

不同基因载体转导人骨髓间充质干细胞比较

刘正山^{1,2}, 张 成^{1,2}, 尚延昌³, 熊 符⁴, 冯善伟², 李 勇², 许勇峰¹, 周 畅¹

¹中山大学 第一附属医院神经内科, 广州 510080

²中山大学干细胞与组织工程研究中心, 广州 510080

³中国人民解放军总医院老年神经内科, 北京 100853

⁴南方医科大学遗传学教研室, 广州 510515

通信作者: 张 成 电话: 020-87332387, 传真: 020-87333122, 电子邮件: zhangch6@mail.sysu.edu.cn

摘要: 目的 比较腺病毒载体、腺相关病毒载体、杆状病毒载体和质粒载体对人骨髓间充质干细胞 (hBMSCs) 的转导效率。**方法** 体外原代培养 hBMSCs, 进行腺病毒载体、腺相关病毒载体、杆状病毒载体和质粒载体转染实验。采用倒置荧光显微镜及流式细胞仪检测经基因载体转染后的 hBMSCs 胞内目的蛋白表达情况。**结果** 倒置荧光显微镜观察结果显示, 基因载体转染后的部分 hBMSCs 胞内有 GFP 表达而发绿色荧光, 其中杆状病毒转导的 hBMSCs 荧光强度较强。流式细胞仪检测结果表明, 腺病毒载体、腺相关病毒载体及质粒载体的转导效率和绿色荧光蛋白阳性细胞平均荧光强度分别是 42%、37%、22% 和 158、115、77, 均明显低于杆状病毒的 70% ($P < 0.01$) 和 212 ($P < 0.05$)。**结论** 杆状病毒载体对 hBMSCs 的转导效率高于腺病毒载体、腺相关病毒载体和质粒载体, 有望成为人体基因治疗研究中更为理想的基因载体。

关键词: 杆状病毒; 基因载体; 转导; 人骨髓间充质干细胞

中图分类号: R373.9 文献标识码: A 文章编号: 1000-503X(2008)05-0569-05

DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2008.05.013

Comparison of Transduction Efficiencies of Various Gene Vectors in Human Bone-marrow-derived Mesenchymal Stem Cells

LIU Zheng-shan^{1,2}, ZHANG Cheng^{1,2}, SHANG Yan-chang³, XIONG Fu⁴,
FENG Shan-wei², LI Yong², XU Yong-feng¹, ZHOU Chang¹

¹ Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

² Center for Stem Cell Biology and Tissue Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

³ Department of Geriatric Neurology, Chinese People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100853, China

⁴ Department of Medical Genetics, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Corresponding author: ZHANG Cheng Tel: 020-87332387, Fax: 020-87333122, E-mail: zhangch6@mail.sysu.edu.cn

ABSTRACT: Objective To compare the transduction efficiencies of adenoviral vector, adeno-associated viral vector, baculoviral vector, and plasmid vector in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells (hBMSCs). **Methods** The hBMSCs were cultured *in vitro* and transduced with the adenoviral vector, adeno-associated viral vector, baculoviral vector, and plasmid vector. The expression of target protein was observed by inverted fluorescent microscopy and flow cytometry. **Results** Inverted fluorescent microscopy showed that some of the hBMSCs after transduction expressed the green fluorescent protein (GFP) and the hBMSCs transduced

with baculoviral vector expressed more GFP than those of other three vectors. Flow cytometry showed that the transduction efficiencies and mean fluorescence intensities of the adenoviral vector, adeno-associated viral vector, and plasmid vector were 42%, 37%, and 22% and 158, 115, and 77, respectively, which were significantly lower than those of baculoviral vector (70%, $P < 0.01$; 212, $P < 0.05$; respectively). **Conclusion** Compared with the adenoviral vector, adeno-associated viral vector, and plasmid vector, the baculoviral vector has higher transduction efficiency in hBMSCs and therefore may be a more suitable gene vector for research in human gene therapy.

Key words: baculovirus; gene vector; transduction; human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells

Acta Acad Med Sin. 2008,30(5):569-573

经基因修饰的人骨髓间充质干细胞 (human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells, hBMSCs) 在临床上具有广泛的应用价值。熊符等^[1]构建了含有人微小抗肌萎缩蛋白基因的重组腺病毒, 发现其可有效转导抗肌萎缩蛋白基因敲除小鼠的骨髓间充质干细胞 (mouse bone-marrow-derived mesenchymal stem cells, mBMSCs)。Kumar 等^[2]将带有骨形成蛋白 2 (bone morphogenetic protein 2, BMP-2) 基因的重组腺相关病毒转导的 BMSCs 用来治疗小鼠的骨质疏松疾病, 也起到了一定治疗效果。Ho 等^[3]研究表明, 重组杆状病毒可在体外高效转导 hBMSCs, 且不影响其增殖及分化能力。Jo 等^[4]将带有肾上腺髓质素基因的质粒转入 BMSCs, 并用其治疗心肌梗死动物模型, 发现可明显改善心功能。上述研究说明, 腺病毒载体、腺相关病毒载体、杆状病毒载体和质粒载体都可以有效将目的基因转入种子细胞并起到一定治疗作用。本研究比较了腺病毒载体、腺相关病毒载体、杆状病毒载体和质粒载体对 hBMSCs 的转导效率。

材料和方法

主要试剂和设备 低糖 DMEM 培养基 (L-DMEM)、胎牛血清、无钙镁 PBS 和碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 购自美国 Gibco 公司, 胰酶、青霉素、链霉素、牛血清蛋白和淋巴细胞分离液购自德国 Sigma 公司, 培养瓶、离心管和培养皿购自美国 Corning 公司, lipofecting 2000 脂质体为美国 Invitrogen 公司产品, 紫外分光光度仪为美国 Beckman 公司产品, 倒置荧光显微镜为日本 Olympus 产品, 流式细胞仪为美国 BD 公司产品。

人骨髓来源 经肝素抗凝的成人骨髓来自于中山大学第一附属医院胸外科手术被切除的肋骨, 该

患者无血液系统疾病和家族遗传病史。

基因载体 重组腺病毒载体 (Ad-CMV-EGFP) 由本实验室构建后于 -80°C 冻存, 室温复苏后将其转导 293 细胞扩增病毒, 用极度稀释法测定扩增后的重组腺病毒滴度; 重组腺相关病毒 (AAV2-EGFP, 滴度为 1×10^{12} v. g/ml) 购自本元正阳基因有限公司; 带有绿色荧光蛋白基因的重组杆状病毒 (BacV-CMV-EGFP, 滴度为 1×10^{11} v. g/ml) 由华中农业大学微生物国家重点实验室惠赠; 带有 GFP 的质粒 (pEGFP) 购自日本 Clontech 公司, 采用大肠杆菌扩增 pEGFP, 紫外分光光度仪测得其浓度为 $900 \mu\text{g/ml}$ 。

hBMSCs 的培养及鉴定 经抗凝处理的 2~3 ml 人骨髓用淋巴细胞分离液分离 (2000 r/min , 20 min) 后, 将单核细胞移植入 25 cm^2 培养瓶中, 加入 3.5 ml 含有 10% 胎牛血清、 4 ng/ml bFGF、 100 U/ml 青霉素和 $100 \mu\text{g/ml}$ 链霉素的低糖 DMEM 中, 3 d 后换液, 去除漂浮细胞可见少量贴壁细胞生长, 7~10 d 后贴壁细胞可达 80% 左右, PBS 清洗 2 遍, 用 0.25% 胰酶消化并以 1:2 传代。以后每 3 d 换液 1 次, 待细胞长至 90% 时, 1:3 传代。将 P4 代 hBMSCs 消化, 吹打为单细胞悬液后, 采用流式细胞仪检测其表面抗原分子表达情况。

病毒载体转导 hBMSCs 将 P4~P6 代 hBMSCs 种植于直径为 3.5 cm 的培养皿中, 待细胞长至 80% 后吸去培养基, 用 PBS 洗 2 遍。依据培养皿中的细胞数, 调整腺病毒载体、腺相关病毒载体及杆状病毒载体数量, 使感染指数 (multiplicity of infection, MOI) 为 200 v. g/cell, 加入 0.5 ml PBS 冲悬后, 将培养皿置于 25°C 恒温振荡器孵育 4 h, 再用 PBS 洗 2 遍, 加 2.5 ml 完全培养基于培养皿中, 放置于 37°C 细胞培养箱中继续培养。

pEGFP 转染 hBMSCs 将 $3.2 \mu\text{g}$ pEGFP 与 8 ml lipofecting 2000 脂质体混合后, 加入 0.5 ml PBS, 于

室温下放置 20 min, 再将混合悬液加入培养皿中, 加入 0.5 ml PBS 充分混匀质粒, 将培养皿置于培养箱 4 h 后改加完全培养基继续培养 hBMSCs。

目的基因在 hBMSCs 中表达的检测 将腺病毒载体、杆状病毒载体及质粒载体转导 2 d 后的 hBMSCs 和腺相关病毒载体转导 4 d 后 hBMSCs 置于倒置荧光显微镜下, 采用蓝光激发观察、摄像, 发蓝色荧光的细胞定义为阳性细胞。将腺病毒载体、杆状病毒载体及质粒载体转导 2 d 后 hBMSCs 和腺相关病毒载体转导 4 d 后 hBMSCs 分别用 PBS 洗 2 遍, 0.25% 胰酶消化, 将细胞移至离心管中 1 000 r/min 离心 6 min, 用 0.5 ml 含 5% 牛血清蛋白的 PBS 重新悬浮, 并吹散为单细胞悬液后使用流式细胞仪检测各基因载体的转导效率, 用 Cell-Quest 软件对结果进行分析。每个细胞样品约 $(4 \sim 5) \times 10^5$ 个细胞, 以未经病毒载

体或质粒载体转导 hBMSCs 为阴性对照组。

统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件, LSD 检验进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

结 果

hBMSCs 培养及扩增情况 种植于 25 cm² 培养瓶中的 hBMSCs, 3 d 后换液时即可见部分贴壁生长的梭形细胞; 7 ~ 10 d 时, 瓶内细胞可长至 80% 以上, 传代后细胞增殖较快, 约 2 d 即可增殖 1 倍, 经 3 代以上传代后细胞呈现较均一的梭形, 漩涡状或栅栏状生长 (图 1)。流式细胞仪检测显示, P4 代 hBMSCs 表面可表达抗原分子 CD29 和 CD44, 不表达抗原分子 CD34 和 CD45 (图 2)。

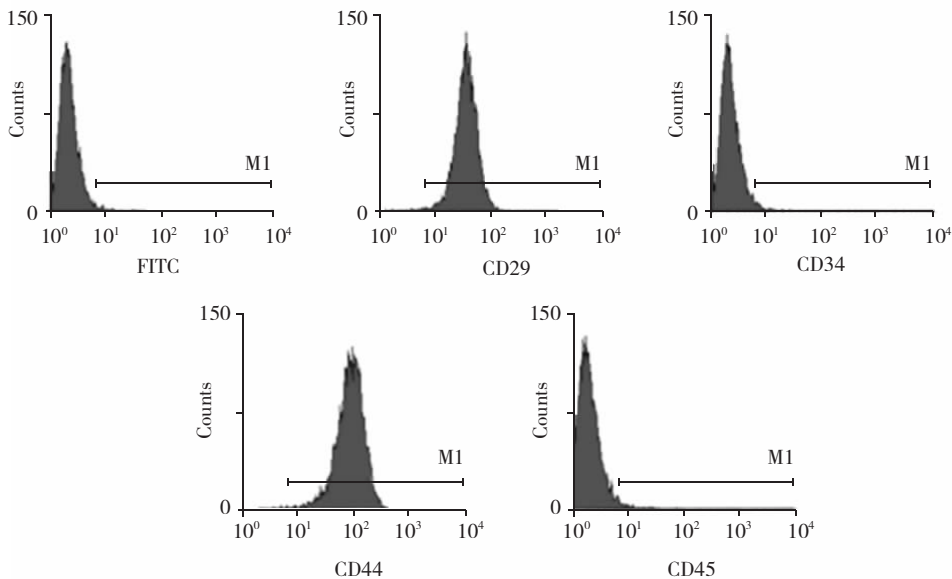


图 2 P4 代 hBMSCs 的表面抗原鉴定

Fig 2 Identification of the surface antigens of P4 hBMSCs

FITC: 阴性对照; CD29 和 CD44: 阳性; CD34 和 CD45: 阴性

FITC: negative control; CD29 and CD44: positive; CD34 and CD45: negative

基因载体转导 hBMSCs 结果 经 293 细胞扩增的腺病毒载体滴度可达 10^8 v. g/ml。倒置荧光显微镜观察结果显示, 经腺病毒载体、腺相关病毒载体和杆状病毒载体转导 2 d 后的 hBMSCs, 普光下未见有细胞漂浮死亡、变形老化等现象, 其增殖速度与未转导组细胞无明显差别; 经质粒转染 2 d 后 hBMSCs, 普光下可见部分漂浮死亡细胞, 细胞形态变化不明显, 细胞增殖能力略低于未转染质粒对照组 (图 3)。

基因载体转染 hBMSCs 后目的蛋白表达情况

倒置荧光显微镜及蓝光激发观察、摄像结果显示, 腺病毒载体、腺相关病毒载体及质粒载体转染后的 hBMSCs, 发绿色荧光蛋白的细胞数量不多, 且发光细胞的荧光强度不高; 杆状病毒转导的 hBMSCs, 发绿色荧光蛋白的细胞数量相对较多, 且发光细胞的荧光强度亦较强 (图 4)。

基因载体对 hBMSCs 的转导效率 流式细胞仪检测结果显示, 腺病毒载体、腺相关病毒载体及质粒载体的转导效率和绿色荧光蛋白阳性细胞平均荧

光强度分别是 42%、37%、22% 和 158、115 和 77， $(P < 0.05)$ (图 5)。均明显低于杆状病毒载体的 70% ($P < 0.01$) 和 212

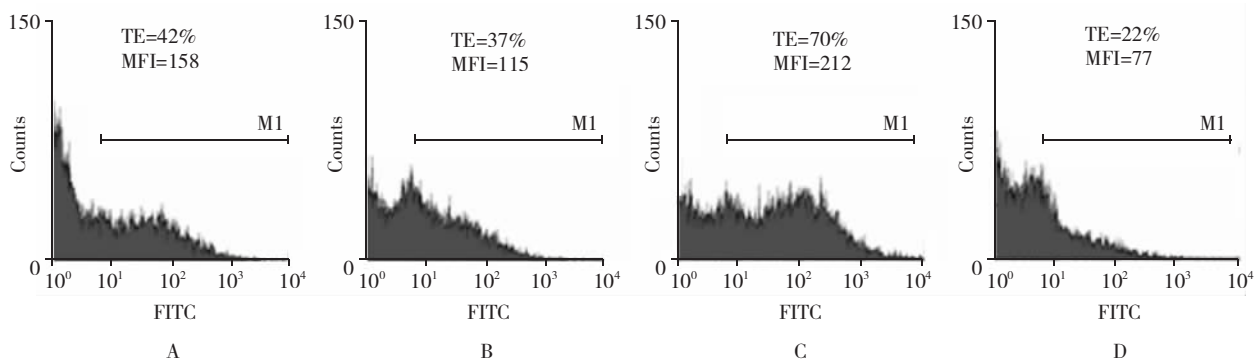


图 5 基因载体对 hBMSCs 的转导效率

Fig 5 Transduction efficiency of gene vectors in hBMSCs

A. 腺病毒载体; B. 腺相关病毒载体; C. 杆状病毒载体; D. 质粒载体; TE: 转导效率; MFI: 平均荧光强度

A. adenovirus; B. adeno-associated virus; C. baculovirus; D. plasmid; TE: transduction efficiency; MFI: mean fluorescence intensity

讨 论

基因载体修饰种子细胞较为关键的一步是能否使目的基因有效进入种子细胞, 其中病毒载体在转导效率方面通常优于非病毒载体。腺病毒载体、腺相关病毒载体及质粒载体是目前基因研究中较为常用的基因载体, 杆状病毒载体则是新近出现的一种基因载体。杆状病毒主要是通过细胞表面受体接触, 经胞吞作用进入哺乳动物细胞内。腺病毒载体、腺相关病毒载体与杆状病毒载体进入细胞的途径类似, 本研究根据 Hsu 等^[5]的方法用杆状病毒载体转导 hBMSCs。质粒转染细胞的方法包括: (1) 化学方法, 如脂质体转染法; (2) 物理方法, 如显微注射法和电穿孔法等^[6]。由于脂质体转染法简便、可靠, 且对靶细胞损伤较小, 是目前质粒转染靶细胞最常用的方法。由于腺病毒载体、杆状病毒载体及环形质粒载体在靶细胞内的表达都具有瞬时性, 即一般目的蛋白在靶细胞内的表达高峰期分别为转导后 2~3 d, 而腺相关病毒载体可以整合到宿主细胞染色体内, 一般目的蛋白表达高峰期分别为转导后 4~6 d^[7], 故本研究分别在基因载体转导后的不同时间段, 用倒置荧光显微镜观察和流式细胞仪检测了 hBMSCs 胞内目的蛋白表达情况。结果显示, 腺病毒载体、腺相关病毒载体及质粒载体转染 hBMSCs 效率较低, 且 GFP 阳性细胞平均荧光强度亦较低; 而杆状病毒载体的转导效率和阳性细胞平均荧光强度均较高, 且在较

高转导效率下, 未见有靶细胞形态变化和漂浮死亡等现象。可见, 与腺病毒载体、腺相关病毒载体及质粒载体相比, 杆状病毒载体不仅可以较有效地将目的基因转入 hBMSCs 并在胞内有效表达目的蛋白, 而且对 hBMSCs 无明显细胞毒性作用。因此, 在今后基因修饰 hBMSCs 研究中, 杆状病毒载体也许是一种更为理想的基因载体。

除能将目的基因有效转入靶细胞外, 重组杆状病毒作为基因载体具有以下优点: (1) 对哺乳动物细胞没有毒性; (2) 在细胞内不可转录及复制; (3) 具有较大载体容量 (38 kb); (4) 不会随机插入细胞染色体内而引起细胞发生突变^[8]。而腺病毒、腺相关病毒及质粒载体则有许多自身条件的限制: (1) 除对靶细胞转导效率较低外, 腺病毒载体容量较小; (2) 腺相关病毒载体容量小, 体外扩增及纯化操作较难; (3) 质粒载体容量亦有限, 且不同质粒载体转染靶细胞后对细胞活性都会有一定影响^[9]。

综上所述, 本研究证实杆状病毒载体对 hBMSCs 的转导效率高于腺病毒载体、腺相关病毒载体及质粒载体, 其作为基因载体又拥有众多自身优点, 是一种更有临床应用价值的新型基因载体。

(本文图 1, 3, 4 见插图第 3 页)

参 考 文 献

- [1] 熊 符, 张 成, 肖少波, 等. Microdystrophin 基因重组腺病毒的构建及转染 mdx 骨髓间充质干细胞的表达 [J].

- 生物工程学报, 2007, 23(1):27-32.
- [2] Kumar S, Mahendra G, Naqy TR, *et al.* Osteogenic differentiation of recombinant adeno-associated virus 2-transduced murine mesenchymal stem cells and development of an immunocompetent mouse model for *ex vivo* osteoporosis gene therapy [J]. *Hum Gene Ther*, 2004, 15(12):1197-1206.
- [3] Ho YC, Chung YC, Hwang SM, *et al.* Transgene expression and differentiation of baculovirus-transduced human mesenchymal stem cells [J]. *J Gene Med*, 2005, 7(7):860-868.
- [4] Jo J, Naqaya N, Miyahara Y, *et al.* Transplantation of genetically engineered mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with myocardial infarction; benefit of a novel nonviral vector, cationized dextran [J]. *Tissue Eng*, 2007, 13(2):313-322.
- [5] Hsu CS, Ho YC, Wang KC, *et al.* Investigation of optimal transduction conditions for baculovirus-mediated gene delivery into mammalian cells [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2004, 88(1):42-51.
- [6] Partridge KA, Oreffo RO. Gene delivery in bone tissue engineering: progress and prospects using viral and nonviral strategies [J]. *Tissue Eng*, 2004, 10(1-2):295-307.
- [7] Zhang XJ, Godbey WT. Viral vectors for gene delivery in tissue engineering [J]. *Advan Drug Deliv Revi*, 2006, 58(4):515-534.
- [8] Sandig V, Hofmann C, Steinert S, *et al.* Gene transfer into hepatocytes and human liver tissue by baculovirus vectors [J]. *Hum Gene Ther*, 1996, 7(16):1937-1945.
- [9] Verma IM, Somia N. Gene therapy-promises, problems and prospects [J]. *Nature*, 1997, 389(6648):239-242.

(2008-03-24 收稿)