

重组绿色荧光蛋白腺相关病毒载体转染 293 细胞和 CD34⁺ 细胞

李黎波¹, 冯茹², 周淑芸² (南方医科大学¹ 南方医院肿瘤科, ² 血液科, 广东 广州 510515)

摘要:目的 研究重组绿色荧光蛋白腺相关病毒载体分别转染 293 细胞(人胚肾细胞)和人 CD34⁺ 细胞后绿色荧光蛋白的表达情况。方法 用 CS-3000 血细胞分离机分离骨髓单个核细胞, 免疫磁性分离仪纯化 CD34⁺ 细胞, 重组绿色荧光蛋白腺相关病毒载体分别转染两种细胞, 并通过荧光显微镜、流式细胞仪对绿色荧光蛋白的表达进行分析。结果 荧光显微镜下两种细胞均可见绿色荧光蛋白表达, 流式细胞仪于一定时间内检测 293 细胞的基因转导效率最高为 32.8%, CD34⁺ 细胞的基因转导效率最高为 25%, 在所观察的时间内, 转染率呈先升高后降低趋势。结论 重组绿色荧光蛋白腺相关病毒载体能转染 293 和 CD34⁺ 细胞, 绿色荧光蛋白基因可作为良好的报告基因, 为将来的干细胞基因治疗打下良好基础。

关键词:腺相关病毒; 绿色荧光蛋白; 293 细胞; CD34⁺ 细胞

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2005)01-0026-04

Transfection of human 293 and CD34⁺ cells with recombinant green fluorescent protein adeno-associated virus

LI Li-bo¹, FENG Ru², ZHOU Shu-yun¹

Department of Oncology¹, Department of Hematology², Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To investigate the expressions of recombinant green fluorescent protein (GFP) in 293 cells (human embryonic kidney cells) and CD34⁺ cells transfected with adeno-associated virus carrying the gene encoding the recombinant GFP. **Method** Mononuclear cells from the bone marrow were collected on cell separator CS-3000, and CD34⁺ cells were separated on immunomagnetic MiniMACS columns. CD34⁺ cells and 293 cells were transfected with recombined adeno-associated virus respectively, and the expressions of the GFP were detected by flow cytometry and fluorescence microscopy. **Result** GFP expression was observed in the two cells under fluorescent microscope. The highest transfection efficiency of the recombined adeno-associated virus was about 32.8% in 293 cells and 25% in CD34⁺ cells, and decreased with the prolongation of transfection time. **Conclusion** Adeno-associated viral vector encoding recombinant GFP can be transfected into human 293 cells and CD34⁺ cells, which provides a basis for future gene therapy.

Key words: adeno-associated virus; green fluorescent protein; 293 cells; CD34⁺ cells

腺相关病毒(AAV)近年来因其独特的优势越来越受到重视,它与人类疾病无密切相关,能定点整合在人 19 号染色体上,AAV 以非随机的形式稳定整合到细胞基因组中,无潜在致病威胁,同时能稳定地表达外源基因,其宿主范围广,可转染分裂期及非分裂期细胞,且转染效率高^[1]。绿色荧光蛋白(GFP)是一种新型报告基因,它在长波紫外光或者 Ca²⁺ 激发下发出绿色荧光,而不需要其他外源底物或者辅助因子的参与,没有种属特异性和毒性,其灵敏度和分辨率明显高于现有的免疫组织化学方法^[2]。现就重组绿色荧光蛋白腺相关病毒(rAAV/GFP)分别转染 293 细胞和人 CD34⁺ 细胞进行研究。以确定 GFP 作为 AAV

为载体的基因治疗系统中监测指标的可靠性。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

rAAV/GFP 和 293 细胞(人胚肾细胞)由中国预防医学科学院病毒学研究所病毒基因工程国家重点实验室赠送,分离 CD34⁺ 细胞的正常外周血细胞采自异基因移植正常供者。Nikon Eclipse E600 荧光显微镜;CS-3000 血细胞分离机;miniMACS 免疫磁性分离仪;流式细胞仪;BD Caliber。

1.2 试剂

DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司,白细胞介素 3(IL-3)、白细胞介素 6(IL-6)、干细胞刺激因子(SCF)购自日本麒麟公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞分离、纯化、培养 健康供者外周血经 CS-3000 血细胞分离机分离采集外周血单个核细胞,

收稿日期:2003-04-30

基金项目:国家自然科学基金(39670826)

Supported by National Natural Science Foundation of China (39670826)

作者简介:李黎波(1964-),男,第一军医大学在读博士研究生,主要从事肿瘤综合治疗研究工作,电话:020-61641657

MiniMACS免疫磁性分离仪纯化 CD34⁺ 细胞,其培养体系为:DMEM 2 ml,胎牛血清 12%,IL-3 10 ng/ml,IL-6 50 ng/ml,SCF 100 ng/ml。接种 CD34⁺ 细胞细胞数为:1.0×10⁵/ml。293 细胞的培养体系为:DMEM 2 ml,胎牛血清 10%,接种细胞数与 CD34⁺ 细胞的细胞数相同。

1.3.2 基因转染 检测 rAAV/GFP 的病毒滴度为:2.0×10⁴ cfu/ml。将 rAAV/GFP 上清 4 μl 分别加入 293 细胞培养体系和 CD34⁺ 细胞培养体系,并于加入病毒后 12、24、48 和 72 h 定期观察细胞数、细胞活力的变化,以及在相差显微镜和荧光显微镜下观察 GFP 基因的转染情况,用流式细胞仪检测其荧光细胞的强度和含量。

1.3.3 荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白 吸取 CD34⁺ 转染后的细胞 200 μl,离心,1 000 r/min,5 min。吸取细胞沉淀滴片,加盖玻片。先在相差显微镜下观察细

胞形态与分布,而后再行荧光显微镜观察。调整荧光显微镜参数:发射波长 490 nm,激发波长 475 nm。荧光显微镜下观察,转染细胞可见绿色荧光。293 细胞是贴壁细胞,因此观察细胞时必须先用胰酶消化,之后的处理方法同 CD34⁺ 细胞。

1.3.4 流式细胞仪检测 直接用荧光 1(FL1)和荧光 2(FL2)检测。

2 结果

2.1 CD34⁺ 细胞形态观察

CD34⁺ 细胞纯化后涂片,瑞氏染色后显微镜下观察,细胞呈圆形,核浆比例大,部分细胞核仁明显,浆内未见或少见颗粒,见图 1。CD34⁺ 细胞培养后 72 h 后,2 000 r/min 离心 5 min,取残渣滴片,瑞氏染色后显微镜下观察,细胞体积略有变小,核大,部份核仁仍明显(图 2)。

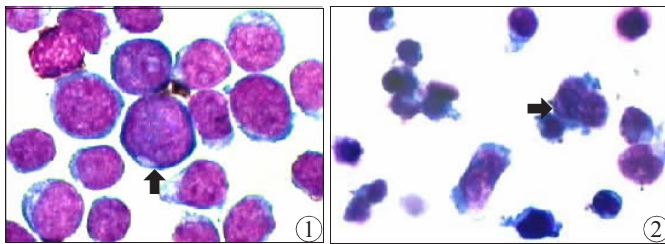


图 1 MiniMACS 纯化后 CD34⁺ 细胞

(瑞氏染色,原放大倍数:10×100)

Fig.1 CD34⁺ cells purified by MiniMACS

(Wright's staining, original magnification: 10×100)

图 2 MiniMACS 纯化后 CD34⁺ 细胞培养后 72 h

(瑞氏染色,原放大倍数:10×100)

Fig.2 CD34⁺ cells cultured for 72 h after purification by MiniMACS (Wright's staining, original magnification:10×100)

GFP 转染后观察 293 细胞和 CD34⁺ 细胞在 12、24、48 和 72 h 时,锥虫蓝染色显示细胞活力的趋势变化情况,可见 293 细胞在 72 h 时的细胞活力与 CD34⁺ 细胞的细胞活力相比,无明显差异,见图 3。

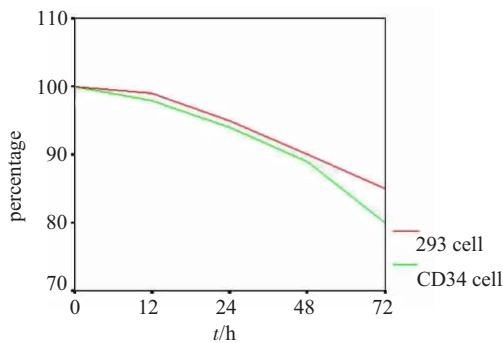


图 3 GFP 转染后 293 细胞和 CD34⁺ 细胞细胞活力的时间变化趋势

Fig.3 Time-dependent changes in the activity of 293 cells and CD34⁺ cells transfected by GFP

GFP 转染后分别观察 293 细胞和 CD34⁺ 细胞在相差显微镜下和荧光显微镜下的细胞形态和绿色荧光着色情况,通过相差显微镜和荧光显微镜的镜下观察比较,见图 4、5、6、7、8、9、10。

2.2 流式细胞仪检测结果

rAAV/GFP 转染 293 细胞后,GFP 检测阳性率:24 h 后为 7.5%,48 h 后为 16.38%,72 h 后为 32.8%,5 d 后为 10.4%。在所观察的时间内,随时间延长,转染率呈先上升后下降趋势(图 11)。

rAAV/GFP 转染 CD34⁺ 细胞后,24 h 后为 10%,48 h 后为 25%,72 h 后为 20.3%,5 d 后为 13.5%。转染率高峰在 48~72 h 之间。在所观察的时间内,随时间延长,转染率呈上升后下降趋势(图 12)。

3 讨论

GFP 来源于 *Aequorea victoria* 水母,其基因表达的蛋白中有一个由经过修饰的氨基酸组成的生色团,它能在紫外或蓝光的激发下发出绿色荧光,是目前唯一能在异源细胞内表达后自发产生荧光的蛋白质,因此 GFP 已用作新型报告基因引起人们极大的兴趣^[3]。AAV 的研究在近年来取得了突破性进展,AAV 能将外源基因定点整合,无逆转录病毒的潜在致病性,宿主范围广,可转染分裂期及非分裂期细胞,适合长期、稳定地在体内表达^[4]。Bartlett 等^[5]构建了 rAAV-βgal 载体,转染造血干祖细胞,结果发现 60%~70%的细胞中可检测到 βgal 的表达,说明 rAAV 可以高效地将

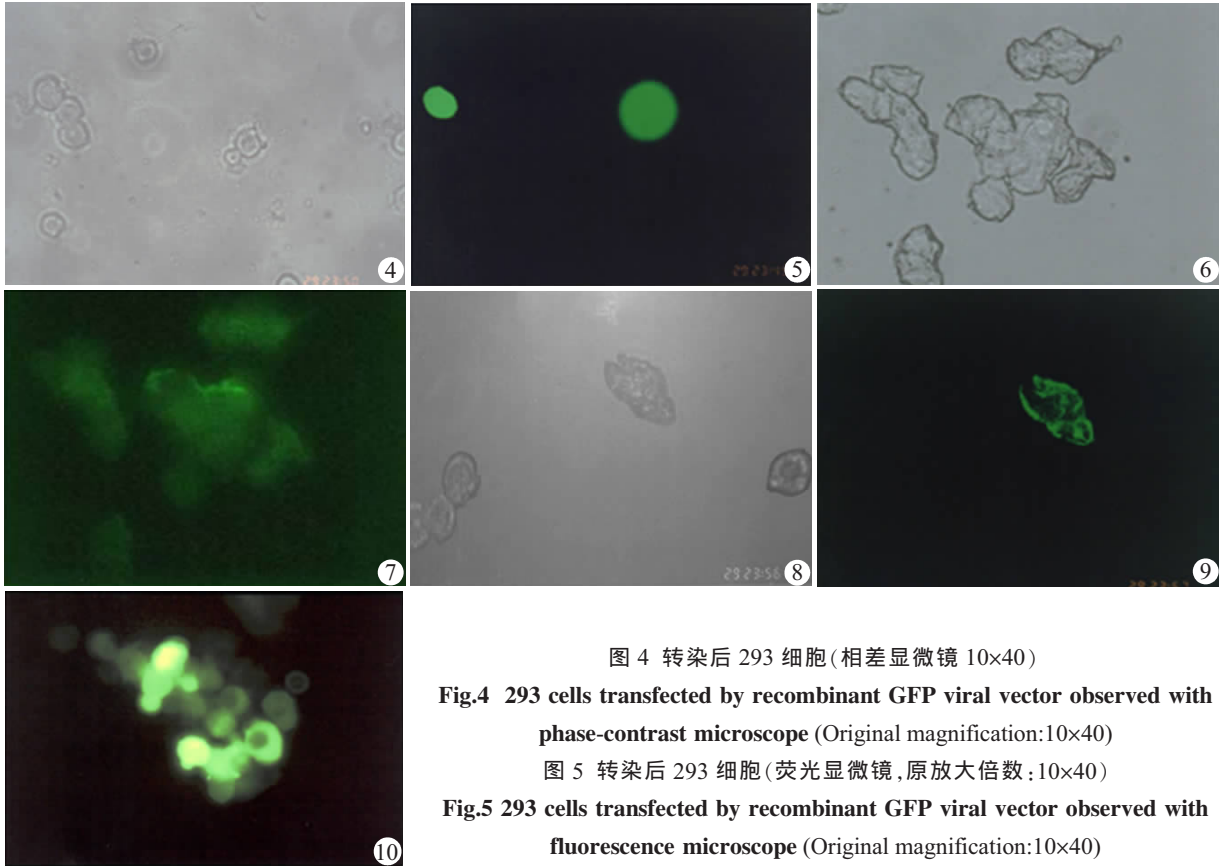


图 4 转染后 293 细胞(相差显微镜 10×40)

Fig.4 293 cells transfected by recombinant GFP viral vector observed with phase-contrast microscope (Original magnification:10×40)

图 5 转染后 293 细胞(荧光显微镜,原放大倍数:10×40)

Fig.5 293 cells transfected by recombinant GFP viral vector observed with fluorescence microscope (Original magnification:10×40)

图 6 转染后 CD34⁺ 细胞(相差显微镜,原放大倍数:10×40)

Fig.6 CD34⁺ cells transfected by recombinant GFP viral vector observed with phase-contrast microscope (Original magnification:10×40)

图 7 转染后 CD34⁺ 细胞(荧光显微镜,原放大倍数:10×40)

Fig.7 CD34⁺ cells transfected by recombinant GFP viral vector observed with fluorescence microscope (Original magnification:10×40)

图 8 CD34⁺ 细胞(相差显微镜,原放大倍数:10×40)

Fig.8 CD34⁺ cells transfected by recombinant GFP viral vector observed with phase-contrast microscope (Original magnification:10×40)

图 9 CD34⁺ 细胞(荧光显微镜,原放大倍数:10×40)

Fig.9 CD34⁺ cells transfected by recombinant GFP viral vector observed with fluorescence microscope (Original magnification:10×40)

图 10 293 细胞(荧光显微镜,原放大倍数:10×40)

Fig.10 293 cells transfected by recombinant GFP viral vector observed with fluorescence microscope (Original magnification:10×40)

外源基因导入原始造血细胞。

本实验检测了 rAAV/GFP 转染 293 细胞和 CD34⁺ 细胞 12~72 h 后细胞数、细胞活力和转导效率的转染情况。转染后 293 细胞的荧光阳性细胞数高于 CD34⁺ 细胞培养体系的细胞数，原因之一可能是 CD34⁺ 细胞的特性所决定的，多数 CD34⁺ 细胞处于 G₀/G₁ 期，启动慢^[6]。而 293 细胞是一种恶性转化的人胚肾细胞系，启动快，扩增持续时间和扩增倍数高于 CD34⁺ 细胞。原因之二是 CD34⁺ 细胞的培养体系有待完善，这也正是体内与体外培养的差异所在。293 细胞和 CD34⁺ 细胞在培养期间内的细胞活性相差无

几，说明尽管 CD34⁺ 细胞在体外培养扩增比较困难，但如果培养体系选择恰当，体外造血干细胞培养扩增是可能的^[7]。

通过相差显微镜和荧光显微镜下观察以及流式细胞仪的检测，GFP 转染后 293 细胞绿色荧光蛋白表达细胞阳性率远远高于 CD34⁺ 细胞的阳性率，而且 293 细胞中绿色荧光阳性细胞的荧光强度也明显大于 CD34⁺ 细胞中表达阳性细胞，原因可能是 293 细胞属于成熟细胞，细胞中以细胞浆比例为重，而 CD34⁺ 细胞中以细胞核比例为主，GFP 是以蛋白的形式存在于细胞浆中的，293 细胞浆多而细胞核小，细

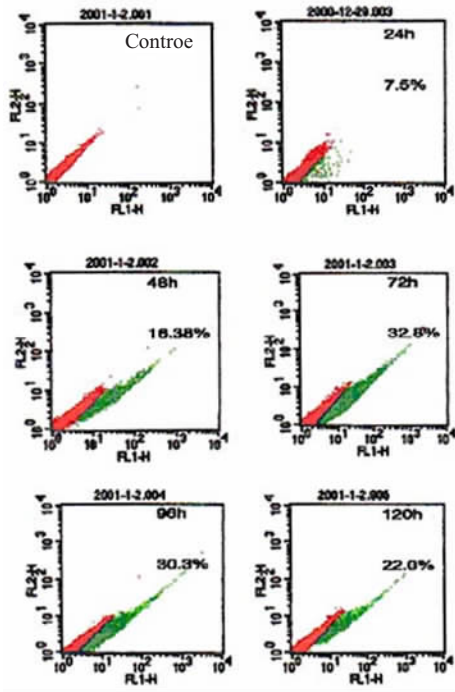


图 11 流式细胞仪检测 rAAV/GFP 对 293 细胞的转染效率

Fig.11 Transfection efficiency of rAAV/GFP in 293 cells examined by flow cytometry

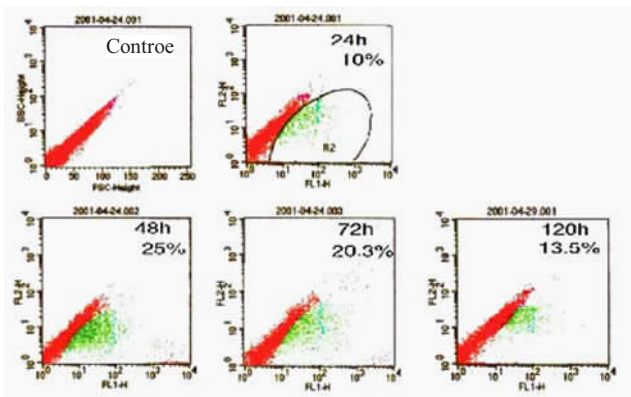


图 12 流式细胞仪检测 rAAV/GFP 对 CD34⁺ 细胞的转染效率

Fig.12 Transfection efficiency of rAAV/GFP in CD34⁺ cells examined by flow cytometry

胞浆中的 GFP 的量多, 表现为阳性细胞绿色荧光强度高, 反之 CD34⁺ 细胞的阳性细胞绿色强度弱, 而且绿色荧光多见于细胞的边缘区。另外, 从流式细胞仪的检测结果看, 无论是 293 细胞还是 CD34⁺ 细胞, 尽管可以看出荧光细胞群和非荧光细胞群, 其荧光细胞群与非荧光细胞群之间非常接近, 未分成明显的两个区域, 考虑其原因是我们所选用的 GFP 基因所表达的荧光强度不够, 以致于分群不理想。

本试验 rAAV/GFP 重组病毒转染 293 细胞和 CD34⁺ 细胞, 其转染的阳性率均低于其他作者所报道的阳性率^[8]。考虑可能存在原因是: rAAV/GFP 重组病毒滴度较低, 以及分离纯化后的 CD34⁺ 细胞经检测约 99% 处于 G₀ 期, 蛋白合成量少。尽管重组 rAAV/GFP 转染 CD34⁺ 细胞的转染率较报导的低, 但是仍高于逆转录病毒的转染效率, 说明 AAV 用于介导造血细胞的基因治疗, 优于逆转录病毒载体。因此我们有待于优化 AAV 重组病毒的制备方法, 提高重组病毒的病毒滴度, 改善造血干细胞的体外培养体系, 进一步提高 AAV 重组病毒转染效率, 为将来的基因治疗打下良好的基础。

参考文献:

- [1] PE Monahan, RJ Samulski, J Tazelaar, *et al.* Direct intramuscular injection with recombinant AAV vectors results in sustained expression in a dog model of hemophilia[J]. *Gene Ther* 1998, 5: 40-9.
- [2] Martin C, Yuan T, Ghia Euskirchen, *et al.* Green fluorescent protein as a marker for gene expression[J]. *Science*, 1994, 263(11): 802-5.
- [3] Douglas CP, Virginia K, Wiliam WW, *et al.* Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein[J]. *Gene*, 1992, 111 (2):229-33.
- [4] 胡贵方, 吴小兵, 俞守义, 等. 含乙型肝炎表面抗原基因重组腺相关病毒的构建及其基因的表达和功能初步研究[J]. *第一军医大学学报*, 2003, 23(6): 553-6.
Hu GF, Wu XB, Yu SY, *et al.* Construction of recombinant adeno-associated virus carrying hepatitis B surface antigen gene and preliminary study of the gene expression and function[J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2003, 23(6): 553-6.
- [5] Bartlett JS, Jude SR, Mccown TJ. Selective and rapid uptake of adeno-associated virus type 2 in brain[J]. *Human Gene Ther*, 1998, 9: 1181-6.
- [6] 陈捷, 周淑芸, 冯茹, 等. 抑制性消减杂交技术检测骨髓 CD34⁺ 细胞基因差异表达[J]. *第一军医大学学报*, 2002, 22(9): 823-5.
Chen J, Zhou SY, Feng R. Identification of differentially expressed genes in bone marrow CD34⁺ cells by suppression subtractive hybridization[J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2002, 22(9): 823-5.
- [7] 胡舜英, 冯茹, 李黎波, 等. 腺相关病毒与人多药耐药基因重组载体的构建及其在 NIH3T3 细胞中的表达[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2000, 16(3): 326-9.
Hu SY, Feng R, Li LB, *et al.* Construction of recombinant AAV-MDR1 and expression in NIH3T3 cells[J]. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2000, 16(3):326-9.
- [8] Nathwani AC, Hanawa H, Vandergriff J, *et al.* Efficient gene transfer into human cord blood CD34⁺ cells and the CD34⁺CD38⁻ subset using highly purified recombinant adeno-associated virus vector preparations that are free of helper virus and wild-type AAV [J]. *Gene Ther*, 2000, 7(3): 183-95.