hBMP7 组 GAG 含量、II 型胶原含量高于 LacZ 组、未转染组,差异有统计学意义,这说明 hBMP7 基因转染有促进合成 GAG、II 型胶原的功能。这可能是由于 BMP-7 基因在髓核细胞表达后,分泌 BMP-7 到上清液中,自身及周围的髓核细胞细胞膜上的 BMP II 型受体和上清液中的 BMP-7 通过自分泌及旁分泌的形式结合,结合了 II 型受体的 BMP-7 被 I 型受体识别行成三聚体,I 型受体发生磷酸化,磷酸化的 I 型受体再作用于 Smad1 或 Smad5 使其继发磷酸化而被激活,激活后二者再结合 Smad4,进入胞核内,结合 PDRII-BFI 形成活性转录调节复合体,该复合体又与启动元素结合,从而作用 c-myc、P-15 等下游因子,从而促进细胞增殖和产生细胞外基质^[17-20]。

综合本次研究结果可知:hBMP-7 基因转染可提高髓核细

胞增殖能力,促进其产生细胞外基质。

参考文献(References)

- [1] Kim C K, Rhee J I. Optimization of Extracellular Production of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-7 (rhBMP-7) with *Bacillus subtilis*[J]. J Microbiol Biotechnol, 2013 Nov 13[Epub ahead of print]
- [2] Maria C G, Rodolfo C, Massimiliano C, et al. Cost effectiveness of tibial nonunion treatment: A comparison between rhBMP-7 and autologous bone graft in two Italian centres [J]. Injury, 2013, 44(12): 1871-1879
- [3] Yang X, Han G, Pang X, et al. Chitosan/collagen scaffold containing bone morphogenetic protein-7 DNA supports dental pulp stem cell differentiation in vitro and in vivo [J]. J Biomed Mater Res A, 2012 Feb 18. doi: 10.1002/jbm.a.34064. [Epub ahead of print]
- [4] Kanna R M, Shetty A P, Rajasekaran S. Patterns of lumbar disc degeneration are different in degenerative disc disease and disc prolapse magnetic resonance imaging analysis of 224 patients [J]. Spine J, 2014, 14(2): 300-307
- [5] 陈德胜,李燕,黄凌燕,等.白藜芦醇对大鼠腰椎间盘突出退变的影响[J].宁夏医科大学学报, 2011, 33(12): 1150-1152
Chen De-sheng, Li Yan, Huang Ling-yan, et al. Effect of Resveratrol on Expression of MMP -9 in the Lumbar Intervetral Disc Degeneration of Rats[J]. Journal of Ningxia Medical University, 2011, 33(12): 1150-1152
- [6] 罗平,陈学明,刘玉林,等.Peroxiredoxin II 在退变椎间盘髓核中的表达及临床意义[J].现代生物医学进展, 2011, 11(6): 1155-1157
Luo Ping, Chen Xue-ming, Liu Yu-lin, et al. Expression of peroxiredoxin II in nucleus pulposus of degenerative intervertebral disc and its clinical significance[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2011, 11(6): 1155-1157
- [7] 林委栋,林秋阳.经椎板开窗手术治疗腰椎间盘突出症的临床体会[J].辽宁医学院学报, 2012, 33(3): 228-229
Lin Wei-dong, Lin Qiu-yang. Feasibility of Clinical Fenestration Disc Removal Surgery for Lumbar Disc Herniation[J]. Journal of Liaoning Medical University, 2012, 33(3): 228-229

- [8] Colombier P, Clouet J, Hamel O, et al. The lumbar intervertebral disc: From embryonic development to degeneration [J]. Joint Bone Spine, 2013 Aug 7. pii: S1297-319X(13)00197-8
- [9] Ohtori S, Inoue G, Orita S, et al. No acceleration of intervertebral disc degeneration after a single injection of bupivacaine in young age group with follow-up of 5 years[J]. Asian Spine J, 2013, 7(3):212-217
- [10] Omair A, Holden M, Lie B A, et al. Treatment outcome of chronic low back pain and radiographic lumbar disc degeneration are associated with inflammatory and matrix degrading gene variants: a prospective genetic association study[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2013, 14: 105
- [11] Taher F, Essig D, Lebl D R, et al. Lumbar degenerative disc disease: current and future concepts of diagnosis and management [J]. Adv Orthop, 2012, 2012: 970752
- [12] Cheung K M, Samartzis D, Karppinen J, et al. Are "patterns" of lumbar disc degeneration associated with low back pain?: new insights based on skipped level disc pathology [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2012,37(7): E430-E438
- [13] Bisschop A, Mullender M G, Kingma I, et al. The impact of bone mineral density and disc degeneration on shear strength and stiffness of the lumbar spine following laminectomy [J]. Eur Spine J, 2012, 21(3): 530-536
- [14] Wang G D, Wu S Y, Han J X, et al. [Effects of rhBMP-7 on osteoblast differentiation of murine bone marrow mesenchymal stem cells in vitro] [J]. Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2012, 28(10): 1025-1028
- [15] Moghaddam-Alvandi A, Zimmermann G, Buchler A, et al. Results of nonunion treatment with bone morphogenetic protein 7 (BMP-7)[J]. Unfallchirurg, 2012, 115(6): 518-526
- [16] Hegewald A A, Medved F, Feng D, et al. Enhancing tissue repair in annulus fibrosus defects of the intervertebral disc: analysis of a bio-integrative annulus implant in an in-vivo ovine model[J]. J Tissue Eng Regen Med, 2013
- [17] Namatollahi L, Mahboudi F, Rahimpour A, et al. A novel human bone morphogenetic protein-7 variant with an enriched heparin-binding site[J]. Mol Biol (Mosk), 2013, 47(3): 453-460
- [18] Reichert J C, Cipitria A, Epari D R, et al. A tissue engineering solution for segmental defect regeneration in load-bearing long bones [J]. Sci Transl Med, 2012, 4(141): 141r-193r
- [19] Lee K B, Taghavi C E, Murray S S, et al. BMP induced inflammation: a comparison of rhBMP-7 and rhBMP-2 [J]. J Orthop Res, 2012, 30(12): 1985-1994
- [20] Busuttil N K, Ayoub A, McMahon J, et al. Mandibular reconstruction in the rabbit using beta-tricalcium phosphate (beta-TCP) scaffolding and recombinant bone morphogenetic protein 7 (rhBMP-7) - histological, radiographic and mechanical evaluations[J]. J Craniomaxillofac Surg, 2012, 40(8): e461-e469

(上接第 1430 页)

- [9] Ninomiya M, Shirabe K, Terashi T, et al. Deceleration of regenerative response improves the outcome of rat with massive hepatectomy[J]. Am J Transplant, 2010, 10(7): 1580-1587
- [10] 刘文渊, 张玉君, 徐土炳, 等. 离体肝切除联合自体肝移植大鼠模型的建立[J]. 山西医科大学学报, 2011, 42(9): 703-705
Liu Wen-yuan, Zhang Yu-jun, Xu Tu-bing, et al. Establishment of an extracorporeal liver resection and partial liver autotransplantation model in rats[J]. J Shanxi Med Univ, 2011, 42(9): 703-705
- [11] Benjamin M, Stutchfield, Stuart J, et al. Prospects for stem cell transplantation in the treatment of hepatic disease [J]. Liver Transpl, 2010, 16(7): 827-836
- [12] Lazarevich NL, Shavochkina DA, Fleishman DI, et al. Deregulation of hepatocyte nuclear factor 4(HNF4) as a marker of epithelial tumors progression[J]. Exp Oncol, 2010, 32(3): 167-171
- [13] 史冀华, 朱盛兴, 张水军. 大鼠肝部分切除术的应用解剖及实施[J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(22): 2516-2520
Shi Ji-hua, Zhu Sheng-xing, Zhang Shui-jun. Applied Anatomy of liver and partial hepatectomy in rats[J]. World Chin J Digestol, 2008, 16(22): 2516-2520
- [14] Aller MA, Lorente L, Prieto I, et al. Hepatectomies in the rat: A look at the caudate process through microsurgery [J]. Dig Liver Dis, 2009, 41(10): 695-699
- [15] Palmes D, Dietal KH, Derw G, et al. Auxiliary Partial orthotopic liver transplantation treatment of acute liver failure in a new rat model[J]. Langenbecks Arch Surg, 2002, 386(7): 534-541
- [16] Madrahimov N, Dirsch O, Broelsch C, et al. Marginal hepatectomy in the rat: from anatomy to surgery[J]. Ann Surg, 2006, 244(1): 89-98
- [17] Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells [J]. Science, 1999, 284(14): 1168-1170
- [18] 马军, 段芳龄, 李文晰, 等. 大鼠移植骨髓细胞向肝细胞转化的实验研究[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2003, 12(2): 138-143
Ma Jun, Duan Fang-ling, Li Wen-xi, et al. Study on differentiation of bone marrow cells into hepatic lineages in rat[J]. Chin J Gastro Hepa, 2003, 12(2): 138-143
- [19] 向国安, 张刚庆, 方驰华, 等. 同种异体骨髓间质干细胞移植在大鼠肝内定居能力初步研究 [J]. 第一军医大学学报, 2005, 25(8): 994-997
Xiang Guo-an, Zhang Gang-qing, Fang Chi-hua, et al. A preliminary study of the homing capacity of allograft mesenchymal stem cells to rat liver[J]. J First Mil Med Univ, 2005, 25(8): 994-997
- [20] 刘彦, 谭道玉, 李昌平, 等. 细胞移植对肝纤维化大鼠肝脏组织结构的影响[J]. 检验医学与临床, 2009, 12(6): 933-935
Liu Yan, Tan Dao-yu, Li Chang-ping, et al. Effect of transplanting hepatocyte-like cells on rat's hepatic histologic structure [J]. Lab Med Clin, 2009, 12(6): 933-935
- [21] Eguchi S, Lilja H, Hewitt WR, et al. Loss and recovery of live regeneration in rats with fulminant hepatic failure [J]. J Surg Res, 1997, 72(2): 112-122