

# 人白细胞介素 1 受体拮抗剂基因转染人颞颌关节软骨细胞的实验研究

李逸松 田卫东 王 栋 李声伟 陈希哲

**【摘要】** 目的 研究人白细胞介素 1 受体拮抗剂(hIL-1ra)基因转染人颞颌关节软骨细胞的方法和表达。方法 分离培养人颞颌关节软骨细胞,将 hIL-1ra 基因以阳离子脂质体 Lipofectine 介导进行基因转染,免疫细胞化学染色和 ELISA 法检测转染细胞中 hIL-1ra 蛋白的表达。结果 使用阳离子脂质体介导 hIL-1ra 基因转染人颞颌关节软骨细胞,免疫细胞化学染色 hIL-1ra 蛋白呈阳性表达,瞬时转染和稳定转染时,转染细胞胞浆内和培养基上清液中均有目的基因的表达,与未经转染的对照组存在显著性差异( $P < 0.01$ )。结论 体外实验证实脂质体介导 hIL-1ra 基因转染方法切实可行,为今后颞颌关节骨关节病的基因治疗提供了依据。

**【关键词】** 软骨细胞; 人白细胞介素 1 受体拮抗剂; 颞颌关节; 骨关节病; 基因转染

## An Experimental Study on Gene Transfection of Human Interleukin-1 Receptor Antagonist Gene into Chondrocytes of Temporomandibular Joint

LI Yisong, TIAN Weidong, WANG Dong, et al. (Department of Oral and Maxillofacial Surgery, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041 China)

**【Abstract】 Objective** The purpose of this study was to investigate methods and expression of the recombinant human interleukin-1 receptor antagonist gene transfected into chondrocytes of temporomandibular joints (TMJ). **Methods** Chondrocytes derived from the TMJ of 5~7 months old human fetus were transfected by recombinant human interleukin-1 receptor antagonist gene via cationic liposome (Lipofectine) as a medium. The expressing level of hIL-1ra protein was detected using immunocytochemistry and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The positive results of the immunocytochemistry were found. The positive expression was detected in the cell plasma and the cell culture supernatant, and there was significant difference between the cells with and without gene transfection ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** This feasible method provides experimented evidence for the future gene therapy of temporomandibular joint osteoarthritis.

**【Key words】** chondrocyte; human interleukin-1 receptor antagonist; temporomandibular joint; osteoarthritis; gene transfection

颞颌关节骨关节病(temporomandibular joint osteoarthritis, TMJOA)是一种以关节软骨的进行性耗损为特征的关节退行性疾病,是口腔颌面外科的一种常见病和多发病。目前临床采用的局部药物注射治疗和手术治疗的方法,效果均不能令人满意。实验证明,白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)具有促进软骨基质降解和关节软骨破坏的功能,对 TMJOA 发生发展起着重要的作用<sup>1</sup>。白细胞介素 1 受体拮抗剂(interleukin-1 receptor antagonist, IL-1ra)是 IL-1 的天然拮抗剂,是从单核细胞中纯化出来的一种分子量约 23~25 kD 的糖基化蛋白,能与 IL-1 竞争性地结合 IL-1 受

体,阻断 IL-1 的作用,其结合不引发任何机体不良反应<sup>2</sup>。因此,通过特定载体,将人白细胞介素 1 受体拮抗剂(hIL-1ra)基因转移到颞颌关节中,使该基因在关节内长期稳定地大量表达,产生 hIL-1ra 蛋白可以阻断病理状态下产生的 IL-1 的破坏作用,从而减轻 TMJOA 患者的临床症状,将有益于 TMJOA 的治疗。本实验用阳离子脂质体 Lipofectine 介导 hIL-1ra 基因转染人颞颌关节软骨细胞,旨在研究这种方法的可行性,以期对 TMJOA 的基因治疗提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料和仪器

型胶原酶及胰蛋白酶(Sigma 公司,美国),DMEM 培养基及 G418(Gibco 公司,美国),脂质体转染试剂 Lipofectine (Invitrogen 公司,美国),6 孔培养板(Falcon 公司,美国),IL-1ra 山羊抗人单克隆抗体(Santa Cruz 公司,美国),ELISA 试剂盒(Bio-

本课题为国家教育部回国人员启动基金(编号 363)及四川省青年基金(编号 387)资助项目

作者单位:610041 四川大学华西口腔医学院口腔颌面外科学教研室

source 公司,比利时),感受态大肠杆菌 JM109 (TaKaRa Biotechnology Co. Ltd,美国),质粒抽提试剂盒(上海华舜生物工程有限公司),hIL-1ra 基因由四川大学华西口腔医学院田薇博士构建并惠赠。

NUAIRE 超净工作台 (Nuair 公司,美国),倒置相差显微镜 (Olympus 公司,日本),HTS7000 Plus 微型紫外荧光/可见光高效分析仪 (PE 公司,美国)。

## 1.2 实验方法

1.2.1 hIL-1ra 基因质粒扩增方法 参照《分子克隆实验指南》<sup>3</sup>,制备感受态大肠杆菌 JM109,先将质粒转化,酶切,小量提取鉴定。然后大量抽提质粒,纯化,测定  $OD_{260}/OD_{280}$  在 1.8~2.0 之间,-20 储存备用。

1.2.2 人颞颌关节软骨细胞的分离培养 取自自愿节育的 5~7 月龄经水囊引产的胚胎,参照文献方法<sup>4</sup>,于无菌条件下切取胚胎双侧颞颌关节髁状突软骨,机械分离至  $1\text{ mm}^3$  大小,加入 4~5 倍量的 0.25% 胰蛋白酶,于 37 消化 30 min,换用 4~5 倍量的 0.2% 型胶原酶,37 消化 3~5 h,收集细胞悬液,置于 37,5%  $\text{CO}_2$  恒温培养箱中培养。

1.2.3 阳离子脂质体介导 hIL-1ra 基因转染人颞颌关节软骨细胞 将人颞颌关节软骨细胞原代培养第二代的细胞接种至 6 孔板中,24 h 后细胞汇集达 60%~70% 时即可进行转染。按照 Lipofectine 说明书中贴壁细胞转染法,以脂质体/DNA 比例 ( $\mu\text{l}/\mu\text{g}$ ) 2:1 混合复合物,进行转染,对照组不加入转染复合物。定时在倒置显微镜下观察细胞转染情况,3~4 h 后终止转染,加入含小牛血清的 DMEM 培养基,在 37,5%  $\text{CO}_2$  恒温培养箱中继续培养。48 h 后,收获瞬时转染的细胞悬液及上清液,-20 冻存。部分细胞更换含 0.5 mg/ml G418 的培养液进行筛选,待对照组的细胞绝大部分死亡时,将 G418 浓度降为 0.2 mg/ml 继续培养,适时收获稳定转染的细胞悬液及上清液,-20 冻存。细胞悬液经反复冻融 3~4 次,形成细胞冻融液。

1.2.4 转染细胞免疫细胞化学染色 预先放置盖玻片于 6 孔板中,接种软骨细胞制成细胞爬片,按上述方法进行转染。继续培养 48 h 后,取出细胞爬片,丙酮固定 5~10 min,用 LsAB 免疫细胞化学染色法染色,一抗为 IL-1ra 羊抗人单克隆抗体,二抗为生物素标记兔抗羊抗体,在显微镜下进行观察并照相记录,以未经转染的细胞为对照。

1.2.5 转染细胞中 hIL-1ra 蛋白表达量的测定 用双抗体夹心 ELISA 法,按试剂盒说明书操作,检测细胞冻融液和细胞培养液中 hIL-1ra 蛋白的含量。

## 1.3 统计学分析

转染和未转染的细胞冻融液和细胞培养液中 hIL-1ra 蛋白的含量数值用 SPSS10.0 统计软件包进行配对 *t* 检验。

## 2 结 果

### 2.1 脂质体介导的基因转染

在转染过程中,镜下可见细胞发生形态及结构上的破坏,如细胞变形、皱缩、折光性下降,细胞液中可

见黑色的细胞碎屑。在对转染细胞进行筛选时,对照组细胞及不稳定转染的细胞因不能抵抗 G418 的筛选作用,在 7~10 d 内死亡,而稳定转染的细胞由于染色体上具有源自质粒的 neo 基因,可对抗 G418 的毒性,因而逐步形成抗性细胞克隆,其生长速度较正常细胞缓慢。

### 2.2 hIL-1ra 基因在转染细胞胞浆中的表达

免疫细胞化学染色观察,转染细胞中见胞浆内分布着棕黄色颗粒的阳性结果(见图 1),未转染的细胞则呈阴性结果。



图 1 转染 hIL-1ra 基因后,软骨细胞中出现了棕黄色产物 LsAB  $\times 200$

Fig 1 The brown IL-1ra protein appeared in the cells transfected LsAB  $\times 200$

### 2.3 hIL-1ra 蛋白表达量的检测

ELISA 测定转染和未转染的细胞冻融液和细胞培养液中 hIL-1ra 蛋白的含量见表 1,转染组细胞培养液和细胞冻融液中 hIL-1ra 蛋白表达量均显著高于对照组 ( $P < 0.01$ )。

表 1 经 hIL-1ra 基因转染的 TMJ 软骨细胞中 hIL-1ra 蛋白表达量测定结果 ( $\bar{x} \pm s$ , pg/ml,  $n = 4$ )

Tab 1 The expressing level of hIL-1ra protein in the transfected cell ( $\bar{x} \pm s$ , pg/ml,  $n = 4$ )

组别	转染细胞组	未转染细胞组
瞬时转染细胞上清液	233.743 $\pm$ 13.594	0 *
瞬时转染细胞冻融液	1113.040 $\pm$ 30.398	0 *
稳定转染细胞上清液	74.813 $\pm$ 2.375	0 *
稳定转染细胞冻融液	1051.829 $\pm$ 19.859	0 *

\* 由于其含量过低,ELISA 法检测认定为“0”值

## 3 讨 论

TMJOA 是临床的一种常见疾病,多发生于中老年患者,表现为关节软骨的耗损破坏,骨赘形成,滑膜炎症及软骨下骨的改建等,是一系列生化因素和机械因素共同作用的结果<sup>5</sup>。研究<sup>6</sup>表明,一些细胞因子和生长因子在关节软骨和滑膜的正常结构及功能的维持方面起着重要作用,其中 IL-1 可通过 IL-6 介导

抑制软骨细胞蛋白多糖的合成,促进基质微分子降解及金属蛋白酶的合成,从而导致基质降解,软骨破坏等。所以,消除 IL-1 对关节软骨的破坏作用,对于减轻 TMJOA 的临床症状及促进其治疗是非常有效的。

TMJOA 的传统治疗方法,虽均有一定效果,但各有其局限性:手术治疗则不能解决关节软骨的生理性修复问题,也不能改变关节软骨随病程发展被进一步破坏的结局;全身用药,到达关节腔的药物量少,而全身的器官组织均暴露于药物的副作用下;关节腔内直接注射药物如 IL-1 拮抗剂蛋白等,虽可取得一定疗效,但药物会很快被降解清除,存在着疗效持续时间的限制,反复注射不但药物价格昂贵,使患者难以承受,而且增加了关节感染的机会。而采用基因治疗,则可以克服以上治疗方法的种种弊端。即通过特定载体介导,用有治疗作用的基因转染 TM 软骨细胞和滑膜细胞,通过基因蛋白表达产物长期持续地拮抗相关致病因子的作用,而达到延缓病程进展,促进组织修复,促进 TMJOA 的预防和治疗的作用。当前,对大骨关节病的基因治疗研究较多,hIL-1ra 离体基因转移实验在国外已进入人类大骨关节疾病治疗的临床试验阶段<sup>7,8</sup>,而对于 TMJOA 的基因治疗还少有报道。本实验采用阳离子脂质体 Lipofectine 介导 hIL-1ra 基因转染人胚颞颌关节软骨细胞,经 G418 筛选获得稳定转染的细胞,经免疫细胞化学染色和 ELISA 法对转染细胞内外 hIL-1ra 蛋白的表达进行了定性及定量的分析研究,表明外源性基因 hIL-1ra 在导入 TM 关节软骨细胞后具有转录和翻译活性,并有一定数量的表达。这些结果表明了以 hIL-1ra 基因作为治疗基因,软骨细胞作为靶细胞,对 TMJOA 进行基因治疗具有良好的应用前景,为进一步的动物实验和临床试验提供了实验依据。

基因治疗中,载体的选择非常重要。目前常用的有两类载体,即病毒载体和非病毒载体。病毒载体转染效率虽高,但安全性有一定缺陷,如使用逆转录病毒可能会产生与病毒相关的毒性作用,包括辅助病毒复制以及发生插入性基因突变;而腺病毒载体使用时间长了会刺激免疫介导的感染细胞破坏,容易诱发炎症反应,导致破坏性的细胞免疫应答<sup>9,10</sup>。目前国外对于骨关节病的基因治疗研究中,较多采用的就是病毒载体进行体外转染,即将治疗基因用病毒载体包裹,转染体外培养的细胞后,再将能表达治疗基因的细胞注射到关节内,以达到基因治疗的目的<sup>5,8,9</sup>。这种方法将有关病毒的操作部分放在体外进行,提高了安全性,且容易控制效果,但步骤多,技术复杂,费用

昂贵,不宜于大量推广应用。非病毒载体转染效率较病毒载体低,但操作简便,相对安全,而且采用体内一步转染方法,可以将治疗基因与载体混和注射到关节腔内,可达到治疗基因在关节内直接表达的目的,所以具有较好的发展前景。本实验所采用的脂质体载体,是目前应用较广泛的一种非病毒载体,其介导机制在于通过脂质体所带的正电荷与带负电荷的质粒 DNA 结合形成复合物,利用与细胞膜相似的磷脂双分子层结构,与细胞膜融合并将 DNA 转入细胞。同其它载体相比,该载体具有制备简单,毒性低,包装容量大,可保护 DNA 免受核酸酶的降解,用它包装的 DNA 在 4 可长期保存而不失活的优点。从本实验来看,通过对影响脂质体转染效率的一些因素:如脂质体和 DNA 浓度比;细胞的生长状况和密度;DNA 的纯度;培养基中的血清和双抗;细胞在脂质体—DNA 复合物中的暴露时间等进行严格控制和充分优化,可以有效地提高脂质体介导的基因转染效率,使其更好地在基因治疗中应用。

### 参考文献

- Hung CL, Galea-Lauri J, Mueller GM, et al. Suppression of intra-articular responses to interleukin-1 by transfer of the interleukin-1 receptor antagonist gene to synovium. *Gene Ther*, 1994, 1(1): 64-69
- 孙柯儿,凌世淦,宋晓国,等. 人白介素 1 受体拮抗剂的 cDNA 克隆和原核表达. *细胞与分子免疫学杂志*, 1998, 14(1): 5-7
- Sanbrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 著. 金冬雁,黎孟枫,译. 分子克隆实验指南. 第 2 版,北京:科学出版社,1992:24-27
- 焦岩涛,王大章,田卫东,等. 人胚颞颌关节软骨细胞培养及生物学特性研究. *华西口腔医学杂志*, 1997, 15(3): 187-189
- Pelletier JP, Caron JP, Evans C, et al. In vivo suppression of early experimental osteoarthritis by interleukin-1 receptor antagonist using gene therapy. *Arthritis Rheum*, 1997, 40(6): 1012-1019
- Williams RO, Feldmann M, Maini RN. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(6): 9784-9789
- Balker AC, Joosten LA, Arntz OJ, et al. Prevention of murine collagen-induced arthritis in the knee and ipsilateral paw by local express of human interleukin-1 receptor antagonist protein in the knee. *Arthritis Rheum*, 1997, 40(5): 893-900
- Evans CH, Robbins PD, Ghivizzani SC, et al. Clinical trial to assess the safety, feasibility, and efficacy of transferring a potentially antiarthritic cytokine gene to human joints with rheumatoid arthritis. *Hum Gene Ther*, 1996, 7(6): 1261
- Cornetta K, Morgan RA, Anderson WF. Safety issues related to retroviral-mediated gene transfer in humans. *Hum Gene Ther*, 1991, 2(1): 5-14
- Yang Y, Nunes FA, Berencsik K, et al. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(8): 4407-4411