

文章编号 1006-8147(2016)03-0208-05

论著

可调控 BMP-2 表达的单质粒载体构建及其在 ADSCs 中的表达研究

王鹏¹, 苗军², 方成¹, 胡永成², 陈晓鹏¹

(1. 天津医科大学研究生院, 天津 300070; 2. 天津市天津医院骨科, 天津 300211)

摘要 目的: 拟构建可调控骨形态发生蛋白(BMP-2)表达的单质粒慢病毒表达载体, 为研究骨修复过程中的成骨性能打下基础。方法: 通过基因重组技术获取含 BMP-2 的慢病毒表达载体, 通过菌落 PCR 和基因测序鉴定; 将慢病毒表达载体与包装载体 pMD2.G 和 pSPAX 在 293T 细胞中包装, 收集病毒液, 转染大鼠脂肪基质干细胞(ADSCs)。首先, 从细胞形态学和 MTT 来初步分析诱导剂多西环素(Dox)不同浓度对 ADSCs 活性的影响; 其次, 缩小 Dox 浓度范围, 在荧光显微镜下通过荧光表达强度判断 Dox 对 ADSCs 中基因表达的诱导效率, 相同条件下, qRT-PCR 分析 BMP-2 的 mRNA 的相对表达量, 进一步优化 Dox 的诱导浓度; 最后, 通过 Western blot 检测不同 Dox 浓度下, 转染目的基因的 ADSCs 中 BMP-2 表达, Image J 软件进行灰度值分析判断二者之间的剂量依赖关系。结果: 1% 琼脂糖凝胶电泳证实 pUC57-BMP-2 经双酶切后可获得大小约 1 100 bp 的目的基因片段, 菌落 PCR 和基因测序证实含目的基因的慢病毒表达载体 pLVCT-BMP-2 构建成功。ADSCs 对 Dox 最大耐受浓度为 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Dox 对 ADSCs 中目的基因表达的最大诱导浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Western blot 证实 ADSCs 中 BMP-2 表达与 Dox 浓度(0~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)存在剂量依赖关系。结论: 成功构建可调控 BMP-2 表达的单质粒慢病毒表达载体, 转染 ADSCs 后, BMP-2 的表达与 Dox 浓度存在剂量依赖关系。

关键词 骨形态发生蛋白-2; 基因调控; 多西环素; 脂肪基质干细胞; 慢病毒表达载体

中图分类号 R68

文献标志码 A

Construction of a single vector in BMP-2 expression in a controlled manner and its expression in ADSCs

WANG Peng¹, MIAO Jun², FANG Cheng¹, HU Yong-cheng², CHEN Xiao-peng¹

(1. Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Department of Orthopedics, Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China)

Abstract Objective: To construct a single vector in BMP-2 expression in a controlled manner and investigate its expression in adipose derived stromal cells(ADSCs). **Methods:** The lentiviral vector containing BMP-2 gene was constructed through genetic recombination and identified by bacterial PCR and sequence analysis. ADSCs were transfected by lentivirus collected from 293T cell. First, cell viability was analyzed through cell morphology and MTT assay at different induced concentrations of doxycycline (Dox). Second, to estimate the efficiency of the Tet-On and determine the optimal induction concentration of Dox, the strength of fluorescence was detected. The mRNA of BMP-2 was also analyzed through qRT-PCR. Lastly, the capacity of inducing BMP-2 expression in ADSCs by Dox was investigated by Western blot and densitometric analysis. **Results:** pLVCT-BMP-2 was successfully generated in this research by bacterial PCR and sequence analysis. The results indicated ADSCs from rat could stand up to 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Dox, and Dox of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was finally determined as the optimal induction concentration. The densitometric analysis of BMP-2 expression showed that BMP-2 expression in ADSCs was in a dose-dependent manner. **Conclusion:** Lentiviral vector containing BMP-2 could be successfully generated. The conditional BMP-2 expression is regulated by Dox in a dose-dependent manner, providing the opportunity to explore BMP-2 expression and guide the bone healing process *in vivo*.

Key words bone morphogenetic protein-2; gene controlling; doxycycline; adipose derived stromal cells; lentiviral vectors

骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein 2, BMP-2)是骨修复过程中不可替代的生长因子,其作用的时间和剂量与骨修复过程中的成骨性能密切相关^[1-2]。目前多将 BMP-2 包被入微球、与载体材

料混合,通过材料降解控制其释放从而实现 BMP-2 以时间和剂量依赖的方式作用,而蛋白质易降解,如 BMP-2 在大鼠体内的半衰期为 16 min, 灵长类只有 6.7 min^[3]。随着基因调控技术的发展,有望实现不同生长因子以时间和剂量依赖的方式表达,但多将目的基因和调控元件构建在不同的载体上,需要通过多次转染的方式实现 BMP-2 的调控表达,这种方法的转染效率低,且目的基因在无诱导条件下

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81472140);天津市自然科学基金资助项目(12JCYBJC16400, 14JCTPJC00487)

作者简介 王鹏(1990-),男,硕士在读,研究方向:骨外科;通信作者:胡永成, E-mail: yongchenghu@126.com。

的背景表达高^[4-5]。为了有效促进骨修复,BMP-2 表达需要一种更为精确、有效的调控系统。本研究的目的:(1)构建可调控 BMP-2 表达的单质粒慢病毒载体;(2)优化诱导剂对 ADSCs 有效作用浓度,研究优化后的浓度对 BMP-2 表达的调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料

FBS(HyClone 公司,美国);L-DMEM 培养基(GIBCO 公司,美国);双抗(青霉素-链霉素,GIBCO 公司,美国);MTT、多西环素(Doxycycline, Dox)、聚凝胺(Polybrene)(Sigma 公司,美国);磷酸盐缓冲液(PBS)(生工,上海);rTap DNA 聚合酶(宝生物工程(大连)有限公司,大连)。293T 细胞由天津医科大学免疫炎症实验室张荣信教授惠赠;慢病毒表达载体 pLVCT-tTRKRAB(简称 pLVCT)、包装质粒 pMD2.G、psPAX2 购自 Addgene(美国);质粒 pUC57-BMP-2 由金唯智(苏州,中国)合成。Plasmid 抽提试剂盒,聚合酶链反应产物回收试剂盒(Qiagen 公司,德国),大鼠 BMP-2 抗体(ImmunoWay 生物公司,美国)。Plus-20 离心超滤装置(Millipore 公司,美国);倒置荧光显微镜(Olympus 公司,日本)。

1.2 方法

1.2.1 调控 BMP-2 的慢病毒表达载体构建及鉴定

从 Genebank 中提取大鼠 BMP-2 基因(NM_017178.1)编码区序列,由金唯智公司将 BMP-2 基因合成在质粒 pUC57 中,即 pUC57-BMP-2。设计合成含 *PacI* 酶切位点(TTAATTAA)和 *MLu I* 酶切位点(ACGCGT)的一对引物,引物序列:上游引物 5'- CCTTAATTAATGCTGGCCGGACCCGC -3', 下游引物 5'-CGACGCGTCTAGCGACACCCGCAAC C-3',以 pUC57-BMP-2 重组质粒为模板,PCR 法扩增出大鼠 BMP-2 目的片段,聚合酶链反应参数为:预变性 95 °C,5 min;循环变性,94 °C,30 s;复性,55 °C,1 min;延伸,72 °C,90 s,共 32 个循环,72 °C,延伸 15 min。经双酶切后在体积分数 1%的琼脂糖凝胶电泳鉴定。

按聚合酶链反应产物回收试剂盒说明回收纯化目的片段,与同样经双酶切、纯化的慢病毒表达质粒 pLVCT 定向连接,连接产物转化感受态 DH5 α ,将转化后的菌落平铺于含 1%氨苄霉素抗性的培养板中,37 °C 过夜培养,对长出的克隆进行 PCR 鉴定,共挑选 5 个克隆。其中 PCR 鉴定为阳性的克隆经测序鉴定,证明 BMP-2 已经定向连入 pLVCT,命名为 pLVCT-BMP-2。

在 293T 细胞中包装慢病毒,根据 pLVCT-

BMP-2、pMD2.G 和 psPAX2 测得的浓度,算出包装所需要的体积,分别于包装后的 48 h 和 72 h 收获病毒液,4 °C 保存。将 1 \times 10⁶ 个 ADSCs 种植于 10 cm 皿中,待细胞 80%融合后,在 8 μ g/mL 的转染增强剂聚凝胺存在的前体下,用收集的病毒液感染大鼠 ADSCs,6 h 后更换正常培养基。

1.2.2 诱导剂浓度的优化

Dox 用于诱导 BMP-2 表达,根据以往的研究报道,间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)耐受 Dox 的浓度大约为 1~10 μ g/mL^[6-8]。为了评估 Dox 对 ADSCs 的毒性,将 ADSCs 种植于 6 孔板中(1 \times 10⁵ 个/孔),首先设置不同的 Dox 浓度梯度(0、2、5、6、7 μ g/mL),初步筛选诱导剂合适作用浓度,倒置显微镜下观察不同诱导剂浓度的诱导剂对 ADSCs 形态的影响;同时,将 ADSCs 种植于 96 孔板(1 \times 10³ 个/孔)中,72 h 后采用 MTT 的方法在 490 nm 的吸光度下检测以上不同浓度下细胞的活性变化。

为了进一步优化 Dox 的诱导浓度,再将转染目的基因的 ADSCs 种植于 6 孔板中(1 \times 10⁵ 个/孔),添加不同浓度的 Dox(0、1、3、5、5.5、6 μ g/mL),通过在倒置显微镜下观察 GFP 的表达强度来判断诱导剂调控基因诱导表达的效率;同时,72 h 后提取不同浓度下细胞的 RNA,设计合适的引物(表 1),采用 qRT-PCR 检测不同诱导浓度下,目的基因的表达变化。

表 1 qRT-PCR 引物设计

Tab 1 The design of qRT-PCR primer

Gene		Sequence(5'-3')
BMP-2	Fwd	GCATCGCGCCCTTATCC
	Rev	TTCCTCGATGGCTTCTTCGT
GAPDH	Fwd	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT
	Rev	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG

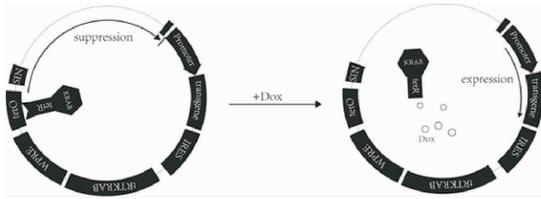
1.2.3 BMP-2 表达调控研究

将 1 \times 10⁶ 个转染目的基因的 ADSCs 种植于 10 cm 皿中,添加不同浓度的 Dox,72 h 后提取不同诱导浓度下总蛋白,Western blot 研究 Dox 浓度梯度调控 BMP-2 在 ADSCs 中表达的剂量依赖关系,采用 Image J 软件通过灰度值分析,描绘诱导剂浓度与 BMP-2 相对表达量的关系。

1.2.4 调控 BMP-2 的慢病毒表达载体的构建和鉴定

慢病毒表达载体 pLVCT 的作用原理:如图 1, pUC57-BMP-2 重组质粒经克隆限制性内切酶 *Pac I* 和 *MLu I* 酶切后可获得长度为 1 100 bp 的片段产物(图 2A)。回收目的基因片段和酶切后的慢病毒表达片段,将二者在室温下经酶联、转化感受态的

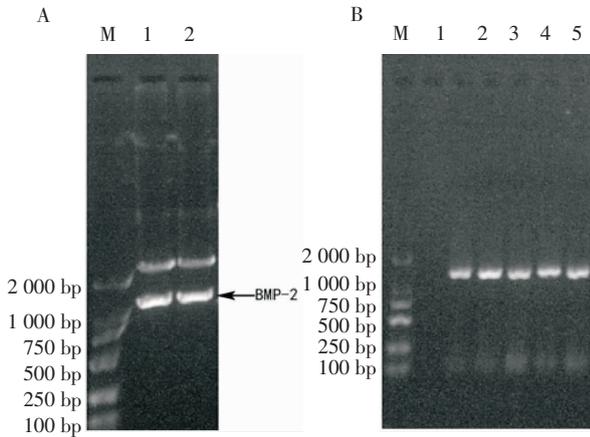
DH5 α , 接种于琼脂培养板上, 随机挑选 5 个单克隆菌落行 PCR 鉴定, 均为阳性, 片段大小约为 1 100 bp (图2B)。基因测序与 Genbank 中的参考序列一致, 提示成功构建 HO-1 基因慢病毒载体。再将阳性克隆的菌落通过摇菌、提质粒的方式可大量获得含目的基因的慢病毒表达载体。



无 Dox 时, tTRKRAB 元件可抑制目的基因的表达; 添加 Dox 后, 可导致 tTRKRAB 构象改变, 促进目的基因表达。

图 1 pLVCT 作用模式图

Fig 1 The pattern action of pLVCT



M. Maker; 1~5. 分别是实验组 1、2、3、4、5
A: 目的片段经克隆后酶切鉴定; B: 菌液 PCR 鉴定阳性克隆

图 2 1% 琼脂糖凝胶电泳

Fig 2 1% agarose gel electrophoresis

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件 (SPSS 公司, 美国) 进行统计分析。计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组之间比较采用 *t* 检验, 检验水准 α 值取双侧 0.05。

2 结果

2.1 诱导剂浓度的优化 Dox 浓度梯度为 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, ADSCs 的形态发生改变 (图 3), 活性降低 (图 4)。因此, 笔者缩小 Dox 的诱导浓度, 倒置荧光显微镜下观察诱导剂浓度与荧光表达的剂量关系, 发现 Dox 浓度梯度为 5.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 荧光强度较 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 没有明显增强 (图 5); 以 Dox 浓度为 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 测得的 BMP-2 的 mRNA 为参照, 其它不同浓度组 BMP-2 的 mRNA 相对表达量比较发现: Dox 浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, mRNA 的表达量较 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 增多, 差别有统计学意义 ($P < 0.05$), 而与 5.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 差别无统计学意义

($P > 0.05$) (图 6)。因此选择 Dox 为 (0、1、2、3、4、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 作为接下来的研究对象。

2.2 BMP-2 表达调控研究 从 Western blot 结果中可知, Dox 在 0、1、2、3、4、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内, 随着 Dox 浓度的逐渐增加, BMP-2 的表达逐渐增加 (图 7A); 灰度值分析发现, Dox 的诱导浓度与 BMP-2 的表达量存在一定的线性关系 (图 7B), BMP-2 在 Dox 为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 条件下, 较 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 表达明显增多 ($P < 0.05$)。

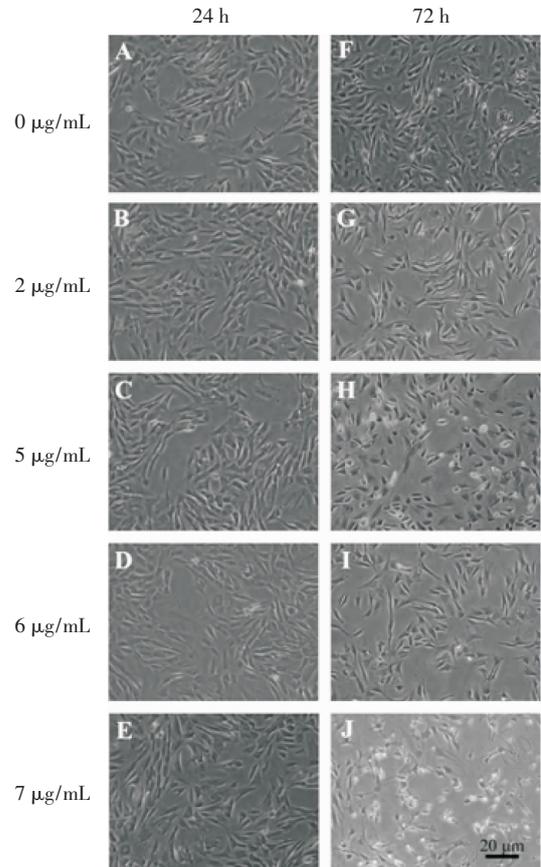
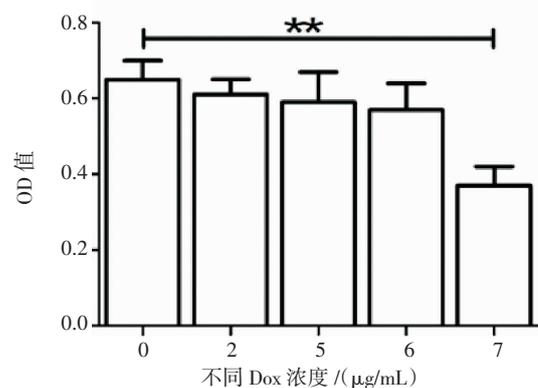


图 3 不同 Dox 浓度下, ADSCs 细胞形态变化

Fig 3 The cell morphological changes of ADSCs at different concentrations



*** $P < 0.01$

图 4 不同 Dox 浓度下, 细胞活性检测

Fig 4 The cell activity assay at different Dox concentrations

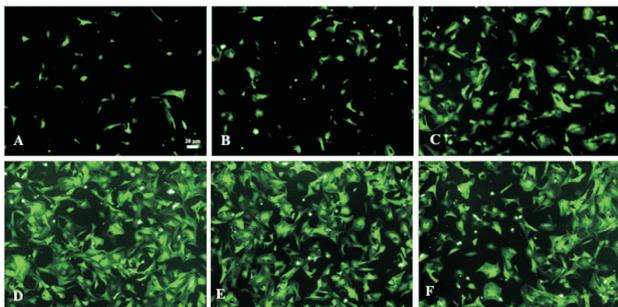
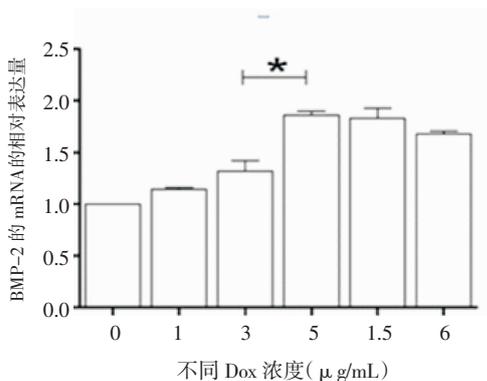
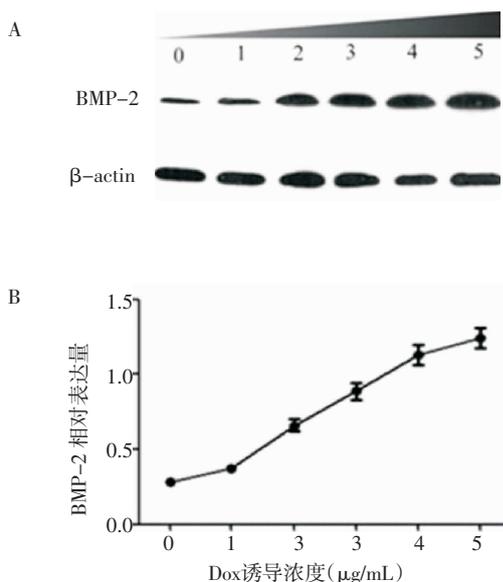


图 5 不同 Dox 浓度(0、1、3、5、5.5、6 μg/mL)下,荧光诱导强度变化
Fig 5 At different Dox concentration (0,1,3,5,5.5,6 μg/mL), the change of the fluorescence induced intensity



*P< 0.05

图 6 不同 Dox 浓度下,BMP-2 的 mRNA 表达变化
Fig 6 The expression changes of mRNA of BMP-2 at different Dox concentrations



A: Western blot 验证 BMP-2 表达;B:灰度值分析不同 Dox 诱导浓度与 BMP-2 相对表达量之间的关系

图 7 不同 Dox 浓度下,BMP-2 在 ADSCs 中的诱导表达分析
Fig 7 The analysis of the induced expression of BMP-2 in ADSCs at different Dox concentrations

3 讨论

骨修复是细胞迁移、增殖、分化、基质合成、矿化

有序发生高度协调的过程^[9]。研究发现,去除 BMP-2 可以阻止骨折的早期修复,即便补充上调 BMP-4 和-7 也不能逆转^[3],故 BMP-2 在骨修复中具有不可替代的作用。Gurkan 等^[10]研究骨髓提取物体外成骨分化过程中发现 BMP-2 在不同阶段表达变化规律不同:BMP-2 在 2~7 d 间高表达,上调 Runx2、Smad4,使得细胞转向成骨分化,随后,BMP-2 表达逐渐降低并维持在一定水平,在此过程中,成骨分化的细胞逐渐成熟。因此,调节 BMP-2 在骨修复中作用的时间和剂量是目前骨组织工程中研究的重点^[2,4,11]。而基因调控技术的进步为实现生长因子以时间和剂量依赖的作用方式提供有效途径^[12]。

3.1 基因调控技术的研究现状 基因调控技术包括转录前调控和转录后调控,前者包括细胞特异性调控系统、条件调控系统以及二者结合的调控系统^[12]。目前,骨组织工程中基因精确调控的研究多利用条件调控系统,该系统通过影响转录因子与 DNA 序列结合实现下游目的基因表达开放或关闭,它根据对转录因子的作用原理不同,又可分为两种:一种是通过添加生物小分子作为配体改变转录因子的构象或结构,即配体调控系统,包括四环素(Tetracycline, Tet)调控系统和雷帕霉素调控系统等;另一种是根据生理环境的变化调节转录因子的功能状态而影响目的基因表达,即生理调控系统,包括低氧调控系统和氧化应激调控系统。

配体调控系统中小分子诱导剂与基因表达之间存在严格的剂量依赖关系,更能满足 BMP-2 的表达特点,其中 Tet 调控系统最有前景,已在动物体内实验中得到初步验证^[11]。该系统由 Tet 阻遏蛋白(Tet repressor protein, TetR)或反义 TetR(reverse TetR, rTetR)、Tet 操纵子序列(Tet operator, TetO)与四环素衍生物 Dox 组成,Dox 的浓度对 rTetR 或 TetR 构象改变存在剂量反应关系,从而改变与 TetO 结合的强弱,根据 rTetR 或 TetR 对 TetO 结合后目的基因的转录方式不同可以分为 Tet-On 和 Tet-Off 两大类,前者在添加 Dox 时改变 rTetR 构象,使其与 TetO 结合增强,从而诱导下游 BMP-2 表达,且 BMP-2 表达量与诱导剂存在剂量依赖型关系;而 Tet-Off 系统中添加 Dox 时导致 TetR 构象改变,与 TetO 结合增强,抑制下游 BMP-2 表达,后期当需要 BMP-2 持续低表达时,Dox 的持续添加会减低骨代谢率,因子 Tet-On 系统应用范围更广^[13]。为了实现 BMP-2 的调控表达,传统的方法多采用两种质粒共转染 MSCs 的方式,一个载体表达 BMP-2,另一个载体表达转录激活因子,调节 BMP-2 的表达,本研

究中采用的慢病毒表达载体为单质粒,既包含表达 BMP-2 的载体,又具有可调控 BMP-2 表达的激活因子;再将具有转录抑制作用的 KRAB (Krüppel-associated box) 基因序列整合到 TetO 上游,在未添加 Dox 时 KRAB 可以促进 TetR 与 TetO 结合,故新得到的 Tet-On 系统降低目的基因的背景表达,即不添加 Dox 时无或仅有少量目的基因表达,同时单质粒慢病毒转染的方法提高了目的基因的转染效率。

3.2 诱导剂浓度与目的基因表达的剂量依赖关系 该研究中构建的单质粒慢病毒 Tet-On 系统中, Dox 作为诱导剂可在一定范围内通过浓度大小来控制目的基因的表达^[14],而骨修复后 Dox 的持续添加会影响骨代谢率^[15],因此,需要对 Dox 的诱导浓度进行筛选。本研究中,在 Dox 小于 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 条件下, ADSCs 培养 72 h 后,细胞形态未发生明显改变,说明 ADSCs 可以耐受 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Dox。ADSCs 这种耐受 Dox 药理毒性的作用较软骨细胞大^[15]。可能是干细胞具有相对较强的增殖能力,可以抵抗细胞凋亡引起的数量的减少,而随着 Dox 浓度的增加,当 Dox 浓度为 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,细胞形态发生改变,伴随着细胞增殖能力的减弱。

为了进一步研究 Dox 对目的基因的诱导效率,缩小 Dox 浓度范围后,观察 Dox 浓度与荧光表达强弱的关系,当 Dox 浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, ADSCs 的荧光强度达到最大,约 90%;当 Dox 浓度增加至 5.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,荧光表达较 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 并没有明显增强,此外, BMP-2 的 mRNA 相对表达量也证实 Dox 为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 可作为转染后 ADSCs 内目的基因表达的最大诱导浓度。由于荧光表达基因位于目的基因下游,随目的基因的表达而共同表达,其强度大小可以间接反映目的基因表达^[16],这些研究提示 Dox 浓度在 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以内,与 BMP-2 的表达可能存在剂量依赖性。

为了研究 Dox 诱导调控 ADSCs 中 BMP-2 表达,本研究采用了目前比较成熟的方法之一, Western blot,它可以通过特异性的抗体检测细胞中目的基因的表达。在相同上样量和曝光强度条件下,可以通过对基因表达的灰度值分析来判断目的基因表达强弱^[8]。本研究中,我们通过 Image J 软件分析结果发现, Dox 浓度在 0~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间增加,可诱导 BMP-2 基因表达的增多,二者之间存在剂量反应关系。

综上所述,本实验构建的 pLVCT-BMP-2 表达载体,除了实现 BMP-2 蛋白的调控表达之外,还将绿色荧

光蛋白作为报告基因,为体内外研究骨修复过程的示踪定位和诱导表达强度提供了一个重要且方便的工具,为下一步研究多因子联合作用奠定基础。

参考文献:

- [1] Ramazanoglu M, Lutz R, Rusche P, et al. Bone response to biomimetic implants delivering BMP-2 and VEGF: an immunohistochemical study[J]. *J Craniomaxillofac Surg*, 2013, 41(8): 826
- [2] Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe B D, et al. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing[J]. *Nat Genet*, 2006, 38(12): 1424
- [3] Lauzon M A, Bergeron E, Marcos B, et al. Bone repair: new developments in growth factor delivery systems and their mathematical modeling[J]. *J Control Release*, 2012, 162(3): 502
- [4] Noël D, Gazit D, Bouquet C, et al. Short-term BMP-2 expression is sufficient for in vivo osteochondral differentiation of mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cells*, 2004, 22(1): 74
- [5] Mizuguchi H, Hayakawa T. Characteristics of adenovirus-mediated tetracycline-controllable expression system[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1568(1): 21
- [6] Qian DY, Bai B, Yan G, et al. Construction of doxycycline-mediated BMP-2 transgene combining with APA microcapsules for bone repair[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2016, 44(1): 270
- [7] Lee H H, O'malley M J, Friel N A, et al. Effects of doxycycline on mesenchymal stem cell chondrogenesis and cartilage repair [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013, 21(2): 385
- [8] Wang Y H, Ho M L, Chang J K, et al. Microporation is a valuable transfection method for gene expression in human adipose tissue-derived stem cells[J]. *Mol Ther*, 2009, 17(2): 302
- [9] Kempen D H, Lu L C, Heijink A, et al. Effect of local sequential VEGF and BMP-2 delivery on ectopic and orthotopic bone regeneration[J]. *Biomaterials*, 2009, 30(14): 2816
- [10] Gurkan U A, Gargac J, Akkus O. The sequential production profiles of growth factors and their relations to bone volume in ossifying bone marrow explants[J]. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16(7): 2295
- [11] Wübbenhorst D, Biol D, Dumler K, et al. Tet-regulated BMP-2 gene expression in lentivirally transduced primary rabbit chondrocytes for treatment of cartilage defects[J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(7): 2037
- [12] Jazwa A, Florczyk U, Jozkowicz A, et al. Gene therapy on demand: site specific regulation of gene therapy[J]. *Gene*, 2013, 525(2): 229
- [13] Shiota G, Yoshida Y. "Tet-On" system toward hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells by hepatocyte nuclear factor[J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 826: 125
- [14] Stieger K, Belbellaa B, Le Guiner C, et al. In vivo gene regulation using tetracycline-regulatable systems[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(7/8): 527
- [15] Yao Y, He Yu, Guan Q, et al. A tetracycline expression system in combination with Sox9 for cartilage tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(6): 1898
- [16] 黄洪超, 苗军, 刘春蓉, 等. 可体内、外示踪的 BMP2 真核表达载体的构建和表达[J]. *中华骨科杂志*, 2010, 30(12): 1228