

重组 2 型腺相关病毒-人骨形成蛋白 7 转染犬髓核细胞及其对髓核细胞表型的影响

王超锋, 阮狄克, 张 超, 王德利, 辛洪奎, 张 燕

(海军总医院骨科 100048 北京市海淀区阜成路 6 号)

【摘要】目的: 观察重组 2 型腺相关病毒-人骨形成蛋白 7 (recombinant adeno-associated virus-2 expressing human bone morphogenetic protein-7, rAAV2-hBMP7) 转染犬髓核细胞情况及其对细胞表型的影响。**方法:** 用 1 岁龄 Beagle 犬 L4/5 椎间盘髓核进行髓核细胞体外培养, 取第 2 代髓核细胞进行实验, 实验组以 rAAV2-hBMP7 (1×10^5 v.g./细胞) 转染髓核细胞, 对照组以重组 2 型腺相关病毒-增强型绿色荧光蛋白 (recombinant adeno-associated virus-2 expressing enhanced green fluorescent protein, rAAV2-EGFP) 转染髓核细胞。在转染后 4d、7d 和 14d 以 PCR 检测髓核细胞中 hBMP7 的 mRNA 表达, 在转染后 7d 和 14d 以 Western blot 法检测髓核细胞中 hBMP7 蛋白表达。在转染后 4d、7d 和 14d 采用 RT-PCR 法检测蛋白多糖、I 型胶原和 II 型胶原的 mRNA 含量, 采用二甲苯蓝及 ELISA 法分别检测蛋白多糖、I 型胶原和 II 型胶原的蛋白含量。**结果:** 实验组髓核细胞表达 hBMP7 mRNA 及蛋白, 并于转染后 7d 时表达量最高, 而对照组无表达。实验组髓核细胞蛋白多糖 mRNA 及蛋白含量在转染后 7d 和 14d 时较 4d 时明显增高, 14d 时较 7d 时亦明显升高 ($P < 0.05$), 对照组各时间点无统计学差异 ($P > 0.05$); 4d 时实验组与对照组比较无明显差异, 7d 和 14d 时较对照组明显增加 ($P < 0.05$)。同组各时间点 I 型胶原 mRNA 及蛋白含量均无统计学差异, 两组各时间点间比较无统计学差异 ($P > 0.05$)。实验组髓核细胞 II 型胶原 mRNA 及蛋白含量在转染后 7d 和 14d 时较 4d 时明显增高, 14d 时较 7d 亦明显升高 ($P < 0.05$), 对照组各时间点无统计学差异 ($P > 0.05$); 实验组 4d 时与对照组比较无明显差异, 7d 和 14d 时较对照组明显增加 ($P < 0.05$)。**结论:** rAAV2-hBMP7 转染犬髓核细胞后能表达 hBMP7 蛋白, 并能提高其蛋白多糖及 II 型胶原含量。

【关键词】 基因转染; 人骨形成蛋白 7; 重组 2 型腺相关病毒; 髓核细胞

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2010.11.07

中图分类号: R681.5, Q78 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2010)-11-0907-06

Effects of adeno-associated virus-2 mediated human BMP-7 gene transfection on the phenotype of nucleus pulposus cells/WANG Chaofeng, RUAN Dike, ZHANG Chao, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2010, 20(11): 907-912

【Abstract】 Objective: To investigate the effects of recombinant adeno-associated virus-2 expressing human bone morphogenetic protein-7 (rAAV2-hBMP7) on the phenotype of canine nucleus pulposus (NP) cells. **Method:** The NP cells were derived from lumbar 4-5 intervertebral disc of 1 year old beagle dog. The 2nd passage NP cells were cultured and transfected by rAAV2-hBMP7 at multiplicities of infection of 1×10^5 genomes per cell (experiment group), while the control group cells by recombinant adeno-associated virus-2 expressing enhanced green fluorescent protein (rAAV2-EGFP). NP cells were assessed semi-qualitatively for BMP7 expression by RT-PCR at 4, 7 and 14 days after transfection. BMP7 protein expressed by NP cells were assayed by Western blot at 7 and 14 days post-transfection. Aggrecan, type I and type II collagen secreted by NP cells were qualitatively assayed at 4, 7 and 14 days after transfection in the transfection and control groups by dimethylmethylene blue (DMMB) and ELISA method. **Result:** The NP cell transfected by rAAV2-hBMP7 expressed human BMP7 mRNA and BMP7 protein. Their expression level reached peak at the 7th

基金项目: 国家自然科学基金重点支持项目 (批准号: 30730095)

第一作者简介: 男 (1978-), 医学博士, 主治医师, 研究方向: 脊柱外科、组织工程研究

电话: (010) 68780323 E-mail: fengwcf2007@163.com

通讯作者: 阮狄克

days. However, these proteins could not be detected in the control group at any time points. In experiment group, the accumulation of proteoglycans mRNA and protein at 7 and 14 days after transfection were remarkably higher than that of 4 days after transfection. Moreover, the accumulation of proteoglycans mRNA and protein at 14 days was higher than that of 7 days ($P < 0.05$). However, the accumulation of proteoglycans mRNA and protein showed no significant difference at any time points in the control group ($P > 0.05$). The accumulation of proteoglycans mRNA and protein in the experiment group was not different from that of the control group at 4 days, but higher than that of control group at 7 and 14 days ($P < 0.05$). The accumulation of type I collagen mRNA and protein in each groups showed no difference at any time points. Moreover, there was no difference at each time point in both groups ($P < 0.05$). In the experiment group, the accumulation of II collagen mRNA and protein at 7 and 14 days were remarkably higher than that at 4 days. Moreover, the accumulation of II collagen mRNA and protein at 14 days post-transfection was higher than that at 7 days ($P < 0.05$). However, the accumulation of II collagen mRNA and protein showed no significant difference at any time points in the control group ($P > 0.05$). The accumulation of II collagen mRNA and protein in experiment group was not different from that of the control group at 4 days, but higher than that of the control group at 7 and 14 days ($P < 0.05$). **Conclusion:** The NP cells transfected by the rAAV2-hBMP7 can overexpress hBMP7. The rAAV2-hBMP7 is capable of promoting the expression of proteoglycans and type II collagen of NP cells.

【Key word】 Gene transfection; Bone morphogenetic protein-7; Recombinant adeno-associated virus type-2; Nucleus pulposus cell

【Author's address】 Department of Orthopaedic Surgery, Navy General Hospital, Beijing, 100048, China

椎间盘细胞尤其是髓核细胞在维持椎间盘生物学功能及椎间盘高度方面发挥着重要作用。动物实验已证实自体髓核细胞移植能有效修复或者阻止椎间盘退变^[1,2]。但实验中发现,髓核细胞在体外培养时增殖能力差,细胞表型易丢失^[3,4]。Zhang 等^[5-7]利用腺病毒介导人骨形成蛋白 7(human bone morphogenetic protein-7, hBMP7)及 hBMP10 基因成功增加关节软骨细胞的蛋白多糖及 II 型胶原含量。而目前利用腺相关病毒将 hBMP7 基因转染至髓核细胞以增加髓核细胞功能蛋白的表达尚未见报道。本研究拟通过重组 2 型腺相关病毒 (recombinant adeno-associated virus-2, rAAV2) 将外源性人 BMP7 基因导入犬髓核细胞,以增强髓核细胞的生物学活性,使其能表达更多的蛋白多糖及 II 型胶原。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

DMEM 培养液、PBS、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (Hyclone), 0.25% Trypsin-EDTA (Gibco)。PCR、RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司; PCR 引物根据 PCR 引物设计原则,按照人 BMP7、犬蛋白多糖、I 型胶原、II 型胶原及甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 基因序列,利用 Primer

Premer 5 软件设计,由北京博迈德生物公司合成。重组 2 型腺相关病毒-人骨形成蛋白 7 (recombinant adeno-associated virus-2 expressing human bone morphogenetic protein-7, rAAV2-hBMP7) 及重组 2 型腺相关病毒-增强型绿色荧光蛋白 (recombinant adeno-associated virus-2 expressing enhanced green fluorescent protein, rAAV2-EGFP) (两载体病毒滴度均为 5.1×10^{11} v.g/ml) 由本元正阳公司包装。

1.2 犬髓核细胞的体外培养及转染

本实验经海军总医院动物管理中心同意,犬髓核组织取自 1 岁龄 Beagle 犬。犬麻醉后左侧卧位,无菌铺单后,按后外侧入路显露 L4/5 椎间盘,切开纤维环组织,取 2~3g 髓核组织,无菌环境下用 PBS 冲洗,锋利眼科剪剪成约 1mm^3 的组织块,用 0.1% 的 II 型胶原酶在 37℃ 的培养箱中消化 4h, 3000r/min 离心, PBS 漂洗,离心 3 次,加入含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基,于细胞培养箱中培养,取第 2 代细胞进行进一步实验。

以不同梯度的 rAAV2-EGFP 转染犬髓核细胞,参考文献^[9]的 rAAV2 对成纤维细胞的最佳转染复数 (multiple of infection, MOI) 测定方法,测定 rAAV2 病毒对髓核细胞的最佳 MOI,转染后 7d 分别在相差显微镜与荧光显微镜下观察髓核细胞的形态及 EGFP 表达情况,再以流式细胞仪

检测能够表达绿色荧光蛋白的髓核细胞占总细胞的率, 确定 rAAV2 对犬髓核细胞的最佳 MOI, 实验组以测得的最佳 MOI 用 rAAV2- hBMP7 转染犬髓核细胞, 对照组以 rAAV2-EGFP 转染犬髓核细胞。转染方法参考文献^[8]。

1.3 hBMP7 mRNA 的检测

采用 RT-PCR 法检测 hBMP7 mRNA。在转染后 4d、7d 和 14d 分别收集两组细胞, 以 hBMP7-F: 5'-AGATAGCCATTTCTCACC-3' 和 hBMP7-R: 3'-GTTCTGCGGTTCTTGGT-5' 为上下游引物, 以 PCR 法检测转染后髓核细胞 mRNA 中是否含有 hBMP7 基因序列, 如含有则能正确扩增出 564bp 的碱基片段。细胞总 RNA 的提取按 Trizol 常规提取 RNA 的方法进行。按两步法进行 RT-PCR 检测。以犬的 GAPDH 为内参, 上下游引物分别为: GAPDH-F: 5'-AAGGCTGTGGGCAAGG-3', GAPDH-R: 3'-TGGGTGAGGAGGTGAAA-5'。对 PCR 产物以 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。溴化乙锭 (EB) 染色后紫外灯下观测, 采集结果, 采用 Bandscan 5.0 软件对采集的结果中各条带的灰度值及条带面积进行定量, 以目的条带与内参条带比值使得结果半定量。

1.4 hBMP7 蛋白的检测

采用 Western blot 法检测 hBMP7 蛋白。在转染后 7d 和 14d 两组髓核细胞分别以蛋白裂解液裂解, -20℃ 低温离心, 取上清提取总蛋白, 95℃ 加热 5min 使蛋白变性。取 20mg 总蛋白在 SDS-PAGE 胶中电泳, 并转至硝酸纤维膜上。用 5% 的脱脂牛奶封闭硝酸纤维膜, 再以抗人 BMP7 (Santa Cruz Biotechnology, USA) 鼠源单克隆抗体 4℃ 孵育过夜。一抗以 1:1000 稀释。内参为 β -actin 单克隆抗体 (1:25000 稀释液; Santa Cruz Biotechnology City, State, USA)。摇床震荡洗涤 3 次, 再加羊抗鼠 IgG (1:5000 稀释; Santa Cruz Biotechnology) 二抗室温下孵育 2h, 洗涤后, 以酶连接化学免疫发光剂 (Applygen Technologies Inc., Beijing, China) 浸泡。用 LAS 1000 分析仪曝光目的条带

(Kodak Photo Film, City, State, USA)。利用内参 β -actin 进行标准化, 用 Bandscan 5.0 软件对采集结果中各条带的灰度值及条带面积进行定量, 以目的条带与内参条带比值使得结果半定量。

1.5 蛋白多糖、I 型胶原和 II 型胶原 mRNA 含量的检测

采用 RT-PCR 法检测转染后 4d、7d 和 14d 实验组和对照组髓核细胞中目的基因 mRNA 的含量, 以评估转染后髓核细胞产生的 hBMP7 对髓核细胞自身合成蛋白多糖和 I、II 型胶原 mRNA 产生的影响。应用 SYBR Green Master Mix (Takara, Tokyo, Japan) 试剂盒进行 PCR 反应, 反应所用引物见表 1, 反应中所需的各组各时间点样本 cDNA 为方法 1.3 两步法中第一步所获得的反应产物。RT-PCR 具体步骤如下: 取 SYBR Green 10 μ l、cDNA 1 μ l、上下游引物各 0.5 μ l (使引物量达 5 μ g)、无菌水 8 μ l, 配置成 20 μ l 反应体系, 置入 Bio-Rad 生产的 Mini real-time PCR 机, 设置程序: 第一步: 95℃ 5min, 第二步共 40 个循环: 95℃ 15s, 72℃ 30s, 第三步: 熔解曲线分析, 以 GAPDH 作为内参, 用以标准化蛋白多糖和 I、II 型胶原 mRNA 含量。将各基因所获得的扩增循环数 (cycle threshold, CT) 同内参基因 CT 值做差来标准化。

1.6 蛋白多糖含量测定

在转染后 4、7 和 14d, 分别以 100mg/ml 的木瓜蛋白酶对两组细胞进行消化, 37℃ 孵育 4h, 取 20 μ l 木瓜蛋白酶消化液加入 96 孔板, 同时将不同浓度的蛋白多糖标准品 20 μ l (用标准 S-GAG 溶液制作) 加入 96 孔板中, 再用多头加样枪同时加入浓度 50mg/L 二甲基蓝 (dimethylmethylene blue, DMMB) 染液 200 μ l, 显色 1min 后, 立即在 650nm 的酶标仪上测吸光度。绘制标准曲线, 按绘制的标准曲线计算各样本中的蛋白多糖含量。

1.7 I 型和 II 型胶原蛋白含量的检测

用 ELISA 法检测 I、II 型胶原蛋白含量。培养至 4d、7d 和 14d 的两组细胞分别用蛋白酶裂解

表 1 I 型胶原、II 型胶原、蛋白多糖和 GAPDH 的 mRNA 引物序列

	上游引物	下游引物
I 型胶原	5'-AAGAAGAAGACATCCACCACTC-3'	3'-ACAACACGCTACTGCACTAGA-5'
II 型胶原	5'-CCCGAACCCACAAACAACA-3'	3'-CCGAGACGTGACTTACCGA-5'
蛋白多糖	5'-CCTACGATGTCTACTGCTATGTGG-3'	3'-CTTAGACTATTGCGGTGGGAC-5'
GAPDH	5'-ATGTTTGTGATGGGCGTGAA-3'	3'-TGACGAACCGAGGAGATCGG-5'

液冰上裂解,分别取 100 μ l 加入 96 孔板中,每个样本 3 个复孔。I、II 型胶原蛋白标准品用牛 I、II 型胶原蛋白(Sigma-Aldrich,USA)溶液制作。置于 4℃ 中孵育过夜,用 0.01M PBS 和 0.5% Tween 20 洗涤,再以 1% 牛血清室温下封闭 1h,洗涤后,以 1:1000 的 I、II 型胶原鼠源性单克隆抗体(Sigma-Aldrich,USA)室温下孵育 2h,洗涤后,以抗鼠 IgG 抗体(Sigma-Aldrich)室温下孵育 1h,以交联磷酸酶的生物素(Sigma-Aldrich,USA)孵育 1h,每孔中加入对硝基苯磷酸二乙酯(Sigma-Aldrich,USA)20 μ l 孵育 20min,用 3M NaOH 中和反应,置入酶标仪(Bio-Rad,USA)中,在 405nm 处读取吸光度值,按绘制的标准曲线计算各样本各胶原含量。

1.8 统计学处理方法

共进行 6 次独立实验。组间各时间点所得数据采用方差分析,组内不同时间点间数据比较采用方差分析中的 q 检验,统计学软件为 SPSS 13.0, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

两组转染后犬髓核细胞在 2 周培养观察期内细胞均以长梭形为主,细胞形态良好,两组间未见明显的细胞形态差异。对照组在荧光显微镜下观察可见大部分髓核细胞能发出绿色荧光,说明被 rAAV2-EGFP 转染后的髓核细胞可表达 EGFP 蛋白(图 1)。通过流式细胞仪检测 rAAV2-hBMP7 对犬髓核细胞的最佳 MOI 为 1×10^5 v.g/细胞。

对照组各时间点均未见 564bp 的阳性条带,只显示大小为 252bp 的内参条带;实验组在转染后 4d、7d 和 14d 均能够扩增出 564bp 的目的条带和 252bp 的内参条带(图 2),转染后 4d、7d 和 14d 目的条带与内参条带的比值分别为 4.1 ± 0.6 、 5.2 ± 0.7 和 1.7 ± 0.3 ,7d 时 hBMP7 基因 mRNA 相对表达量最高($P < 0.05$)。

对照组在转染后 7d 和 14d 均未观察到 hBMP7 蛋白阳性条带;实验组在转染后 7d 和 14d 均检测到 hBMP7 蛋白的表达(图 3),转染后 7d、14d 目的条带与内参条带的比值分别为 2.1 ± 0.4 ,

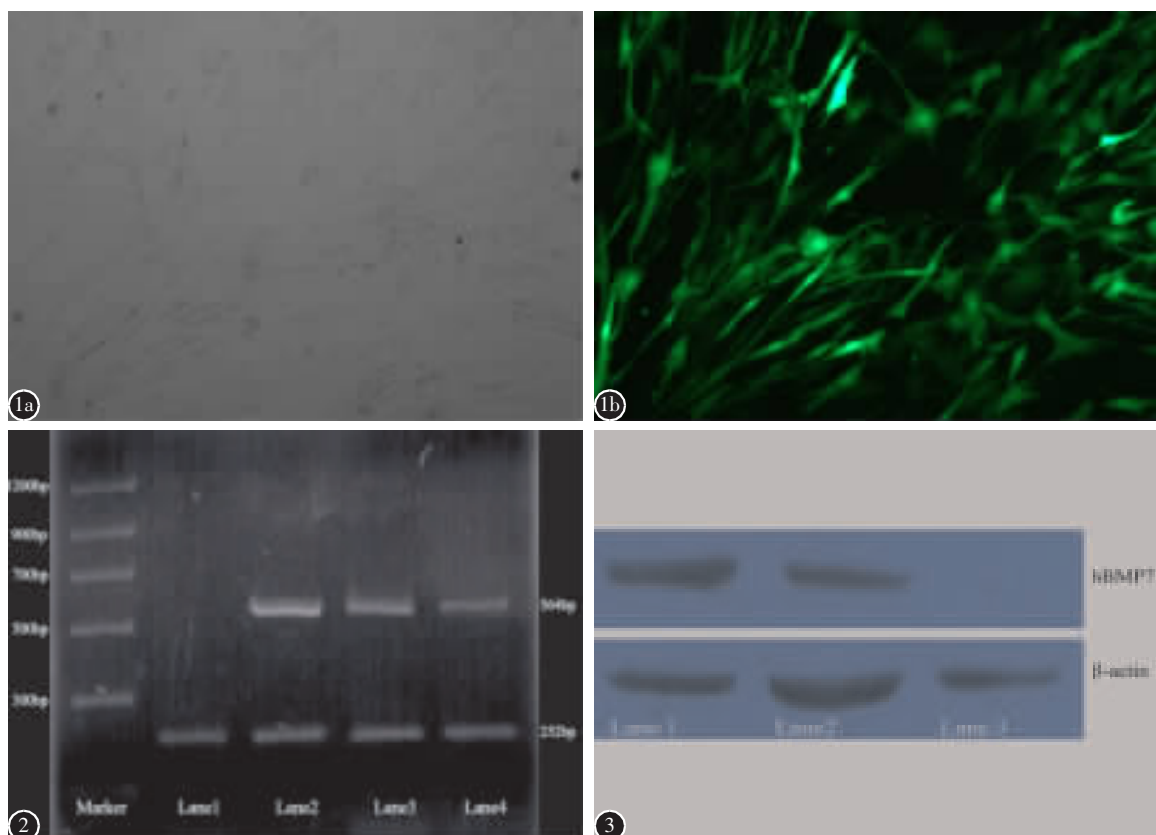


图 1 对照组转染后 7d a 相差显微镜下髓核细胞呈梭形,形态正常,胞浆丰富 b 荧光显微镜下可见表达绿色荧光蛋白的髓核细胞 图 2 转染后髓核细胞表达 hBMP mRNA 的 PCR 电泳结果(Lane1 为对照组,Lane2、3、4 分别为实验组转染后 4d、7d 和 14d) 图 3 转染后髓核细胞 hBMP7 蛋白表达结果(Lane1 和 Lane2 分别为实验组转染后 7d 和 14d,Lane3 为对照组)

0.4±0.1, 转染后 7d hBMP7 蛋白表达量相对较高。

两组转染后犬髓核细胞中蛋白多糖和 I、II 型胶原蛋白 mRNA 含量检查结果见表 2。转染后 4d 时实验组细胞蛋白多糖 mRNA 含量和 II 型胶原 mRNA 含量与对照组比较均无统计学差异, 7d 和 14d 时均较对照组明显增加 ($P<0.05$), 实验组随着时间延长表达量逐渐增加 ($P<0.05$)。I 型胶原 mRNA 含量同组各时间点比较及各时间点两组间比较均无统计学差异 ($P>0.05$)。

转染后 4、7、14d 两组犬髓核细胞蛋白多糖蛋白和 I、II 型胶原蛋白含量见表 3。转染后 4d 蛋白多糖蛋白和 II 型胶原蛋白含量两组间无明显差异, 转染后 7d 和 14d 时实验组较对照组明显增加 ($P<0.05$), 实验组随着时间延长蛋白含量逐渐增加 ($P<0.05$)。I 型胶原蛋白含量同组各时间点比较及各时间点两组间比较均无统计学差异 ($P>0.05$)。

3 讨论

有研究证实转化生长因子- β (TGF- β) 家族中的许多成员都能调节椎间盘细胞的代谢, 在体内环境中能促进椎间盘细胞的合成代谢^[9,10]。BMP7 又名成骨蛋白-1 (OP-1), 是 TGF- β 超家族中的一员, 对软骨分化和代谢有潜在调节作用^[6]。研究发现 BMP7 是目前发现的 BMP 家族中能最有效促进牛髓核细胞合成蛋白多糖的一种生长因子^[5]。

An 等^[10]利用兔模型将重组人 BMP7 直接注入退变的椎间盘组织中以治疗退变性椎间盘疾

病, 虽然研究结果显示体内直接注射 BMP7 能提高兔髓核细胞的蛋白多糖含量, 但理论上存在作用时间短, 不能起到修复椎间盘所需的持久作用。而多次注射 BMP7 在临床实践中不具有可操作性, 且花费巨大。腺病毒有潜在致病性及强的免疫原性, 出于安全性考虑, 利用腺病毒介导的基因转染治疗在临床实践中应用受到限制。腺相关病毒 (AAV) 是一种单链的微小 DNA 病毒, 在基因治疗研究中备受关注, 是较理想的基因治疗载体^[11-13]: ①人类感染率高, 达 90%, 与人类疾病无相关性、免疫原性弱; ②宿主范围广泛, 包括分裂和非分裂期的细胞; ③携带的外源基因可以长期稳定表达, 并可调控; ④已有多个使用 AAV 为载体的基因治疗新药获得美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准进入临床试验。

基于 rAAV2 具有的诸多优点, 本研究选用 rAAV2 作为介导 hBMP7 入犬髓核细胞的载体。构建 rAAV2-hBMP7, 利用其转染犬髓核细胞后, 通过 RT-PCR 及 Western blot 方法检测, 发现能成功地将 hBMP7 基因转染入犬髓核细胞, 并表达出 hBMP7 蛋白。在转染后 4、7 和 14d, 均可检测到 hBMP7 mRNA 的表达, 且在 7d 时表达量相对最高。BMP7 蛋白也能在转染后 7、14d 检测到较高的表达量, 与 mRNA 一样, 也是在 7d 时表达量相对最高。表明 hBMP7 mRNA 表达量的多少与 hBMP7 蛋白的高低相一致, 其表达高峰在转染后 7d。而用腺病毒转染 hBMP7 基因至骨髓基质干细胞时, 最早在转染后 24h 就可检测到 hBMP7 基因的表达, 而在转染后 48h 就可达到表达最高峰^[14],

表 2 转染后不同时间点两组髓核细胞中蛋白多糖、I 型胶原、II 型胶原 mRNA 与内参 GAPDH 表达的 CT 差值 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

	蛋白多糖		I 型胶原		II 型胶原	
	实验组 ^①	对照组	实验组	对照组	实验组 ^①	对照组
转染后 4d	4.82±0.13	4.74±0.15	1.15±0.11	1.10±0.08	3.22±0.08	3.12±0.13
转染后 7d	5.75±0.09 ^②	4.86±0.11	1.24±0.12	1.09±0.11	4.03±0.10 ^②	3.24±0.09
转染后 14d	6.23±0.20 ^②	4.90±0.08	1.31±0.12	1.11±0.10	4.25±0.14 ^②	3.16±0.11

注: ①实验组内各时间点之间两两比较 $P<0.05$, ②与同时时间点对照组比较 $P<0.05$

表 3 转染后不同时间点两组髓核细胞中蛋白多糖、I 型胶原、II 型胶原的蛋白含量 ($\mu\text{g}/10\text{cm}^2, n=6, \bar{x}\pm s$)

	蛋白多糖		I 型胶原		II 型胶原	
	实验组 ^①	对照组	实验组	对照组	实验组 ^①	对照组
转染后 4d	4.63±0.64	4.61±0.81	1.5±0.4	1.4±0.4	3.5±0.8	3.4±0.7
转染后 7d	7.95±1.12 ^②	5.60±1.32	2.0±0.6	1.9±0.5	8.0±0.5 ^②	4.9±0.4
转染后 14d	13.30±1.62 ^②	7.51±1.20	2.1±0.7	2.1±0.4	11.9±0.6 ^②	6.1±0.8

注: ①实验组内各时间点之间两两比较 $P<0.05$, ②与同时时间点对照组比较 $P<0.05$

这同 AAV 转染 hBMP7 基因至髓核细胞有所不同,产生这种不同的主要原因可能是由于 AAV 是一种单链 DNA 病毒,转染至细胞后必须在细胞核内合成为双链后才能表达相关蛋白,完成这一步需要较长的时间,在 AAV 病毒的转染中是一明显的限速步骤^[11]。

在本研究中,rAAV2-hBMP7 转染后髓核细胞能增加蛋白多糖和Ⅱ型胶原的合成量,而对Ⅰ型胶原合成量却无明显影响,与其他研究结果^[7,14]一致。rAAV2-hBMP7 转染组髓核细胞中蛋白多糖 mRNA 的表达与对照组比较,转染后 4d 无明显差别,而在 7d 和 14d 时明显增加。Ⅱ型胶原 mRNA 变化趋势与蛋白多糖一致,而Ⅰ型胶原 mRNA 两组无明显差异。蛋白多糖、Ⅰ型胶原和Ⅱ型胶原蛋白的变化与各自 mRNA 的变化相一致。我们认为,在转染后 4d 蛋白多糖及Ⅱ型胶原与对照组相比较未见变化的原因在于,转染早期所表达的 hBMP7 蛋白浓度较低,不能达到产生作用的有效浓度,而在转染后 7d 和 14d 时髓核细胞表达 hBMP 蛋白达到一个稳定高浓度的水平,足以对髓核细胞中蛋白多糖及Ⅱ型胶原含量产生刺激作用。

我们相信基于 AAV 的 hBMP7 基因转染可能作为一种新的可行的方法来增加软骨样细胞主要生物学表型。这种方法可能会被广泛应用于椎间盘退变性疾病及软骨样病变的治疗,主要是通过此方法增加细胞外基质的含量,以改变疾病的病理过程。在本研究中利用 rAAV2-hBMP7 转染犬髓核细胞在体外能表达 hBMP7 蛋白至少 14d,但在体内的表达情况则有待于进一步研究。

4 参考文献

1. Yamamoto Y, Mochida J, Sakai D, et al. Upregulation of the viability of nucleus pulposus cells by bone-marrow-derived stromal cells: significance of direct cell-to-cell contact in co-culture system[J]. Spine, 2004, 29(14): 1508-1514.
2. Gruber HE, Johnson TL, Leslie K, et al. Autologous intervertebral disc cell implantation: a model using Psammomys obesus, the sand rat[J]. Spine, 2002, 27(15): 1626-1633.
3. Hiraki Y, Inoue H, Kato Y, et al. Combined effects of somatomedin-like growth factors with fibroblast growth factor or epidermal growth factor in DNA synthesis in rabbit chondrocytes[J]. Mol Cell Bio Chem, 1987, 76(11): 185-193.
4. 张荣峰, 阮狄克, 张超, 等. 人髓核软骨样细胞的生物学特性观察[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2008, 18(11): 870-874.
5. Zhang Y, Phillips FM, Thonar EJ, et al. Cell therapy using articular chondrocytes overexpressing BMP-7 or BMP-10 in a rabbit disc organ culture model [J]. Spine, 2008, 33 (8): 831-838.
6. Zhang Y, Markova D, Im HJ, et al. Primary bovine intervertebral disc cells transduced with adenovirus overexpressing 12 BMPs and Sox9 maintain appropriate phenotype [J]. Am J Phys Med Rehabil, 2009, 88(6): 455-463.
7. Zhang Y, An HS, Thonar EJ, et al. Comparative effects of bone morphogenetic proteins and sox9 overexpression on extracellular matrix metabolism of bovine nucleus pulposus cells [J]. Spine, 2006, 31(19): 2173-2179.
8. 李连华, 翁习生, 邱贵兴, 等. 2 型重组腺相关病毒转染新西兰兔关节软骨细胞的体外研究[J]. 中华医学杂志, 2006, 86(21): 1489-1492.
9. Kim DJ, Moon SH, Kim H, et al. Bone morphogenetic protein-2 facilitates expression of chondrogenic, not osteogenic, phenotype of human intervertebral disc cells [J]. Spine, 2003, 28 (24): 2679-2684.
10. An HS, Takegami K, Kamada H, et al. Intradiscal administration of osteogenic protein-1 increases intervertebral disc height and proteoglycan content in the nucleus pulposus in normal adolescent rabbits[J]. Spine, 2005, 30(1): 25-31.
11. 吴小兵, 董小岩, 伍志坚, 等. 一种快速高效分离和纯化重组腺病毒伴随病毒载体的方法[J]. 科学通报, 2000, 45(15): 2071-2075.
12. Xiao X, Li J, Samulski R. Efficient long term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector[J]. J Virol, 1996, 70(11): 8098-8108.
13. Grieger JC, Samulski RJ. Adeno-associated virus as a gene therapy vector: vector development, production and clinical applications [J]. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2005, 99 (1): 119-145.
14. Schwarz EM. The adeno-associated virus vector for orthopaedic gene therapy[J]. Clin Orthop, 2000, 379(Suppl): S31-S39.

(收稿日期: 2010-07-27 修回日期: 2010-09-27)

(英文编审 蒋欣/刘思麒)

(本文编辑 李伟霞)