

BMP-2 基因修饰的骨髓间充质干细胞复合纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66 植入体改善大鼠萎缩性骨不连

黄永, 马建文, 李玉, 景青玲, 张钦, 李长帅

(青海大学附属医院创伤骨科, 西宁 810001)

摘要 目的 探究骨形态发生蛋白(BMP)-2 基因修饰的骨髓间充质干细胞(BMSCs) 复合纳米羟基磷灰石(nHA)/聚酰胺 66(PA66) 对大鼠股骨骨不连的治疗作用。方法 分离大鼠 BMSCs, 并分为支架(sent) + BMSCs 组、sent + BMSCs + rhBMP-2 组、sent + BMSCs + Ad-BMP-2 组; 将人重组 BMP-2(rhBMP-2) 或腺病毒感染 BMP-2(Ad-BMP-2) 载体转染 BMSCs 并装载 nHA/PA66 支架材料。流式细胞仪检测 BMSCs 表达特定表面标志物, 通过 MTT 法检测细胞增殖情况, ELISA 检测相关生物活性因子, 包括血小板衍生生长因子(PDGF)、转化生长因子- β (TGF- β)、血管内皮生长因子(VEGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、骨钙素(OCN)、骨连接蛋白(ON)、碱性磷酸酶(ALP)。扫描电子显微镜(SEM) 观察细胞生长和黏附情况。在 SD 大鼠的萎缩性骨不连模型中, 将 sent + BMSCs + rhBMP-2 或 sent + BMSCs + Ad-BMP-2 复合体植入缺损区域, 分为 rhBMP-2 组及 Ad-BMP-2 组, 并通过 X 射线和 MicroCT 评估治疗效果。结果 nHA/PA66 支架表面光滑且多孔, BMSCs 良好黏附。流式细胞术显示在 BMSCs 中高表达 CD29 和 CD90, 低表达 CD45 和 CD34。MTT 显示细胞在 72 h 后迅速增殖。与 sent + BMSCs 组及 sent + BMSCs + rhBMP-2 组相比, sent + BMSCs + Ad-BMP-2 组 ALP 活性、PDGF、TGF- β 、VEGF、FGF、OCN、ON 表达均上调($P < 0.05$)。术后 12 周 Ad-BMP-2 组大鼠支架复合体已完全被新生皮质骨包裹, 且表面光滑完整。X 射线显示 Ad-BMP-2 组复合体已完全被新生皮质骨包裹, 恢复程度优于 rhBMP-2 组。MicroCT 结果显示, 与 rhBMP-2 组相比, Ad-BMP-2 组术后 12 周大鼠骨体积分数、骨小梁厚度、骨小梁数目、骨矿物质密度及骨矿物质含量均升高($P < 0.05$), 骨小梁分离水平降低($P < 0.05$)。结论 Ad-BMP-2 转染 BMSCs 复合 nHA/PA66 支架材料可以更有效地表达生物活性, 为 BMSCs 提供持续和良好的增殖分化微环境, 有利于促进局部成骨活性, 且有利于骨缺损修复。

关键词 萎缩性骨不连; 骨形态发生蛋白-2; 骨髓间充质干细胞; 纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66; 腺病毒; 骨支架材料

中图分类号 R 651.1+5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)09-1599-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.09.005

骨不连是指骨折后超过 6 个月仍未愈合, 发生率为 1.9% ~ 10%, 造成患者身心痛苦和卫生保健系统经济负担^[1]。传统手术治疗萎缩性骨不连存在局限与并发症, 随着生物工程的发展, 基因治疗、干细胞治疗等新方法不断涌现。纳米羟基磷灰石/聚酰胺 66(nano-hydroxyapatite/polyamide66, nHA/PA66) 作为一种新型的生物活性材料, 生物相容性良好, 在骨缺损修复中显示出巨大的潜力, 可有效重建脊椎结构^[2]。骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2) 基因是重要的骨诱导因子, 已被广泛研究并应用于临床, 以促进骨缺损的修复和再生^[3]。BMP-2 基因修饰的骨髓间充质干细胞

(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 在骨再生中作用关键。BMSCs 能够在体内外分化为成骨细胞, 促进新骨形成^[4]。BMP-2 基因转染至 BMSCs 中具有增强其成骨分化, 提高骨缺损修复的能力, 但 BMP-2 直接使用半衰期短、易降解, 成本高且有风险^[5]。重组人 BMP-2(recombinant human BMP-2, rhBMP-2) 能加快骨愈合, 但存在过敏反应和感染风险^[6]。腺病毒(adenovirus, Ad) 载体能够提高 BMP-2(Ad-BMP-2) 表达, 促进成骨。因此, 该研究旨在探讨 rhBMP-2 或 Ad-BMP-2 感染 BMSCs 结合 nHA/PA66 支架治疗骨不连的效果, 比较其骨传导性、骨诱导性和成骨潜力。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 40 只 8 周龄雄性 Sprague-Dawley(SD) 大鼠(体质量 280 ~ 340 g) 来自中国科学院上海实验动物中心。实验动物的饲养按照青海大学

2025-06-03 接收

基金项目: 青海省自然科学基金项目(编号: 2022-ZJ-968Q)

作者简介: 黄永, 男, 博士;

李长帅, 男, 主治医师, 通信作者, E-mail: wxqlzyy@163.com

附属医院动物伦理委员会批准的方案进行(伦理批号: P-SL-202204)。本研究动物实验均严格按照《实验动物护理和使用指南》进行。动物饲养在无病原体级的动物中心,温度为 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$, 12 h/12 h 明暗循环,湿度为 $50\% \pm 5\%$,可自由获取食物和水。

1.1.2 主要材料与仪器 nHA/PA66 多孔支架材料委托四川国纳科技有限公司使用相转移法制备并提供;噻唑蓝(methylthiazolyl-diphenyl-tetrazolium bromide, MTT)试剂盒、血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factors, FGF)、骨钙素(osteocalcin, OCN)、骨连接蛋白(osteonectin, ON) ELISA 试剂盒及 BCIP/NBT 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司;成脂诱导分化与染色试剂盒(货号: PWL081)购自大连美仑生物技术有限公司;rhBMP-2 载体及 Karnovsky 固定液购自上海生工生物工程技术服务有限公司;anti-分化簇(cluster of differentiation, CD) 90、anti-CD29、anti-CD34 及 anti-CD45 均购自美国 Biolegend 公司。流式细胞仪系统(型号: NovoCyte)购自美国 Agilent 公司;全波长酶标仪(型号: Multiskan SkyHigh)购自美国 Thermo Fisher 公司;扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM; 型号: S4800-II)购自日本 Hitachi 公司。

1.2 方法

1.2.1 BMSCs 分离、培养及检测 通过全骨髓贴壁培养法培养大鼠 BMSCs。大鼠被处死后,无菌取出股骨和胫骨,去除两端骨髓,用含有 20% 胎牛血清的培养基冲洗骨髓。原代细胞在 3 d 后换液,当细胞融合度达到 70%~80% 时,用胰蛋白酶消化并按 1:2 比例传代,改用含 10% 胎牛血清的培养液。第 3 代 BMSCs 用于成骨诱导分化,使用含有特定成分的诱导液,每 2 d 更换 1 次。通过流式细胞仪检测 BMSCs 的表面标志物,包括 CD90、CD29、CD34 和 CD45。此外,使用成脂分化试剂盒诱导 BMSCs 分化为脂肪细胞,并通过油红 O 染色和显微镜观察脂肪细胞的形成。

1.2.2 腺病毒载体、nHA/PA66 多孔支架材料制备及感染 本研究制备了含人 BMP-2 基因的第 1 代血清型 5 型腺病毒载体 Ad-BMP-2,并测定了病毒滴度和噬斑形成单位。同时,制备了 nHA 与 PA66 质

量比为 6:4 的多孔支架材料,并对其进行了灭菌处理和微观结构观察。之后,将第 3 代大鼠 BMSCs 分别与 rhBMP-2 和 Ad-BMP-2 共培养 24 h,并将这些细胞装载到 nHA/PA66 多孔支架上,构建了 3 种不同的组织工程骨:支架(sent) + BMSCs 组、sent + BMSCs + rhBMP-2 组和 sent + BMSCs + Ad-BMP-2 组。

1.2.3 MTT 法检测细胞生长情况 将各组细胞在 96 孔板中孵育 24、48、72、96 h,然后在每孔中加入 10 μL MTT,每孔加入 100 μL 二甲亚砜来溶解结晶紫沉淀,用酶标仪检测在 490 nm 处的 OD 值。

1.2.4 ELISA 检测相关生物活性因子 各组细胞培养至第 7 天,使用 ELISA 试剂盒按照说明书方法检测浸出液中相关生物活性因子(PDGF、TGF- β 、VEGF、FGF、OCN 及 ON)的浓度。

1.2.5 ALP 活性检测 各组细胞培养至第 7 天,细胞在 4% 多聚甲醛中固定 20 min,用蒸馏水洗涤 3 次。接下来,用 BCIP/NBT ALP 染色试剂盒对细胞进行染色。为了测定 ALP 活性,在 96 孔板上用裂解缓冲液(20 mmol/L pH 7.5 Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl 和 1% Triton X-100)裂解细胞,加入底物和对硝基酚。使用酶标仪测定 405 nm 处 OD 值以测定 ALP 活性。

1.2.6 SEM 观察 BMSCs 在 nHA/PA66 上的黏附情况 根据参考文献^[7]: 各组细胞培养至第 7 天,将各组细胞固定在 Karnovsky 固定液中,在乙醇中脱水,在玻璃表面干燥,然后用溅射涂层涂上金。在 SEM 上观察 BMSCs 在 nHA/PA66 上的附着情况。通过二次电子成像,工作距离为 15~25 mm,加速电压为 20~25 kV。

1.2.7 建立大鼠萎缩性骨不连模型 在大鼠成功麻醉后(10% 水合氯醛, 300 mg/kg, 腹腔麻醉)进行以下操作:脱毛并固定大鼠于加热手术台上,消毒皮肤后,沿髂旁切口暴露股骨内外侧髁。用电钻在股骨髁间钻入 1.25 mm 克氏针,避免穿出髓腔,克氏针穿出皮肤后截断并埋入皮下。在股骨中段外侧切口,暴露股骨并保护周围软组织,进行截骨。去除骨髓后植入材料于缺损区,用生理盐水冲洗并缝合切口。术后注射青霉素,正常喂养,并允许负重活动。使用特制 Ω 形克氏针稳定股骨,保持缺损末端分开,以固定支架于缺损中。

SD 大鼠分为 2 组,每组 20 只, rhBMP-2 组以 BMSCs/rhBMP-2 并装载 nHA/PA66 支架复合物, Ad-BMP-2 组以 BMSCs/Ad-BMP-2 并装载 nHA/

PA66 支架复合物,将上述复合体植入缺损位置。于术后 12 周对 SD 大鼠行左下肢 X 射线检查,观察病变区域的骨痂生成情况。

1.2.8 MicroCT 检测 扫描分辨率为 30 μm , MicroCT 自带三维重建系统及 MicroCT 40 软件被用来测量和分析术后 12 周 SD 大鼠萎缩性骨不连模型中病变区域的相关数据,包括体积分数 (bone volume/total volume, BV/TV)、骨小梁厚度 (trabecular thickness, Tb. Th)、骨小梁数目 (trabecular number, Tb. N)、骨小梁分离 (trabecular spacing, Tb. Sp)、骨矿物质密度 (bone mineral density, BMD)、骨矿物质含量 (bone mineral content, BMC)。

1.2.9 统计学处理 应用 SPSS 26.0 软件进行数据统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 student's *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SEM 观察 nHA/PA66 支架 SEM 显示 nHA/PA66 表面光滑,呈相互连通的多孔结构。见图 1。

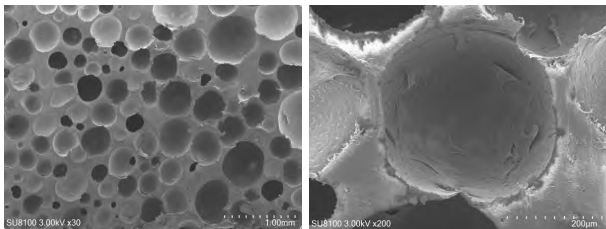


图 1 nHA/PA66 支架 SEM 镜下图

Fig. 1 SEM images of nHA/PA66 stent

2.2 BMSCs 细胞鉴定情况

2.2.1 BMSCs 细胞特异性表面标志物 BMSCs 细胞表面抗原 CD29、CD90、CD45 和 CD34 的表达率分别为 99.60%、96.10%、4.92% 和 4.87%。见图 2。

2.2.2 BMSCs 成脂分化后脂肪细胞形成情况 图 3 视野内可见细胞内出现红色脂滴,此为脂肪细胞形成的典型特征。脂滴在细胞内的数量、大小及分布存在异质性,反映出不同细胞成脂分化程度不一。细胞间可见丝状结构,或为细胞突起及细胞外基质成分。

2.3 各组细胞增殖活性比较 MT 检测结果显示, sent + BMSCs 组、sent + BMSCs + rhBMP-2 组及 sent + BMSCs + Ad-BMP-2 组细胞生长趋势一致,均表现为 72 h 前增殖速度缓慢,72 h 后增殖速度迅速增加。见图 4。

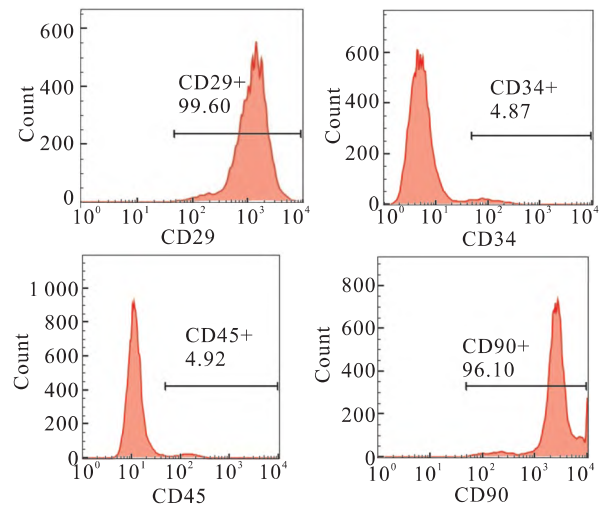


图 2 流式细胞术检测 BMSCs 细胞特异性表面标志物

Fig. 2 BMSCs cell-specific surface markers were detected by flow cytometry

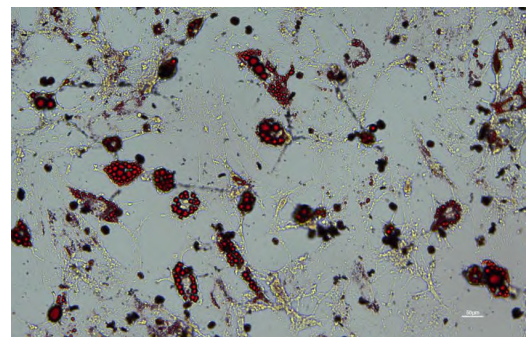


图 3 BMSCs 成脂分化后脂肪细胞形成情况 $\times 200$

Fig. 3 The formation of adipocytes after adipogenic differentiation of BMSCs $\times 200$

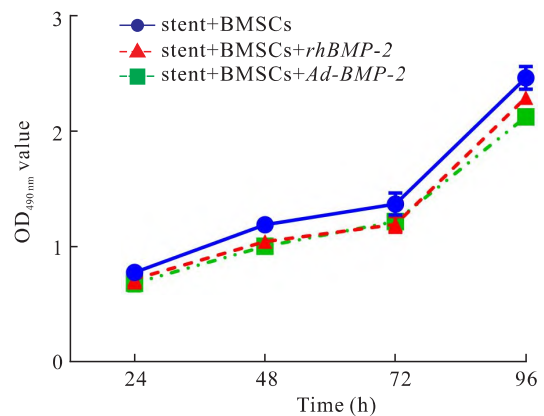


图 4 各组细胞增殖活性曲线

Fig. 4 Curve of cell proliferation activity in each group

2.4 各组细胞 ALP 活性比较 sent + BMSCs 组 (0.09 ± 0.01) 与 sent + BMSCs + rhBMP-2 组 (0.10

± 0.02) 相比 ALP 活性无显著变化 ($t = 0.775, P > 0.05$); 与 sent + BMSCs 组及 sent + BMSCs + *rhBMP-2* 组相比, sent + BMSCs + *Ad-BMP-2* 组 (0.14 ± 0.02) 比 ALP 活性上调 ($t = 3.873, 3.098$, 均 $P < 0.05$)。见图 5。

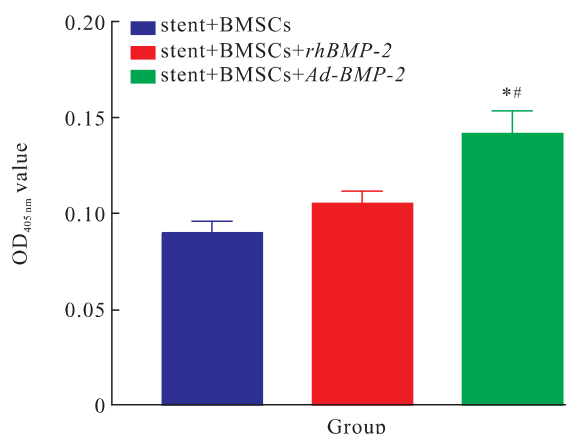


图 5 各组 ALP 活性比较

Fig. 5 Comparison of ALP activity in each group

* $P < 0.05$ vs stent + BMSCs group; # $P < 0.05$ vs stent + BMSCs + *rhBMP-2* group.

2.5 各组生物活性因子表达比较 与 sent + BMSCs 组相比, sent + BMSCs + *rhBMP-2* 组 ON、PDGF 及 VEGF 表达升高 ($t = 14.845, 12.041, 16.505$, 均 $P < 0.05$), FGF、OCN 及 TGF- β 表达均无显著变化 (t

$= 0.336, 0.736, 0.115$, 均 $P > 0.05$); 与 sent + BMSCs 组及 sent + BMSCs + *rhBMP-2* 组相比, sent + BMSCs + *Ad-BMP-2* 组 ON ($t = 62.423, 49.436$)、PDGF ($t = 29.956, 34.058$)、VEGF ($t = 86.419, 70.793$)、FGF ($t = 70.117, 64.463$)、OCN ($t = 18.615, 18.559$) 及 TGF- β ($t = 16.767, 21.731$) 表达均上调 (均 $P < 0.05$)。见表 1。

2.6 SEM 观察 BMSCs 在 nHA/PA66 上的黏附情况 SEM 镜下 3 组 BMSCs 与 nHA/PA66 支架材料均可见 nHA/PA66 支架材料表面细胞连接成片, 有丝状纤维形成, 表明 BMSCs 在 nHA/PA66 上发生了较好的黏附。见图 6。

2.7 X 射线观察大鼠病变区域 *rhBMP-2* 组及 *Ad-BMP-2* 组大鼠术前骨缺损明显, 术后 12 周 *rhBMP-2* 组大鼠可见骨性骨痂形成, 有高密度皮质骨包裹 BMSCs/*rhBMP-2* 装载 nHA/PA66 支架材料, 两端有明显连接, 但仍可见缺损部位; *Ad-BMP-2* 组大鼠术后 12 周 BMSCs/*Ad-BMP-2* 装载 nHA/PA66 支架复合物已完全被新生皮质骨包裹, 且表面光滑完整。见图 7。提示 *Ad-BMP-2* 组在促进骨愈合方面表现更优

2.8 MicroCT 检测观察 与 *rhBMP-2* 组相比, *Ad-BMP-2* 组术后 12 周大鼠 BMD、BMC、Tb. Th、BV/TV、Tb. N 均升高 ($P < 0.05$), Tb. Sp 水平降低 ($P < 0.05$)。见图 8 及表 2。

表 1 各组生物活性因子表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Comparison of the expression of bioactive factors in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	ON (ng/mL)	PDGF (pg/mL)	VEGF (pg/mL)	FGF (pg/mL)	OCN (ng/mL)	TGF- β (ng/mL)
stent + BMSCs	35.20 $\pm$ 0.52	107.39 $\pm$ 6.54	193.58 $\pm$ 2.34	145.35 $\pm$ 2.41	15.65 $\pm$ 0.72	75.26 $\pm$ 5.42
stent + BMSCs + <i>rhBMP-2</i>	47.20 $\pm$ 1.30*	116.26 $\pm$ 3.73*	229.61 $\pm$ 2.97*	144.60 $\pm$ 3.02	15.18 $\pm$ 0.84	74.86 $\pm$ 2.63
stent + BMSCs + <i>Ad-BMP-2</i>	128.64 $\pm$ 2.54*#	275.36 $\pm$ 7.18*#	461.36 $\pm$ 4.83*#	312.74 $\pm$ 3.36*#	35.69 $\pm$ 1.72*#	147.97 $\pm$ 5.20*#

* $P < 0.05$ vs stent + BMSCs group; # $P < 0.05$ vs stent + BMSCs + *rhBMP-2* group.

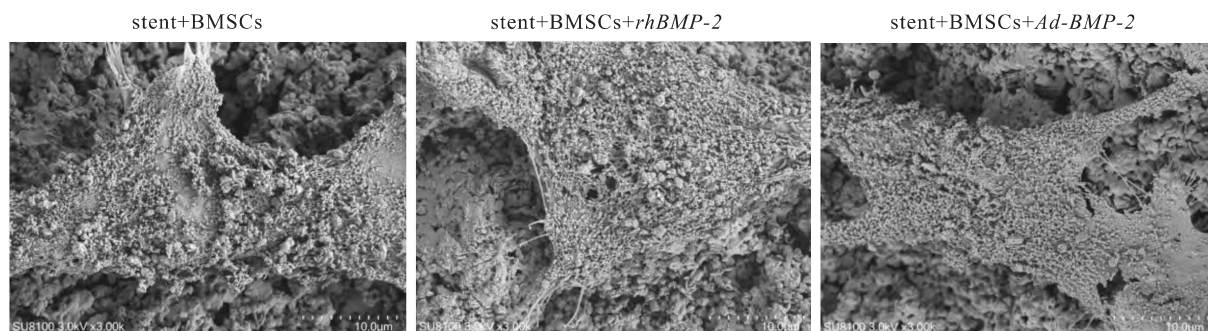


图 6 SEM 观察 BMSCs 在 nHA/PA66 上的黏附情况 $\times 200$

Fig. 6 Adhesion of BMSCs on nHA/PA66 observed by SEM $\times 200$

表 2 各组大鼠术后 12 周骨密度及骨结构参数比较($\bar{x} \pm s, n=20$)Tab. 2 Comparison of bone mineral density and bone structure parameters of rats in each group 12 weeks after operation ($\bar{x} \pm s, n=20$)

Group	BMD (mg/cm ²)	BMC (g)	Tb. Th (mm)	BV/TV (%)	Tb. N (mm ⁻¹)	Tb. Sp (mm)
rhBMP-2	176.39 ± 11.34	0.75 ± 0.09	0.16 ± 0.03	31.41 ± 1.85	3.15 ± 0.64	0.52 ± 0.11
Ad-BMP-2	194.26 ± 12.51	0.84 ± 0.12	0.22 ± 0.04	34.67 ± 1.94	3.63 ± 0.75	0.44 ± 0.09
t value	4.733	2.688	5.367	5.439	2.177	2.517
P value	<0.001	0.011	<0.001	<0.001	0.036	0.016



图 7 X 射线观察大鼠病变区域

Fig. 7 X-ray observation of the lesion area in rats

The two groups of rats were the same rat before and 12 weeks after surgery; The red arrow indicates the molding position, and the yellow arrow indicates the position after fracture recovery.

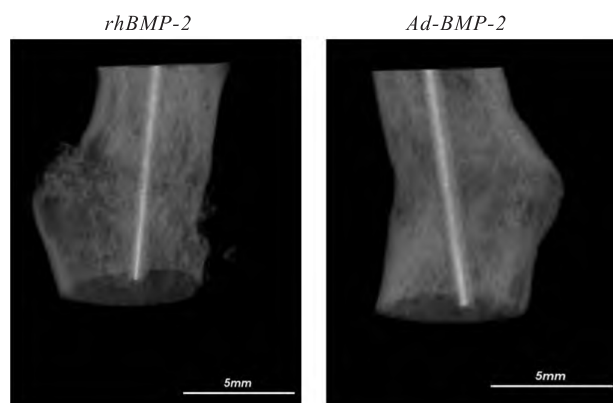


图 8 大鼠术后 12 周 microCT 观察骨组织结构形态

Fig. 8 The bone tissue structure and morphology of rats were observed by microCT 12 weeks after the operation

3 讨论

本研究探讨了 BMP-2 基因修饰的 BMSCs 复合 nHA/PA66 植入体对大鼠萎缩性骨不连的改善作用。骨不连是指骨折愈合停滞,而骨组织工程通过在支架中加入生长因子或活细胞来增强骨形成^[8]。nHA/PA66 复合材料的微结构特性对骨愈合具有重

要影响。纳米羟基磷灰石 (nHA) 作为一种生物活性材料,具有良好的生物相容性和骨传导性,能够促进骨细胞的黏附和增殖。PA66 则提供了必要的机械强度和支撑力,使得复合材料在植入后能够承受生物负荷^[7]。本研究 SEM 显示 nHA/PA66 支架具有多孔结构,有利于骨和血管再生,并为 BMSCs 提供了良好的黏附基质,促进了细胞的增殖和成骨分化。BMP-2 通过激活 Smad 信号通路,促进未分化间充质干细胞向成骨细胞的分化,从而加速骨愈合过程^[9]。这种组合策略不仅提高了骨愈合的效率,还可能降低术后并发症的发生率。

BMP-2 基因是促进骨和软骨发育的关键生长因子,已被美国食品和药物管理局批准用于临床^[10]。然而,高剂量 BMP-2 基因使用存在并发症,而腺病毒载体因其高转染效率和安全性被用于基因治疗^[11]。BMSCs 是骨组织工程的主要细胞来源和常用的细胞。本研究采用 Chamberlain et al^[12] 的方法,通过将 BMSCs 与特定化学物质共培养来诱导其分化为成骨细胞。本研究 MTT 检测显示,不同组别的细胞生长趋势相似,说明 rhBMP-2 或 Ad-BMP-2 处理的 BMSCs 与 nHA/PA66 支架的复合培养对细胞生长影响不大。流式细胞仪检测显示 BMSCs 表达特定表面标志物,确认其为 BMSCs 而非造血细胞。研究^[13]表明,BMP-2 修饰的 BMSCs 能增强体外 ALP 活性、细胞增殖和矿化,并在体内促进骨缺损愈合和骨折修复。本研究结果显示,与仅含 BMSCs 的 sent 组和含 BMSCs + rhBMP-2 的 sent 组相比,含 BMSCs + Ad-BMP-2 的 sent 组 ALP 活性更高,表明 Ad-BMP-2 比 rhBMP-2 更能促进 BMSCs 成骨分化。与 sent + BMSCs 组及 sent + BMSCs + rhBMP-2 组相比,sent + BMSCs + Ad-BMP-2 组在 ALP 活性及多种生长因子(如 PDGF、TGF- β 、VEGF、FGF、OCN 和 ON)表达上均显著上调。其中,研究^[14]表明,PDGF 有助于维持骨干细胞的未成熟状态并促进其向损伤部位迁移。TGF- β 和 BMP 在骨骼发育中发挥重要功能^[15]。VEGF 促进血管生成和 MSCs 成骨分化^[16]。FGF 参与维持成人骨稳态和骨折愈

合。OCN 和 ON 调节骨细胞功能和骨质量。表明 *BMP-2* 基因修饰显著增强了 BMSCs 的成骨能力。这与其他研究结果一致^[17], *BMP-2* 被广泛认为是促进骨愈合的有效因子,其能够刺激成骨细胞的分化和骨组织的形成。

在大鼠萎缩性骨不连模型中,植入 BMSCs/*rh-BMP-2* 或 BMSCs/*Ad-BMP-2* 装载的 nHA/PA66 支架后,X 射线和 MicroCT 检查显示,*Ad-BMP-2* 组大鼠的新骨形成量和骨愈合情况优于 *rhBMP-2* 组,表明 BMSCs/*Ad-BMP-2* 复合 nHA/PA66 支架材料对治疗骨不连效果更佳。与传统的自体骨移植相比,本研究选择 nHA/PA66 复合材料和 *BMP-2* 基因修饰的 BMSCs 作为治疗方案,不仅避免了自体骨取材的创伤和并发症,还能通过基因修饰提高骨愈合的效率。与其他治疗方案相比,如仅使用 *rhBMP-2* 或传统的生物材料,*Ad-BMP-2* 基因修饰的 BMSCs 复合 nHA/PA66 支架在促进骨愈合方面表现出更好的效果。研究^[6]表明,*rhBMP-2* 的应用能够显著提高骨愈合率和缩短愈合时间,但其效果在不同类型的骨不连中可能存在差异。而本研究的方案通过结合生物材料和基因治疗,提供了一种更为有效的骨不连治疗策略。

综上所述,以腺病毒为载体修饰 *BMP-2* 形成了 *Ad-BMP-2*,转染 BMSCs 复合 nHA/PA66 支架材料可以更有效表达生物活性,为 BMSCs 提供持续和良好的增殖分化微环境,有利于促进局部成骨活性和骨缺损修复。

参考文献

- [1] Deng A D, Innocenti M, Arora R, et al. Vascularized small-bone transfers for fracture nonunion and bony defects [J]. Clin Plast Surg, 2020, 47(4): 501–20. doi: 10.1016/j.cps.2020.06.005.
- [2] 王华楠,李玉宝,左奕,等. 骨组织工程用 n-HA/PA66 多孔贯通支架的制备及表征 [J]. 高分子材料科学与工程, 2007, 23(1): 230–3. doi: 10.16865/j.cnki.1000–7555.2007.01.058.
- [2] Wang H N, Li Y B, Zuo Y, et al. Fabrication and characterization of n-HA/PA66 composite scaffold for bone tissue engineering [J]. Polym Mater Sci Eng, 2007, 23(1): 230–3. doi: 10.16865/j.cnki.1000–7555.2007.01.058.
- [3] Fernandez L, Petrizzo A. The use of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) in spine surgery is it valuable? [J]. Bull Hosp Jt Dis (2013), 2023, 81(1): 40–5.
- [4] 戚孟春,邓久鹏,董伟,等. 骨髓间充质干细胞与支架材料 nHA/PA66 复合培养的生物活性研究 [J]. 口腔医学研究, 2010, 26(6): 805–8. doi: 10.13701/j.cnki.kqxyj.2010.06.052.
- [4] Qi M C, Deng J P, Dong W, et al. Biological characteristics of bone marrow mesenchymal stem cells co-cultured with nano-hydroxyapatite/polyamide 66 [J]. J Oral Sci Res, 2010, 26(6): 805–8. doi: 10.13701/j.cnki.kqxyj.2010.06.052.
- [5] 赖文涛,赵志军,张春阳. *Bmp2* 影响脂肪干细胞成骨能力的研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(6): 963–9. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2023.06.015.
- [5] Lai W T, Zhao Z J, Zhang C Y. Study on the effect of *Bmp2* on the osteogenic ability of adipose stem cells [J]. Acta Univ Med Anhui, 2023, 58(6): 963–9. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2023.06.015.
- [6] Fuchs T, Stolberg-Stolberg J, Michel P A, et al. Effect of bone morphogenetic protein-2 in the treatment of long bone non-unions [J]. J Clin Med, 2021, 10(19): 4597. doi: 10.3390/jcm10194597.
- [7] Li A, Li J, Zhang Z, et al. Nanohydroxyapatite/polyamide 66 crosslinked with QK and BMP-2-derived peptide prevented femur nonunion in rats [J]. J Mater Chem B, 2021, 9(9): 2249–65. doi: 10.1039/d0tb02554b.
- [8] Shibli J A, Nagay B E, Suárez L J, et al. Bone tissue engineering using osteogenic cells: from the bench to the clinical application [J]. Tissue Eng Part C Methods, 2022, 28(5): 179–92. doi: 10.1089/ten.TEC.2022.0021.
- [9] Chen X, Tan B, Bao Z, et al. Enhanced bone regeneration via spatiotemporal and controlled delivery of a genetically engineered BMP-2 in a composite Hydrogel [J]. Biomaterials, 2021, 277: 121117. doi: 10.1016/j.biomaterials.2021.121117.
- [10] Ingwersen L C, Frank M, Naujokat H, et al. BMP-2 long-term stimulation of human pre-osteoblasts induces osteogenic differentiation and promotes transdifferentiation and bone remodeling processes [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(6): 3077. doi: 10.3390/ijms23063077.
- [11] Nilson R, Lübbers O, Weiß L, et al. Transduction enhancers enable efficient human adenovirus type 5-mediated gene transfer into human multipotent mesenchymal stromal cells [J]. Viruses, 2021, 13(6): 1136. doi: 10.3390/v13061136.
- [12] Chamberlain G, Fox J, Ashton B, et al. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing [J]. Stem Cells, 2007, 25(11): 2739–49. doi: 10.1634/stemcells.2007–0197.
- [13] Li Y, Fu G, Gong Y, et al. BMP-2 promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by enhancing mitochondrial activity [J]. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2022, 22(1): 123–31.
- [14] Su W, Liu G, Liu X, et al. Angiogenesis stimulated by elevated PDGF-BB in subchondral bone contributes to osteoarthritis development [J]. JCI Insight, 2020, 5(8): e135446. doi: 10.1172/jci.insight.135446.
- [15] Wu M, Wu S, Chen W, et al. The roles and regulatory mechanisms of TGF- β and BMP signaling in bone and cartilage develop-

- ment, homeostasis and disease [J]. *Cell Res*, 2024, 34(2): 101–23. doi: 10.1038/s41422-023-00918-9.
- [16] Burger M G, Grosso A, Briquez P S, et al. Robust coupling of angiogenesis and osteogenesis by VEGF-decorated matrices for bone regeneration [J]. *Acta Biomater*, 2022, 149: 111–25. doi: 10.1016/j.actbio.2022.07.014.
- [17] Kitahara T, Tateiwa D, Hirai H, et al. *rhBMP-2*-loaded hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate microsphere/hydrogel composite promotes bone regeneration in a novel rat femoral nonunion model [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2024, 12: 1461260. doi: 10.3389/fbioe.2024.1461260.

***BMP-2* gene-modified bone marrow mesenchymal stem cells combined with nano-hydroxyapatite/polyamide 66 implants improve atrophic nonunion of bone in rats**

Huang Yong, Ma Jianwen, Li Yu, Jing Qingling, Zhang Qin, Li Changshuai

(*Dept of Trauma Orthopedics, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810001*)

Abstract Objective To investigate the therapeutic effect of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) modified by bone morphogenetic protein (BMP)-2 gene combined with nano-hydroxyapatite (nHA)/polyamide 66 (PA66) on femoral nonunion in rats. **Methods** Rat BMSCs were isolated and divided into the stent + BMSCs group, stent + BMSCs + *rhBMP-2* group, and stent + BMSCs + *Ad-BMP-2* group; human recombinant BMP-2 (*rh-BMP-2*) or adenovirus-infected BMP-2 (*Ad-BMP-2*) vector was transfected into BMSCs and loaded onto nHA/PA66 stent materials. Flow cytometry was used to detect that BMSCs expressed specific surface markers. Cell proliferation was detected by MTT assay, related bioactive factors [platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor- β (TGF- β), vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor (FGF), osteocalcin (OCN), osteonectin (ON)] were detected by ELISA, alkaline phosphatase (ALP) activity was detected, and cell growth and adhesion were observed by scanning electron microscopy (SEM). In the atrophic nonunion model of SD rats, the stent + BMSCs + *rhBMP-2* or stent + BMSCs + *Ad-BMP-2* complex was implanted into the defect area, which was divided into the *rhBMP-2* group and the *Ad-BMP-2* group, and the therapeutic effect was evaluated by X-ray and MicroCT. **Results** The surface of the nHA/PA66 stent was smooth and porous, and BMSCs adhered well. Flow cytometry showed high expression of CD29 and CD90 and low expression of CD45 and CD34 in BMSCs. MTT showed that the cells proliferated rapidly after 72 h. Compared with the stent + BMSCs group and the stent + BMSCs + *rhBMP-2* group, the ALP activity, the expressions of PDGF, TGF- β , VEGF, FGF, OCN, and ON in the stent + BMSCs + *Ad-BMP-2* group were significantly up-regulated ($P < 0.05$). 12 weeks after surgery, the stent complex in the *Ad-BMP-2* group of rats was completely wrapped by newly formed cortical bone, and the surface was smooth and intact. X-ray showed that the complex in the *Ad-BMP-2* group was completely wrapped by newly formed cortical bone, and the recovery degree was better than that in the *rhBMP-2* group. Micro-CT results showed that compared with the *rhBMP-2* group, the bone volume fraction, trabecular thickness, trabecular number, bone mineral density, and bone mineral content in the *Ad-BMP-2* group all increased 12 weeks after surgery ($P < 0.05$), and the trabecular separation level decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** *Ad-BMP-2*-transfected BMSCs combined with nHA/PA66 stent material can express bioactivity more effectively, provide a continuous and good microenvironment for the proliferation and differentiation of BMSCs, which is beneficial to promoting local osteogenic activity and bone defect repair.

Key words atrophic nonunion of bone; bone morphogenetic protein-2; bone marrow mesenchymal stem cells; nano-hydroxyapatite/polyamide 66; adenovirus; bone stent material

Fund program Natural Science Foundation of Qinghai Province (No. 2022-ZJ-968Q)

Corresponding author Li Changshuai, E-mail: wxqlyzyy@163.com