

骨形成蛋白 2 基因转染的人牙周膜成纤维细胞的骨诱导作用

司晓辉 刘 正

【摘要】 目的 建立表达骨形成蛋白 2 (BMP-2) 的人牙周膜成纤维细胞 (HPDLFs), 观察其体内成骨作用, 为牙周缺损修复基因疗法的建立提供实验依据。方法 采用脂质体载体将人 BMP-2 噬菌粒表达载体 pBK-B2 转染至 HPDLFs。利用免疫组化 ABC 法检测转染细胞内 BMP-2 蛋白的表达, 并于无菌条件下将转染细胞注射于裸鼠股部肌肉内, 21 d 后取材, 苏木精—伊红染色观察肌肉组织内骨形成情况。结果 BMP-2 基因转染后 HPDLFs 内有 BMP-2 蛋白的表达。在注射 BMP-2 基因转染细胞的肌肉组织内可见明显的新骨形成。结论 BMP-2 基因成功转入 HPDLFs 中并得到有效表达, 转染 BMP-2 基因的 HPDLFs 能够在体内诱导新骨形成。

【关键词】 骨形成蛋白; 人牙周膜成纤维细胞; 基因转染; 诱导; 成骨

Bone Induction by Human Periodontal Ligament Fibroblasts Transfected with Bone Morphogenetic Protein 2 Gene

SI Xiaohui, LIU Zheng. (Research Institute of Stomatology, The Ninth People's Hospital, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200011, China)

【Abstract】 Objective To establish human periodontal ligament fibroblasts (HPDLFs) that express bone morphogenetic protein 2 and observe their osteogenesis *in vivo*, so as to provide fundamental data for future study on gene therapy of periodontal defect treatment. **Methods** The phagemid expression vector for BMP-2 (pBK-B2) was transfected into HPDLFs by using Lipofect AMINE. The BMP-2 expression was determined by immunohistochemical ABC method. The BMP-2 gene transfected HPDLFs were injected into thigh muscle of nude mice under sterile condition. Specimens were collected in 21 days after injection and underwent normal procedures for fixation, decalcification, embedding, incising and staining with HE. **Results** The results demonstrated that BMP-2 protein expressed in HPDLFs after BMP-2 gene transfection. The HPDLFs transfected with BMP-2 gene could induce new bone formation at the injection site. **Conclusion** The results indicated that BMP-2 gene was transfected successfully and expressed efficiently in HPDLFs. The HPDLFs transfected with BMP-2 gene are capable of inducing new bone formation *in vivo*.

【Key words】 bone morphogenetic protein; human periodontal ligament fibroblasts; gene transfection; induction; osteogenesis

牙周膜细胞,包括牙周膜成纤维细胞(periodontal ligament fibroblasts, PDLFs)、成骨细胞、成牙骨质细胞等是牙周组织再生和形成新附着的重要成分,但在牙周炎症或创伤时,牙周膜再生细胞数量及其生物学功能的降低则阻碍了牙周组织的完全再生。骨形成蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)能够诱导新骨形成,用于牙周组织再生具有良好的应用前景,但是应用天然或重组 BMP 面临制备过程繁杂、活性不稳定及免疫原性等问题。利用基因治疗的方法促进骨的

愈合和再生是目前研究的热点之一,它通过病毒或非病毒载体,以直接或间接方法将 BMP 基因导入受损部位,可以提供更具生理活性的蛋白质,且经济有效^{1,2}。本研究以 BMP-2 为目的基因,人牙周膜成纤维细胞(human PDLFs, HPDLFs)为载体细胞,建立表达 BMP-2 的人牙周膜成纤维细胞,并观察其体内成骨作用,为牙周缺损修复的基因疗法提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要材料

低糖 DMEM、胰蛋白酶、脂质体 LipofectAMINE 转染试剂盒和 G418 (Gibco 公司,美国),超级新生牛血清 FBS(杭州四季青生物工程研究所),BMP-2 噬菌粒表达载体 pBK-B2(笔者构建)³,免疫组化 ABC 试剂盒(Vector 公司,美国),6 周龄雄性裸鼠(上海第二医科大学动物中心提供)3 只,体重 15~17 g。

本课题为国家自然科学基金(编号 30000191)、中国博士后科学基金(编号 中博基 1999 第 17 号)及上海市博士后基金(编号 沪科 2000 第 487 号)资助项目

作者单位:200011 上海第二医科大学第九人民医院口腔医学研究所

1.2 HPDLFs的原代培养及BMP-2基因转染

取12岁男孩因正畸需要而拔除左上颌第一前磨牙的牙周组织,参照已建立的方法进行牙周膜细胞的原代培养并作细胞来源鉴定,将第4代细胞用于转染。采用脂质体载体将pBKB2和不含BMP-2片段的空载体pBK分别转染至HPDLFs,设未转染细胞为对照。转染3d后弃去原培养液,加入含G418 200 mg/L、10% FBS的DMEM培养液,在标准环境下培养,10d后未转染细胞全部死亡,而转染pBKB2和pBK(均含G418抗性基因neo)的细胞能在G418压力下生成抗性克隆,扩大培养G418抗性的细胞。

1.3 转染细胞内BMP-2的表达

利用鼠抗人BMP-2单克隆抗体进行免疫组化ABC法染色,检测上述细胞内BMP-2蛋白的表达。

1.4 裸鼠体内注射及组织学观察

第4代转染pBKB2的细胞经胰酶消化、0.01 mol/L PBS (pH 7.4)离心洗涤后,以 1×10^{10} 个/L的密度悬浮于100 μ l PBS中,无菌条件下注射于裸鼠股部肌肉内。21d后取股部肌肉,常规固定、脱钙、包埋,苏木精-伊红染色。以相同条件注射未转染细胞、转染pBK细胞和PBS作为对照。

2 结 果

2.1 转染细胞内BMP-2的表达

在转染pBKB2细胞的细胞质中有BMP-2的棕色阳性信号(图1),而未转染细胞和转染pBK的细胞内为阴性,证明BMP-2基因转染成功且在HPDLFs中得到表达。



图1 转染BMP-2基因的HPDLFs细胞质呈阳性 ABC $\times 400$

Fig 1 HPDLFs transfected BMP-2 gene demonstrated protein positive signals ABC $\times 400$

2.2 组织学观察

在注射转染pBKB2细胞的肌肉组织内有明显的新骨形成,且以软骨组织为主(图2),而注射未转染细胞、转染pBK细胞及PBS的肌组织间未见明显改变,证明BMP-2基因转染的HPDLFs能够在体内诱导新骨形成。

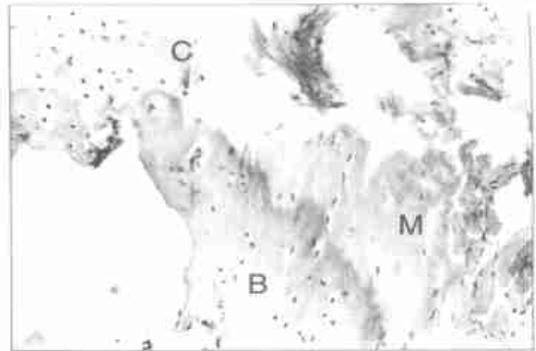


图2 注射BMP-2基因转染的HPDLFs肌肉组织内可见新骨形成 HE $\times 400$

C:软骨,B:骨,M:肌肉

Fig 2 New bone formed in the intramuscular injected with HPDLFs transfected BMP-2 gene HE $\times 400$

3 讨 论

牙周疾病治疗的理想效果不仅在于终止病变本身,更在于促进牙周组织的再生,包括牙周膜、牙骨质和牙槽骨的再生,达到牙周组织结构与功能的完全恢复。自然发生的牙周修复过程由于受到各种全身及局部因素的影响,其修复能力是有限的。目前,大量的人体和动物研究集中于破坏了的牙周组织的重建,以恢复由牙周疾病所引起的骨缺损为主。BMP的异位诱骨活性用于牙周组织的再生越来越受到重视,特别是基因工程技术的发展,能够大量生产重组的BMP。虽然原核和昆虫表达系统也用于BMP蛋白的表达,但哺乳动物表达系统更有利于翻译后修饰,包括蛋白二聚体化、糖基化、前体蛋白去除及蛋白的有效分泌等。目前用于牙周组织修复研究最多的是重组人BMP-2和BMP-7。

然而BMP生理半衰期短,植入体内易被快速降解吸收。虽然多种复合材料可作为BMP的载体,但是目前仍未建立理想的BMP释放系统,影响了BMP的临床应用。采用基因治疗的方法,外源性BMP基因可直接在宿主体内完成表达和加工,能够完整地保留其天然结构,且在体内表达的BMP呈现出生物亲和方式,而这种方式是外源性BMP所不能模仿的。此外,BMP受体是典型的跨膜蛋白,外源性BMP由于不能与其受体发生有效结合,不会引起生物学反应或反应短暂,而内源性合成的BMP能够插入细胞质膜与受体高效结合,进而引发一系列的生物学反应¹。利用BMP基因治疗刺激新骨形成避免了复杂且昂贵的蛋白纯化步骤,使成本显著降低。骨髓基质细胞、骨膜细胞、成肌细胞、C3H10T1/2细胞、CHO细胞、成骨细胞、成纤维细胞和牙龈细胞等可作为BMP基因

治疗的载体细胞⁴⁻⁶,但是尚未见以牙周膜成纤维细胞作为载体细胞的报道。由于牙周组织的遗传特性和组织特性,尤其是原代培养所得到的细胞是由多种细胞亚群构成,因此必须对所培养的细胞进行生物学特性观察并作细胞来源鉴定,同时寻找合适的培养条件,以保持细胞生物学性状的稳定,减少细胞异质性的影响。本实验所培养的 HPDLFs 的生长曲线、倍增时间、贴壁率和细胞形态均与文献报道相近,免疫组化结果证明所培养的细胞为来源于中胚层的、非上皮源性、非血管内皮源性、非神经源性的成纤维细胞,染色体核型为正常人的染色体组型,说明本实验培养的细胞可靠,可用于进一步的研究⁷。

目前使用的基因导入方法包括物理法(微注射和基因枪等)和载体法,载体又分为非病毒载体和病毒载体。非病毒载体便宜且较少抗原性,安全性高,但其基因表达往往是瞬时的,表达效率亦不高^{1,8}。而利用病毒载体介导基因转移,以其转染率高和良好的靶向性成为被广泛应用的方法,这其中包括逆转录病毒和腺病毒载体等。对于局部骨组织修复,暂时的基因表达可能会更有利,只需在组织愈合期内有足够高的 BMP 产生即可防止过度骨化。由于腺病毒载体可以转染分裂或静止细胞,病毒基因不发生整合,基因突变的可能性小,所以骨组织的修复多采用腺病毒载体。然而腺病毒载体易诱发宿主针对病毒蛋白和基因表达产物的免疫反应,但可通过应用免疫抑制剂和载体改造等方法来解决^{9,10}。本实验中新骨的生成量较少,可能与应用的噬菌粒表达载体(原核、真核细胞内均可表达)的转染效率较低和蛋白表达量较少有关,这也是笔者下一步要解决的问题。研究证实,肌肉组织在 BMP 蛋白的诱导下,首先出现局部间充质细胞的迁移、聚集和增生(3~5 d),随后间充质细胞逐渐分化为成软骨细胞和软骨细胞(7~11 d),最后软骨细胞肥大,软骨外基质钙化,在钙化的软骨上合成类骨质,直至软骨全部由骨代替(14~21 d)。按照这一过程,同时考虑到 BMP-2 基因转染细胞的蛋白分泌量可能少于纯化或重组的蛋白,所以笔者选择注射后 21 d 观察成熟骨的形成。

本研究结果显示,HPDLFs 转染 BMP-2 基因后,BMP-2 能够在细胞中得到表达,并且能够在裸鼠体内诱导新骨形成。在体外实验还发现转染 BMP-2 基因的 HPDLFs 具备了成骨细胞的表型,表现为碱性磷酸酶活性提高、骨钙素合成增加及矿化能力提高(另文报道)。结合体内外实验结果,笔者认为表达 BMP-2

的 HPDLFs 细胞诱导新骨形成,一方面是以自分泌形式即分泌的 BMP-2 作用于 HPDLFs 本身,促进其向成骨样细胞分化;另一方面是以旁分泌形式,即分泌的 BMP-2 作用于裸鼠肌肉内的未分化间充质细胞,诱导其向骨-软骨细胞分化。Krebsbach 等⁵认为,由 BMP-7 转导的人成纤维细胞在免疫受损小鼠体内能够诱导新骨形成,而新骨为供体人和受体鼠的嵌合体,支持了上述观点。利用 HPDLFs 作为载体细胞的优点是转基因的细胞不仅作为目的蛋白的“小加工厂”为局部提供 BMP,而且 HPDLFs 是 BMP 作用的靶细胞之一,在缺损局部补充了前体细胞的不足,更有利于牙周组织的修复。

参考文献

- 1 Scaduto AA, Lieberman JR. Gene therapy for osteoinduction. *Orthop Clin North Am*, 1999, 30 (4): 625-633
- 2 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 Cell Biochem*, 2000, 78 (3): 476-486
- 3 司晓辉, 杨连甲, 金岩. 转染人骨形成蛋白 2 基因对 NIH3T3 细胞生物学行为的影响. *中华口腔医学杂志*, 1999, 34 (2): 103-105
- 4 Gonda K, Nakaoka T, Yoshimura K, et al. Heterotopic ossification of degenerating rat skeletal muscle induced by adenovirus-mediated transfer of bone morphogenetic protein-2 gene. *J Bone Miner Res*, 2000, 15 (6): 1056-1065
- 5 Krebsbach PH, Gu K, Franceschi RT, et al. Gene therapy-directed osteogenesis: BMP-7-transduced human fibroblasts form bone *in vivo*. *Hum Gene Ther*, 2000, 11 (8): 1201-1210
- 6 Gazit D, Turgeman G, Kelley P, et al. Engineered pluripotent mesenchymal cells integrate and differentiate in regenerating bone: A novel cell-mediated gene therapy. *J Gene Med*, 1999, 1 (2): 121-133
- 7 司晓辉, 刘正. 人牙周膜成纤维细胞的体外培养及生物学性状. *陕西医学杂志*, 2001, 30 (4): 195-197
- 8 Musgrave DS, Bosch P, Ghivizzani S, et al. Adenovirus-mediated direct gene therapy with bone morphogenetic protein-2 produces bone. *Bone*, 1999, 24 (6): 541-547
- 9 Okubo Y, Bessho K, Fujimura K, et al. Osteoinduction by bone morphogenetic protein-2 via adenoviral vector under transient immunosuppression. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 267 (1): 382-387
- 10 Baltzer AW, Lattermann C, Whalen JD, et al. Genetic enhancement of fracture repair: Healing of an experimental segmental defect by adenoviral transfer of the BMP-2 gene. *Gene Ther*, 2000, 7 (9): 734-739

(2000-08-21 收稿, 2003-07-15 修回)

(本文编辑 王晴)