

[文章编号] 1000-1182(2008)04-0421-04

· 专栏论著 ·

腺相关病毒介导的骨形态发生蛋白7基因 促种植体周骨缺损修复的实验研究

宋珂, 杜建明, 罗仁惠, 曹颖光

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 口腔医学中心, 湖北 武汉 430030)

[摘要] 目的 观察载bmp7基因的腺相关病毒(rAAV-BMP7)复合Bio-Oss的基因治疗方法对种植体周骨缺损修复的影响。方法 体外构建载bmp7基因的腺相关病毒,并与Bio-Oss复合。6只雄性新西兰大白兔双侧胫骨植入种植体,并制备直径8mm、深4mm的种植体周骨缺损,A组骨缺损区填入rAAV-BMP7/Bio-Oss复合物;B组仅填入Bio-Oss;C组不充填材料。术后4、8周分期处死动物,取样进行组织学观察和形态学分析。结果 A、B组骨缺损处均有新骨形成,A组较B组新骨形成更早、新生骨量更多、骨成熟程度更高($P<0.05$)。结论 rAAV-BMP7复合Bio-Oss较单纯植入Bio-Oss能更快、更有效地促进种植体周围骨缺损形成新骨,新骨量大且成熟度高,并能形成理想的种植体-骨结合界面。

[关键词] 骨形态发生蛋白7; 基因治疗; 骨再生; 骨整合

[中图分类号] R783 [文献标识码] A

Effect of Bio-Oss loading with rAAV-BMP7 on regeneration of bone defects around dental implant SONG Ke, DU Jian-ming, LUO Ren-hui, CAO Ying-guang (Center of Stomatology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

[Abstract] Objective To evaluate in vivo gene delivery of Bio-Oss coated with adeno-associated virus-mediated human bone morphogenetic protein 7(rAAV-BMP7/Bio-Oss) for bone regeneration around dental implants. Methods In vitro rAAV-BMP7 were constructed and compounded with Bio-Oss. In 6 male New Zealand rabbits, two hydroxyapatite(HA) coated titanium dental implants were placed respectively to each animal in the bilateral tibia metaphysis. Before implantation, a standardized gap(8 mm in width, 4 mm in depth) was created between the implant surface and the surrounding bone walls. Rabbits were randomly divided into three groups(group A, B, C). Gaps of group A were filled with rAAV-BMP7/Bio-Oss($n=4$), gaps of group B were filled with Bio-Oss alone($n=4$), and gaps of group C were filled with nothing($n=4$). The rabbits were sacrificed at 4 and 8 weeks respectively, and the sclerous tissue slices obtained, then histology and histomorphometric analysis were conducted. Results Histological and histomorphometric analysis revealed an enlarged bone-forming area in the bone defects of group A and B at 4 and 8 weeks after implantation. Greater bone-implant contact was achieved with rAAV-BMP7/Bio-Oss than with Bio-Oss alone and this difference was statistically significant($P<0.05$). Conclusion rAAV-BMP7/Bio-Oss can induce a stronger peri-implant bone reaction and larger new bone formation than Bio-Oss alone in the treatment of bone defects adjacent to titanium dental implants.

[Key words] bone morphogenetic protein 7; gene therapy; bone regeneration; osseointegration

因龋病、牙周病、肿瘤和外伤等导致牙齿缺失的同时,还可能造成牙槽骨或颌骨组织的缺损,直接影响种植义齿的修复治疗和长期稳定。目前临床

通常采用自体骨、异体骨或人工骨替代品移植等方法修复骨组织缺损,但仍存在多次手术、疗程长及疗效难以控制等一些不足^[1]。为了寻求更迅速、有效、简便的方法,近年来应用促骨生长因子基因治疗的实验研究受到关注。其中骨形态发生蛋白7(bone morphogenetic protein 7, BMP7)又称成骨形态发生蛋白1,是目前公认的可促进牙和种植体周围骨再生的重要因子之一^[2]。本研究拟利用腺相关

[收稿日期] 2008-02-28; [修回日期] 2008-04-24

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30572065/C03031103);教育部留学回国人员启动基金资助项目(教外司留[2004]527号)

[作者简介] 宋珂(1982-),女,湖北人,博士

[通讯作者] 曹颖光, Tel: 027-83663225

病毒(adeno-associated virus, AAV)作为基因治疗的载体,将重组人bmp7基因导入实验动物骨内种植体周围骨缺损处,对缺损骨组织的再生及骨结合情况进行观察。

1 材料和方法

1.1 材料

质粒pAAV-BMP7(包含完整的蛋白编码区,约1.3 kb,本实验室构建^[3],其中含有人全长序列(2 kb)的bmp7基因购于美国Open biosystems公司。腺相关病毒系统AAV Helper-Free System(由江苏省人类功能基因组重点实验室韩晓惠赠)。AAV-293细胞(ATCC公司,美国);磷酸钙转染试剂盒(中国碧云天有限公司);新生牛血清(Gibco公司,美国);质粒大提试剂盒(Qiagen公司,德国);肝素层析柱(Sigma公司,美国);Biomax-100K NMWL过滤装置(Millipore公司,美国)。

羟磷灰石涂层钛种植体(3.3 mm×12.0 mm)12颗(北京莱顿生物材料有限公司),无机牛骨Bio-Oss(Geistlich Pharma公司,瑞士)。Leica 1600SP硬组织切片(Leica公司,德国),种植机(Satelec公司,法国),BLB种植器械盒(北京莱顿生物材料有限公司)。

1.2 重组腺相关病毒rAAV-BMP7包装及滴度测定

将质粒大提试剂盒抽提的AAV Helper-Free System的质粒pAAV-BMP7、pAAV-RC及pHelper以摩尔比1:1:1混合,按磷酸钙转染试剂盒使用方法共转染AAV-293细胞,对照组转染pAAV-hrGFP、pAAV-RC及pHelper。转染后8 h换液,72 h收集细胞,于液氮及37℃水浴反复冻融收集病毒上清液,肝素亲和层析法纯化,继以Biomax-100K NMWL过滤装置浓缩、去盐^[4],最终的病毒液贮存于-80℃备用。斑点杂交测定重组病毒的物理性滴度,选取含有CMV启动子的pAAV-MCS质粒作为rAAV滴度测定的标准品,倍比稀释后与重组病毒一起于100℃煮沸变性后点于尼龙膜上,杂交后显色比较。将rAAV-BMP7病毒液浸润Bio-Oss颗粒,抽真空,每天0.5 h,连续3 d,保存于4℃冰箱中。

1.3 动物实验

新西兰大白兔6只,雄性,体重4.0~4.5 kg(同济医学院动物中心提供),随机分成A、B、C组,每组2只。常规脱毛、消毒后质量浓度为20 g/L戊巴比妥钠(每千克体重35 mg)行耳缘静脉麻醉,暴露双侧胫骨干骺端,按标准方法在每侧制备3.3 mm×12 mm的羟磷灰石涂层钛种植体骨腔,并在上部制备直径为8 mm、深4 mm的圆柱状骨缺损(种植体周骨缺损约

2.35 mm)。植入并确认种植体稳定后,A组在双侧种植体上部缺损处填入浸润rAAV-BMP7病毒液的Bio-Oss颗粒(n=4),B组的双侧仅填入Bio-Oss颗粒(n=4),C组双侧不填入任何材料(n=4)。分层缝合关闭术区。术后庆大霉素肌肉注射,每天1次,连续3 d。所有实验的大白兔均无死亡,切口无感染,愈合良好。

1.4 组织标本的制备及观察

分别于术后第4周(共3组,每组1只动物、2枚种植体)及第8周(共3组,每组1只动物、2枚种植体)处死动物。取胫骨立即用体积分数为10%甲醛溶液固定7 d后转入体积分数为70%乙醇内,行梯度脱水,氯仿媒浸,聚甲基丙烯酸甲酯包埋,用硬组织切片沿种植体长轴平行胫骨向连续切割,暴露骨移植材料与种植体结合面,手工磨片,使数张切片厚度均为20~30 μm。甲苯胺蓝染色,树胶封片。每组切片各随机选5张,在倒置显微镜下观察组织形态,并运用HMIAS-2000高清晰度彩色医学图像分析系统定量测定种植体-骨结合百分率及新生骨的百分率^[5]。

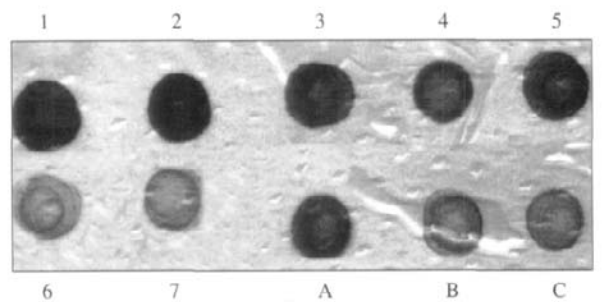
1.5 统计学分析

采用SPSS 13.0软件进行统计分析,测量数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量数据采用t检验。

2 结果

2.1 rAAV-BMP7斑点杂交测定病毒滴度

rAAV-BMP7斑点杂交结果见图1。由图1比较得知,病毒滴度为 2.5×10^{11} vector genomes/mL,即每毫升病毒液的病毒颗粒中含有的基因组拷贝总数为 2.5×10^{11} 。



1-7为标准品倍比稀释后的杂交印迹,其依次为 3×10^{12} 、 2×10^{12} 、 1×10^{12} 、 5×10^{11} 、 2.5×10^{11} 、 1.25×10^{11} 、 6.25×10^{10} vector genomes/mL; A: rAAV-BMP7病毒原液; B: rAAV-BMP7病毒液稀释2倍; C: rAAV-BMP7病毒液稀释4倍

图1 rAAV-BMP7斑点杂交测定病毒滴度

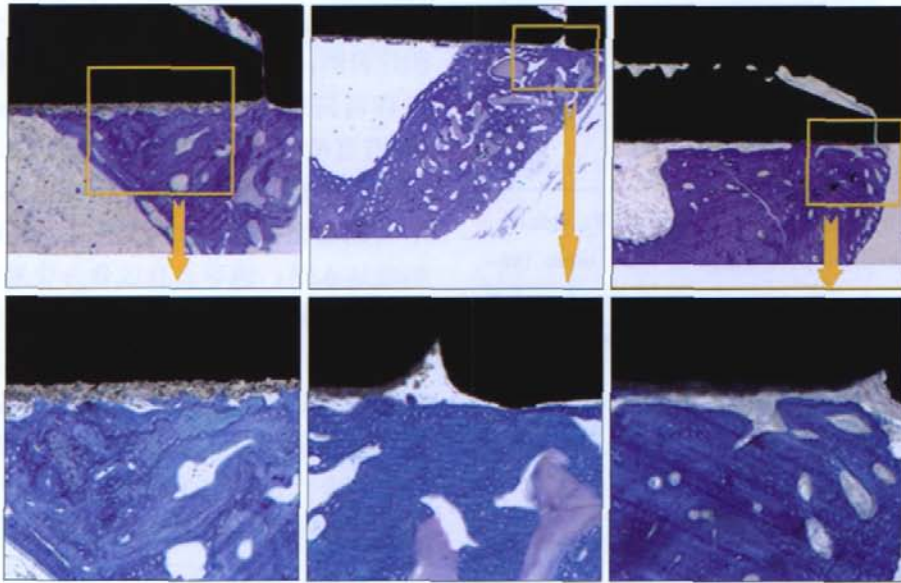
Fig 1 Dot-blot assay for rAAV-BMP7 physical particle titer

2.2 组织学观察

4周组织切片显示(图2),A组散在分布的Bio-Oss颗粒表面新骨形成较多,周围的骨小梁相互连接

成桥，种植体与新生骨之间结合增多；B组可见Bio-Oss颗粒散在分布，表面有少量的新骨形成，骨小梁较A组细小，骨小梁间空腔较多；C组的骨缺损与种植体之间新骨形成很少。8周组织切片显示(图

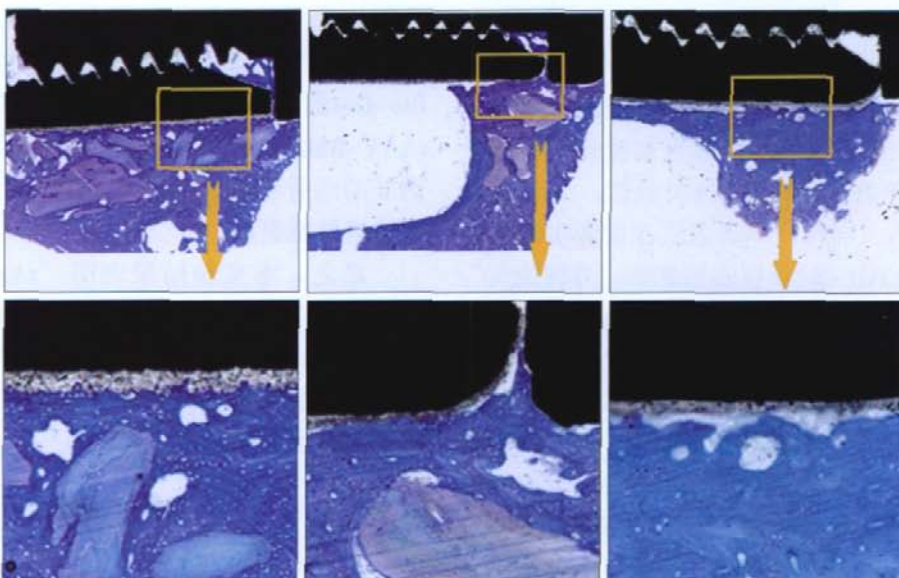
3)，A组骨缺损区新骨与B组相比更加成熟致密，种植体表面新骨形成明显增多，骨整合良好，可见环形板状哈弗氏系统形成；C组种植体表面仍存在间隙。



左：A组；中：B组；右：C组

图 2 4周时各组种植体周围骨缺损修复的组织学观察 甲苯胺蓝染色 上 ×25；下 ×40

Fig 2 Morphology of bone defects regeneration around the peri-implant of different groups after 4 weeks of healing toluidine blue staining top ×25; bottom ×40



左：A组；中：B组；右：C组

图 3 8周时各组种植体周围骨缺损修复的组织学观察 甲苯胺蓝染色 上 ×25；下 ×40

Fig 3 Morphology of bone defects regeneration around the peri-implant of different groups after 8 weeks of healing toluidine blue staining top ×25; bottom ×40

2.3 组织形态学定量测定结果

骨结合百分率测量结果见表1。由表1可见，rAAV-BMP7/Bio-Oss组、Bio-Oss组样本缺损区新生骨与种植体之间的骨结合百分率随时间延长而增加，均明显高于空白组。统计分析结果表明，4、8

周时，rAAV-BMP7/Bio-Oss组骨结合百分率均高于Bio-Oss组($P<0.05$)。各组骨缺损区新生骨百分率测量结果见表2，由表2可见，rAAV-BMP7/Bio-Oss组新生骨百分率在4、8周时均高于Bio-Oss组($P<0.05$)。

表 1 4周及8周时各组种植体-骨结合百分率的比较 (%, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Compared to percentage of new bone-to-implant contact of different groups at the 4 and 8 weeks post-gene delivery (% , $\bar{x} \pm s$)

时间	骨结合百分率		
	rAAV- BMP7/Bio- Oss组	Bio- Oss组	空白组
4周	61.76 \pm 1.87	43.33 \pm 2.01	7.88 \pm 0.78
8周	87.65 \pm 1.50	64.41 \pm 1.08	11.09 \pm 1.38

表 2 4周及8周时各组新生骨百分率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Compared to percentage of new bone formation of different groups at the 4 and 8 weeks post-gene delivery (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	新生骨百分率	
	4周	8周
Bio- Oss组	28.05 \pm 1.26	49.16 \pm 3.57
rAAV- BMP7/Bio- Oss组	46.60 \pm 1.18	72.54 \pm 1.05

3 讨论

有关BMP的研究已不陌生，然而直接应用BMP促进成骨不仅需要较高的诱导剂量，且半衰期短，其临床应用受到限制。因此选用合适的载体，将BMP导入骨组织缺陷处的基因治疗方法受到关注。Fang等^[6]以质粒为载体，把鼠全长BMP4 cDNA包被于胶原中直接植入鼠5 mm股骨缺损中，结果显示虽然BMP4质粒诱导合成了BMP4蛋白来加速骨缺损的愈合，但质粒介导的BMP4表达时间短暂，无法得到长期稳定的表达。同样，本课题组在前期实验中构建pCDNA3.1(+)-TGF- β 1真核表达载体，并转染大鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)，短期内检测到细胞中肿瘤生长因子1基因表达水平增高^[7-8]。这些质粒表达载体对细胞的转染率低，无法整合于细胞核中长期稳定的表达，限制了其在基因治疗中的应用。Dunn等^[9]选用腺病毒携带bmp7基因，联合胶原植入大鼠的下颌骨缺损区，生物发光视像测量结果显示，在骨缺损区10 d内有持续、定向的转基因表达，但有研究表明腺病毒能引起体内T淋巴细胞强烈的免疫应答，会相对降低基因的成骨诱导作用。本实验选用的重组腺相关病毒已经完全去除了病毒基因组中的编码序列，不表达病毒自身蛋白，免疫原性低^[10]，组织形态学定量测定结果显示第4周和第8周时rAAV- BMP7/Bio- Oss组的骨结合百分率及新生骨量明显比Bio- Oss组高，说明AAV作为基因治疗的载体能长期稳定地表达目的基因，加快促进新骨形成。

按照基因转移的技术路线可将基因治疗分为间接体内法和直接体内法。从患者体内获得靶细胞，在体外将治疗基因转移入该细胞，经过体外筛选、培养、扩增后再将阳性细胞回输到患者体内而发挥作用，这是间接体内法^[7]。将DNA略加修饰或包裹后直接注射入患者体内适当部位并有效表达而达到治疗目的，称为直接体内法^[11]，本实验选用体内法，将病毒滴度为 2.5×10^{11} vector genomes/mL的rAAV- BMP7直接应用于诱导成骨的部位，使病毒载体在体内广泛感染应用部位的组织细胞，整合于细胞核中长期稳定的表达BMP7蛋白，增加其在骨组织中的表达水平，诱导具有成骨分化潜能的成骨始祖细胞向成骨细胞分化而成骨^[12]。组织学及形态测量结果皆显示，基因治疗组的新骨形成优于其他组，说明病毒滴度为 2.5×10^{11} vector genomes/mL的AAV已足以应用于体内且可发挥相应的治疗作用。

现今广泛应用于临床的人工骨材料只具有骨传导作用而无骨诱导能力，成骨作用相对较差。以人工骨材料为支架，辅以基因工程技术可使材料具有长期稳定的骨诱导能力，能更有效、快速地促进骨修复。Bio- Oss的多孔隙结构，不仅有利于骨缺损部位新骨的形成和长入，还有利于病毒颗粒的附着，为基因治疗载体提供了理想的支架。骨结合百分率及新生骨百分率测量结果显示，rAAV- BMP7/Bio- Oss组在新骨形成及种植体骨结合能力上均优于同期Bio- Oss组。rAAV- BMP7起到了诱导成骨的作用，rAAV- BMP7与Bio- Oss复合可同时发挥骨传导、骨诱导的成骨优势，新骨形成更早，新生骨量更多，骨的成熟度更高。

总之，本实验结果表明，rAAV- BMP7与Bio- Oss的复合可加快新骨形成，提高新生骨量，骨的成熟度更高，缩短了种植体植入后骨整合的时间，为后续研究和改进基因治疗方法促种植体周围骨缺损修复提供了实验基础。

[参考文献]

[1] Hammerle CH, Glauser R. Clinical evaluation of dental implant treatment[J]. Periodontol 2000, 2004, 34(1) 230- 239.
 [2] Thomadakis G, Ramoshebi LN, Crooks J, et al. Immunolocalization of bone morphogenetic protein-2 and -3 and osteogenic protein-1 during murine tooth root morphogenesis and in other craniofacial structures[J]. Eur J Oral Sci, 1999, 107(5) 368- 377.
 [3] Song K, Rao N, Chen M, et al. Construction of adeno-associated virus system for human bone morphogenetic protein 7 gene [J]. J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci, 2008, 28(1) :17- 21.

- tein expression correlates with poor differentiation, enhanced malignant potential, and more aggressive clinical behavior of epithelial ovarian tumors[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(2) :779- 785.
- [9] Benezra R, Davis RL, Lockshon D, et al. The protein Id : A negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins[J]. Cell, 1990, 61(1) :49- 59.
- [10] Ouyang XS, Wang X, Lee DT, et al. Over expression of Id-1 in prostate cancer[J]. J Urol, 2002, 167(6) :2598- 2602.
- [11] Coppe JP, Itahana Y, Moore DH, et al. Id-1 and Id-2 proteins as molecular markers for human prostate cancer progression[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(6) :2044- 2051.
- [12] Desprez PY, Hara E, Bissell MJ, et al. Suppression of mammary epithelial cell differentiation by the helix-loop-helix protein Id-1 [J]. Mol Cell Biol, 1995, 15(6) :3398- 3404.
- [13] Desprez PY, Lin CQ, Thomasset N, et al. A novel pathway for mammary epithelial cell invasion induced by the helix-loop-helix protein Id-1[J]. Mol Cell Biol, 1998, 18(8) :4577- 4588.
- [14] Fong S, Itahana Y, Sumida T, et al. Id1 as a molecular target in therapy for breast cancer cell invasion and metastasis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(23) :13543- 13548.
- [15] Lyden D, Young AZ, Zagzag D, et al. Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts[J]. Nature, 1999, 401(6754) :670- 677.
- [16] Langlands K, Down GA, Kealey T. Id proteins are dynamically expressed in normal epidermis and dysregulated in squamous cell carcinoma[J]. Cancer Res, 2000, 60(21) :5929- 5933.
- [17] 郑丰平, 袁世珍, 冯智英, 等. TSP、VEGF与大肠癌血管生成、转移关系的研究[J]. 实用肿瘤杂志, 2000, 15(6) :394- 397.
- ZHENG Feng-ping, YUAN Shi-zhen, FENG Zhi-ying, et al. Study on relationship between TSP, VEGF and neovascularization and metastasis of carcinoma of large intestine[J]. J Pract Oncology, 2000, 15(6) :394- 397.
- [18] Sargiannidou I, Qiu C, Tuszynski GP. Mechanisms of thrombospondin-1-mediated metastasis and angiogenesis [J]. Semin Thromb Hemost, 2004, 30(1) :127- 136.
- [19] Bomstein P. Thrombospondins : Structure and regulation of expression[J]. FASEB J, 1992, 6(14) :3290- 3299.
- [20] Qian X, Tuszynski GP. Express of thrombospondin-1 in cancer : A role in tumor progression[J]. Proceedings Society Experimental Biology Medicine, 1996, 212(3) :199- 207.
- [21] Sargiannidou I, Zhou J, Tuszynski GP. The role of thrombospondin-1 in tumor progression[J]. Exp Biol Med(Maywood), 2001, 226(8) :726- 733.
- [22] 黄生福, 杨竹林, 苗雄鹰, 等. 胰腺癌组织中IL-8 mRNA, TSP-1 mRNA表达及与微血管计数的关系[J]. 中国现代医学杂志, 2004, 14(12) :83- 85.
- HUANG Sheng-fu, YANG Zhu-lin, MIAO Xiong-ying, et al. Study on expressions of IL-8 mRNA, TSP-1 mRNA and their relationship with microvessel counts in pancreatic carcinoma tissues[J]. Chin J Modern Med, 2004, 14(12) :83- 85.
- [23] Albo D, Shinohara T, Tuszynski GP. Up-regulation of matrix metalloproteinase 9 by thrombospondin 1 in gastric cancer[J]. J Surg Res, 2002, 108(1) :51- 60.

(本文编辑 王 晴)

(上接第 424 页)

- [4] Auricchio A, Hildinger M, O Connor E, et al. Isolation of highly infectious and pure adeno-associated virus type 2 vectors with a single-step gravity-flow column[J]. Hum Gene Ther, 2001, 12(1) :71- 76.
- [5] Prousaefs P, Lozada J. Use of titanium mesh for staged localized alveolar ridge augmentation : Clinical and histologic-histomorphometric evaluation[J]. J Oral Implantol, 2006, 32(5) :237- 247.
- [6] Fang J, Zhu YY, Smiley E, et al. Stimulation of new bone formation by direct transfer of osteogenic plasmid genes[J]. Proc Natl Acad Sci, 1996, 93(11) :5753- 5758.
- [7] 曹颖光, 王 戎, 宋 珂, 等. 转化生长因子-1基因治疗对种植体周围骨质疏松的影响[J]. 华西口腔医学杂志, 2007, 25(4) :335- 338.
- CAO Ying-guang, WANG Rong, SONG Ke, et al. Effects of transforming growth factor-1 gene therapy on bone rarefaction around endosseous implant[J]. West China J Stomatol, 2007, 25(4) :335- 338.
- [8] 王 戎, 曹颖光, 王华均, 等. TGF-1基因真核表达载体的构建及在BMSCs中的表达[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2005, 14(2) :217- 221.
- WANG Rong, CAO Ying-guang, WANG Hua-jun, et al. Construction of eukaryotic vector carrying TGF-1 gene and its expression in bone mesenchymal stem cells[J]. Chinese J Histochemistry Cytochemistry, 2005, 14(2) :217- 221.
- [9] Dunn CA, Jin Q, Taba MJ, et al. BMP gene delivery for alveolar bone engineering at dental implant defects[J]. Mol Ther, 2005, 11(2) :294- 299.
- [10] Seisenberger G, Ried MU, Endress T, et al. Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-associated virus[J]. Science, 2001, 294(5548) :1929- 1932.
- [11] Schek RM, Hollister ST, Krebsbach PH. Delivery and protection of adenoviruses using biocompatible hydrogels for localized gene therapy[J]. Mol Ther, 2004, 9(1) :130- 138.
- [12] Ulrich-Vinther M. Gene therapy methods in bone and joint disorders. Evaluation of the adeno-associated virus vector in experimental models of articular cartilage disorders, periprosthetic osteolysis and bone healing[J]. Acta Orthop Suppl, 2007, 78(325) :1- 64.

(本文编辑 汤亚玲)