

bmp-2 和 vegf165 共表达基因修饰的 BMSCs 对腱骨界面愈合的研究

车伟, 赵其纯, 尚希福, 贺瑞, 陈敏

摘要 **目的** 探讨骨形态发生蛋白-2(*bmp-2*)和血管内皮生长因子 165(*vegf165*)共表达基因修饰的骨髓间充质干细胞(BMSCs)对兔前交叉韧带重建术后腱骨界面的组织形态学和生物力学的影响。**方法** 将 66 只大白兔,随机分成实验组、对照组及正常组。实验组术后在腱骨界面注入经慢病毒转染稳定表达 *bmp-2* 和 *vegf165* 的 BMSCs 和纤维蛋白胶(FG),对照组腱骨界面注入 BMSCs 和 FG,分别在术后第 3、8 和 12 周进行组织学观察和生物力学检测。**结果** 组织学病理显示,实验组新生血管和成纤维细胞浸润高于对照组,并在术后第 12 周形成典型的 4 层直接止点结构,其组织愈合情况优于同期对照组。生物力学显示相同时间点实验组最大载负荷明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** *bmp-2* 和 *vegf165* 共表达基因修饰的 BMSCs 对腱骨界面愈合有促进作用。

关键词 血管内皮生长因子 165;骨形态发生蛋白-2;骨髓间充质干细胞;腱骨愈合;前交叉韧带

中图分类号 R 686.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)03-0324-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.03.004

膝关节前交叉韧带(anterior cruciate ligament, ACL)是限制胫骨过度前移的重要解剖组织。ACL 断裂是骨科常见病,且呈逐年升高趋势,多见于运动损伤和交通意外^[1]。ACL 断裂是 ACL 损伤的重要表现形式,ACL 断裂后难以自愈,严重影响膝关节的功能。手术治疗是 ACL 断裂的主要治疗手段,其中关节镜下重建术是金标准,而关节镜下半腱肌重建术又是目前治疗 ACL 断裂的主流术式^[2]。前交叉韧带关节镜下重建术后腱骨界面愈合是个复杂的过程,往往存在有骨隧道扩大、再次翻修、愈合时间过长等诸多问题^[3],研究^[4-5]显示移植肌腱植入骨隧道内至少 1 年才能逐渐愈合,这也是影响膝关节

术后锻炼的关键因素。骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)是多种间充质细胞的前体细胞,具有多向分化的潜能,其分化形成的血管、骨、软骨等细胞组织具有促进腱骨愈合的作用。重组人骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein 2, BMP-2)可诱导间充质细胞分化为骨、软骨组织,血管内皮生长因子 165(vascular endothelial growth factor 165, VEGF165)可诱导新生的血管长入。该研究通过建立成年兔动物实验模型,观察腱骨间组织学和生物力学的变化,探讨 *bmp-2* 和 *vegf165* 共表达基因修饰的 BMSCs 对腱骨愈合的影响,为临床应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组 66 只健康成年新西兰大白兔,购自安徽医科大学实验动物中心,清洁级,2.1~2.7 kg,平均 2.4 kg,饲养于安徽医科大学附属省立医院动物实验室。实验前检查白兔膝关节活动正常,前后抽屉及侧方应力实验阴性。按照实验要求随机分为实验组、对照组、正常组,分组情况见表 1。实验组术后在腱骨界面注入经慢病毒转染稳定表达 *bmp-2* 和 *vegf165* 的 BMSCs 和纤维蛋白胶(fibrin glue, FG),对照组腱骨界面注入 BMSCs 和 FG,正常组 6 只未做手术。

表 1 实验兔分组($n=66$ 只)

时间 (周)	实验组		对照组		正常组	
	病理	拉力试验	病理	拉力试验	病理	拉力试验
3	8 膝	12 膝	8 膝	12 膝	-	-
8	8 膝	12 膝	8 膝	12 膝	-	-
12	8 膝	12 膝	8 膝	12 膝	-	12 膝

1.2 兔 BMSCs 的提取与培养 大白兔称重后采用耳缘静脉注射麻醉,消毒后用 16 号骨髓穿刺针行双侧髌骨穿刺抽取骨髓各 4 ml,采用体外密度梯度离心法分离出单个核细胞层,接种到含 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养液中,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,48 h 后换液,以后每 3 d 换液 1 次。显

2016-12-12 接收

基金项目:安徽省科技厅年度重点科研项目(编号:11070403044)

作者单位:安徽医科大学附属省立医院骨科,合肥 230001

作者简介:车伟,男,硕士研究生;

赵其纯,男,主任医师,硕士生导师,责任作者;E-mail:

qichzhao@163.com

显微镜下观察细胞形态均一,呈螺旋状,贴壁紧密生长融合约达到 80% 以上后进行细胞传代以扩大培养。

1.3 靶细胞病毒侵染实验方法 骨髓干细胞用 3 ml PBS 洗涤 2 次,加 Trypsin-EDTA solution 混匀,再加入 2 ml 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,使细胞形成单细胞悬液并稀释。将慢病毒原液用 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液稀释并加入聚凝胺。每孔加入 150 μ l 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养 48 h,观测慢病毒侵染结果。

1.4 病毒滴度检测方法 293T 细胞用 D-Hank's solution 洗涤 2 次,加 Trypsin-EDTA solution 混匀,再加入 2 ml 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液。将慢病毒用 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液 10 倍稀释 4 个梯度,再加入胎牛血清的 DMEM 培养液,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 继续培养 72 h。通过荧光显微镜计数荧光细胞,结合稀释倍数计算病毒滴度。

1.5 动物前交叉韧带重建模型的建立 将实验兔子称重后,用 3% 的戊巴比妥钠经耳缘静脉麻醉,术区常规脱毛、消毒。采用膝前正中切口,从股内侧肌后方显露半腱肌并取出,清除肌腱周围肌肉并叠成双股,两端用 3-0 线编织缝合。从膝前内侧入路显露前交叉韧带并从其上下止点处切除,用 2.0 mm 克氏针分别在股骨与胫骨前交叉韧带残端定位钻取隧道,用钢丝引导肌腱先从胫骨隧道穿入关节腔再穿出股骨隧道外口,屈膝 30 $^{\circ}$,将编织的肌腱两端通过骨桥固定在胫骨与股骨隧道外口处。实验组分别在股骨隧道与肌腱间、胫骨与肌腱间注入经慢病毒转染稳定表达 bmp-2 和 vegf165 的 BMSCs 和 FG,对照组髓骨界面注入 BMSCs 和 FG 混合物,之后使用庆大霉素冲洗膝关节,查前抽屉实验阴性,复位膝关节,缝合切口。术后包扎伤口,不固定伤肢,3 d 内每日给予 20 万 U 青霉素钠预防感染,实验动物有 1 只死于麻醉和 1 只术中右股骨骨折,术中均补齐,无实验动物感染。

1.6 组织学观察 实验组和对照组分别于术后 3、8、12 周用空气栓塞法随机处死 10 只兔子,8 个膝作为组织学观察,12 个膝标本用于生物力学测试,术后 12 周正常组处死 6 只兔子 12 只膝用于生物力学测试。膝标本石蜡切片 HE 染色,观察组织学变化结果。

1.7 生物力学测试 膝关节胫骨近端和股骨远端各保留 3.5 cm,去除肌腱两端的缝线、骨桥和软组织,保留前交叉韧带,纱布包裹, -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存,集中进行力学测试。测试前室温内标本解冻 24 h,

屈膝 30 $^{\circ}$,将股骨与胫骨固定在力学测试机器上,拉力和韧带在同一轴线上,先拉伸处理消除肌腱的松弛,拉伸速度 0.4 mm/s,再行拉断试验,以 0.6 mm/s 拉速拉断韧带,计算断裂载荷。

1.8 统计学处理 对生物力学结果采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各时间点最大载荷采用 *t* 检验,多组均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 bmp-2/vegf165 共表达慢病毒转染 BMSCs 和 PCR 检测 第三代 BMSCs 显微镜下的观察结果见图 1A,经重组慢病毒转染 48 ~ 72 h 后的 BMSCs 在荧光显微镜下进行观察,可见 BMSCs 荧光加强,荧光与 BMSCs 轮廓一致,见图 1B。

VEGF165 和 BMP2 过表达 Real time PCR 检测:提取 RNA 检测过程中 RNA 没有降解、无蛋白污染,电泳提示 PCR 产物大小无误,没有杂带也无非特异性扩增。

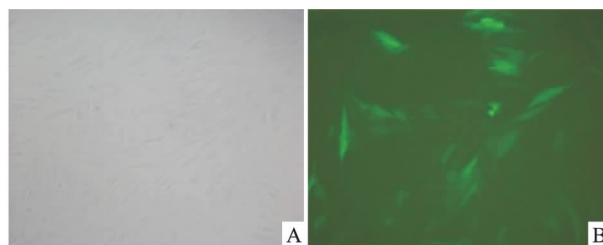


图 1 BMSCs 浸染效率评价 $\times 40$

A: 白光视野; B: 荧光视野

2.2 术后生物力学结果 将相同时间点取得兔膝关节标本进行生物力学检查。术后 3 周行拉力测定,实验组与对照组移植物均由隧道内拉出。术后 8 周,实验组中 6 例在移植物实质部断裂,6 例从隧道内拉出;对照组中 2 例在移植物实质部断裂,10 例从隧道内拉出。术后 12 周,实验组中 11 例在移植物实质部断裂,1 例从隧道内拉出;对照组中 4 例在移植物实质部断裂,8 例从隧道内拉出;而正常组中 12 例均在移植物实质部断裂,见表 2。图 2 显示,术后 3、8 周实验组最大载荷明显大于对照组,

表 2 移植物肌腱断裂或拉脱部位 (n)

组别	3 周		8 周		12 周	
	隧道内 拉出	断裂	隧道内 拉出	断裂	隧道内 拉出	断裂
实验	12	0	6	6	1	11
对照	12	0	10	2	8	4
正常	-	-	-	-	0	12

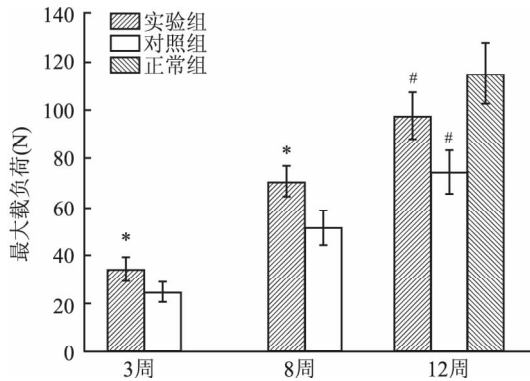


图2 术后3个时间点肌腱移植植物最大载负荷比较 (N, n = 12, $\bar{x} \pm s$)
与对照组比较: * $P < 0.05$; 与正常组比较: # $P < 0.05$

差异有统计学意义 ($P < 0.05$) ; 术后12周, 实验组与对照组均小于正常组, 差异有统计学意义 ($F = 148.8, P < 0.001$) 。

2.3 腱-骨组织愈合形态学结果 实验组术后第3周腱骨界面连接较紧密, 有大量的纤维母细胞沿肌腱纵型方向生长, 有未成熟类软骨细胞排列不规则、周围基质染蓝, 有大量炎性细胞、细胞核深染且沿新生血管分布。对照组术后第3周腱骨界面间隙稍大, 肌腱与骨质连接疏松, 其间填充少量肉芽组织, 有少量成纤维细胞和炎性细胞生长。实验组术后第8周腱骨界面有软骨细胞移行带, 类软骨细胞排列规则, 有少量骨质长入肌腱, 骨道与肌腱连接紧密, 胶原纤维增多, 炎性细胞减少。对照组术后第8周移植植物与骨质之间结合紧密, 可见类软骨细胞生成、间充质干细胞、少量新生血管, 有大量成纤维细

胞生成, 胶原纤维增多, 但排列比较紊乱。实验组术后第12周腱骨界面有新骨形成, 有大量软骨生成, 排列整齐, 腱骨界面出现胶原纤维-软骨细胞移行带改变。形成典型的韧带-非钙化纤维软骨-钙化软骨-骨四层直接止点结构, 接近前交叉韧带直接止点结构。对照组术后第12周肌腱与骨质连接紧密, 有Sharpey纤维结构, 胶原纤维仍不规则。见图3。

3 讨论

腱骨愈合是一个复杂的过程, 肌腱移植到骨道内术后3周, 腱骨界面有大量炎性细胞浸润并沿新生血管分布, 类软骨细胞、纤维母细胞增多。术后8周, 腱骨界面连接更加紧密, 成纤维细胞和胶原纤维增多, 并逐渐被软骨细胞取代。术后12周肌腱与骨之间以胶原纤维连接, 形成Sharpey's样纤维, 上述改变被认为是移植植物与骨质愈合的早期征象^[6]。移植肌腱与骨质间以纤维软骨相连形成直接止点, 即典型的末端4层结构: 肌腱韧带、未钙化的纤维软骨、钙化的纤维软骨和骨组织。

BMSCs具有更新和增殖能力, 有分化多种细胞的潜能, 可在不同诱导环境下生长不同细胞, 如成骨细胞、软骨细胞、肌腱等, 研究^[7-8]证明BMSCs能促进腱骨界面细胞增殖促进愈合。VEGF165是血管内皮细胞的分裂原, 能作用于内皮细胞形成新生血管, 增加其通透性。VEGF165在软骨和骨组织形成中有重要作用, 表现为能促进肌腱移植植物与骨道间血管组织和其它细胞侵入^[9]。骨形态发生蛋白是

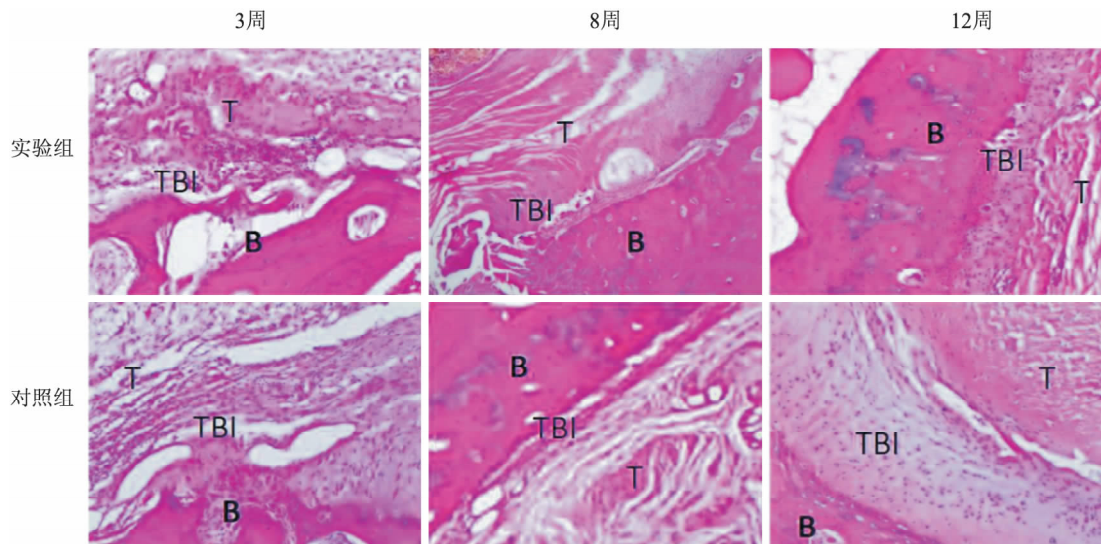


图3 术后两组各时间点腱骨界面的组织学观察 HE × 100
T: 肌腱; TBI: 腱骨界面; B: 骨

促进成骨细胞的主要因子,其主要功能是作用于骨原细胞并使其分化为骨和软骨细胞^[10],BMP2 是骨形态发生蛋白家族重要成员,表现为其与 BMSCs 表面受体结合,进而促进干细胞向骨和软骨细胞趋化、分裂。既往的研究^[11]已经证实 BMP2 具有促进骨再生能力及 VEGF165 具有促进血管再生能力,可协同作用有效促进兔桡骨缺损术后骨愈合,且联合使用疗效大于单独应用。但是在 ACL 断裂关节镜下重建术后应用疗效未有明确报道。本实验使用 *bmp-2/vegf165* 基因共表达慢病毒转染兔 BMSCs,之后通过构建兔膝关节前交叉韧带重建模型,探索 *bmp-2* 及 *vegf165* 对 ACL 断裂重建术后腱骨界面愈合的作用。生物力学检测结果表明,与正常组比较,肌腱重建术后(实验组、对照组)其主要薄弱部位主要集中在腱骨界面连接部,但是随着时间的延长,该部位的抗拉能力亦不断增强。而实验组与对照组比较,实验组的抗拉能力明显高于对照组。腱-骨组织愈合形态学观察结果表明,与对照组比较,实验组术后 3 周炎性细胞浸润及新生血管分布更加密集,术后 8 周腱-骨连接部连接更加紧密,术后 12 周腱-骨之间纤维软骨排列更加整齐,可见典型的韧带-非钙化纤维软骨-钙化软骨-骨四层结构。

综上所述,*bmp-2/vegf165* 基因共表达慢病毒转染兔 BMSCs 应用 ACL 断裂重建能促进重建韧带新生血管生成和腱骨界面骨软骨生成,从而达到直接愈合,对腱骨界面愈合具有明显促进作用,这为今后的进一步研究及临床应用提供了重要的基础。

参考文献

[1] Wu B, Zhao Z, Li S, et al. Preservation of remnant attachment improves graft healing in a rabbit model of anterior cruciate ligament reconstruction [J]. *Arthroscopy*, 2013, 29(8): 1362-71.

[2] Uozumi H, Aizawa T, Sugita T, et al. Visualization of torn anterior cruciate ligament Using 3-dimensional computed tomography [J]. *Orthop Rev(Pavia)*, 2013, 5(3): e22.

[3] Murray M M, Fleming B C. Use of a bioactive scaffold to stimulate anterior cruciate ligament healing also minimizes posttraumatic osteoarthritis after surgery [J]. *Am J Sports Med*, 2013, 41(8): 1762-70.

[4] Riboh J C, Hasselblad V, Godin J A, et al. Transtibial versus independent drilling techniques for anterior cruciate ligament reconstruction: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression [J]. *Am J Sports Med*, 2013, 41(11): 2693-702.

[5] Lefevre N, Naouri J F, Bohu Y, et al. Partial tears of the anterior cruciate ligament: diagnostic performance of isotropic three-dimensional fast spin echo(3D-FSE-Cube) MRI [J]. *Eur J Orthop Surg Traumatol*, 2014, 24(1): 85-91.

[6] Rodeo S A, Suzuki K, Deng X H, et al. Use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to enhance tendon healing in a bone tunnel [J]. *Am J Sports Med*, 1999, 27(4): 476-88.

[7] Tian F, Ji X L, Xiao W A, et al. CXCL13 promotes the effect of bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) on tendon-bone healing in rats and in C3H10T1/2 cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(2): 3178-87.

[8] Kanazawa T, Soejima T, Noguchi K, et al. Tendon-to-bone healing using autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells in ACL reconstruction without a tibial bone tunnel-A histological study [J]. *Muscles Ligaments Tendons J*, 2014, 4(2): 201-6.

[9] Wei X, Mao Z, Hou Y, et al. Local administration of TGF- β 1/VEGF165 gene-transduced bone mesenchymal stem cells for Achilles allograft replacement of the anterior cruciate ligament in rabbits [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 406(2): 204-10.

[10] Dean D B, Watson J T, Moed B R, et al. Role of bone morphogenetic proteins and their antagonists in healing of bone fracture [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2009, 14: 2878-88.

[11] 邢艳莉,汪春兰,曹东升,等.双基因 rhBMP-4/VEGF121 在治疗兔桡骨缺损中的作用 [J]. *安徽医科大学学报*, 2010, 45(2): 172-5.

Effect of modified BMSCs with gene co-expression of *bmp2* and *vegf165* on tendon-bone healing

Che Wei, Zhao Qichun, Shang Xifu, et al

(Dept of Orthopedic Surgery, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the effect of modified bone mesenchymal stem cells (BMSCs) with gene co-expression of bone morphogenetic protein 2 (*bmp2*) and vascular endothelial growth factor 165 (*vegf165*) on histomorphology and biomechanics of tendon-bone healing after rabbit anterior cruciate ligament reconstruction. **Methods**

Sixty-six white rabbits were randomly divided into three groups: experimental group, control group, normal group. The tendon-bone interface was injected with BMSCs transferred by lentiviral vector with gene co-expression of *bmp2* and *vegf165* in experimental group, BMSCs without transfection in control group and none in normal group.

过表达 LncRNA GAS5 对 SD 大鼠心肌成纤维细胞活化增殖的影响

张家贵^{1,2}, 陶辉^{1,2}, 施鹏^{1,2}, 陈泽文^{1,2}, 曹炜^{1,2}, 占红英^{1,2}, 石开虎^{1,2}

摘要 目的 应用长链非编码 RNA GAS5 (LncRNA GAS5) 过表达质粒 (pEGFP-C1-GAS5) 转染 SD 大鼠心肌成纤维细胞, 观察其对心肌成纤维细胞活化增殖的影响。方法 提取 SD 大鼠心肌成纤维细胞, 转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 刺激其增殖, 分为 pEGFP-C1-GAS5 组、阴性对照组和空白对照组, 应用 LncRNA GAS5 基因的过表达质粒 (pEGFP-C1-GAS5) 通过脂质体瞬时转染细胞, 48 h 后收获细胞。采用实时定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 检测 GAS5、I 型胶原前胶原 (Col1A1) 和 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 的 mRNA 表达, Western blot 分析 Col1A1 和 α -SMA 蛋白表达变化, MTT 法检测细胞增殖活力。结果 TGF- β 1 刺激心肌成纤维细胞后, qRT-PCR 结果显示 LncRNA GAS5 的表达量较正常组下降 ($P < 0.05$); 与阴性对照组和空白对照组比较, 转染了 pEGFP-C1-GAS5 的实验组, qRT-PCR 结果显示实验组的 GAS5 表达均明显升高 ($P < 0.05$), 同时 α -SMA 和 Col1A1 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.05$); Western blot 结果显示转染 pEGFP-C1-GAS5 的实验组 α -SMA 和 Col1A1 蛋白表达量均明显降低 ($P < 0.05$); MTT 法检测结果表明在实验组心肌成纤维细胞的增殖活力低于阴性对照组和空白对照组 ($P < 0.05$)。结论 过表达 LncRNA GAS5 可显著降低心肌成纤维细胞的增殖活力, 提示 GAS5 有抑制心肌成纤维细胞的活化增殖的

作用, 为以后进一步研究提供依据。

关键词 LncRNA GAS5; 心肌成纤维细胞; α -平滑肌肌动蛋白; I 型胶原前胶原

中图分类号 R 542.23

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)03-0328-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.03.005

心肌纤维化是在各种损伤因素的作用下导致的心肌细胞间质出现的异常胶原纤维沉积, 是房颤等多种心脏疾病的病理基础, 是心肌重构的一个重要结构改变^[1]。心肌纤维化的发病机制非常复杂, 基因及信号通路的异常变化均会导致心肌纤维化的发生, 而心肌成纤维细胞 (cardiac fibroblasts, CFs) 的活化增殖则是心肌纤维化发生发展中的中心事件^[2]。目前关于心肌纤维化发生机制已有许多研究^[3-4]表明一些长链非编码 RNA (long noncoding RNAs, LncRNAs) 参与心脏疾病的发生发展。有文献^[5]证实, 生长特异性抑制 5 (growth arrest-specific 5, GAS5) 在细胞的增殖与生长过程中充当重要的调节器, 然而, 在心肌纤维化中关于 GAS5 的报道甚少。该研究通过体外培养的原代 CFs 为研究对象, 采用 Lipofectamine 2000 Reagent 瞬时转染 GAS5 基因的过表达质粒 (pEGFP-C1-GAS5), 观察随后的 CFs 增殖情况及相关 RNA 和蛋白水平的变化, 探寻 GAS5 在心肌纤维化中的作用, 为以后研究心肌纤维化的机制提供新思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料

2016-12-12 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81570295); 安徽省科技攻关计划项目 (编号: 1501041148); 安徽高校自然科学基金项目 (编号: KJ2015A320)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第二附属医院心胸外科, 合肥 230601

² 安徽医科大学心血管病研究中心, 合肥 230601

作者简介: 张家贵, 男, 硕士研究生;

石开虎, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: shikaihu@gmail.com

Histomorphology and biomechanics were evaluated in 3rd, 8th and 12th week after surgery. **Results** Histological pathology revealed that neovascularization and fibroblast cells infiltration in experimental group were higher than that in the control group. Ability of tissue healing was better than the control group owing to the formation of typical 4-layered tendon-bone interface at in 12th week postoperatively. Biomechanics test found that the maximum loads in the experimental group showed significant superior outcomes compared with the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The modified BMSCs with gene co-expression of *bmp2* and *vegfl65* may improve the outcome of tendon-bone healing.

Key words vascular endothelial growth factor 165; bone morphogenetic protein 2; bone mesenchymal stem cells; tendon-bone healing; anterior cruciate ligament