

外培养的优点是取材方便、产量大、具有较强的增殖、分化能力,在适当的条件下可向成肌细胞、成软骨细胞和成骨细胞等多个方向分化。因此,骨骼肌卫星细胞在这些组织的组织工程研究中具有广阔的应用前景。肌肉介导是实现基因转移最安全、简便和有效的途径。可用目的基因转染骨骼肌卫星细胞,再将转染后的细胞移植入肌肉内,植入细胞可与局部肌肉融合并形成肌纤维,从而使目的基因在植入部位表达和分泌,以达到基因治疗的目的^[7]。本实验成功地构建了人 rhBMP7 的逆转录病毒载体,并通过逆转录病毒介导将人 rhBMP7 基因转入骨骼肌卫星细胞中。rhBMP-7 mRNA 表达的有无既是 rhBMP7 基因在骨骼肌卫星细胞基因组的整合是否有效的证明,也是细胞是否能表达 rhBMP7 多肽蛋白的前提。本实验通过 RT-PCR 证实重组基因逆转录病毒感染细胞后能够稳定地表达外源性 rhBMP7 的 mRNA 达 4 周以上。

经转染的骨骼肌卫星细胞是否能够合成外源性 rhBMP7 及是否具有生物学活性,以及其对细胞增殖、分化等生物学特性的影响这些具有实际意义的关键问题,仍在进一步研究中。逆转录病毒介导的基因转移具有将外源性基因插入靶细胞基因组的功能,能够获得外源性基因长效表达的特点^[8]。本实验也证实经转染的细胞 4~6 周后仍有外源性 rhBMP7 mRNA 的表达,这对于构建组织工程化骨组织是非常有利的。但同时由于逆转录病毒介导的基因转移是将外源性基因随机插入靶细胞基因组中的,因此是否会造成

细胞的畸变,经转染的细胞植入体内后是否会造成过量成骨或致癌、致畸等副效应仍有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 裴国献,杨润功,魏宽海,等.带血供肌瓣作为骨形态发生蛋白载体修复骨缺损的实验研究[J].中华外科杂志,2001,39(1):76-9.
Pei GX, Yang RG, Wei KH, *et al.* Vascular muscle flap combined with bone morphogenetic protein for forming bone bridge to repair bone defect: experimental study[J]. Chin J Surg, 2001, 39(1): 76-9.
- [2] 魏宽海,裴国献.组织损伤修复的基因疗法研究进展[J].中华外科杂志,2000,38(4):309-13.
Wei KH, Pei GX. Process of gene therapy for tissue repair[J]. Chin J Surg, 2000, 38(4): 309-13.
- [3] Franceschi RT, Wang D, Krebsbach PH, *et al.* Gene therapy for bone formation: *in vitro* and *in vivo* osteogenic activity of an adenovirus expressing BMP7[J]. J Cell Biochem, 2000, 78(2): 476-86.
- [4] Johnson SE, Allen RE. Proliferation cell nuclear antigen (PCNA) is expressed in activated rat skeletal muscle satellite cells [J]. J Cell Physiol, 1993, 154(1): 39-43.
- [5] 颜子颖,王海林.精编分子生物学实验指南[M].北京:科学出版社,2000,241-5.
- [6] Drissi H, Lomri A, Lasmoles F, *et al.* Skeletal unloading induces biphasic changes in insulin-like growth factor-1 mRNA levels and osteoblast activity[J]. Exp Cell Res, 1999, 251(2): 275-84.
- [7] Bonham L, Palmer T, Miller AD, *et al.* Prolonged expression of therapeutic levels of human granulocyte colony-stimulating factor in rats following gene transfer to skeletal muscle [J]. Hum Gene Ther, 1996,7(12): 1423-35.
- [8] Evans CH, Robbins PD, Pennsylvania P. Possible orthopaedic applications of gene therapy[J]. J Bone Joint Surg, 1995, 77(7): 1103-14.

胚胎小鼠组织的特异性转基因技术

获得功能的转基因技术对于研究基因的功能是非常重要的手段,但控制基因在适当的时间和地点进行表达是比较困难的。因为真正组织特异性的启动子很难找到,现在用逆转录病毒转染的方法又难以控制病毒的扩散。Saito 和 Nakatsuji 研究了一种基于电穿孔的基因转化系统。

电穿孔是一种用电流的脉冲来使细胞暂时对大分子具有通透性的转化方法,在体外被广泛的应用,在体内也成功的被用在小鼠胚胎的基因导入中。因为小鼠胚胎仅仅只能被培养很短的一段时间,所以观察转化基因的长期效应还很难。

在这个新的研究中,研究者在子宫内用电穿孔的方法将 DNA 导入胚胎小鼠的大脑一侧,另一侧作为对照。DNA 先被用微管注射到适合的位置,再加以电脉冲。在受精 13.5d 后,大脑能被清楚的通过子宫壁看到,更早期的胚胎就只能在子宫外进行基因转化了。90%以上的胚胎存活下来,大多数情况下,转基因表达在电穿孔后可以维持的 6 周。

Saito 和 Nakatsuji 开发的系统可以准确的定位转化基因的位置,还可以限制转化基因的表达,这个新技术对小鼠大脑的发育过程中的神经生物学研究会有很大的推动作用。