

逆转录病毒介导人重组骨形态发生蛋白基因转染骨骼肌卫星细胞mRNA的表达

在我们以前的研究中,用带血供肌瓣作为骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)载体来修复骨缺损可达到满意的效果[1]。但使用外源性BMP存在着明显的不足:(1)来源有限,提取过程复杂,价格昂贵;(2)半衰期短,很快被创伤局部的蛋白酶所水解,从而影响效应的发挥;(3)所需的浓度较高;(4)使用的BMP多为体外基因重组产品,生物活性较低[2]。利用基因转移技术将编码重组人骨形态发生蛋白7(recombinant human bone morphogenetic protein 7, rhBMP7)的基因片段转移至骨骼肌卫星细胞中,有可能在较长时间内持续、高效地分泌具有生物活性的BMP,作用于局部的骨骼肌卫星细胞[3]及通过血液而来的其他组织干细胞,诱导它们转化为成骨细胞,从而达到修复骨缺损的目的。为达到上述远期目标,本实验首先探讨逆转录病毒介导人重组rhBMP7基因转染骨骼肌卫星细胞的可行性及目的基因的表达情况。

1 材料与方 法

1.1 骨骼肌卫星细胞的培养与鉴定

Wistar大鼠(第一军医大学动物所),体质量200~250 g,雌雄不限。腹腔麻醉后无菌条件下取前肢肱三头肌,用冷D-Hanks液冲洗3遍,显微镜下尽可能地去脂肪、肌腱、肌膜等结缔组织。剪碎后,采用改良的Johnson法[4]进行消化:0.1%的I型胶原酶(Sigma)消化20~30 min。弃上清,再用0.25%的胰蛋白酶消化50~60 min后,终止消化,反复吹打后依次滤过100、200、400目的不锈钢网。滤液1 000 r/min离心10 min,用含20%胎牛血清的培养基重新悬浮细胞。将细胞悬液加入未经多聚赖氨酸处理的培养瓶中,采用差速贴壁法进行纯化:即成纤维细胞贴壁速度快,1 h后就可贴壁,而骨骼肌卫星细胞1 h尚未开始贴壁。因此,培养1 h后吸出培养基,其中主要为没有贴壁的骨骼肌卫星细胞。纯化后的细胞进行锥虫蓝染色计数,接种于底部经L-多聚赖氨酸处理的培养瓶中,用生长培养基(含20%胎牛血清和0.1%鸡胚提取液的DMEM/F12培养基)进行培养。4 d后换液,以后每天换液1次,倒置显微镜下观察细胞形态与生长情况。待细胞生长至70%接触后传代培养。取培养至第2代的细胞,消化后以 1×10^5 /孔接种于放有盖玻片的6孔培养板中,加入生长培养基进行培养。待细胞分裂、增殖至80%汇合后,改用分化培养基(含1%马血清的DMEM/F12培养基)进行培养。待肌管形成后,取出盖玻片,常规处理后分别进行HE染色及 α -骨骼肌肌动蛋白(α -sarcometric actin)和肌球蛋白(myosin)的免疫细胞化学染色(博士德公司),以取自皮肤的成纤维细胞做阴性对照。

1.2 rhBMP7逆转录病毒载体的构建

1.2.1 rhBMP7基因的鉴定 PBSK-rhBMP7(American Tissue Culture公司)含有rhBMP7 cDNA,全长1 448 bp。分别使用Xba I和EcoR I酶(New England Biolab公司)酶切PBSK-rhBMP7,琼脂糖电泳观察片段大小。采用Sanger法进行测序[5],与Genebank中基因序列进行对比。

1.2.2 PLNCX₂-rhBMP7逆转录病毒表达载体的构建和鉴定 用PBSK-BMP7质粒和真核表达载体PLNCX₂质粒(Gene公司)分别转化DH5 α 感受态大肠杆菌(Gene公司)。小量提取质粒,Sal I酶切PBSK-BMP7质粒和

PLNCX₂质粒，凝胶片段回收后，PLNCX₂回收片段进行CIP处理。T4 DNA连接酶连接rhBMP7基因和PLNCX₂载体(粘-粘端反应)，转化DH5 α 感受态大肠杆菌，提取质粒进行酶切鉴定(Sma I酶切)，从而筛选出正确插入的重组质粒PLNCX₂-rhBMP7。

1.2.3 重组逆转录病毒的制备 转染前1 d，选择生长状态良好的PT67细胞，按 $(1\sim 2) \times 10^5$ /孔接种于6孔板中。少量提取PLNCX₂-BMP7和PLNCX₂，使用FuGENE_{TM}6 (Promega公司)进行转染，待细胞形成50%~80%汇合的单层后，按1:3传代，用G418筛选至阳性克隆形成，将阳性克隆细胞进行扩增，待细胞形成50%~80%汇合的单层后按1:3传代，使用不含G418的培养基继续培养48 h，收集培养基上清。所得逆转录病毒分别命名为PT-PLNCV₂-BMP7和PT-PLNCV₂。

1.2.4 病毒滴度的测定 测定开始前1 d将NIH3T3细胞以 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ /孔密度种于6孔板中，从包装细胞中收集含病毒的培养基。用0.45 μ m硝酸纤维素膜过滤，分 1×10^{-1} 、 1×10^{-2} 、 1×10^{-3} 、 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 和 1×10^{-6} 共6个稀释梯度感染NIH3T3细胞，培养细胞并使用G418进行抗性筛选4周。经筛选的细胞可逐渐形成克隆，将细胞用美兰染色后，根据细胞克隆数，计算病毒滴度。

1.3 rhBMP7逆转录病毒转染骨骼肌卫星细胞

转染前12 h以 1×10^5 密度将骨骼肌卫星细胞接种于6孔板中。按滴度较高的稀释倍数将PLNCX₂-rhBMP7和PLNCX₂病毒液加入骨骼肌卫星细胞中，培养24 h后更换培养基。使用G418筛选至阳性克隆形成(约2周)，将阳性克隆细胞进行扩增和2周后细胞50%~80%汇合的单层传代进行检测。

1.4 RT-PCR检测rhBMP7 mRNA的表达

使用TRIzol RNA提取试剂盒(Gibco公司)提取经过筛选的骨骼肌卫星细胞总RNA，使用SuperScript One-Step RT-PCR试剂盒(Gibco公司)进行RT-PCR反应。所用PCR引物由上海生物工程公司合成，rhBMP7引物：AGC CAG AAC CGC TCC AAG ACG-3' (正义)，5'-CTA GTG GCA GCC ACA GGC CGG-3' (反义)，其扩增产物为396 bp；内参照GAPDH引物：5'-TGC TGG TGC TGA GTA TGT CG-3' (正义)，5'-ATT GAG AGC AAT GCC AGC C-3' (反义)，其扩增产物为646 bp [6]。反应完成后，取PCR产物rhBMP7 5 μ l和GAPDH 5 μ l，进行1.5%琼脂糖凝胶电泳。

2 结果

2.1 骨骼肌卫星细胞的培养与鉴定

本研究所获取的原代细胞，锥虫蓝染色显示成活率在90%以上。倒置显微镜下，细胞贴壁后呈梭形或纺锤形。随培养时间的延长，细胞增殖、迁移并逐渐规律性地沿一个方向平行排列。当细胞融合到80%以上后，不需分化培养基即可自发地相互融合，形成肌管。传代细胞增殖速度较原代细胞明显加快，但传至第9代后，细胞逐渐出现老化现象，表现为形态不规则，细胞突起增加，胞浆内颗粒增多等。骨骼肌卫星细胞在分化培养基作用下，细胞间发生融合、形成肌管的能力明显增强。肌管为光滑长条形，许多细胞核聚集在一起，位于肌管的中央，形成核链，肌管间多呈平行排列(图1)。免疫细胞化学染色显示， α -骨骼肌肌动蛋白(图2)和肌球蛋白(图3)在骨骼肌卫星细胞都为弱阳性，在肌管为强阳性。

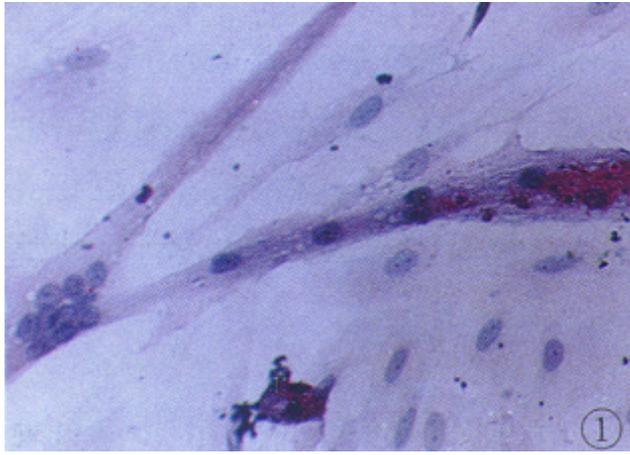


图1 在诱导培养基下骨骼肌卫星细胞融合形成肌管(HE染色, ×25)

Fig.1 Skeletal muscle satellite cells formed myotubes in deduced media (HE staining, ×25)

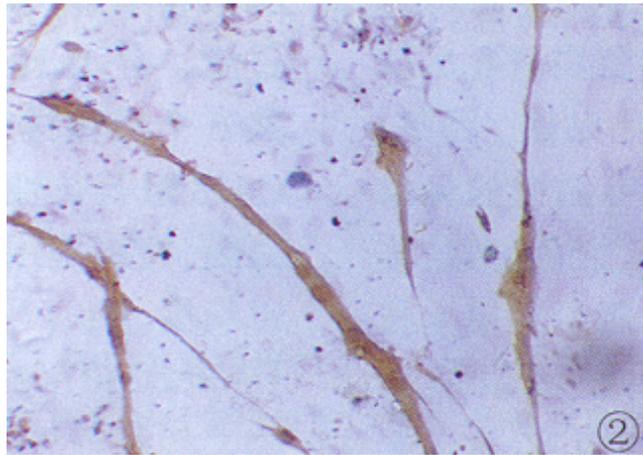


图2 α -骨骼肌肌动蛋白免疫化学染色(×10)

Fig.2 Immunochemical staining of α -sarcomeric actin (×10)

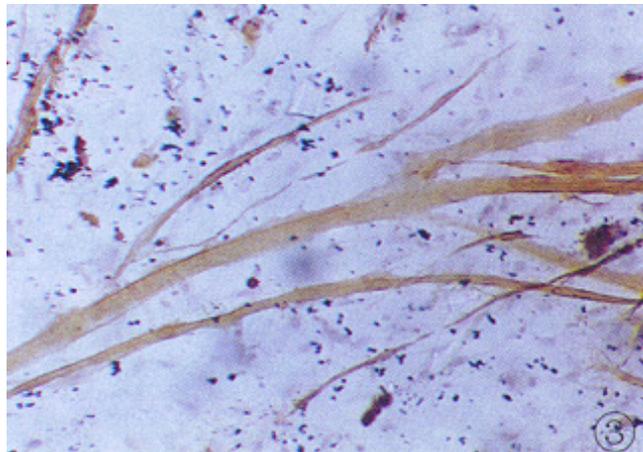


图3 肌球蛋白免疫化学染色(×10)

Fig.3 Immunochemical staining of myosin (×10)

2.2 rhBMP7逆转录病毒载体的构建

2.2.1 rhBMP7基因的鉴定 琼脂糖凝胶电泳结果可见使用EcoR I酶切可得到3.1、0.78、0.55 kb三条片段。使用Xba I酶切可得到1.5、3.0 kb, 均符合物理图谱。测序结果亦符合物理图谱。

2.2.2 PLNCX₂-BMP7逆转录病毒表达载体的构建和鉴定 使用Sma I酶切重组质粒后琼脂糖凝胶电泳结

果(图4)，如果为正向连接应产生1 923、2 564、3 061 bp三个DNA片段，若为反向连接则产生621、3 061和3 866 bp三个DNA片段，若未连接产生3 061和3 039 bp两个DNA片段。其中第1、2 组表明此构建的重组载体为正向连接。

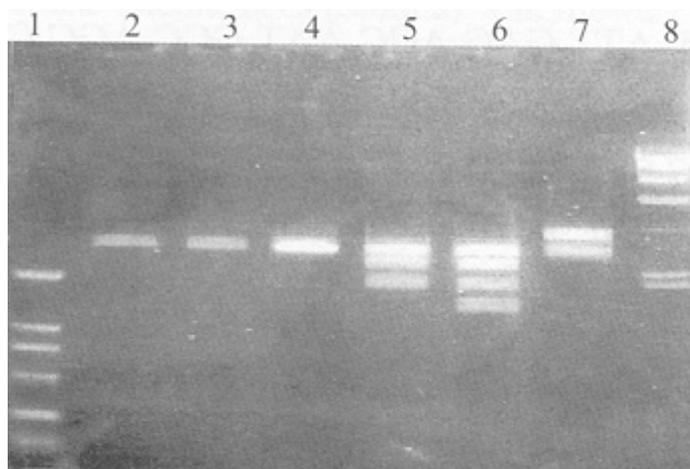


图4 重组质粒的Sma I 酶切鉴定图谱

Fig.4 Sma I restriction enzyme digestion map of the recombinant plasmid

1: DNA marker (100-1 000 bp); 2: Non-linkage (I); 3: Non-linkage (II); 4: Non-linkage (III); 5: Correct linkage (I); 6: Correct linkage (II); 7: Reverse linkage; 8: DNA marker (1-10 kb)

2.2.3 重组逆转录病毒的制备 利用脂质体介导方法成功地将PLNCX₂-BMP7和PLNCX₂导入PT67包装细胞中，经G418抗性筛选后，形成了多个抗性克隆，未转染的PT67细胞则于10 d后全部死亡。将抗性细胞克隆扩增后获取的细胞培养上清液即为重组病毒PT-PLNCV₂-BMP7的液体。

2.2.4 病毒滴度的测定 以两组细胞克隆数的平均数乘以病毒稀释倍数，即为重组逆转录病毒的实际感染性病毒的滴度。本组病毒滴度在 $2.0 \times 10^3 \sim 5.6 \times 10^5$ cfu/ml之间，以稀释 1×10^3 的病毒液滴度最高。

2.3 RT-PCR检测转染骨骼肌卫星细胞中rhBMP-7 mRNA的表达

PCR产物琼脂糖凝胶电泳结果(图5)可见经PT-PLNCV₂-BMP7感染的骨骼肌卫星细胞的RT-PCR产物为长度分别为396和646 bp两个DNA条带；而PT-PLNCV₂感染和未感染病毒液的骨骼肌卫星细胞只有646 bp一个DNA条带。

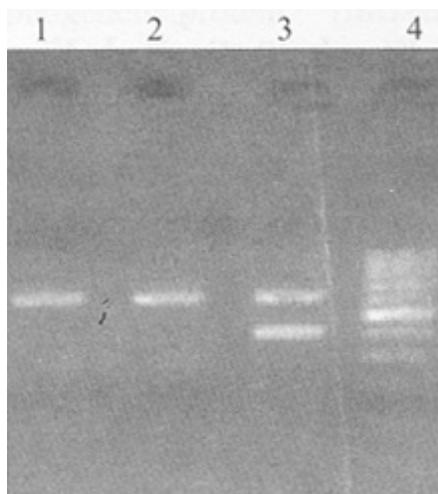


图5 RT-PCR结果

Fig.5 Result of RT-PCR

1: DNA marker (100-1 000 bp); 2: Transfection with PT-PLNCV₂-BMP7; 3: Transfection with PT-PLNCV₂; 4: Non-transfection

3 讨论

我们以前的研究证实,带血供肌瓣可作为BMP的良好载体,它具有提供靶细胞、缓慢释放BMP、提供成骨修复方向和保持丰富血运等优点。鉴于使用外源性BMP存在着诸多不足,因此我们考虑将BMP的基因转染入带血供肌瓣中,通过目的基因的有效表达,可在体内稳定地表达BMP,从而促进肌瓣内的骨骼肌卫星细胞及由血液来的间充质干细胞转化为成骨细胞而修复骨缺损。本实验目的在于验证这种方法的可行性。

本实验成功地培养出了骨骼肌卫星细胞,体外培养的骨骼肌卫星细胞主要可用于组织工程和基因治疗两个方面。骨骼肌卫星细胞属于组织干细胞,其体外培养的优点是取材方便、产量大、具有较强的增殖、分化能力,在适当的条件下可向成肌细胞、成软骨细胞和成骨细胞等多个方向分化。因此,骨骼肌卫星细胞在这些组织的组织工程研究中具有广阔的应用前景。肌肉介导是实现基因转移最安全、简便和有效的途径。可用目的基因转染骨骼肌卫星细胞,再将转染后的细胞移植入肌肉内,植入细胞可与局部肌肉融合并形成肌纤维,从而使目的基因在植入部位表达和分泌,以达到基因治疗的目的[7]。本实验成功地构建了人rhBMP7的逆转录病毒载体,并通过逆转录病毒介导将人rhBMP7基因转入骨骼肌卫星细胞中。rhBMP-7 mRNA表达的有无既是rhBMP7基因在骨骼肌卫星细胞基因组的整合是否有效的证明,也是细胞是否能表达rhBMP7多肽蛋白的前提。本实验通过RT-PCR证实重组基因逆转录病毒感染细胞后能够稳定地表达外源性rhBMP7的mRNA达4周以上。

经转染的骨骼肌卫星细胞是否能够合成外源性rhBMP7及是否具有生物学活性,以及其对细胞增殖、分化等生物学特性的影响这些具有实际意义的关键问题,仍在进一步研究中。逆转录病毒介导的基因转移具有将外源性基因插入靶细胞基因组的功能,能够获得外源性基因长效表达的特点[8]。本实验也证实经转染的细胞4~6周后仍有外源性rhBMP7 mRNA的表达,这对于构建组织工程化骨组织是非常有利的。但同时由于逆转录病毒介导的基因转移是将外源性基因随机插入靶细胞基因组中的,因此是否会造成细胞的畸变,经转染的细胞植入体内后是否会造成过量成骨或致癌、致畸等副效应仍有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 裴国献, 杨润功, 魏宽海, 等. 带血供肌瓣作为骨形态发生蛋白载体修复骨缺损的实验研究[J]. 中华外科杂志, 2001, 39(1): 76-9.
- Pei GX, Yang RG, Wei KH, et al. Vascular muscle flap combined with bone morphogenetic protein for forming bone bridge to repair bone defect: experimental study[J]. Chin J Surg, 2001, 39(1): 76-9.
- [2] 魏宽海, 裴国献. 组织损伤修复的基因疗法研究进展[J]. 中华外科杂志, 2000, 38(4): 309-13.
- Wei KH, Pei GX. Process of gene therapy for tissue repair[J]. Chin J Surg, 2000, 38(4): 309-13.
- [3] Franceschi RT, Wang D, Krebsbach PH, et al. Gene therapy for bone formation: in vitro and in vivo osteogenic activity of an adenovirus expressing BMP7[J]. J Cell Biochem, 2000, 78(2): 476-86.
- [4] Johnson SE, Allen RE. Proliferation cell nuclear antigen (PCNA) is expressed in activated rat skeletal muscle satellite cells[J]. J Cell Physiol, 1993, 154(1): 39-43.
- [5] 颜子颖, 王海林. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2000, 241-5.
- [6] Drissi H, Lomri A, Lasmoles F, et al. Skeletal unloading induces biphasic changes in insulin-like growth factor-1 mRNA levels and osteoblast activity[J]. Exp Cell Res, 1999, 251(2): 275-84.
- [7] Bonham L, Palmer T, Miller AD, et al. Prolonged expression of therapeutic levels

of human granulocyte colony - stimulating factor in rats following gene transfer to skeletal muscle[J]. Hum Gene Ther, 1996,7(12): 1423-35.

[8] Evans CH, Robbins PD, Pennsylvania P. Possible orthopaedic applications of gene therapy[J]. J Bone Joint Surg, 1995, 77(7): 1103-14.

参考文献:

[1] 裴国献, 杨润功, 魏宽海, 等. 带血供肌瓣作为骨形态发生蛋白载体修复骨缺损的实验研究[J]. 中华外科杂志, 2001, 39(1): 76-9.

Pei GX, Yang RG, Wei KH, et al. Vascular muscle flap combined with bone morphogenetic protein for forming bone bridge to repair bone defect: experimental study[J]. Chin J Surg, 2001, 39(1): 76-9.

[2] 魏宽海, 裴国献. 组织损伤修复的基因疗法研究进展[J]. 中华外科杂志, 2000, 38(4): 309-13.

Wei KH, Pei GX. Process of gene therapy for tissue repair[J]. Chin J Surg, 2000, 38(4): 309-13.

[3] Franceschi RT, Wang D, Krebsbach PH, et al. Gene therapy for bone formation: in vitro and in vivo osteogenic activity of an adenovirus expressing BMP7[J]. J Cell Biochem, 2000, 78(2): 476-86.

[4] Johnson SE, Allen RE. Proliferation cell nuclear antigen (PCNA) is expressed in activated rat skeletal muscle satellite cells[J]. J Cell Physiol, 1993, 154(1): 39-43.

[5] 颜子颖, 王海林. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2000, 241-5.

[6] Drissi H, Lomri A, Lasmoles F, et al. Skeletal unloading induces biphasic changes in insulin-like growth factor-1 mRNA levels and osteoblast activity[J]. Exp Cell Res, 1999, 251(2): 275-84.

[7] Bonham L, Palmer T, Miller AD, et al. Prolonged expression of therapeutic levels of human granulocyte colony - stimulating factor in rats following gene transfer to skeletal muscle[J]. Hum Gene Ther, 1996,7(12): 1423-35.

[8] Evans CH, Robbins PD, Pennsylvania P. Possible orthopaedic applications of gene therapy[J]. J Bone Joint Surg, 1995, 77(7): 1103-14.