

# 慢病毒载体介导成纤维细胞高效稳定表达 绿色荧光蛋白

曹鸿国<sup>1,2</sup>, 李运生<sup>1</sup>, 曲秀霞<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>安徽农业大学动物科技学院, 安徽合肥 230036; <sup>2</sup>北京大学生命科学学院, 北京 100871)

**摘要:** 试验尝试建立稳定表达外源基因的人成纤维细胞系。取成年男性包皮皮肤的皮下组织, 分离培养人皮肤成纤维细胞, 分别采用脂质体和慢病毒载体介导转染人皮肤成纤维细胞表达绿色荧光蛋白。结果显示, 来自成年人包皮皮下组织的成纤维细胞呈梭形, 具有快速的增殖和稳定的生长性能。脂质体介导转染的人皮肤成纤维细胞绿色荧光蛋白表达不稳定, 阳性细胞表达率低, 转染后的人成纤维细胞变得更为细长, 细胞生长速度降低。慢病毒载体介导人皮肤成纤维细胞高效稳定表达绿色荧光蛋白, 转染后细胞生长性能和形态没有变化, 经过多次传代和冻存复苏对人皮肤成纤维细胞绿色荧光蛋白的表达没有影响, 通过流式细胞仪对慢病毒介导表达绿色荧光蛋白的人皮肤成纤维细胞检测显示, 绿色荧光蛋白表达阳性率为 99.85%, 并且表达绿色荧光蛋白的人皮肤成纤维细胞细胞均一程度为 76.05%。试验证实了慢病毒载体能够高效稳定介导人皮肤成纤维细胞表达绿色荧光蛋白。

**关键词:** 慢病毒载体; 成纤维细胞; 绿色荧光蛋白

**中图分类号:** Q813.1+1 **文献标识码:** A

## Expression of EGFP Gene in Fibroblasts Mediated by Lentiviral Vector

Cao Hongguo<sup>1,2</sup>, Li Yunsheng<sup>1</sup>, Qu Xiuxia<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

<sup>2</sup>College of Life Science, Peking University, Beijing 100086)

**Abstract:** In order to study dedifferentiation and cell orientation in the body of human adult cell, adult human fibroblast lines that stably expressed exterior gene were established. Adult male foreskin subcutaneous tissues apart from epidermis and hypodermis were taken by surgery operation and human foreskin fibroblasts were isolated and cultured, then enhanced green fluorescence protein (EGFP) in human fibroblasts were expressed by lipofectamine and lentiviral vectors, respectively. Results showed that human fibroblasts had shuttle-like image and stable growth characteristics. EGFP was unsteadily expressed in human fibroblasts, positive cells in total fibroblasts were very low, human fibroblasts became thinner and had slower growth characteristic after transfected by lipofectamine. In contrast, EGFP was steadily expressed in human fibroblasts, positive cells in total fibroblasts was very high, and fibroblasts had rapid proliferation and stable growth characteristics that were not affected by continuous cell passage and cell frozen-thawed after transfected by lentiviral vectors. In addition, EGFP positive fibroblasts in total cells were 99.85% and homogeneous fibroblasts in total cells were 76.05% by flowcytometer assay. It is showed that expression of EGFP gene in human fibroblasts mediated by lentiviral vector was high efficient and stable.

**Key words:** lentiviral vector, fibroblast, enhanced green fluorescence protein

**基金项目:** 国家 973 项目 (2001CB510106) 资助。

**第一作者简介:** 曹鸿国, 男, 1975 年出生, 博士, 主要从事细胞工程方面的研究。通信地址: 230036 安徽合肥安徽农业大学动物科技学院。E-mail: caohongguo1@yahoo.com.cn。

**收稿日期:** 2008-04-08, **修回日期:** 2008-05-08。

胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES)是一种具有多能性的干细胞群体,为人类再生医学种子细胞的来源库,诱导体细胞重构为多能性干细胞有效避免了免疫排斥和伦理问题,目前已成为人类再生医学研究的热点。人类包皮组织材料具有取材方便,来源广泛等优点,最近研究发现来源于人包皮组织的上皮细胞呈现毛囊干细胞特征<sup>[1]</sup>,人体包皮组织的成纤维细胞具有干细胞的多能性,在常规细胞培养条件下维持干细胞的多能性,并且在体外诱导条件下可以诱导分化为脂肪细胞、软骨细胞等多种类型的细胞<sup>[2]</sup>。最近研究显示对于来自人体的成纤维细胞通过逆转录病毒载体介导转染 *Oct4*, *Nanog*, *Sox2* 和 *Lin28<sup>B1</sup>* 或 *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* 和 *c-Myc*<sup>[3,4]</sup> 种基因,表达外源基因的人成纤维细胞呈现出人 ES 细胞扁平集落形态、表达人 ES 细胞干细胞标记、体外分能够分化多种其它类型细胞、在小鼠体内形成畸胎瘤等多种 ES 细胞特征。慢病毒载体作为一类重组逆转录病毒载体,目前已成为一种重要的基因转移工具被应用于基因导入和细胞分子生物学研究领域。慢病毒载体在转基因生产中具有高效稳定等特点,目前在 ES 细胞的研究中逐渐被广泛应用。本次试验通过分离培养来自成年个体包皮组织的成纤维细胞,慢病毒介导成纤维细胞表达增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)的研究,为诱导人皮肤成纤维细胞来源的多能性干细胞及追踪细胞定位奠定基础 and 平台。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验时间、地点

2005年9月—2006年5月在北京大学医学部实验动物中心进行相关试验。

### 1.2 人皮肤成纤维细胞的分离培养

成年男性包皮部位皮肤取自临床进行包皮切割个体,手术试验材料为北京大学第三医院提供。取新鲜的成年包皮皮肤材料,75%酒精短时间浸泡消毒,无菌 PBS 液洗涤,用小剪刀剪下包皮皮肤皮下组织,不用结构致密的表皮和真皮,把剪下的包皮皮肤皮下组织用小剪刀仔细剪成小组织块。取新鲜的培养液把 6cm 培养皿底部事先用培养液浸润,培养液为含 20%胎牛血清的高糖 DMEM 培养液,用小镊子把组织块均匀地放置于培养皿底部,吸出培养皿内多余的培养液,然后翻转倒置培养皿,37℃培养箱中培养。2~3h 后,添加新鲜的培养液,37℃培养箱中培养,2d 后去除没有贴壁的组织块继续培养,待组织块中长出的细胞长满培养皿后,0.25%胰酶消化传代。

### 1.3 人成纤维细胞生长曲线的测定

取第 4 代人皮肤成纤维细胞用胰酶消化传代并进行计数。按  $2 \times 10^4$ /ml 接种人皮肤成纤维细胞于 24 孔培养板中,间隔 24h,每天同一时间计数 1 次,每次 3 孔,每孔计数 3 次,连续对人皮肤成纤维细胞进行计数 7d。

### 1.4 脂质体转染人皮肤成纤维细胞表达 EGFP

脂质体转染 EGFP 于人皮肤成纤维细胞,转染前 EGFP-N1 质粒被限制性内切酶 *ApaI* 进行酶切线性化,回收酶切后的线性化 EGFP-N1 质粒,用脂质体转染 EGFP-N1 质粒于人皮肤成纤维细胞,所用脂质体为 Invitrogen 公司 Lipofectamine™ 2000,按照操作说明书进行质粒转染。待转染人皮肤成纤维细胞铺满 90~95%的培养皿时,用灭菌去离子水分别稀释线性化 EGFP-N1 质粒和脂质体,室温孵育。将脂质体同质粒液体进行混合,轻轻吹打混匀,室温孵育,然后加入无血清培养基,轻轻吹打混匀,室温孵育。用无血清培养基把人皮肤成纤维细胞洗涤,转移质粒脂质体混合液至人皮肤成纤维细胞上,37℃培养箱中孵育 4~6h。然后更换普通培养液进行培养,24h 后更换含 G418 培养液进行筛选培养。

### 1.5 慢病毒转染人成纤维细胞 EGFP 荧光蛋白

慢病毒介导人皮肤成纤维细胞表达 EGFP,慢病毒载体 PLL3.7 带有 EGFP 报告基因,报告基因启动子为 CMV,载体无抗药性基因。首先在 293T 细胞上包装具有感染能力的病毒,包毒前 20~24h 消化传代 293T 细胞,包毒时 293T 细胞铺满 60%~80%的培养皿。包毒时把 PLL3.7 载体质粒同 VSVG-RSV-REV、p MDLg/p RRE 质粒按比例混合,利用磷酸钙沉淀在 293T 细胞内包装成具有感染活性的病毒颗粒,48h 后收集转染用病毒液,病毒液经过离心浓缩之后,加入到铺满 30%~50%培养皿底部人皮肤成纤维细胞的培养液中,添加 Polybrene 提高转染效率,37℃培养箱中培养。

### 1.6 人成纤维细胞表达 EGFP 的流式细胞仪检测

取慢病毒介导后经过 10 代培养传代表达 EGFP 的人皮肤成纤维细胞,PBS 液多次洗涤,胰酶-EDTA 消化液进行消化,PBS 液洗涤,离心收集细胞沉淀,适量 PBS 液重悬人皮肤成纤维细胞样本,进行流式细胞仪检测分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 人皮肤成纤维细胞的形态

来自成年人包皮皮肤的成纤维细胞经过组织块培养法进行分离传代培养,分离培养的人包皮皮肤成纤维细胞呈梭形,细胞形态一致,没有上皮样铺路石状

细胞长出。分离培养的细胞具有快速的生长增殖特性,可以稳定传代,在 1:2 进行传代的情况下,人皮肤成纤维细胞每隔 3~4d 时进行传代 1 次,生长中人皮肤成纤维细胞形态较为铺展,随着生长密度的增加,细胞铺满培养皿后细胞逐步变得细长,呈现典型的

梭形形态。经过反复冻存复苏后的人皮肤成纤维细胞在培养传代过程中生长特性基本不受影响,具有稳定地生长培养性能,分离培养的人皮肤成纤维细胞在连续进行传至 20 代的情况下,细胞的形态和生长特性不受传代的影响(图1)。

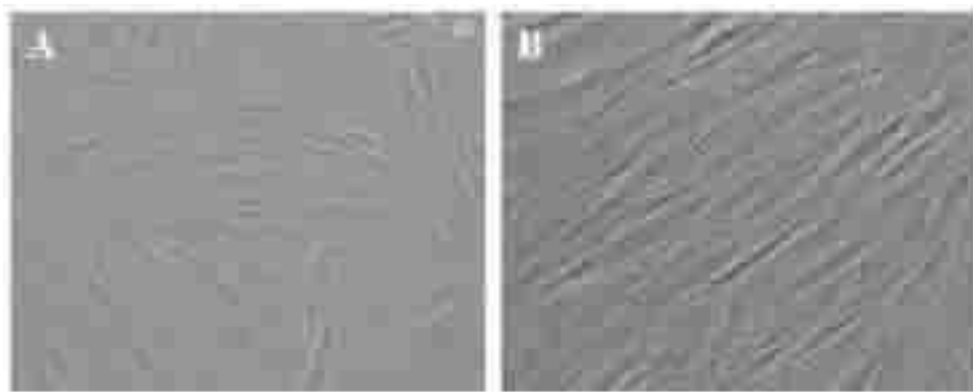


图 1 人皮肤成纤维细胞形态(100×)

注:A. 生长中的人皮肤成纤维细胞;B. 铺满培养皿的人皮肤成纤维细胞。

## 2.2 人皮肤成纤维细胞的生长特点

对第 4 代人皮肤成纤维细胞进行消化计数,在相同的计数条件下细胞生长的第 1 天细胞数为  $2.10 \times 10^4/\text{ml}$ ,细胞数增长缓慢。在第 2、3 天时细胞数分别为  $2.38 \times 10^4/\text{ml}$  和  $3.44 \times 10^4/\text{ml}$ ,细胞出现较为平缓的增

长。在第 4、5 天时细胞增长较为迅速,分别为  $6.94 \times 10^4/\text{ml}$  和  $9.15 \times 10^4/\text{ml}$ 。在生长的第 6、7 天时细胞增长速度较为平稳,细胞数分别为  $9.22 \times 10^4/\text{ml}$  和  $9.29 \times 10^4/\text{ml}$ 。经过一周的人皮肤成纤维细胞生长计数检测,人皮肤成纤维细胞的生长趋势呈现“S”型特征(图 2)。

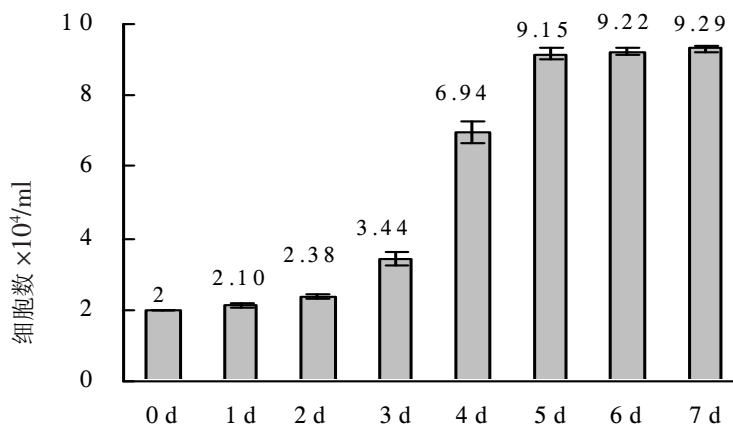


图 2 人皮肤成纤维细胞的生长特点

## 2.3 脂质体介导转染人成纤维细胞表达 EGFP

按照脂质体介导转染人皮肤成纤维细胞表达 EGFP 操作要求,人皮肤成纤维细胞在转染操作 24h 后,细胞变得更为细长。48h 时在荧光显微镜下可见到少数人皮肤成纤维细胞表达 EGFP,荧光蛋白的表达强度有一定的差异,细胞形态细长。经过 1 周的 G418 筛选培养人皮肤成纤维细胞大量脱落,荧光显微镜下表达 EGFP 的人皮肤成纤维细胞数量越来越少,在 48h 时部分表达 EGFP 的人皮肤成纤维细胞经过 1 周的筛选培养,荧光表达减弱或消失,在 G418 的作用下细胞脱落死亡,结果证实了脂质体介

导的人皮肤成纤维细胞表达 EGFP 为瞬时不稳定表达(图 3)。

## 2.4 慢病毒载体介导转染人成纤维细胞表达 EGFP

经过慢病毒载体介导的人皮肤成纤维细胞稳定高效地表达 EGFP,在荧光显微镜下人皮肤成纤维细胞荧光蛋白表达较强,荧光强度均一稳定。对转染表达 EGFP 的人皮肤成纤维细胞进行多次消化传代或冻存复苏培养,EGFP 在人皮肤成纤维细胞的荧光表达强度和表达效率没有变化。表达 EGFP 的人皮肤成纤维细胞生长性能稳定,仍保持原有的生长形态和生长速度(图 4)。

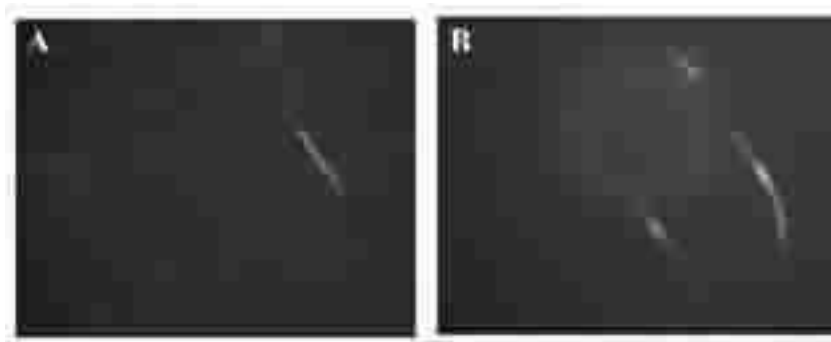


图3 脂质体转染的EGFP阳性人皮肤成纤维细胞(100×)

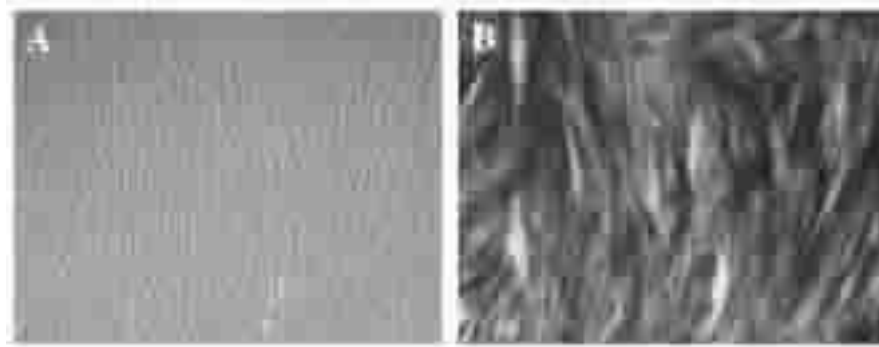


图4 慢病毒转染的EGFP阳性人皮肤成纤维细胞(100×)

注:A. EGFP 阳性人皮肤成纤维细胞;B. 荧光显微镜下表达 EGFP 的人皮肤成纤维细胞。

### 2.5 流式细胞仪对人皮肤成纤维细胞 EGFP 的检测分析

慢病毒载体介导的人皮肤成纤维细胞高效稳定表达 EGFP, 在转染后 48h 人皮肤成纤维细胞形态为纤维状, 没有出现细胞脱落和细胞更为细长的现象, 细胞的形态和生长速度不受慢病毒载体介导转染的影响。

对慢病毒介导转染过 EGFP 细胞进行消化传代, 经过多次消化传代后, 用流式细胞仪对人皮肤成纤维细胞的 EGFP 的表达状况进行检测, 检测结果显示, EGFP 阳性人皮肤成纤维细胞的形态特征为颗粒大小均匀, 细胞均一度为 76.05%, 皮肤成纤维细胞高效稳定强表达 EGFP, 细胞 EGFP 阳性率为 99.85%(图 5)。

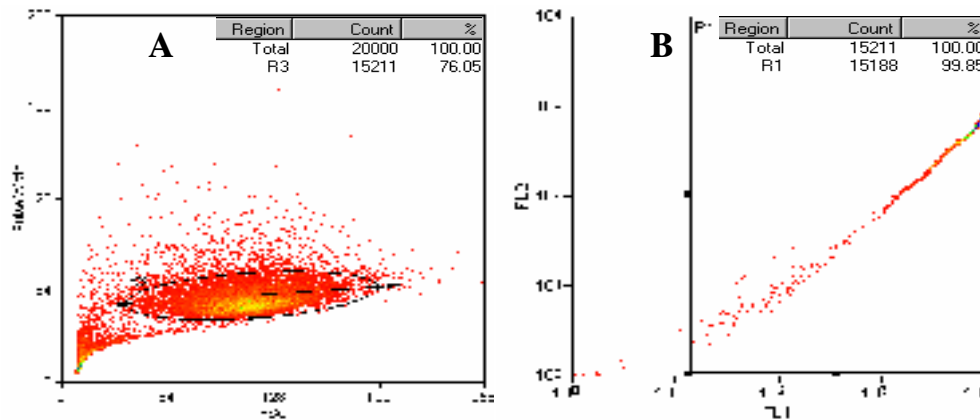


图5 EGFP 阳性人皮肤成纤维细胞流式细胞仪检测

注:A. EGFP 阳性人皮肤成纤维细胞细胞大小均一程度分析;B. 人皮肤成纤维细胞 EGFP 阳性程度表达分析。

### 3 讨论

干细胞是目前生命科学研究的重点, 多能性干细胞拥有强大的可塑性, 在体外可以诱导分化成包括生殖细胞在内的多种机体组成细胞, 因此如何产生来源于病人的多能性干细胞是生命科学研究的热点。最近的研究发现通过逆转录病毒载体介导在成年机体的皮肤细胞中导入外源基因, 诱导产生的细胞具有干细胞

特征, 在体外培养条件下形成 ES 细胞的集落形态, 表达 ES 细胞的表面标记, 在小鼠体内可以形成畸胎瘤。逆转录病毒载体作为目前介导目的基因转入体细胞中的一种高效转基因手段, 具有方便、快捷、高效和稳定转染等优点。2006 年人类第一次利用逆转录病毒介导小鼠皮肤成纤维细胞表达 *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* 和 *c-Myc*, 表达这些外源基因的小鼠成纤维细胞呈现小鼠 ES 细

细胞的形态和特征<sup>[5]</sup>。最近的研究证实了人体成纤维细胞通过逆转录病毒载体介导表达 *Oct4*, *Nanog*, *Sox2* 和 *Lin28*<sup>[3]</sup> 或 *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* 和 *c-Myc*<sup>[4]</sup> 种基因, 高效表达外源基因的人成纤维细胞呈现出人 ES 细胞扁平集落形态、表达人 ES 细胞干细胞标记、体外分能够分化多种其它类型细胞、在小鼠体内形成畸胎瘤等多种人 ES 细胞特征。慢病毒 (Lentivirus) 是逆转录病毒家族的成员, 病毒能够利用自身组分将外源基因整合入宿主细胞基因组 DNA 中, 从而使外源基因随着宿主细胞的分裂增殖和传代而稳定表达。本次试验通过利用慢病毒载体介导 EGFP 在人皮肤成纤维细胞中表达, 为导入外源基因如 *Oct4*、*Sox2*、*Nanog* 等诱导成体细胞去分化为多能性干细胞的研究奠定基础。在本次研究中发现, 脂质体介导 EGFP 在人成纤维细胞中的表达效率很低, 并且 EGFP 在人成纤维细胞表达为瞬时不稳定表达。另外, 由于脂质体介导基因转染过程中无血清培养液的应用, 影响人成纤维细胞的生长状态。在相同培养环境条件下, 慢病毒载体可以介导人成纤维细胞高效稳定表达 EGFP, EGFP 在人成纤维细胞中的表达率为 99.85%, 从而证实了慢病毒对于人体原代细胞的强大导入外源基因功能。

人包皮材料具有取材方便, 来源广泛, 对供体损害较小, 目前已成为人体皮肤材料的主要来源之一。人包皮组织的成纤维细胞具有多种功能, 研究发现来源于人包皮组织的成纤维细胞在小鼠 ES 细胞的培养过程中作为小鼠 ES 细胞的饲养层, 在培养液中不添加 LIF 的情况下维持小鼠 ES 细胞的干细胞特征<sup>[6]</sup>。来源于人包皮组织的皮肤成纤维细胞用作人 ES 细胞的饲养层, 可以较好地维持人 ES 细胞的干细胞特征, 有效地维持人 ES 细胞的未分化状态<sup>[7-9]</sup>。另外, 人包皮组织的成纤维细胞具有干细胞的多能性, 在常规的细胞培养条件下可以稳定传代, 能够保持干细胞的多能性, 并且在体外诱导条件下可以诱导分化为脂肪细胞、软骨细胞等多种类型的细胞, 表现出干细胞的可塑性<sup>[2]</sup>。通过慢病毒介导 EGFP 在人包皮成纤维细胞中的表达, 为追踪定位诱导分化的人包皮成纤维细胞奠定基础。EGFP 是一种在荧光激发下能直接发出绿色荧光的蛋白质, 利用 EGFP 标记细胞, 通过对 EGFP 标记的细胞进行实时观察, 追踪标记细胞在宿主中的嵌合特征和发育规律具有十分重要的意义。另外, 早期胚胎微环境对成体细胞具有重编程作用, Kulesa 等对人恶性黑色素瘤细胞进行 EGFP 标记, 发现早期鸡胚的微环境可以把注射到鸡胚中的人恶性黑色素瘤细胞成功转变成正常色素细胞<sup>[10]</sup>, 证实了胚胎微环境的重构能力及癌

细胞在胚胎微环境条件下能够发生去分化和再分化。Zeng 等采用子宫内注射技术, 将标记的人脐血造血干细胞注入山羊胚胎中形成嵌合体山羊, 在分娩出的山羊多个器官组织中检测到人脐血造血干细胞的植入和分化成山羊机体组成细胞<sup>[11]</sup>, 进一步证明了细胞生长的微环境可以决定甚至改变细胞的命运。本次试验通过对人体成纤维细胞进行 EGFP 标记为深入研究早期胚胎微环境中人成体细胞重构去分化奠定基础。

本次试验通过人包皮组织成纤维细胞的分离培养和建立慢病毒介导高效表达 EGFP 的人成纤维细胞系, 从而为深入研究人成体细胞的重构去分化为多能性干细胞及追踪 EGFP 标记人体细胞定位奠定基础。

### 参考文献

- [1] Terunuma A, Cross J W, Dyke M, et al. Behavior of Human Foreskin Keratinocytes Expressing a Hair Follicle Stem Cell Marker CD200 [J]. *J Invest Dermatol*, 2008, 128(5): 1332-1334.
- [2] Chen F G, Zhang W J, Bi D, et al. Clonal analysis of nestin(-) vimentin (+) multipotent fibroblasts isolated from human dermis [J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 16): 2875-2883.
- [3] Yu J, Vodyanik M A, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells [J]. *Science*, 2007, 318(5858): 1917-1920.
- [4] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors [J]. *Cell*, 2007, 131(5): 861-872.
- [5] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. *Cell*, 2006, 126(4): 663-676.
- [6] Meng G L, Zur Nieden N I, Liu S Y, et al. Properties of murine embryonic stem cells maintained on human foreskin fibroblasts without LIF [J]. *Mol Reprod Dev*, 2008, 75(4): 614-622.
- [7] Amit M, Margulets V, Segev H, et al. Human feeder layers for human embryonic stem cells [J]. *Biol Reprod*, 2003, 68(6): 2150-2156.
- [8] Inzunza J, Gertow K, Strömberg M A, et al. Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells [J]. *Stem Cells*, 2005, 23(4): 544-549.
- [9] Valbuena D, Galán A, Sánchez E, et al. Derivation and characterization of three new Spanish human embryonic stem cell lines (VAL-3-4-5) on human feeder and in serum-free conditions [J]. *Reprod Biomed*, 2006, 13(6): 875-886.
- [10] Kulesa P M, Kasemeier-Kulesa J C, Teddy J M, et al. Reprogramming metastatic melanoma cells to assume a neural crest cell-like phenotype in an embryonic microenvironment [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(10): 3752-3757.
- [11] Zeng F, Chen M J, Baldwin D A, et al. Multiorgan engraftment and differentiation of human cord blood CD34+ Lin- cells in goats assessed by gene expression profiling [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(20): 7801-7806.