

· 论 著 ·

hBMP2 和 hVEGF165 双基因修饰组织工程骨的构建及检测

范 伟,张 弓,安 洪,蒋电明,倪卫东
(重庆医科大学附属第一医院骨科 400016)

摘要:目的 构建 hBMP2 和 hVEGF165 双基因修饰的组织工程骨并检测其表达情况。方法 构建 hVEGF165 和 hBMP2 真核表达质粒,并转染至兔成骨细胞,以 DPB 为支架,构建双基因修饰的组织工程骨,同时采用 RT-PCR 和 Western blot 对两种基因表达情况进行检测。**结果** 转染 hBMP2 和 hVEGF165 的成骨细胞可以在 DPB 上贴附生长,并且体外表达时间可持续 7 d。**结论** 成功构建双基因修饰组织工程骨,且能有效表达,为其用于大段骨缺损修复奠定了实验基础。

关键词:组织工程骨;血管内皮细胞生长因子;骨形态发生蛋白;基因表达

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.24.006

中图分类号:R687.34;Q786

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)24-3317-03

Construction and detection of dual-gene-modified tissue engineering bone with the hBMP2 and hVEGF165

FAN Wei,ZHANG Gong,AN Hong,et al.

(Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective Construction of dual-gene-modified tissue engineering bone with hBMP2 and hVEGF165, and detection the genes expression. **Methods** This experiment is to construct pEGFP/hBMP2 and pEGFP/hVEGF165, which were both transfected into osteoblasts and then build a dual-gene-modified tissue engineering bone in vitro with the DPB as the frame. We detected the genes expression with RT-PCR and Western blot. **Results** Osteoblasts transfected plasmids of pEGFP/hBMP2 and pEGFP/hVEGF165 could be growthed in DPB, and the genes could continue to express about 7 d. **Conclusion** The dual-gene-modified tissue engineering bone were constructed successfully, the genes could be effective expressed in this tissue engineering bone, thus laying an experimental foundation for further observation of its revascularization and bone formation in vivo and for the repair of large bone defect.

Key words: tissue engineering bone; VEGF; BMP; gene expression

因创伤等造成的骨缺损在临床上十分常见,对缺损的修复主要采用骨移植的方法进行治疗。现有的治疗手段均存在一些缺陷,组织工程技术为骨缺损修复提供了新的途径。本实验构建 hBMP2 和 hVEGF16 基因修饰的组织工程骨,为进一步观察其在体内的再血管化和成骨活性,用于大段骨缺损修复奠定实验基础。

1 材料与与方法

1.1 材料 质粒 pIRES2-EGFP-hBMP2 及 pET22b-hVEGF165、pEGFP-C1 及大肠埃希菌 DH5 α 由重庆医科大学临床检验诊断学实验室保存。健康成年新西兰大白兔,雌雄不限,体质量 2.30~3.20 kg 和临产前 1 周孕兔,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.2 试剂和设备 过氧化氢和乙醚、环氧乙烷、Bgl II、Kpn I、EcoR I、DL2000 DNA maker、T4DNA 连接酶、质粒抽提试剂盒、DNA 产物纯化试剂盒、Lipofectamine、RNA 提取试剂盒、TaqplusDNA 聚合酶、PVDF 膜、PCR 仪、全自动酶标仪、凝胶成像系统、培养箱、荧光显微镜等。

1.3 方法

1.3.1 pEGFP/hVEGF165、pEGFP/hBMP2 重组质粒的构建及鉴定 (1)pEGFP/hVEGF165 质粒构建及鉴定:引物(由上海生工设计)上游 5'CGG CAG ATC TAT GAA CTT TCT GCT GTC TTG3';下游 5'GAT GGT ACC TCA CCG CCT CGG CTT GTC AC3'。以 pET22-hVEGF165 为模板,按下列体系及条件进行 PCR:94℃ 预变性 2 min;94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 45 s,30 个循环后 72℃ 延伸 5 min。PCR 产物经琼脂糖电泳分离后,进行 PCR 产物回收,用 Kpn I 和 Bgl II 酶切回收产物和 pEGFP-C1 质粒,加入 T4 连接酶进行连接反应。将

重组质粒转化至 DH5 α 进行培养,挑取阳性菌落,回收质粒,-20℃ 保存。采用 PCR 鉴定、Kpn I 和 Bgl II 双酶切鉴定、测序鉴定(上海英骏生物技术有限公司)等。(2)pEGFP/hBMP2 质粒构建及鉴定:用 EcoR I 和 Bgl II 分别酶切质粒 pIRES2-EGFP-hBMP2 和 pEGFP-C1 质粒,37℃ 反应 2 h。回收酶切产物,加入 T4 连接酶进行连接反应。将重组质粒转化至 DH5 α 进行培养,挑取阳性菌落,进行质粒回收,-20℃ 保存。采用 EcoR I 和 Bgl II 双酶切鉴定、测序鉴定。

1.3.2 成骨细胞的培养与鉴定 (1)成骨细胞的培养采用酶消化-组织块联合培养法分离、培养成骨细胞。取临产前 1 周新西兰大白兔胎颅骨顶部组织,浸泡于 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(PBS)中。将骨组织反复冲洗后剪成大约 2 mm×2 mm 的骨块,加入胶原酶消化后,均匀摆放于涂有胎牛血清的培养瓶中,置于培养箱中培养,每 2~3 天全量更换培养液。按 1:2 比例传代培养。(2)成骨细胞的鉴定在倒置相差显微镜下直接观察细胞的生长情况及形态特点。通过 ALP 染色、钙化结节染色对细胞进行观察鉴定。

1.3.3 pEGFP/hVEGF165、pEGFP/hBMP2 体外转染成骨细胞 采用脂质体法进行体外转染,将 pEGFP/hVEGF165、pEGFP/hBMP2 重组质粒共同转染至第 4 代成骨细胞。未转染的成骨细胞为对照组。48 h 后用荧光显微镜观察转染效果。

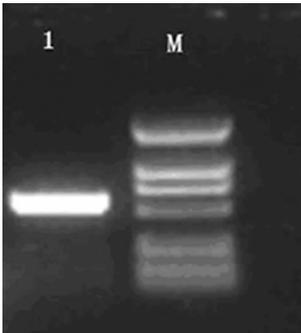
1.3.4 DPB 支架制作 采用过氧化氢-乙醚法制作 DPB 支架材料。用大白兔胫骨上端、股骨下端骨松质切割成 3 mm×4 mm×15 mm 的骨条。将骨条浸泡在盛有 20% 过氧化氢的容器中进行脱蛋白处理后,置入加有乙醚的 Soxhlet 容器中循环脱脂处理,由此制得的 DBP,用环氧乙烷密闭消毒,-20℃

保存。

1.3.5 组织工程骨的构建及检测 (1)成骨细胞与 DPB 体外复合培养:将 DPB 分为两组,实验组(复合转染 pEGFP/hVEGF165、pEGFP/hBMP2 的成骨细胞)和对照组(复合未转染的成骨细胞)。将细胞制成密度为 2×10^7 /mL 的细胞悬液,用微量移液器吸入 40 μ L,缓慢、均匀地浸滴在 DPB 材料上。将接种细胞后的 DPB 材料小心放入孵育箱中培养。(2)RT-PCR 检测 hBMP2 和 hVEGF165 mRNA 的表达:两组细胞于接种后 48 h,随机选取各组 2 个标本进行检测:①引物设计:VEGF165 上游 5'-TAC TGC CAT CCA ATC GAG ACC-3',下游 5'-GCA AGT ACG TTC GTT TAA CTC-3'。BMP2:上游 5'-CGA GCC AAC ACT GTG CGC AGC-3',下游 5'-CTT ATC TGT GAC CAG CTG TGT-3'。 β -actin 上游 5'-TCT TCC AGC CCT CCT TCC TG-3',下游 5'-CGT TTC TGC GCC GTT AGG T-3'。②提取细胞总 RNA。③RT 反应条件:42 $^{\circ}$ C 反转录 40 min,99 $^{\circ}$ C 灭活 5 min。④PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 2 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,57 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 60 s,30 个循环。取 RT-PCR 产物,进行电泳,在凝胶成像系统下成像并观察结果。(3)Western blot 检测 hBMP2 和 hVEGF165 蛋白的表达:将两组细胞接种到 DPB 上进行复合培养,分别选取接种后 1、3、7 d 的标本进行检测:①将胰酶消化后的培养液冰上裂解,制备成细胞上清液及蛋白电泳。②转膜,取上述电泳后凝胶,切胶后按次序与滤纸和 PVDF 膜层叠在一起,放入电转槽,4 $^{\circ}$ C、40 V 过夜。③加入各自抗体进行免疫反应。④化学发光,显影,定影。

2 结 果

2.1 PCR 反应扩增 hVEGF165 cDNA 以 pET22-hVEGF165 为模板的 PCR 产物经电泳显示,在 500 bp 与 750 bp 之间可见一明显扩增条带(图 1),与 hVEGF(约 647 bp)大小相符。



M:DL2000 DNA marker;1:hVEGF165。

图 1 以 pET22-hVEGF165 为模板 PCR 扩增产物电泳图

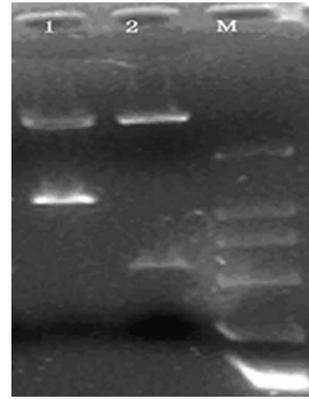
2.2 pEGFP/hVEGF165、pEGFP/hBMP2 重组质粒的双酶切鉴定及测序的结果 重组 pEGFP/hVEGF165 和 pEGFP/hBMP2 质粒经酶切、电泳后可见 1、2 泳道各出现两条片段(图 2),大小分别与 pEGFP (4.7 kb)、hBMP2 (1.2 kb) 和 hVEGF165 相符合,初步表明载体构建成功。质粒经序列分析证实分别含有 hVEGF165 基因序列和 hBMP2 基因序列。进一步证实 pEGFP/hVEGF165 质粒构建成功。

2.3 成骨细胞的培养及鉴定结果

2.3.1 原代培养细胞的观察 培养 2 d 后,可见少量细胞从骨块边缘爬出,并贴壁生长。5~7 d 细胞贴壁生长呈长梭形、不规则形(封 2 图 3)。培养 10 d 左右细胞基本长满培养瓶壁,细胞相互汇合后呈明显“铺路石”状。

2.3.2 传代细胞的观察 传至第 4 代,细胞形态以梭形为主。胞核呈圆形或椭圆形,居中或偏于一侧,呈集落样生长趋势,集

落中心细胞相互重叠(封 2 图 4)。



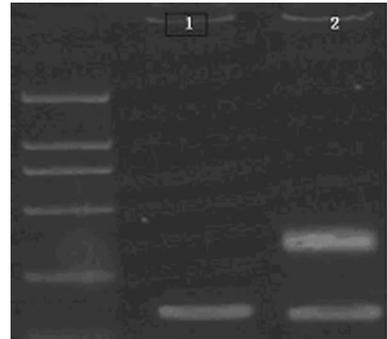
M: DL2000 DNA marker; 1: pEGFP/hBMP2; 2: pEGFP/hVEGF165。

图 2 pEGFP/hVEGF165 和 pEGFP/hBMP2 Bgl II 和 EcoR I 双酶切鉴定

2.3.3 ALP 染色 肉眼观察:在盖玻片上生长的第 4 代细胞布满黑褐色细小颗粒;镜下观察:第 4 代细胞质被染成黑褐色(封 2 图 5)。

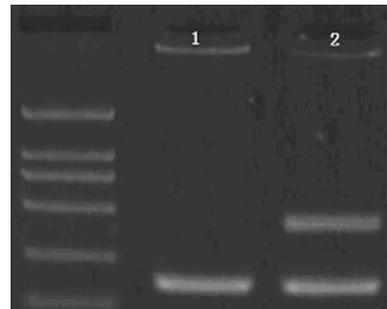
2.3.4 钙化结节染色 肉眼观察:在盖玻片上生长的第 4 代细胞可见散在的黑色结节;镜下观察:可见较多黑褐色结节分布在细胞周围(封 2 图 6)。

2.4 荧光显微镜观察转染效果 第 4 代成骨细胞经质粒转染后 48 h,荧光显微镜下可见对照组几乎无绿色荧光(封 3 图 7),转染组存在较亮的绿色荧光(封 3 图 8)。



1:对照组;2:转染组。

图 9 两组 hBMP2 mRNA 转录水平

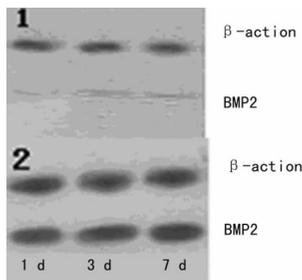


1:对照组;2:转染组。

图 10 两组 hVEGF165 mRNA 转录水平

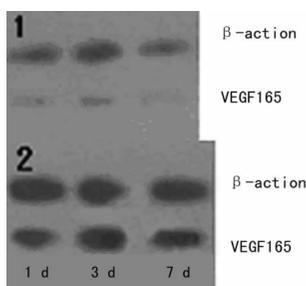
2.5 RT-PCR 检测 hBMP2 和 hVEGF165 mRNA 的表达 RT-PCR 结果表明,转染组的成骨细胞在复合 48 h 后均表达 hBMP2 和 hVEGF165 mRNA,对照组未见明显 mRNA 表达(图 9、10)。表明构建的组织工程骨可以在体外表达 hBMP2 和 hVEGF165 mRNA。

2.6 Western blot 检测结果 Western blot 结果表明转染组的成骨细胞在复合 1 d 即可见 hBMP2 和 hVEGF165 蛋白表达,至 7 d 后转染组还可以高表达两种蛋白,对照组未见明显 hBMP2 和 hVEGF165 蛋白表达或有痕量表达(图 11、12)。表明构建的组织工程骨可以在体外持续(7 d)表达 hBMP2 和 hVEGF165 蛋白。



1: 对照组; 2: 转染组。

图 11 两组 BMP2 蛋白表达水平



1: 对照组; 2: 转染组。

图 12 两组 hVEGF165 蛋白表达水平

3 讨论

血管内皮生长因子(VEGF)是一种特异性作用于血管内皮细胞并促进其增殖的细胞因子,与特异性受体结合后,刺激新生血管的形成^[1]。另外,VEGF 可增加成骨细胞数量,促进骨组织形成,同时减少骨吸收^[2]。因此,VEGF 可以明显加快组织工程骨的血管新生,促进骨缺损的修复^[3]。骨形态发生蛋白(BMP)参与骨骼的生长、发育及创伤的修复,主要表现为 BMP 的诱导成骨作用^[4]。BMP2 能引起细胞的增殖,参与骨的形成、改建和修复,它通过提高碱性磷酸酶的活性,提高骨钙素和胶原蛋白的表达,刺激未分化间充质细胞向成骨细胞定向分化,提高成骨细胞的成骨活性^[5]。虽然 BMP2 单独应用即有较强的诱导成骨活性,但骨修复是一个受多种细胞因子调控的过程,血管形成是其中非常重要的环节。VEGF 是机体内促进血管生长最重要的生长因子,对软骨内成骨及骨折愈合过程中的血管增生发挥重要作用^[6]。VEGF 在由 BMP 介导的成骨过程中非常重要,它们可以通过联合方式促进骨的再生^[7]。有研究表明,在体外培养的成骨细胞等,BMP 和 VEGF 可以相互促进表达,BMP 可对 VEGF 的表达起到正向调控作用^[8]。

支架材料是构建组织工程骨的基本要素之一^[9]。支架材料是细胞附着的基本框架和代谢场所,其影响着细胞生长、分化等多种功能活动。本实验采用的 DBP 为天然生物衍生骨支架材料,具有一定的强度和柔韧度,保存了原有的孔径及孔间连接等天然孔网系统,骨小梁结构得以保持,便于成骨细胞附着生长,为细胞增殖分化、功能发挥、营养物质的交换、血管的长入提供宽大的内部空间和表面积,从而发挥良好的传导成骨作用^[10-11]。经对其理化特性的检测,该材料 pH 值为弱碱性,与体外构建组织工程骨时的环境较一致,且利于钙盐的沉积;

材料在制备过程中经脱脂处理,使其抗原性得以基本消除^[12]。采用环氧乙烷熏蒸法消毒,其挥发的环氧乙烷气体可杀灭材料中的细菌等微生物。该消毒法具有操作简便、消毒彻底、便于保存等优点^[13]。

本实验将重组质粒 pEGFP/hBMP2 和 pEGFP/hVEGF165 分别和共同转染到成骨细胞中,构成组织工程骨中的种子细胞。再用 DPB 支架材料与种子细胞在体外进行复合培养。经观察,转染 hVEGF165 和 hBMP2 基因的成骨细胞在 DPB 上均能有效的贴附、生长、增殖。而且经 RT-PCR 和 Western blot 检测转染后的成骨细胞能在 DPB 上表达 hVEGF165 和 hBMP2,说明成功在体外构建了组织工程骨,为以后修复骨缺损和加快成骨和血管化的体内实验奠定了基础。

参考文献:

- [1] 白志刚,刘万林,苏秀兰,等. VEGF mRNA 与 BMP2 在非创伤性股骨头坏死中表达的研究[J]. 中国矫形外科杂志,2009,17(3):69.
- [2] Hall AP, Westwood FR, Wadsworth PF. Review of the effects of anti-angiogenic compounds on the epiphyseal growth plate[J]. Toxicol Pathol,2006,34:131.
- [3] Geiger F, Bertram H, Berger I, et al. Vascular endothelial growth factor gene-activated matrix(VEGF165-GAM) enhances osteogenesis and angiogenesis in large segmental bone defects[J]. J Bone Miner Res,2005,20:2028.
- [4] Kang Q, Sun MH, Cheng H, et al. Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery[J]. Gene Ther,2004,11(17):1312.
- [5] 张琳琳,戴红卫,张定铭,等. 大鼠正畸牙根吸收修复早期 BMP2 与 BSP 表达的研究[J]. 重庆医学. 2010,39(10):1214.
- [6] Bluteau G, Julien M, Magne D, et al. VEGF and VEGF receptors are differentially expressed in chondrocytes[J]. Bone,2007,40:568.
- [7] Peng H, Usas A, Olshanski A, et al. VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis[J]. J Bone Miner Res,2005,20(11):2017.
- [8] Pufe T, Claassen H, Scholz-Ahrens KE, et al. Influence of estradiol on vascular endothelial growth factor expression in bone: a study in gottingen miniature pigs and human osteoblasts[J]. Calcif Tissue Int,2007,80(3):184.
- [9] 武汉,张春秋,章培标,等. 纤维蛋白胶和异种无机骨构建复合支架材料与种子细胞的复合[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2007,11(1):52.
- [10] 范伟,安洪,蒋电明,等. DPB 为支架材料体外构建的组织工程骨[J]. 中华医学杂志,2006,47(12):3349.
- [11] 曹凯,舒勇,韩智敏,等. 过氧化氢-乙醚法制备 DPB 的理化性质研究[J]. 江西医学院学报,2008,48(1):5.
- [12] 李彦林,杨志明,解慧琪,等. 生物衍生组织工程骨支架材料的制备及理化特性[J]. 生物医学工程学杂志,2002,19(1):10.
- [13] 范伟. VEGF 基因修饰组织工程骨促进兔大段骨缺损修复的实验研究[D]. 重庆:重庆医科大学,2004.