

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2013.01.004

LIM 矿化蛋白-1 对间充质干细胞成骨分化影响的实验研究

徐希彦¹, 邓毅², 李修洋¹, 邓忠良¹

(1. 重庆医科大学附属第二医院骨科, 重庆 400010; 2. 重庆市中医骨科医院骨科, 重庆 400010)

【摘要】目的:构建 LIM 矿化蛋白-1(LIM mineralization protein-1, LMP-1)的真核表达质粒,并在兔骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)内表达,研究 LMP-1 对体外培养 BMSCs 成骨分化的影响。**方法:**RT-PCR 克隆 hLMP-1 和骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2),并构建 pIRES2-EGFP-LMP-1 及 pIRES2-EGFP-BMP-2 重组质粒。分离培养 BMSCs,脂质体介导下将 pIRES2-EGFP-LMP-1、pIRES2-EGFP-BMP-2 和 pIRES2-EGFP 质粒转染 BMSCs。7 d 后收集细胞,RT-PCR 比较 hLMP-1、hBMP-2 及 I 型胶原的表达,检测碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性,免疫组化染色比较骨钙素表达。**结果:**pIRES2-EGFP-LMP-1 和 pIRES2-EGFP-BMP-2 重组质粒构建成功。重组质粒成功转染 BMSCs,RT-PCR 证实表达目的基因,hLMP-1 和 hBMP-2 转染组可以明显促进细胞分泌 ALP 的活性,诱导 I 型胶原和骨钙素的表达。**结论:**LMP-1 可以促进 BMSCs 向成骨细胞分化。

【关键词】基因治疗;LIM 矿化蛋白;组织工程;间充质干细胞;成骨分化

【中国图书分类法分类号】R318.04

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-07-18

作者介绍:徐希彦,Email:xyxand@126.com,

研究方向:脊柱外科方向。

通信作者:邓忠良,Email:deng7586@gmail.com。

[6] Carrion M, Bhat U R, Reuhs B, et al. Isolation and characterization of the lipopolysaccharides from *Bradyrhizobium japonicum*[J]. J Bacteriol, 1990, 172(4): 1725-1731.

[7] Van Regenmortel M H. Structural and functional approaches to the study of protein antigenicity[J]. Immunol Today, 1989, 10(8): 266-272.

[8] Lenstra J A, Kusters J G, van der Zeijst B A. Mapping of viral epitopes with prokaryotic expression products[J]. Arch Virol, 1990, 110(1-2): 1-24.

[9] Sem D S, Baker B L, Victoria E J, et al. Structural characterization and optimization of antibody-selected phage library mimotopes of an antigen associated with autoimmune recurrent thrombosis[J]. Biochemistry, 1998, 37(46): 16069-16081.

[10] Parmley S F, Smith G P. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes[J]. Gene, 1988, 73(2): 305-318.

[11] Devlin J J, Panganiban L C, Devlin P E, et al. Random peptide library: a source of specific protein binding molecule[J]. Science, 1990, 249(4967): 404-406.

[12] Amin N, Aguilar A, Chamacho F, et al. Identification of dengue-specific B-cell epitopes by phage-display random peptide library[J]. Malays J Med Sci, 2009, 16(4): 4-14.

[13] Molek P, Strukelj B, Bratkovic T. Peptide phage display as a tool for drug discovery: targeting membrane receptors[J]. Molecules, 2011, 16

(1): 857-887.

[14] Wang L F, Yu M. Epitope identification and discovery using phage display libraries: applications in vaccine development and diagnostics[J]. Current Drug Targets, 2004, 5(1): 1-15.

[15] Di Rienzo J M, Nakamura K, Inouye M. The outer membrane proteins of gram-negative bacteria: biosynthesis, assembly, and functions[J]. Annu Rev Biochem, 1978, 47: 481-532.

[16] Levine M M, Kaper J B, Black R E, et al. New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development[J]. Microbiol Rev, 1983, 47(4): 510-550.

[17] Yuen H L, Shamala D, Thong K L. Mimotopes of heat shock proteins of *Salmonella enterica* serovar Typhi identified from phage-displayed peptide library[J]. J Infect Dev Ctries, 2008, 2(4): 313-323.

[18] 邹佳, 葛晓冬, 刘友生, 等. 人源脂多糖结合蛋白单克隆抗体的筛选及初步鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(10): 1032-1034.

Zou J, Ge X D, Liu Y S, et al. Screening and identification of phage antibodies against human lipopolysaccharide binding protein[J]. Journal of Third Military Medical University, 2006, 28(10): 1032-1034.

[19] Paulovicova E, Machova E, Hostacka A, et al. Immunological properties of complex conjugates based on *Vibrio cholerae* O1 Ogawa lipopolysaccharide antigen[J]. Clin Exp Immunol, 2006, 144(3): 521-527.

(责任编辑: 冉明会)

Experimental study on effects of LIM mineralization protein-1 on the osteogenic potential of cultured bone marrow mesenchymal stem cells

XU Xiyan¹, DENG Yi², LI Xiuyang¹, DENG Zhongliang¹

(1. Department of Orthopedics, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University;

2. Department of Orthopedics, Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital)

[Abstract] **Objective:** To study influences of LIM mineralization protein(LMP-1) on the osteogenic potential of cultured bone marrow mesenchymal stem cells(BMSCs) by constructing eukaryotic expression plasmid carrying LMP-1 and having it expressed in rabbit BMSCs. **Methods:** Reverse transcription- polymerase chain reation(RT-PCR) technique was used to clone hLMP-1 and hBMP-2 from human placenta tissue and plasmid with hBMP-2. Digestion and ligations with eukaryotic expression plasmid pIRES2-EGFP, pIRES2-EGFP-LMP-1 and pIRES2-EGFP-BMP-2 recombinants were constructed. BMSCs were isolated and culture-expanded from rabbit bone marrow. The third culture was chosen for study. With the help of lipofectamine, plasmids pIRES2-EGFP-LMP-1, pIRES2-EGFP-BMP-2 and pIRES2-EGFP were transfected into BMSCs. Transfective rate was estimated under fluorescence microscope and cells were tested seven days later. Expressions of hLMP-1, hBMP-2 and collagen type I were tested with RT-PCR. Alkaline phosphatase(ALP) testing kit was used to measure ALP activity and immunohistochemical staining was used to test the expression of osteocalcin. **Results:** Restriction and sequencing analyses confirmed that eukaryotic expression plasmid pIRES2-EGFP-LMP-1 and pIRES2-EGFP-BMP-2 was successfully constructed. 15% transfection rate was estimated by fluorescence microscope. Groups transfected with pIRES2-EGFP-LMP-1 and pIRES2-EGFP-BMP-2 expressed hLMP-1 and hBMP-2. Both groups enhanced the activity of ALP and induced the expression of collagen type I and osteocalcin. **Conclusion:** LMP-1 can promote the osteogenic potential of cultured BMSCs, which lays a foundation for gene therapy with LMP-1.

[Key words] gene therapy; LIM mineralization protein; tissue engineering; mesenchymal stem cells; osteogenic differentiation

LIM矿化蛋白-1(LIM mineralization protein-1, LMP-1)是 Boden 等^[1]在 1998 年通过差显 PCR 的方法,从小鼠成骨细胞中克隆并命名的。实验证实其在成骨细胞分化早期就有表达,并且可能参与了骨形成 2 种方式的最后共同通路。体内外实验均证实其可以促进成骨祖细胞和外周血来源的间质干细胞向成骨细胞分化,并且在多种动物体内证实其可以促进骨形成^[2-3]。本研究在国外研究基础上,以免骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)这种常用的种子细胞为实验对象,研究 LMP-1 转染后对其生物学性能的影响,为 LMP-1 的研究提供实验参考,更为其组织工程的应用打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器 RNA 提取试剂盒、cDNA 逆转录试剂盒(Qigen 公司),质粒提取试剂盒、DNA 回收试剂盒(Omega 公司),Percoll 细胞分离液(天津 TBD 公司),阳离子脂质体 Lipofectamine2000(Invitrogn 公司),小鼠抗兔骨钙素抗体(abcam 公司),二步法免疫组化检测试剂盒(北京中杉公司),凝胶呈像系统(Bio-Rad 公司),OLYMPUS-IX70 型生物倒置

显微镜(OLYMPUS 公司)。

1.1.2 质粒及菌株 PIRE2-EGFP 质粒、含人骨形态发生蛋白-2(human bone morphogenetic protein-2, hBMP-2)质粒 pCDNA3.1(+)-BMP-2 由北京中日友好医院邹海波博士惠赠,大肠杆菌 DH5 α 菌株由西南医院翟志芳博士馈赠。

1.2 方法

1.2.1 人胎盘组织总 RNA 提取 于手术室无菌条件下切取健康妇女分娩后胎盘全层组织,分装 30 mg/块,立即放入液氮中带回实验室备用。参照 Qiagen 公司 Reasy mini kit 说明书,液氮里取 30 mg 组织提取其总 RNA。提取后取 5 μ l 电泳,取 5 μ l 稀释成 150 μ l 在紫外分光光度计测吸光度值(absorbance, A)值:以电泳显示 28S、18S 均可见,且 28S 亮度是 18S 的两倍, $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ 在 1.8~2.0 之间者为 RNA 纯度较高;以 RNA 在 260 nm 波长处的 A 计算 RNA 浓度,浓度(μ g/ml) = $A_{260\text{ nm}} \times 40 \times$ 稀释倍数,进行后续实验。

1.2.2 hLMP-1 及 hBMP-2 基因重组质粒载体的构建 RT-PCR 方法分别从人的胎盘组织和质粒 pCDNA3.1(+)-BMP-2 中,克隆 hLMP-1 和 hBMP-2,与真核表达质粒 PIRE2-EGFP 分别经 Hind III 和 Kpn I 双酶切,T4 连接酶在 4 $^{\circ}$ C 过夜连接,转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 12~16 h 后扩增抽提质粒。将双酶切初步鉴定正确的质粒送上海博亚生物技术有限公司测序。

1.2.3 兔 BMSCs 的分离培养 抽得 2 月龄日本大耳白兔股骨粗隆骨髓 2~3 ml,加入含有等倍体积 Percoll 细胞分离液(密度 1.073 g/ml)的离心管中,梯度离心(2 000 r/min 20 min),

然后缓慢吸取中间白膜层细胞至另一离心管中,洗涤、离心、弃上清,DMEM 完全培养液重悬后接种到 35 cm² 玻璃培养瓶中,37 ℃、5%CO₂ 的空气、饱和湿度的培养箱中培养。72 h 首次换液,以后每 3 d 换液,倒置显微镜下观察细胞生长情况,待细胞长至瓶底 90%面积时,进行消化传代。

1.2.4 阳离子脂质体介导外源基因转染细胞 以不同的 DNA/Lipofectamine2000 比例与细胞汇集度做转染预实验优化转染效率。以第 3 代细胞为实验对象,实验分为:pIRES2-EGFP-LMP-1(实验组)、pIRES2-EGFP-BMP-2(阳性对照组)和 pIRES2-EGFP(阴性对照组),按脂质体转染说明转染细胞,每组 5 个复孔。

1.2.5 组间 hLMP-1、hBMP-2 和 I 型胶原的表达情况 分别收集转染 7 d 后的各组细胞提取总 RNA,在紫外分光光度计测定纯度、质量和浓度,取各组总 RNA 1.0 μg,逆转录为 cDNA,同时以 β-actin 为内参对照 PCR,产物电泳 BioRad GelDose200 凝胶成像系统对凝胶电泳进行扫描保存,用 Quantity one 软件对目的片段 A 值进行测定,以免 β-actin 目的片段作为内参照,分别以 hLMP-1、hBMP-2 和 I 型胶原基因的转录目的片段实测 A 值/β-actin 实测 A 值的比值代表目的基因片段 mRNA 的相对含量做统计检验。

1.2.6 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性检测 收集转染 7 d 后的各组细胞,按 ALP 检测试剂盒说明操作;弃去培养液,用 0.01 mol/L PBS 洗各培养瓶 3 次,然后加入 2%Triton X-100 800 μl,4 ℃冰箱过夜后,加入 ALP 缓冲液和基质液各 500 μl,37 ℃孵育 15 min,同时标准管和空白管加样后,再分别加入 ALP 显色液 1 ml,分光光度计 520 nm 波长测 A 值。

1.2.7 转染细胞骨钙素免疫组化染色 以转染后第 7 天的细胞爬片,4%多聚甲醛固定 30 min,SABC 法进行免疫组织化学反应,DAB 显色。复染后中性树胶常规封片,显微镜下观察。结果用成都金盘电子科技大多媒体技术有限公司生产的 GD-8 型医学病理图像分析系统进行定量分析。免疫组化反应产物的标记强度为面积积分光密度(area integral optical density, AIOD),即积分光密度/μm²。

1.3 统计学处理

用 SAS 6.12 统计分析软件进行统计学处理。计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。对多个样本均数的比较,先进行方差齐性检验,方差齐的各组样本均数进行单向方差分析的统计检验。检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 提取 RNA 的定量、定性

电泳结果清晰显示 28S 和 18S 2 条带,其中 28S 的亮度约为 18S 的 2 倍,紫外分光光度计测总 RNA 的浓度约为 200~400 ng/μl 之间, $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}=1.8\sim2.0$ 之间。

2.2 hLMP-1 及 hBMP-2 基因重组质粒载体的构建

以人胎盘组织 cDNA 为模板利用巢式 PCR 扩增获得

1 400 bp 的 hLMP-1 基因;以含有 hBMP-2 的重组质粒为模板扩增获得 1 200 bp 的 BMP-2 基因(图 1、2)。双酶切初步鉴定重组成功的质粒细菌菌液送上海博亚生物技术有限公司测序。将重组质粒 pIRES2-EGFP-LMP-1 测序结果拼接后在 Genbank 上 BLAST 分析,发现 435、792、934 位碱基突变。同时将测序结果在 BLAST 上比对翻译结果显示:与 hLMP-1 翻译区的 457 个氨基酸完全吻合,所以突变的 3 个碱基均为同义突变,并不影响其后的翻译和表达。重组质粒 pIRES2-EGFP-BMP-2 的测序结果拼接在 Genbank 上 BLAST 分析无碱基突变。

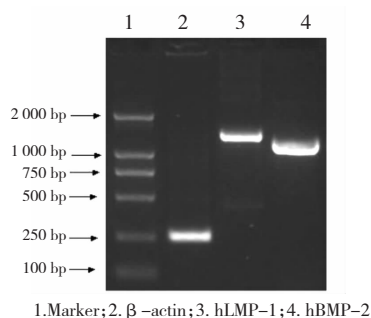


图 1 PCR 克隆 hLMP-1 和 hBMP-2 电泳图

Fig.1 Electrophoretogram of hLMP-1 and hBMP-2 genes

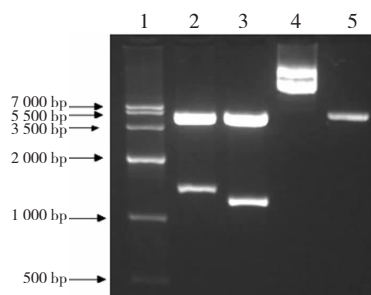


图 2 重组质粒 pIRES2-EGFP-LMP1 及 pIRES2-EGFP-BMP2 酶切后电泳图

Fig.2 Electrophoretogram of pIRES2-EGFP-LMP1 and pIRES2-EGFP-BMP2 after restriction enzyme treatment

2.3 兔 BMSCs 的分离培养

梯度离心分离的细胞接种后 24 h 个别细胞贴壁,细胞形态稍有展开,48~72 h 有极少数细胞贴壁呈成纤维细胞样形态,表现为纺锤状,少数为多角。72 h 首次换液后,血细胞因不贴壁而随换液逐渐清除。第 7 天以后单个细胞或细胞集落形成细胞克隆,细胞呈克隆样生长,在第 12~14 天细胞长满瓶底。传代细胞生长迅速,24 h 基本完成贴壁,6~7 d 即可长满瓶底,收获细胞计数约 1.5×10^6 个/30 cm²。

2.4 阳离子脂质体介导外源基因转染细胞

通过预实验得到阳离子脂质体 Lipofectamine2000,介导外源基因转染兔 BMSCs 细胞的最优化条件为:70%细胞汇集度时,质粒 DNA(μg)/Lipofectamine2000(μl)=1:2 比例混合后。该条件可使细胞转染效率达到 15%左右。基因转染的

BMSCs, 转染后初始有部分细胞呈皱缩表现, 少量表现为核固缩、碎裂、死亡, 1 周后相差显微镜下观察细胞形态同转染前相比没有明显改变。分别以相应的质粒 5.0 μg 与脂质体 Lipofectamine2000 10 μl , 按脂质体转染说明转染细胞, 每组 5 个复孔(图 3、4)。

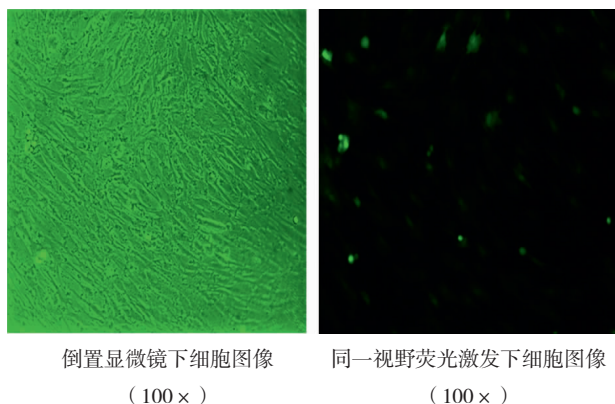


图 3 质粒转染 BMSCs 后倒置显微镜和荧光显微镜下观察转染效率

Fig.3 Transfection efficiency of the plasmid-transfected BMSCs under inverted microscope and fluorescent microscope

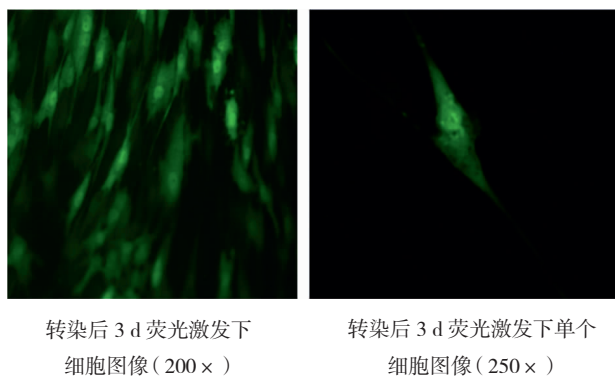
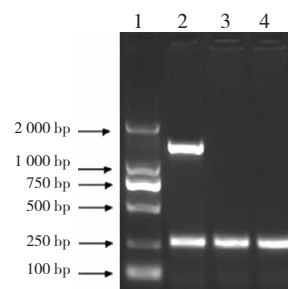


图 4 质粒转染 BMSCs 后荧光激发下细胞图像

Fig.4 BMSCs image under fluorescence microscope after being transfected by plasmid

2.5 组间 hLMP-1、hBMP-2 和 I 型胶原的表达情况

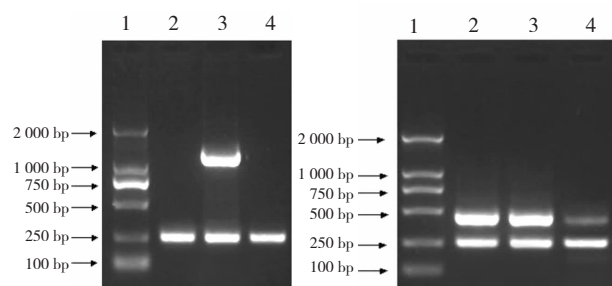
实验组间 pIRES2-EGFP-LMP-1 转染细胞组 5 样本可以检测到 hLMP-1 表达; pIRES2-EGFP-BMP-2 转染细胞组 5 样本可以检测到 hBMP-2 表达; pIRES2-EGFP-LMP-1 和 pIRES2-EGFP-BMP-2 转染细胞组 5 样本均在 500 bp 左右有目的带, 且呈强阳性表达, 而 pIRES2-EGFP 转染细胞组样本仅呈弱阳性表达(图 5~7)。计算各组内 5 个样本 mRNA 相对含量的均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$): pIRES2-EGFP-LMP-1 转染细胞组为 1.851 ± 0.042 , pIRES2-EGFP-BMP-2 转染细胞组为 1.983 ± 0.035 , pIRES2-EGFP 转染细胞组为 0.462 ± 0.028 。统计分析显示: pIRES2-EGFP-LMP-1 和 pIRES2-EGFP-BMP-2 转染细胞组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 2 组均与 pIRES2-EGFP 转染细胞组差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。



1. Marker; 2. pIRES2-EGFP-LMP-1 转染组; 3. pIRES2-EGFP-BMP-2 转染组; 4. pIRES2-EGFP 转染组

图 5 实验组间 hLMP-1 表达检测电泳图

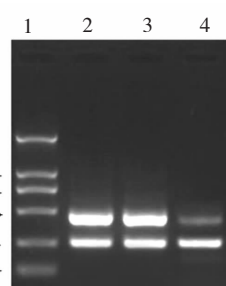
Fig.5 Electrophoretogram of hLMP-1 expressions in different experimental groups



1. Marker; 2. pIRES2-EGFP-LMP-1 转染组; 3. pIRES2-EGFP-BMP-2 转染组; 4. pIRES2-EGFP 转染组

图 6 实验组间 hBMP-2 表达检测电泳图

Fig.6 Electrophoretogram of hBMP-2 expressions in different experimental groups



1. Marker; 2. pIRES2-EGFP-LMP-1 转染组; 3. pIRES2-EGFP-BMP-2 转染组; 4. pIRES2-EGFP 转染组

图 7 实验组间 I 型胶原表达检测电泳图

Fig.7 Electrophoretogram of collagen type I expressions in different experimental groups

2.6 ALP 活性检测

将各组测定 $A_{520\text{nm}}$ 结果按照说明提供的公式计算: ALP (金氏单位) = 测定管 A 值 / 标准管 A 值 $\times$ 标准管酚含量 (0.005 mg) $\times 100\text{ ml} / 0.8\text{ ml}$, 金氏单位定义: 100 ml 血清在 37 $^{\circ}\text{C}$ 与基质作用 15 min 产生 1 mg 酚为 1 个金氏单位。计算各组内 5 个样本 ALP 测定值的均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$): pIRES2-EGFP-LMP-1 转染细胞组为 5.46 ± 0.48 , pIRES2-EGFP-BMP-2 转染细胞组为 6.75 ± 0.54 , pIRES2-EGFP 转染细胞组为 1.33 ± 0.28 。统计分析结果显示: pIRES2-EGFP-LMP-1 和 pIRES2-EGFP-BMP-2 转染细胞组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 2 组均与 pIRES2-EGFP 转染细胞组差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

2.7 转染细胞骨钙素免疫组化染色

显微镜下观察 pIRES2-EGFP-LMP-1 和 pIRES2-EGFP-BMP-2 转染细胞组, 胞浆内有较多的棕黄色颗粒出现, 呈阳性反应, pIRES2-EGFP 转染细胞组, 胞浆内无着色, 呈阴性反应(图 8~10)。图像分析软件计算各组内 5 个样本 AIOD 测定值均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$): pIRES2-EGFP-LMP-1 转染细胞组 0.964 ± 0.037 , pIRES2-EGFP-BMP-2 转染细胞组 $1.058 \pm$

0.053, pIRES2-EGFP 转染细胞组 0.258 ± 0.038 。统计分析结果显示: pIRES2-EGFP-LMP-1 和 pIRES2-EGFP-BMP-2 转染细胞组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 2 组均与 pIRES2-EGFP 转染细胞组差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

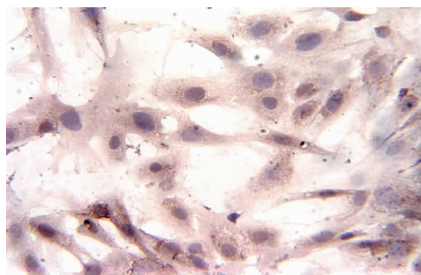


图 8 pIRES2-EGFP-LMP-1 转染细胞后 7 d 骨钙素免疫组化
Fig.8 Immunohistochemical analysis of osteocalcin in the cells at 7 d after being transfected by pIRES2-EGFP-LMP-1

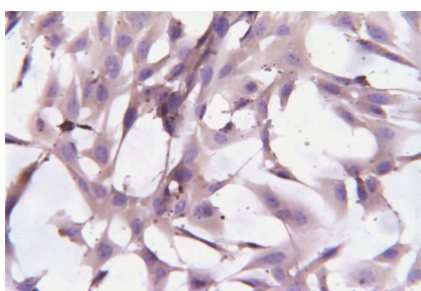


图 9 pIRES2-EGFP-BMP-2 转染细胞后 7 d 骨钙素免疫组化
Fig.9 Immunohistochemical analysis of osteocalcin in the cells at 7 d after being transfected by pIRES2-EGFP-BMP-2

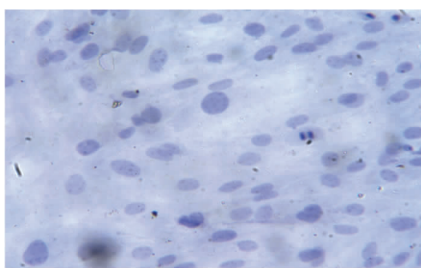


图 10 pIRES2-EGFP 转染细胞后 7 d 骨钙素免疫组化
Fig.10 Immunohistochemical analysis of osteocalcin in the cells at 7 d after being transfected by pIRES2-EGFP

表 1 成骨性标志物检测结果

Tab.1 Detection results of osteogenic markers

分组	hLMP-1、 hBMP-2 和 I 型胶原	ALP 活性	骨钙素免疫 组化染色
pIRES2-EGFP-LMP1 转染细胞组	1.851 ± 0.042	5.46 ± 0.48	0.964 ± 0.037
pIRES2-EGFP-BMP2 转染细胞组	1.983 ± 0.035	6.75 ± 0.54	1.058 ± 0.053
pIRES2-EGFP 转染 细胞组	0.462 ± 0.028	1.33 ± 0.28	0.258 ± 0.038

3 讨 论

从 Urist 等^[4-5]开创性证实脱钙骨基质成骨诱导能力,进而从中提取出具有成骨作用的骨形态发生蛋白开始,人们在细胞因子对骨形成作用方面进行了大量研究,许多生长因子如生长分化因子、血小板源性生长因子等都参与了成骨过程。随着对骨形成分子机制认识的深入,不仅仅是生长因子,一类分泌量较少的生物因子,被发现诱导成骨细胞分化成熟和促进局部骨形成方面有着不可替代的重要作用,被称为骨诱导因子^[6]。Boden 等^[7]通过差异显示多聚酶联反应,得到全长 1 696 bp 的 cDNA 片段,其中 1 374 bp 的翻译区编码 1 个新的 457 个氨基酸的蛋白质,在其 C 端含和 N 端分别含有 LIM 功能域和 PDZ 功能域。LIM 功能域是由半胱氨酸和组氨酸重复出现形成的锌指结构,这一富含半胱氨酸的序列在 Lin-11、Isl-1、Mec-33 种同源蛋白中发现,其主要功能是介导特异的蛋白与蛋白间的相互作用,并参与细胞的增殖和分化,迄今已经发现了 3 个亚型: LMP-1、LMP-2、LMP-3^[7]。组织原位杂交发现 LMP-1 在软骨成骨和膜内成骨过程中的早期阶段均有表达,而利用 LMP-1 反义寡核苷酸阻断其翻译,可以阻止骨小结的形成和骨钙素的分泌,揭示 LMP-1 在成骨细胞分化成熟过程中有着重要作用,并且可能参与了骨形成的最后共同通路^[8]。尽管 LMPs 确切的生物学机制仍然需要进一步实验研究来阐明,然而试验研究揭示 LMPs 可能通过招募众多骨诱导因子共同参与成骨细胞的分化成熟,在骨形成过程中扮演着重要角色,这种作用可能是通过细胞内信号传导通路而实现,并且受一些细胞因子调控。通过构建多种载体将其运用于动物的局部基因治疗已经证实: LMP-1 在体内可以促进异位骨形成和脊柱融合,在局部基因治疗的安全性、有效性和适宜性方面具有很多优势^[9-10]。

与 BMPs 等胞外因子不同, LMPs 是胞内因子,只能通过基因工程的方法将其转导入细胞内进行研究,所以能否成功克隆该基因是本实验的关键。本研究成功构建 hLMP-1、hBMP-2 重组表达质粒载体,并且在实验中以现在研究最为广泛和深入,其促进成骨的作用已经被认同,并且获准了临床运用 BMP-2 为阳性对照,增加 LMP-1 促进成骨作用的说服力,也通过比较两者成骨作用的强弱,促进骨

诱导因子相互间作用的研究。为进一步对其促进成骨作用的研究奠定基础。

从 Friedenstein^[11]发现骨髓培养可形成类似骨和软骨的物质开始,许多研究小组发现并证实骨髓的部分贴壁细胞是多能的,可以分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、成肌细胞和神经元等。20 世纪 90 年代通过利用骨髓梯度离心结合细胞的贴壁特性,逐渐建立并完善了从骨髓中分离、培养 BMSCs 的方法,使得对该细胞的生物学性状及潜在的应用研究得以深入^[12]。在实验中通过骨髓梯度离心,结合全量换液的方法获得相对纯化的 BMSCs。在这种培养体系中,贴壁的细胞除 BMSCs 外,仍然混杂少量的成骨细胞、成软骨细胞、内皮细胞等,这些混杂细胞是否对 BMSCs 的增殖及成骨分化存在影响,现在尚无定论,所以现在大部分实验室利用其进行组织工程研究时,也只是相对纯化的 BMSCs。就实验方法而言,分离培养 BMSCs 的操作简单、对设备要求低、获得细胞数量多且增殖能力强,很适宜做基因转染的载体细胞。

本实验中,利用 Lipofectamine2000 脂质体转染试剂,通过优化转染时的细胞汇集度和脂质体-DNA 比例关系,使得重组质粒可以 15%左右的转染效率转染 BMSCs。采用瞬时转染细胞,短期内收获细胞进行生物学检测,来判断转染的外源基因对靶细胞的影响。这样的实验思路是基于以下考虑:①质粒转染细胞后 48 h 就可以表达外源基因,并且这种表达可以在细胞内稳定表达 2~4 周;②在 Boden 等^[1]对 LMP-1 促进小鼠脊柱融合的研究中发现:少于 1%的小鼠骨髓细胞成功转染了重组质粒 pCMV2-LMP-1,却同样在体内产生成骨效应;③引入了基因转染 BMP-2 作为阳性对照,使实验结果具有说服力和可信度。

国内外公认的对成骨细胞标准检测指标是高 ALP 表达、合成 I 型胶原和分泌骨钙素^[13]。一般认为 ALP 是成骨细胞分化的早期标志,骨钙素是成骨细胞分化成熟的标志, I 型胶原对骨的矿化起重要作用, I 型胶原基因缺陷小鼠将发生成骨不全^[14]。因此,本研究比较了 2 种重组质粒和空质粒转染细胞后 3 种生物学指标的变化,来推断 BMSCs 是否向成骨细胞分化。2 种重组质粒转染细胞后 I 型胶原的表达、ALP 和骨钙素的分泌均较空质粒转染组明显增加,提示 2 种基因转染可能促进 BMSCs 向成骨细胞分化,进一步比较重组质粒间 3 种生物学指标

变化的差异没有统计意义,推断 LMP-1 可以促进 BMSCs 向成骨细胞分化,与国外研究结果相一致,为进一步的实验奠定了实验证据。

参 考 文 献

- [1] Boden S D, Liu Y S, Gregory A H, et al. LMP-1, A LIM-domain protein, mediates BMP-6 effects on bone formation[J]. *Endocrinology*, 1998, 139(12): 5125-5134.
- [2] Minamide A, Boden S D, Viggswarapu M, et al. Mechanism of bone formation with gene therapy of the cDNA encoding for the intracellular protein LMP-1[J]. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 2003, 85(6): 1030-1039.
- [3] Liu Y S, Gregory A H, Boden S D. Overexpressed LIM mineralization proteins do not require LIM domains to induce bone[J]. *Journal of bone and mineral research*, 2002, 17(3): 406-414.
- [4] Urist M R. Bone formation by autoinduction[J]. *Science*, 1965, 150(698): 893-899.
- [5] Urist M R, Mikuski A, Lietze A. A solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1979, 76(4): 1828-1832.
- [6] Yoon S, Tim M D, Boden S D. Osteoinductive molecules in orthopaedics: Basic science and preclinical studies[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2002, 395(1): 33-43.
- [7] Dawid I B, Breen J J, Toyama R. LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions[J]. *Trends Genet*, 1998, 14(1): 156-162.
- [8] Barnes B, Boden S D, Louis-Ugbo J, et al. Lower dose of rhBMP-2 achieves spine fusion when combined with an osteoconductive bulking agent in non-human primates[J]. *Spine*, 2005, 30(10): 1127-1133.
- [9] Pola E, Zhou W, Pola R, et al. Efficient bone formation by gene transfer of human LIM mineralization protein-3[J]. *Gene therapy*, 2004, 11(8): 683-693.
- [10] Viggswarapu M, Boden S D, Liu Y S, et al. Adenoviral delivery of lim mineralization protein-1 induces new-bone formation in vitro and in vivo[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2001, 83(3): 364-376.
- [11] Friedenstein A J. Precursor cells of mechanocytes[J]. *Int Rev Cytol*, 1976, 47(6): 327-359.
- [12] Yoo H J, Yoon S S, Park S, et al. Production and characterization of monoclonal antibodies to mesenchymal stem cells derived from human bone marrow[J]. *Hybridoma*, 2005, 24(2): 92-97.
- [13] Sutherland M S, Rao L G, Muzaffar S A, et al. Age-dependent expression of osteoblastic phenotypic markers in normal human osteoblasts cultured long-term in the presence of dexamethasone[J]. *Osteoporosis Int*, 1995, 5(5): 335-343.
- [14] Diduch D R, Coe M R, Joyner C, et al. Two cell lines from bone marrow that differ in terms of collagen synthesis, osteogenic characteristics, and matrix mineralization[J]. *J Bone Joint Surg (Am)*, 1993, 75(1): 92-105.

(责任编辑:冉明会)