

在 CHO 细胞中表达具有高效成骨活性的 BMP-2/7 异源二聚体

潘秋辉¹, 杨松海², 孙奋勇²

1 中山大学附属第二医院医学研究中心, 广州 510120

2 暨南大学生命科学技术学院生物工程研究所, 广州 510632

摘要: PCR 扩增 BMP-2 与 BMP-7 的编码基因, 利用重叠 PCR 以柔性肽(Gly₄Ser)₅ 编码序列将二者串连并克隆到质粒 pIRESneo3 上, 转染 CHO-K1 细胞得到混合稳定克隆。ELISA 检测培养液中 BMP-2/7 异源二聚体蛋白的表达水平为 230.75 ± 13.34 ng/mL, 以此为条件培养基处理成骨细胞株 MC3T3, 对照组为分别含有 CHO-K1 细胞及大肠杆菌表达的 BMP-2 同源二聚体以及 PBS 的条件培养基。结果发现碱性磷酸酶染色与茜素红染色差异明显, 定量 RT-PCR 显示分子指标 OC、ALP、Runx2 与 Osx 的转录水平明显增高($P < 0.05$), Luciferase 报告基因检测 BMP/Smad 通路活性较对照组升高明显($P < 0.05$)。首次设计构建了 BMP-2/7 异源二聚体蛋白, 其成骨活性显著高于 BMP-2 同源二聚体。

关键词: 骨形态发生蛋白, 异源二聚体, 成骨细胞, 分化

Expression of BMP-2/7 Heterodimers with Potent Ability to Stimulate Osteogenic Differentiation in CHO Cells

Qihui Pan¹, Songhai Yang², and Fenyong Sun²

1 Medical Research Center of the Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China

2 Genetic Engineering Institute, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract: Coding sequences of BMP-2 and BMP-7 were amplified using PCR and ligated with a DNA sequence encoding a flexible peptide (Gly₄Ser)₅. The fusion gene was inserted into plasmid pIRESneo3. The expression level of BMP2/7 heterodimers in the transfected CHO-K1 cells was 230.75±13.34 ng/mL. Culture medium of stably transfected clone pool was collected as conditional medium to treat osteoblast MC3T3 cells. Staining of Alkaline phosphatase and Alizarin red demonstrated that the conditional medium significantly promoted osteogenic differentiation to a higher extent than BMP-2 homodimers expressed in either CHO-K1 cells or *E. coli*. Transcriptional levels of Osteogenic phenotype-related molecular markers such as OC, ALP, Runx2 and Osx were increased ($P < 0.05$), and BMP/Smad signal activities were significantly enhanced by BMP-2/7 heterodimers, comparing with BMP-2 homodimers ($P < 0.05$). The results demonstrate that BMP-2/7 heterodimers expressed in CHO-K1 cells have potent ability to stimulate osteogenic differentiation.

Keywords: bone morphogenetic protein, heterodimer, osteoblast, differentiation

Received: June 12, 2007; **Accepted:** September 17, 2007

Supported by: Guangzhou Science and Technology Plan Project (No. 2006Z1-E0031, No. 2006Z3-E0791)

Corresponding author: Fenyong Sun. Tel: +86-20-85221983; Fax: +86-20-85221983; E-mail: sunfenyong@263.net

广州市科技计划项目 (No. 2006Z1-E0031, No. 2006Z3-E0791) 资助。

骨形态发生蛋白(Bone Morphogenetic Protein, BMP)是一类细胞因子,属于转化生长因子 TGF- β 超家族的成员。目前已发现的 BMP 有十几种,具有独特的诱导成骨能力,可使断骨快速再接和缺骨快速再生,在骨科、口腔科和矫形外科具有广泛的应用前景,能够为伤残者恢复形态和功能提供新的治疗手段^[1]。BMP 家族中 BMP-2、4、7 的活性最高,其中 BMP-2 的产业化研究最为广泛,BMP 蛋白通常以同源二聚体的形式存在,2 个单体之间有一条二硫键形成共价连接^[2]。

研究者从牛脱矿骨粉分离到一种蛋白,分子量约 30 000 D 左右,体内与体外都有明显的骨生成作用。还原型 SDS-PAGE 电泳则发现该蛋白由 2 个亚基组成,分别为 18 000 D 与 16 000 D 左右,经脱糖基处理后,分子量为 16 000 D 与 14 000 D。测序后发现前者为 BMP-7,后者为 BMP-2,表明天然状况下就有 BMP-2/7 异源二聚体的存在,而天然组织提取的 BMP 的诱骨活性比重组 BMP-2 高 4~6 倍^[3,4]。Aki Aono 等人的研究表明 BMP-4/7 异源二聚体的活性明显高于 BMP-4 与 BMP-7 的同源二聚体,并猜测体内组织中 BMP 主要以异源二聚体的形式存在^[5]。BMP 家族的成员都能够与细胞膜表面的 BMP 受体相结合,激活 BMP 受体膜内段的磷酸激酶活性,后者能够增加胞浆内效应分子 Smad 蛋白的磷酸化水平,可进入并聚集于细胞核内,激活靶基因的转录。但目前关于 BMP 家族各成员之间激活 BMP/Smad 通路的方式有何差异还不清楚。

本研究通过基因重组技术,将 BMP-2 与 BMP-7 用一段柔性肽(GlyGlyGlyGlySer)₄ 串连起来,并在哺乳动物细胞中得到异源二聚体的高效表达,发现其活性明显高于 BMP-2 同源二聚体。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株与细胞

大肠杆菌 DH5 α 为本所冻存, p3GC2-LUX 为课题组自行构建, pIRESneo3 购自 Clontech 公司, 成骨细胞 MC3T3-E1 购自北京协和细胞库。

1.2 试剂

限制性核酸内切酶及修饰酶为 Promega、TaKaRa 公司产品, DualLuciferase 报告分析系统为 Promega 公司产品, 脂质体 Lipofectamine2000、RNase、胰蛋

白酶、DMEM 培养基、Trizol、逆转录酶 Superscript III 为 Invitrogen 公司产品, 优质胎牛血清购自 Hyclone, 定量 PCR 用酶 SYBR Green PCR Master Mix 购自 ABI 公司。BMP-2 之 ELISA 试剂盒与大肠杆菌表达的 BMP-2 购自 R&D 公司。

1.3 重叠 PCR 扩增

本实验室前期工作中已通过 RT-PCR 技术获得了 BMP-2 与 BMP-7 成熟肽的编码基因, 并克隆入 pUC19 载体中, 分别为 pUC19-BMP-2 与 pUC19-BMP-7。设计引物, F1: ATCG GCTAGC GCCACCATGGA GACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCT CTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACGCGGCCCA AGCCAAACACAAACAGCG(斜体部分为 *Nhe* I 位点, 黑体部分为 Kozak 序列, 划线部分为小鼠抗体轻链 Ig 的信号肽, 后续部分为 BMP-2 编码序列); R1: GTGGTGGCTCTGGCTTTGGCTGATCGGGAG GAGGTGGCTCATCCACGGGGAGCAAACAGC(划线部分为柔性肽编码基因部分序列); F2: GCCACCGCCAGAGCCACCTCCGG CCTGAACCG CCTCCACCGCGACACCCACAACCTCCA(划线部分为柔性肽编码基因部分序列); R2: ACTG GGATCC CTATTAGTGGCAGCCACAGG(斜体部分为 *Bam*H I 酶切位点)。PCR 分 2 轮进行, 第一轮以 pUC19-BMP-2 与 pUC19-BMP-7 模板, 分别用 F1, R1 以及 F2, R2 为引物进行扩增, 将第一轮 PCR 产物收集后混合, 94 °C 变性 10 min, 68 °C 10 min, 5 个循环, 最后以此为模板, F1 与 R2 为引物扩增。PCR 条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 60 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。

1.4 PCR 产物的克隆

pIRES-neo3 质粒与 BMP-2/7 融合基因的 PCR 产物经 *Nhe* I 与 *Bam*H I 酶切, 混合后连接酶连接 1 h, 将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 涂布具有 Amp 抗性的平板, 37 °C 培养过夜, 挑取单克隆, 5 mL LB 扩增, 抽提质粒, *Nhe* I 与 *Bam*H I 酶切鉴定。将得到的阳性重组子送交上海生工测序。

1.5 细胞株的转染与稳定克隆的形成

CHO-K1 培养于 DMEM 培养基, 10%胎牛血清, 5% CO₂, 37 °C 培养。将 CHO-K1 细胞接种至 24 孔培养板上, 待生长到汇合度为 70% 以上时, 用 Lipofectamine 2000 脂质体转染, 将 1~1.5 μ g 的质粒与 1~3 μ L Lipofectamine2000 混合, 加入细胞培养液

中, 置 37 °C 培养 4~6 h, 更换完全培养基。换液 24 h 后, 将细胞传代至平皿上, 第 2 天加入终浓度为 1000 µg/mL 的 G418 进行筛选, 3、4 d 换 1 次培养液, 每次换液前用 PBS 将脱落的细胞冲掉, 2 周后克隆形成。

1.6 双抗体夹心 ELISA 检测

用双抗体夹心 ELISA 试剂盒检测细胞培养上清中 BMP 蛋白的分泌表达水平。用 PBS 稀释包被抗体至工作浓度, 加入 96 孔板中, 4 °C 孵育过夜。吸出包被液用 PBST 漂洗 3 次, 封闭液 300 µL 封闭 1 h, PBST 漂洗 3 次。用封闭液稀释待测样品与标准品 100 µL, 加入 96 孔板中, 室温放置 2 h, PBST 漂洗 3 次。加入用封闭液稀释的检测抗体 100 µL, PBST 漂洗 3 次。加入显色液 A 和 B 各一滴, 室温显色约 20 min, 终止液终止显色。用酶标仪检测光密度 OD_{450} 与 OD_{570} 检测。检测时将 BMP-2 标准品(80 ng/mL)稀释成浓度为 2000 pg/mL, 然后再倍比稀释成浓度为: 1000、500、250、125、62.5、31.25、15.625 pg/mL, 8 个浓度标准品与待测样品(稀释 1000 倍)同时进行实验, 以未转染的细胞培养上清作为阴性对照, 每个样品均作 3 个复孔, 取均值。

1.7 含 BMP 蛋白的条件培养基制备

将筛选得到的稳定克隆消化后混匀, 扩大培养得到 100 mL 培养液, 用 ELISA 方法进行定量, 而后补加一定体积的完全培养基调整至所需要浓度, 分装后 -20 °C 保存。条件培养基有三种: 含有 BMP-2/7 异源二聚体的培养基, 含有 BMP-2 同源二聚体的培养基(为课题组以前用 CHO-K1 表达系统所制备), 以及含有大肠杆菌表达 BMP-2 同源二聚体(美国 R&D 公司)的培养基。

1.8 细胞化学染色

ALP 染色: 95%乙醇固定 10 min, 晾干, 底液孵育, 37 °C, 4 h, 1%硝酸钴作用 2 min, 冲洗 1~2 min, 1%硫酸铵作用 1 min, 水洗 5 min, 晾干后镜下观察。茜素红染色: 细胞用 PBS 洗 2 遍, 95%乙醇固定 10 min, 0.2%茜素红作用 20 min, 水洗 3 遍, 晾干后镜下观察。

1.9 实时定量 RT-PCR

细胞接种于 6 孔板中, 用 PBS 清洗细胞, Trizol 抽提 RNA, Superscript III 进行逆转录, 42 °C 反应 30 min, 逆转录引物采用 Oligo dT 与 Random Hexamer。Realtime 定量 PCR 反应体系: 2 × PCR premix 10 µL,

Primers 0.8 µL, cDNA 1 µL, H₂O 补平体积 20 µL; 反应条件: 95 °C 10 min, 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 读板, 共 50 个循环; 融解曲线分析: 温度 55 °C ~95 °C, 每分钟读 1 次。每个样设置 3 个复孔。所使用的引物如表 1。

表 1 实时定量 RT-PCR 引物
Table 1 Primers for realtime quantitative RT-PCR

Gene names	Primers sequences
<i>Osx</i>	Forward: CCCTTCTCAAGCACCAATGG Reverse: AGGGTGGGTAGTCATTGCATAG
<i>ALP</i>	Forward: CCGATGGCACACCTGCTT Reverse: GAGGCATACGCCATCACATG
<i>Osteocalcin</i>	Forward: CCGGGAGCAGTGTGAGCTTA Reverse: AGGCGTCTTCAAGCCATACT
<i>Runx2</i>	Forward: AACCGTCAAAGGTGTTGTCTG Reverse: GCACAGAGAGGAAGTGTCTC
β -actin	Forward: CCTGAGGCTCTTTTCCAGCC Reverse: AGGTCCTTACGGATGTCAACGT

1.8 Luciferase 报告基因检测

细胞接种于 24 孔培养板中, 37 °C, 5% CO₂ 条件下培养至 90%~95%融合, BMP 蛋白诱导前使用 0.5%胎牛血清饥饿 24 h, 加入一定量的 BMP 后诱导 24 h。将 2 µg p3GC2-LUX 重组质粒与 0.1 µg pRL-CMV 对照质粒在 Lipofectinamine2000 介导下共转染细胞, 每种重组子平行导入 3 孔细胞, 继续培养 48 h 后收集细胞, 每组实验重复 3 次。细胞裂解后, 按 Promega 双报告检测试剂盒提供的方法操作, 各孔细胞导入效率用海肾荧光素酶(renilla luciferase) 活性校正, 所得数值为萤火虫荧光素酶活性(firefly luciferase activity, FLA)与海肾荧光素酶活性(renilla luciferase activity, RLA)的比值。

2 结果

2.1 BMP-2/7 异源二聚体编码基因的构建

我们采用重叠延伸 PCR 技术将 BMP-2 成熟肽与 BMP-7 成熟肽编码基因通过(GlyGlyGlyGlySer)₄ 的编码基因首尾串连, 同时在 N 端加上小鼠抗体轻链 Ig 的信号肽编码基因以便于融合蛋白的分泌表达(图 1), 结果得到一个 899 bp 的片段(图 2)。

2.2 哺乳动物细胞表达载体的构建

我们选择 pIRESneo3 作为表达载体 e(图 3), 先利用 *Nhe* I 与 *Bam*HI 酶切 BMP-2/7 融合基因, 然后克隆到 pIRESneo3 载体中, 经过酶切鉴定得到阳性重组子 pIRES-BMP-2/7(图 4), 经测序表明序列完全正确。

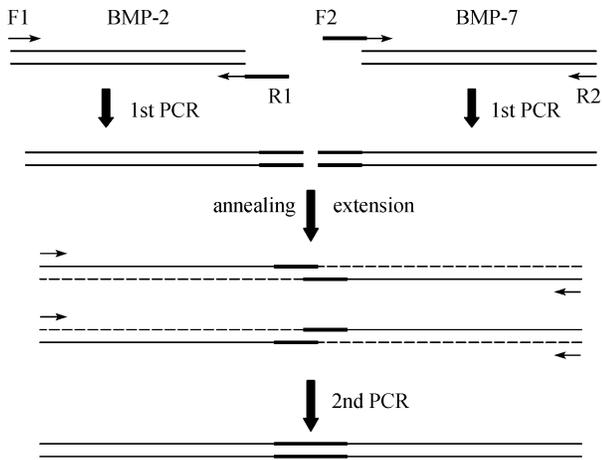


图1 重叠延伸 PCR 构建 BMP-2/7 异源二聚体融合基因
Fig. 1 Construction of BMP-2/7 heterodimer coding gene using overlapping PCR

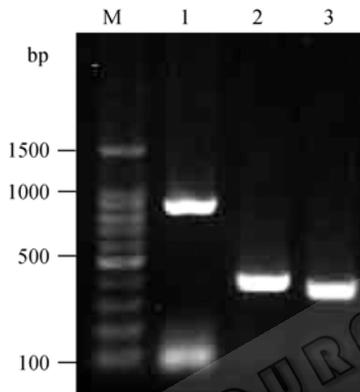


图2 BMP-2/7 异源二聚体编码基因的构建

Fig. 2 Construction of BMP-2/7 fusion gene

M: 100 bp DNA ladder; 1: PCR product of BMP-2/7 fusion gene; 2: PCR product of BMP-7 gene; 3: PCR product of BMP-2 gene

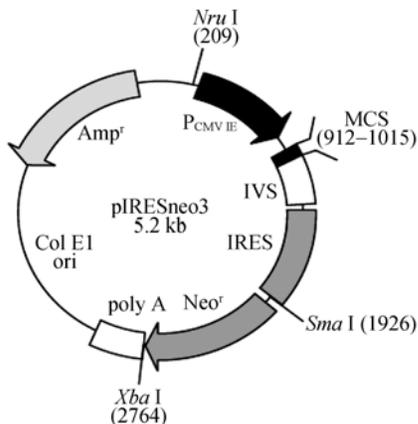


图3 表达质粒载体 pIRESneo3 结构图

Fig. 3 Schematic diagram of expression plasmid pIRESneo3

2.3 稳定细胞株的筛选与鉴定

取重组 pIRES-BMP-2/7 质粒 2 μ g 转染中国仓鼠

卵巢细胞 CHO-K1, 1000 μ g/mL G418 筛选, 2 周以后有明显的抗性克隆形成, 胰酶消化后重新接种在 100 mm 培养皿中, 形成混合克隆, 扩大培养, 收集培养物上清, 使用抗 BMP-2 的 ELISA 检测试剂盒检测 BMP-2/7 异源二聚体的表达水平, 结果显示浓度为 230.75 ± 13.34 ng/mL ($n=3$), 转染空载体的对照组培养上清中没有检测到 BMP-2/7 异源二聚体的表达。同时, 我们又收集细胞在转录水平进行了检测, RT-PCR 的扩增片段包含柔性肽的编码基因, 因此可以有效排除基因组污染的干扰, 结果如图 5 所示, 混合克隆细胞中检测到融合基因 mRNA 的转录, 而空载体对照组检测结果为阴性。



图4 重组表达载体构建

Fig. 4 Construction of recombinant expression vector

M1: 100 bp DNA ladder; M2: DNA/Hind III marker; 1: pIRES-BMP-2/7 digested by *Nhe* I and *Bam*H I; 2: pIRESneo3 vector; 3: PCR product of BMP-2/7 gene

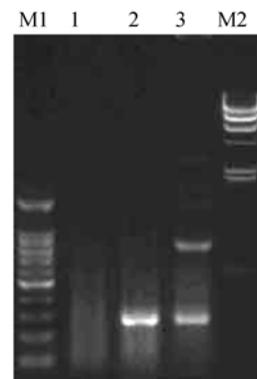


图5 CHO-K1 细胞的 RT-PCR 检测

Fig. 5 RT-PCR analysis of CHO-K1

M1: 100 bp DNA ladder; 1: RT-PCR negative control; 2: pIRESneo3/CHO-K1; 3: pIRES-BMP-2/7/CHO-K1; M2: λ DNA/Hind III

2.4 BMP-2/7 异源二聚体活性检测

2.4.1 碱性磷酸酶染色与矿化染色

碱性磷酸酶为成骨细胞早期分化的标志,能够降解细胞成分中部分含有磷酸根的物质释放磷酸根,在胞外基质中形成磷酸钙的沉淀,参与骨基质的形成。细胞分化的成熟期,大量富含钙盐的物质在胞外沉积,形成成熟的矿化基质,能够被茜素红染色,为骨分化的晚期综合指标。用含有 10%FCS 的完全培养基分别制备具有一定浓度

BMP-2/7 异源二聚体与 BMP-2 同源二聚体(本实验室以前用完全相同的方法所制备)的条件培养基,以及具有大肠杆菌表达的 BMP-2 同源二聚体蛋白(R&D 公司)的条件培养基。培养成骨细胞 MC3T3, 0.5% FCS 饥饿 24 h, 用上述培养基培养 7 d 与 14 d, 分别进行碱性磷酸酶染色与茜素红染色,结果如图 6, BMP-2/7 异源二聚体比较 BMP-2 条件培养基与大肠杆菌表达 BMP-2 能够更加明显促进成骨分化。

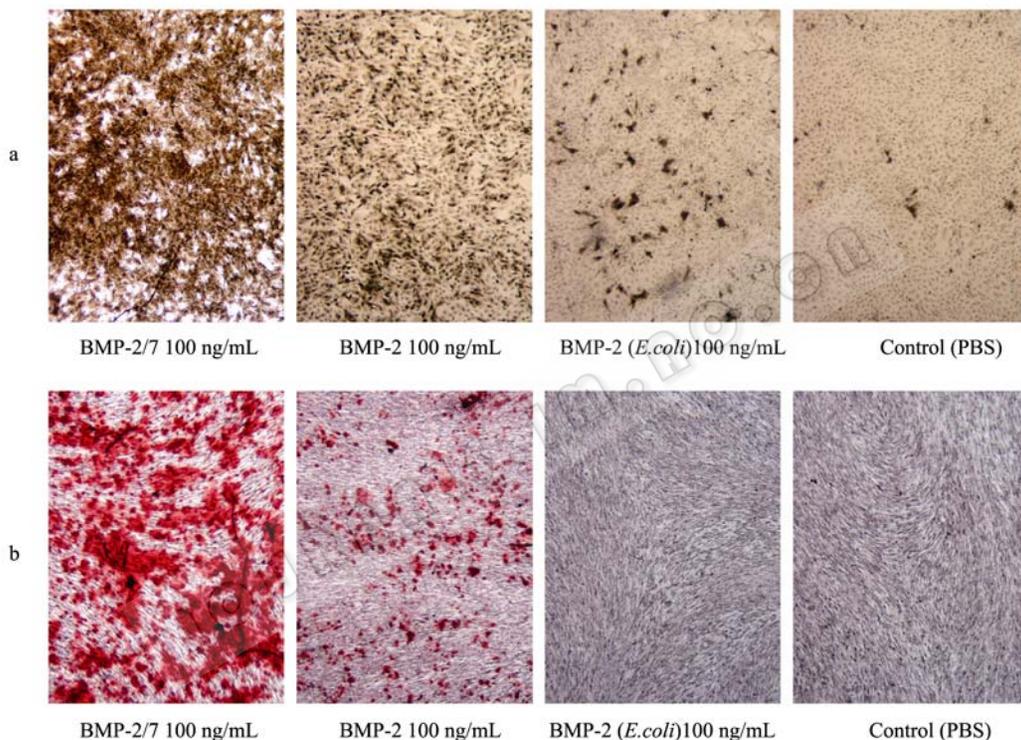


图 6 BMP-2/7 促进成骨细胞的分化作用

Fig. 6 The effects of BMP-2/7 on osteoblast cell differentiation

a: staining for alkaline phosphatase activity; b: alizarin red staining for mineralization

2.4.2 成骨相关基因表达水平的检测

我们以成骨分化过程中的重要转录因子 Runx2、Osx 以及成骨表型基因 Oc (Osteocalcin) 与 ALP 为分子指标,采用定量 RT-PCR 的方法检测 BMP-2/7 对成骨分化的影响,结果表明 BMP-2/7 在 3 d 与 6 d 时能够明显促进成骨细胞的分化与 BMP-2 条件培养基以及大肠杆菌表达 BMP-2 相比,分子指标的表达上调具有显著性差异($n=3, P<0.05$)。

2.4.3 Smad 信号途径的活性检测

经典的 BMP/Smad 信号通路一旦被激活后,Smad 蛋白被磷酸化,进入核内与靶基因启动子上的 BMP 反应元件(BMP Responding Element, BRE)

相结合,激活靶基因的转录。标准的 BRE 序列为 GCCGCGCCGGCTCCAGGGCAGGAGCGGC, 可以将 BRE 串连 3 次连接在 Luciferase 报告基因上游得到报告载体 p3GC2-LUX, 用于检测 BMP/Smad 信号途径的活性。本实验室曾参照 Kusanagi 等人^[6]的方法构建了 p3GC2-LUX 报告载体,本研究用此载体来比较各种 BMP 蛋白对 BMP/Smad 信号途径活性的影响。结果如图 8 所示, 3 种 BMP 蛋白的条件培养基分别处理 MC3T3 细胞 24 h 后, 转染 p3GC2-LUX 报告载体, 24 h 后检测 Luciferase 活性, 发现在各种浓度条件下, BMP-2/7 异源二聚体的作用明显大于另外 2 种条件培养基($P<0.05$)。

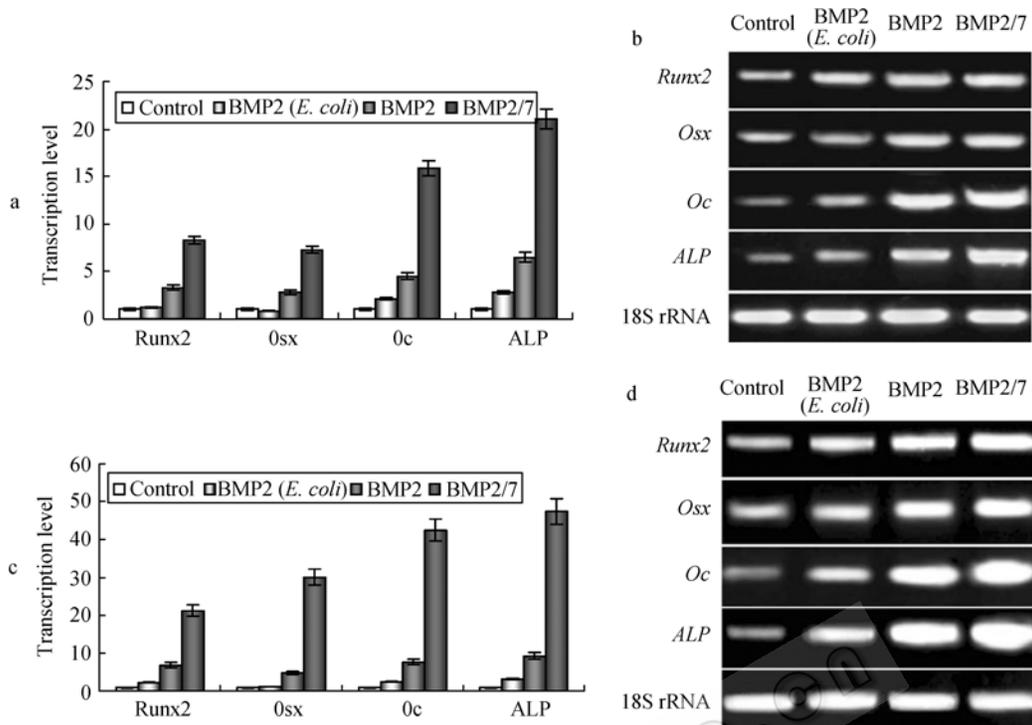
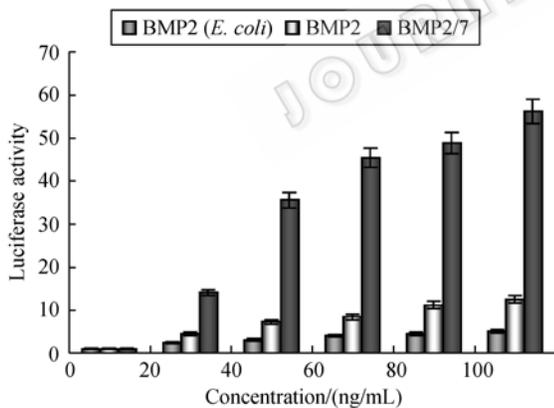


图7 成骨相关基因转录水平的检测

Fig. 7 Analysis of the transcription level of Osteogenic differentiation genes

a, b: 3 d after BMP treatment, quantitative RT-PCR was undertaken to examine the transcription level of the osteo-related genes; c, d: 6 d after BMP treatment, quantitative RT-PCR was undertaken to examine the transcription level of the osteo-related genes

**图8 Luciferase 报告基因检测 BMP 蛋白对于 BMP/Smad 信号通路的作用 (n=3)****Fig. 8 Analysis of the effects of BMP proteins on BMP/Smad signal pathway (n=3)**

3 讨论

Hidaka 等人^[7]曾报道分别用携带 BMP-2 与 BMP-7 的腺病毒同时感染 A549 细胞, 表达出的单体 BMP-2 与 BMP-7 相互间进行随机配对折叠, 得到含有 BMP-2 同源二聚体、BMP-7 同源二聚体以及

BMP-2/7 异源二聚体的混合 BMP 蛋白, 发现混合物的诱骨明显高于 BMP-2 与 BMP-7 同源二聚体。但由于 3 种蛋白分子量接近, 性质相似, 因此给 BMP-2/7 异源二聚体的分离纯化造成较大的困难。本研究首次采用柔性肽的连接技术构建了 BMP-2/7 的异源二聚体蛋白, 柔性肽只有 Gly 与 Ser 两种氨基酸, 因为侧链基团影响小, 所以肽键的刚性很小, 可以自由旋转, 有极强的顺应性, 不会阻碍两侧肽链的自由折叠, 又称柔性连接。目前十分流行的人源化单抗 ScFv, 即是通过柔性肽连接可变区轻、重链构建的^[8]。我们的结果发现 BMP-2/7 异源二聚体能够高效诱导成骨细胞株 MC3T3 的成骨分化, 说明柔性肽具有足够的柔顺性, 空间位阻小, 不会干扰分子间的有效折叠。而且与 Hidaka 等人的方法相比, 本研究将 BMP-2 与 BMP-7 用一段柔性肽共价连接起来表达可以得到均一型的异源二聚体, 避免了同源二聚体的产生, 提高了产率, 降低了纯化的难度, 有利于未来产业化的进行。同时由于二聚体具有七对二硫键, 其中一对是在分子之间形成的, 串连起来的单体由于分子间的距离更加接近, 更利于分子

间二硫键的形成, 提高折叠的效率。

值得注意的是, 天然 BMP 蛋白翻译后得到的是信号肽-原肽-成熟肽的结构, 原肽起到分子内伴侣的作用以帮助正确结构的形成。考虑到产量问题, 我们采用了 CHO-K1 表达系统中最常使用的小鼠抗体轻链 Ig 的信号肽, 由于该信号肽与 BMP 原肽并非天然共存, 因此省去原肽部分, 直接采用了“信号肽-BMP-2 成熟肽-柔性肽-BMP-7 成熟肽”的异源二聚体结构, 仍然获得该融合蛋白较好的表达。

作为阳性对照的 R&D 公司生产的大肠杆菌表达 BMP-2 的生物活性最低, 碱性磷酸酶与茜素红染色的方法几乎检测不到活性, 主要是因为 BMP-2 是糖基化蛋白, 糖基化位点主要分布于 N 端, 失去糖基后活性会明显下降。研究表明一般哺乳动物细胞表达的 BMP 蛋白活性是大肠杆菌表达蛋白的 10 倍以上, 我们以前的工作发现大肠杆菌表达 BMP-2 同源二聚体的有效诱骨浓度大于 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ ^[9], 由于本研究中的使用浓度是 $100 \text{ ng}/\text{mL}$, 因此活性并不明显。

目前关于异源二聚体活性高于同源二聚体的机理并不清楚, 我们认为可能与激活信号通路的方式有密切关系。目前发现, TGF- β 超家族的配体一共有 29 种, 而其受体 BMPRI 型有 7 种, BMPRII 型有 2 种, 为了适应配体的多样性, 受体具有不同的组合方式, 因此不同的配体倾向于结合不同的受体亚型^[10-12]。而且不同的受体亚型膜内段结合的接口蛋白(accessory protein) 不尽相同, 因此激动的信号通路效应分子 Smad 蛋白的种类、形成多聚体的方式都有所不同。例如有文献报道^[13]在 P19 细胞中, BMP-2 主要与 ALK3、ALK6 结合, BMP-7 主要与 ALK2 结合。据此我们认为 BMP-2/7 异源二聚体有着与 BMP-2、BMP-7 同源二聚体不同的信号激活方式, 因此较高的活性水平似乎应与此有关。另外, 由于 BMP 信号通路对组织发育的重要性, 因此通路能够激活一系列的抑制因子, 包括与天然的负显性受体 BAMBI、竞争性受体抑制剂 Noggin、Smad 效应分子磷酸化抑制蛋白 Smad6 与 Smad7、Smad 效应分子的泛素降解酶 Smurf 等, 都可能被不同的配体以不同的效率激活, 因此也构成活性差异的潜在原因^[14]。

REFERENCES

- [1] Kofron MD, Li X, Laurencin CT. Protein- and gene-based tissue engineering in bone repair. *Current Opinion in Biotechnology*, 2004, **15**: 399-405.
- [2] Groppe J, Greenwald J, Wiater E, *et al.* Structural basis of BMP Signaling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature*, 2002, **420** (12): 636-642.
- [3] Israel DI, Nove J, Kerns KM, *et al.* Wozney JMHeterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity *in vitro* and *in vivo*. *Growth Factors*, 1996, **13**: 291-300.
- [4] Hazama M, Aono A, Ueno N, *et al.* Efficient expression of a heterodimer of bone morphogenetic protein subunits using a baculovirus expression system. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **209**: 859-866.
- [5] Aono A, Hazama M, Notoya K, *et al.* Potent ectopic boneinducing activity of bone morphogenetic protein-4/7 heterodimer. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **210**: 670-677.
- [6] Kusanagi K, Inoue H, Ishidou Y, *et al.* Characterization of a bone morphogenetic proteinresponsive smad-binding element. *Mol Biol Cell*, 2000, **11**: 555-565.
- [7] Zhu W, Rawlins BA, Myers ER, *et al.* Combined bone morphogenetic protein-2 and -7 gene transfer enhances osteoblastic differentiation and spine fusion in a rodent model. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2004, **19**(12): 2021-2031.
- [8] Dong ZW, Wang Y. Antibody Engineering. Beijing Medical University Press, 2002.
董志伟, 王琰. 抗体工程. 北京医科大学出版社, 2002.
- [9] Sun FY, Wang J, Sun JH, *et al.* Expression, purification and refolding of recombinanthuman bone morphogenetic protein-2 in Escherichia coli. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2005, **21**(8): 1480-1485.
孙奋勇, 汪炬, 孙晋华, 等. 在大肠杆菌种中表达、纯化与折叠重组骨形态发生蛋白-2. *中国病理生理杂志*, 2005, **21**(8): 1480-1485.
- [10] Massague J. How cells read TGF- β signals. *Nature Rev. Mol. Cell Biol*, 2000, **1**: 169-178.
- [11] Itoh S, Itoh F, Goumans MJ. Signaling of transforming growth factor- β family members through Smad proteins. *Eur J Biochem*, 2000, **267**: 6954-6967.
- [12] Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH. Smad regulation in TGF- β signal transduction. *J Cell Sci*, 2001, **114**: 4359-4369.
- [13] Macias-Silva M, Hoodless PA, Tang SJ, *et al.* Specific activation of smad1 signaling pathways by the BMP-7 type I receptor, ALK2. *J Bio Chem*, 1998, **273**(40): 25628-25636.
- [14] Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signaling. *Nature*, 2003, **425** (9): 577-584.