[文章编号] 1000-1182(2006)04-0300-03

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基因表达

李逸松[1]，田卫东[2]，李声伟[2]，刘 流[1]，代晓明[1]
(1.昆明医学院第一附属医院 口腔颌面外科，云南 昆明 650032;
2.四川大学华西口腔医院 口腔颌面外科，四川 成都 610041)

[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基因表达情况。方法 hIL-1ra基因以阳离子脂质体介导转染体外培养的人颞颌关节软骨细胞，描记细胞生长曲线，计算细胞群体倍增时间，并采用酶联免疫吸附法检测瞬时转染和稳定转染细胞中hIL-1ra蛋白的表达。结果 转染细胞与正常细胞的增殖率有一定差异，转染细胞胞浆内和培养基上清液中均有hIL-1ra蛋白的表达。在细胞转染结束后48 h，细胞内hIL-1ra蛋白的表达量最高，稳定转染细胞中基因表达最长时间达72 d以上。结论 经阳离子脂质体介导hIL-1ra基因转染人颞颌关节软骨细胞后，目的基因在细胞内有一定数量的表达。

[关键词] 人白细胞介素-1受体拮抗剂; 基因转染; 阳离子脂质体
[中图分类号] Q786 [文献标识码] A

Expression of Human Interleukin-1 Receptor Antagonist in the Transfected Chondrocytes of Temporomandibular Joint

LI Yi-song[1], TIAN Wei-dong[2], LI Sheng-wei[2], LIU Liu[1], DAI Xiao-ming[1]. (1. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, China; 2. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] Objective To investigate the expression of the human interleukin-1 receptor antagonist(hIL-1ra) in the transfected chondrocytes of temporomandibular joint(TMJ). Methods Chondrocytes of TMJ in vitro were transfected by hIL-1ra gene via cationic liposome as a medium. The stable transfected cells were selected by G418. The proliferations of the transduced cell were examined with the growth curve, cell population doubling time. The protein expressing in different periods was detected by immunocytochemistry and enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). Results The proliferation suppression of gene transfected cells fell significantly with compared to normal cells. The expression of hIL-1ra was detected in the cell plasma and the cell culture supernatant. The highest expression of IL-1ra protein was at the time of 48 hours after gene transfection. The transiently transfected cells were secreted IL-1ra protein continuously 28 days and the stably transduced cells were secreted IL-1ra protein till 72 days. Conclusion This study showed that hIL-1ra protein expressed positively in the cell plasma and the culture supernatant after gene transfection within a certain periods.

[Key words] human interleukin-1 receptor antagonist; gene transfection; cationic liposome

在人体发生颞颌关节骨关节病(temporomandibular joint osteoarthrosis, TMJOA)时，白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)在关节内的释放是机体调控关节炎症的一种自然反应。IL-1的释放是机体对炎症作用的一种有益的保护机制，但其过量释放有可能使炎症过于严重，导致关节产生发热、疼痛等不适甚至对关节造成损害。为了调控炎症效应，机体的抗炎系统能适度释放白细胞介素-1受体拮抗剂(interleukin-1 receptor antagonist, IL-1ra)以保证炎症反应时不致伤害关节结构。对TMJOA进行基因治疗时，可通过特定载体，将IL-1ra基因转移到颞颌关节细胞中，使该基因在关节内长期稳定地大量表达，产生的IL-1ra蛋白可以弥补炎症时关节内IL-1ra量的不足，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。本实验在前期实

[收稿日期] 2005-09-26; [修回日期] 2006-02-22
[基金项目] 国家教育部回国人员启动基金资助项目(363)；四川省青年基金资助项目(387)
[作者简介] 李逸松(1972-)，男，贵州人，讲师，博士
[通讯作者] 田卫东，Tel: 028-85503490

验成功地以阳离子脂质体介导hIL-1ra基因转染体外培养的人颞颌关节软骨细胞[1]的基础上，进一步研究转染细胞中hIL-1ra的基因表达。

1 材料和方法

1.1 主要材料和仪器

DMEM培养基(Gibco公司，美国)，阳离子脂质体转染试剂Lipefectine(Invitrogen公司，美国)，G418(Gibco公司，美国)，酶联免疫吸附(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(Biosource公司，比利时)，其余试剂均为国产分析纯试剂。

CO_2恒温培养箱(Sanya公司，日本)，NUAIRE超净工作台(Nuaire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

采用阳离子脂质体介导hIL-1ra基因转染人颞颌关节软骨细胞，分别获得瞬时转染细胞和经G418筛选的稳定转染细胞，具体方法见参考文献[1]。颞颌关节软骨细胞采用原代培养的第二代细胞，对照组细胞为转染过程中加入等量阳离子脂质体，进行空载体转染的细胞。

1.2.1 细胞生长曲线描记 将正常颞颌关节软骨细胞、稳定转染细胞和对照组细胞分别以2×10^4个/孔接种于24孔板培养，4 d换液1次，连续8 d。每间隔24 h，每种细胞随机取3孔，以0.25%胰蛋白酶消化细胞后计数，取均数描记细胞生长曲线；计算细胞倍增时间(doubling time, DT)。$DT=t\times\log2/(\log N_t-\log N_0)$，$N_t$和$N_0$分别代表接种t小时后和起始的细胞数。

1.2.2 转染细胞中hIL-1ra蛋白表达量的测定 收集瞬时转染和稳定转染的细胞悬液和上清培养液，收获的细胞悬液在冻存后，经反复冻融3—4次，裂解细胞，形成细胞冻融液，采用双抗体夹心ELISA法，按试剂盒说明书操作，检测不同时间细胞冻融液和细胞培养液中hIL-1ra蛋白的含量。

2 结果

2.1 细胞的生长曲线

正常颞颌关节软骨细胞、稳定转染细胞和对照组细胞的生长曲线见图1。从图1可见，正常颞颌关节软骨细胞的生长曲线较稳定转染细胞和对照组细胞的生长曲线明显上移，而转染细胞和对照组细胞则没有明显区别。3种细胞的倍增时间分别为(63.25±1.84) h，(105.67±3.28) h，(106.44±4.61) h，三者比例为1∶1.67∶1.68 转染细胞和对照组细胞的倍增时间明显多于正常软骨细胞。

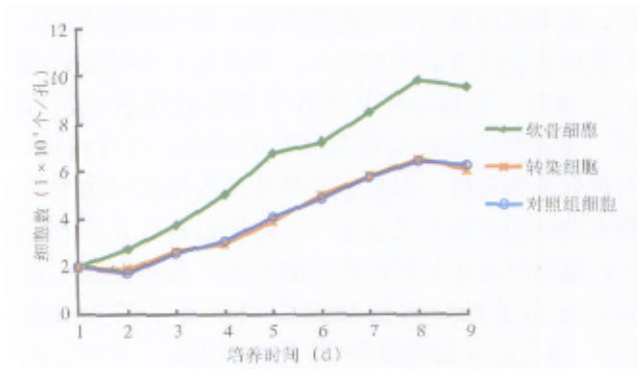

图1 细胞生长曲线

Fig 1 The growth curve of cells

2.2 hIL-1ra蛋白表达量的检测

ELISA法测定不同时间段转染细胞和对照组细胞冻融液和细胞培养液中hIL-1ra蛋白的含量见表1。由表1可见，瞬时转染细胞转染结束后2 d、稳定转染细胞转染后7 d，细胞内hIL-1ra蛋白的表达数量达到最高，以后逐步衰减。瞬时转染细胞在转染后28 d、稳定转染细胞在转染后72 d仍有一定数量的hIL-1ra蛋白的表达。

表1 不同时间转染细胞中hIL-1ra蛋白表达量测定结果(pg/mL)

Tab 1 The expressing level of hIL-1ra protein in the transfected cells in different periods (pg/mL)

转染时间(d)	稳定转染细胞		瞬时转染细胞		对照组	
	细胞上清液	细胞冻融液	细胞上清液	细胞冻融液	细胞上清液	细胞冻融液
1	未测	未测	209.692	908.846	0*	0*
2	未测	未测	248.523	1 085.769	0*	0*
7	76.000	1 039.615	8.982	65.323	0*	0*
14	21.375	189.607	4.222	50.419	0*	0*
21	16.889	191.070	2.375	21.111	0*	0*
28	16.889	155.607	0.691	25.333	0*	0*
72	4.222	26.579	未测	未测	未测	未测

注：*由于含量过低，ELISA法检测认定为“0”值

3 讨论

既往在对骨关节病进行基因治疗的动物实验和临床试验中均发生过试验对象死亡的问题[2]，使基因治疗的试验和临床应用变得更加慎重，尤其是对骨关节病这样的非致命性疾病，安全性被放在了治疗方案考虑的首要位置。病毒载体在治疗基因的转移效率和治疗基因的表达量和稳定性等方面较非病毒载体具有明显的优越性，但安全性上的一些缺陷 限制了其在临床上的大量应用。非病毒载体虽

然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合注射到关节腔内，转染关节滑膜细胞或软骨细胞，达到治疗基因在关节内直接表达的目的，可避免病毒转染可能并发的感染，毒性较低，有很好的安全性。阳离子脂质体是近年发展起来的最有前途的非病毒载体之一，临床已有在其介导下治疗囊型纤维化和黑色素瘤的报道，其转染效率为其他非病毒转染方法如磷酸钙沉淀法的5—100倍[3]。该方法在动物模型[4]以及临床体内试验中也表现出一定的可行性[5-6]。因此本课题组选择阳离子脂质体介导hIL-1ra基因转染人颞颌关节软骨细胞，在前期实验中成功获得了hIL-1ra基因转染的人颞颌关节软骨细胞，并经免疫细胞化学染色和ELISA法检测得以证实[1]。

阳离子脂质体是由脂质双分子层组成的环形封闭囊泡，能在水溶性液体中通过脂质体所带的正电荷，与DNA磷酸骨架中的负电荷自然结合，形成稳定的包裹——脂质体DNA复合物，该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，通过内吞方式穿过细胞膜进入胞浆，从而使基因转入细胞。由于阳离子脂质体的这种介导方式，在将目的基因导入细胞时，脂质体会对细胞的完整性有一定的损害，降低了细胞的生长增殖能力。从本实验的转染细胞生长曲线和倍增时间结果分析，转染细胞的增殖率与正常的颞颌关节软骨细胞相比明显降低，但转染细胞与被等量阳离子脂质体介导空载体转染的对照组细胞相比无明显差别，说明目的基因在细胞中的插入对细胞的功能应无特殊影响。

基因治疗的主要目的是使治疗基因能够在细胞内获得长期、稳定的表达以发挥其治疗作用。本实验通过双抗体夹心ELISA法检测，细胞转染结束后48 h，细胞内hIL-1ra蛋白的表达数量达到最高，以后逐步衰减，在未经筛选的瞬时转染细胞转染后28 d、经过G418筛选后获取的稳定转染的细胞在转染后72 d仍有一定数量的hIL-1ra蛋白的表达，而ELISA法检测在对照组细胞中和正常颞颌关节软骨细胞没有hIL-1ra蛋白的表达[1]；说明正常软骨细胞中几乎没有hIL-1ra蛋白的分泌，只有软骨细胞被成功转染后，目的基因才可能在细胞内长时间、稳定地进行转录、翻译及表达，证实了这种转染方法的可行性。

无论是以病毒载体还是非病毒载体介导的基因转染，也不论是稳定转染还是瞬时转染，基因产物的生成在经历一定时间后均会出现不同程度的衰减，这种情况的原因尚未明了。这可能是因为基因进入细胞后未能整合于靶细胞基因组，随着细胞的传代可能发生外源性基因的丢失；也可能是基因转染后，目的基因的表达存在一定的免疫源性，在关节局部区域引起了免疫反应，而产生对该基因产物的抗体，对基因产物产生抑制所致，这有待于进一步的实验证实。

[参考文献]

[1] 李逸松，田卫东，王 栋，等. 人白介素1受体拮抗剂基因转染人胚颞颌关节软骨细胞的实验研究[J]. 华西口腔医学杂志，2003，21(1)：19-21.
(LI Yi-song, TIAN Wei-dong, WANG Dong, et al. Experimental study on gene transfection of the human interleukin-1 receptor antagonist gene into chondrocytes of temporomandibular joint[J]. West China J Stomatol, 2003, 21(1): 19-21.)

[2] Somia N, Verma IM. Gene therapy: Trials and tribulations[J]. Nat Rev Genet, 2000, 1(2): 91-99.

[3] Muller-Ladner U, Roberts CR, Franklin BN. Human IL-1Ra gene transfer into human synovial fibroblasts is chondroprotective[J]. J Immunol, 1997, 158(7): 3492-3498.

[4] Lasic DD. Novel applications of liposomes[J]. Trends Biotechnol, 1998, 16(7): 307-321.

[5] Nabel GJ, Nabel EG, Yang ZY, et al. Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: Expression, biologic activity, and lack of toxicity in humans[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, 90(23): 11307-11311.

[6] Caplen NJ, Alton EW, Middleton PG, et al. Liposome-mediated CFTR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis[J]. Nat Med, 1995, 1(1): 39-46.

(本文编辑 吴爱华)

《国外医学口腔医学分册》刊名变更为《国际口腔医学杂志》

经中华人民共和国新闻出版总署批准，《国外医学口腔医学分册》杂志已于2006年第4期起更名为《国际口腔医学杂志》，新的国内统一刊号为CN 51-1698/R，国际标准刊号为ISSN 1673-5749。

《国际口腔医学杂志》编辑部