·基础研究·

绿色荧光蛋白基因转染骨髓基质干细胞的瞬时表达检测

蒋欣泉 张志愿 曹 俊 陈传俊 王明国 周晓健 陈万涛

【摘要】 **目的** 检测绿色荧光蛋白基因(EGFP)的表达载体 pEGFP 对 MSCs 的转染效率及瞬时表达,为利用 pEGFP 构建骨形成蛋白(BMP)表达载体并转染骨髓基质干细胞(MSCs)提供依据。**方法** 在体外扩增并酶切鉴定 pEGFP 质粒;抽取兔骨髓,应用贴壁法培养 MSCs;质粒与脂质体按照不同的比例混合,以脂质体介导法转染 pEGFP,应用荧光显微镜观察转染效率及瞬时表达情况。**结果** 转染效率与脂质体和质粒的比例有关,绿色荧光蛋白在基因转染 24 h 后开始表达,48～72 h 最高,1 周后表达逐渐减弱,但 3～4 周后仍有少量表达。**结论** 按照合适的质粒和脂质体比例,pEGFP 转染 MSCs 的效率可达到 30 %,并能持续表达 3 周以上,是转染 MSCs 较为理想的瞬时表达载体。

【关键词】 绿色荧光蛋白基因; 骨髓基质干细胞; 基因转染; 脂质体

Test of Transient Expression of Green Fluorescent Protein Gene Transferred to Bone Marrow Stromal Cells

JIANG Xinquan, ZHANG Zhiyuan, CAO Jun, et al. (*Oral and Maxillofacial Department, Shanghai Ninth Hospital affiliated to Shanghai Second Medical University, Shanghai* 200011, *China*)

【**Abstract**】 **Objective** To determine the optimized condition under which BMP expression vector will be constructed to transfect bone marrow stromal cells (MSCs), plasmid vector coding enhanced green fluorescence protein (EGFP) gene pEGFP was transferred into MSCs. The transfer efficiency and transient expression were subsequently tested. **Methods** pEGFP plasmid was amplified and tested by an enzyme cutting technique in vitro. MSCs, which were initially obtained from the bone marrow of rabbits, were cultured *in vitro* and transferred with pEGFP by means of lipofectamine media methods. The ratio of plasmid and lipofectamine was varied according to the experiment design. Transfer efficiency and transient expression were evaluated by fluorescent microscopy. **Results** Transfer efficiency was correlated with the ratio of plamid and lipofectamine. The expression of EGFP began in 24 hours after transferring, reached maximum in 48-72 hours and decreased in 1 week, however there remained a weak expression for more than 3 weeks. **Conclusion** The efficiency of transferring pEGFP into MSCs could achieve to 30 % with proper ratio of plamid and lipofactamine. pEGFP was an ideal transient expression vector for MSCs gene transference.

【**Key words**】 enhanced green fluorescent protein; marrow stromal cells; gene transference; lipofectamine

骨髓基质中含有多向分化能力的干细胞,Owen 称之为骨髓基质干细胞(marrow stromal cells,MSCs),它是骨愈合过程中骨化的重要细胞,具有来源丰富,采集方便,容易在体外培养、诱导、扩增的特点,该细胞在体外培养具有较强的传代增殖能力,外源目的基因易于导入,因此是骨修复基因治疗较为理想的靶细胞[1]。本文应用带有增强型绿色荧光蛋白基因(enhanced green fluorescent protein, EGFP)的表达载体 pEGFP 转染 MSCs,检测该真核表达载体对 MSCs 的转染效率及瞬时表达,为应用其构建骨形成蛋白(bone morphogenetic protein,BMP)基因表达载体并转染 MSCs 提供依据。

本课题为国家 863 计划组织器官工程重大专项资助项目(编号 2002AA205011)

作者单位:200011 上海第二医科大学附属第九人民医院口腔颌面外科

1 材料和方法

1.1 实验材料与仪器

pEGFP 质粒由北京大学生命科学院提供,脂质体 Lipofectamine (Invitrogen 公司,美国),胎牛血清(HyClone 公司,美国),DMEM (Gibco 公司,美国),β-甘油磷酸钠、L-谷氨酰胺、维生素 C 及地塞米松(Sigma 公司,美国),Wizard 质粒抽提试剂盒(Promega 公司,美国),荧光显微镜(Nikon ECLIPSE TE300,日本)。

1.2 实验方法

1.2.1 质粒的制备及鉴定 按照 Wizard 质粒抽提试剂盒说明书用碱裂解法提取、纯化质粒 DNA ,得到了浓度为 0.2 μg/μl 左右的质粒 DNA , $OD_{260\ nm}$ ∶$OD_{280\ nm}$ = 1.8。再取少量质粒用 *BamHI* 酶切 ,1 %琼脂糖电泳鉴定酶切结果 ,验证该质粒是否确为 pEGFP。

1.2.2 MSCs 培养 无菌条件下抽取新西兰兔股骨大转子处骨髓 3 ml ,置入抗凝培养液中 ,1000 r/min 离心 5 min ,PBS 洗 2 次 ,以 5 ×10^5 个/ml 有核细胞的密度接种于培养瓶中 ,置 37 ℃、5 % CO_2 培养箱中培养。4 d 后半量换液 ,7 d 全量换液 ,以后每 2～3 d 全量换液 1 次。传代时以 2 ×10^5 个/ 皿细胞的密度按实验分组接种到预置盖玻片的六孔板内。传代后当细胞生长接近 70 %～80 %融合 ,进行基因转染。

1.2.3 转染基因 基因转染分组见表 1 ,在无菌管中配制 :溶液 A :1 μg、2 μg pEGFP 质粒分别溶于 100 μl 无血清培养液 ;溶液 B :5 μl 、8 μl 、12 μl 脂质体 Lipofectamine 分别溶于 100 μl 无血清培养液。每个组合各转染 4 孔 ,共 24 孔。混合溶液 A 和溶液 B ,轻柔摇动 ,室温放置 30 min 后 ,加 0.8 ml 无血清培养液 ,轻柔摇动。吸尽培养板中的培养液 ,并以无血清培养液洗涤 1 次 ,将质粒-Lipofectamine 复合物分别滴加到细胞表面 ,置 37 ℃培养箱中培养 ,5 h 后 ,吸尽培养液 ,加入含 10 %胎牛血清的成骨细胞条件培养基。于转染后的 24 h、48 h、72 h、1 周、2 周、3 周、4 周取出贴附细胞的盖玻片进行检测。实验中设未转染的 MSCs 细胞作对照组。

表 1 基因转染分组

Tab 1 The groups of gene transfer

组别	1	2	3	4	5	6
溶液 A(μg)	1	1	1	2	2	2
溶液 B(μl)	5	8	12	5	8	12

1.2.4 荧光显微镜观察 取出盖玻片后以 PBS 洗 2 次 ,倒置在甘油 PBS 载玻片上 ,荧光显微镜下观察 ,每个标本随机取 2 个高倍镜视野 ,记录一个高倍镜下荧光数的平均值 ,应用 SAS 软件进行方差分析。

2 结 果

2.1 酶切鉴定

pEGFP 质粒经 *BamHI* 酶切后 ,电泳显示有一条单一的 4.7 kb 条带 ,根据 pEGFP 图谱分析 ,该质粒含有单一的 *BamHI* 酶切位点 ,全长为 4.7 kb 左右 ,故可验证所获质粒确为 pEGFP(图 1) 。

2.2 荧光显微镜观察绿色荧光蛋白的表达

转染 24 h 后即可见发绿色荧光的细胞 ;48～72 h 阳性细胞明显增多 ,强度增强 ,2、5 组 ,高倍视野 (40 倍) 转染效率达 20 %～30 % ,多为明亮的绿色荧光 ,少数表达较高 ,呈黄绿色 (图 2) 。3、6 组脂质体浓度较高 有较多细胞死亡 ;1 周后 表达绿色荧光的细胞逐渐减少 ,到 3～4 周时 ,仍可见少量散在的荧光。而未转染基因组细胞未见荧光表达。

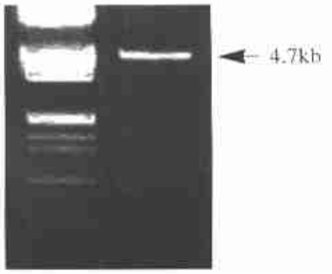

图 1 pEGFP 质粒 *BamHI* 酶鉴定

M :λDNA 酶切 (*EcoRI*/ *Hind* Ⅲ)

I :pEGFP 质粒酶切 (*BamHI*)

Fig 1 The result of pEGFP by *BamHI* cut

图 2 pEGFP 转染 72 h ,2 ,5 组转染效率达 20 %～30 % 荧光显微镜 ×40

Fig 2 72 h after pEGFP gene transfer , transfer effciency was 20 %～30 % in group 2 and 5 fluorescent picture ×40

2.3 荧光细胞数的统计学分析

对不同浓度质粒与脂质体转染 72 h 的荧光细胞数进行方差分析 (表 2) ,结果表明 ,1 组与 4 组、2 组与 5 组、3 组与 6 组的荧光细胞数无显著性差异 (P > 0.01) ;1、2、3 组两两之间 ,4、5、6 组两两之间有显著性差异 (P < 0.01) ;其中 2、5 组荧光细胞数大于其它组别 ,统计学有显著性意义 (P < 0.01) 。说明转染效率与脂质体和质粒的比例有关。

表 2 pEGFP 转染 72 h 各组荧光细胞数(n = 4)

Tab 2 The number of fluorescent cells in groups 72 h after pEGFP gene transfer(n = 4)

测量值	1	2	3	4	5	6
均值	15.00	22.80	4.50	12.75	25.30	3.50
标准差	3.16	4.60	1.29	2.21	2.60	1.50

3 讨 论

绿色荧光蛋白是一种用于检测细胞基因表达和蛋白定位的新型报告分子。它在一定波长的紫外线激发后即可发出明亮的绿色荧光。该荧光比较稳定

无种系依赖性。GFP 已用于原核到真核的一系列细胞中进行表达,被认为是一种通用报告基因[2]。EGFP是一种优化的突变型 GFP,将丝氨酸 65(serine 65,Ser 65)用苏氨酸(threonine,Thr)代替,苯丙氨酸 64(phenylalanine,Phe 64)用亮氨酸(leucine,Leu)代替,使其产生的荧光比野生型 GFP 强 35 倍,大大增强了该报告分子的灵敏度。该分子的激发光波长为488 nm,发射光波长 507 nm[3]。

选择合适的靶细胞,是基因治疗成功与否的一个重要因素,骨修复应用的靶细胞主要是 MSCs。应用 MSCs 来表达目的基因有许多优点:①骨髓干细胞很容易采集并进行组织培养;②细胞表面有骨诱导蛋白受体;③具有明确的成骨潜能。目前以 MSCs 为靶细胞,转染诱导成骨 BMP 基因,通过 BMP 自分泌和旁分泌的作用加速成骨,已逐渐成为研究的热点[4~6]。BMP 在成骨启动的前 2～3 周发挥作用,而成骨后不需持续表达,故利用瞬时表达载体更为合理。不同的表达载体转染不同的细胞,效率不同。瞬时表达载体中腺病毒载体转染效率较高,但有较强的免疫原性,真核表达质粒比病毒载体更为安全,但其缺点是转染效率较低。本实验表明,pEGFP 转染 MSCs 后,在合适的质粒和脂质体比例下,可以达到 30 %的转染效率,并在 1 周内有较强的表达,表达持续时间可达到 2～3 周,基本满足了 BMP 成骨作用时间的要求,因此该载体在优化的条件下是转染 MSCs 较为理想的瞬时表达载体,从而为进一步构建带有成骨基因的表达载体并转染 MSCs 提供了依据。

参考文献

1 Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. Science,1997,276(5309):71-74

2 Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science,1994,263(5148):802-805

3 Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). Gene,1996,173(1):33-38

4 Evans CH, Robbins PD. Genetically augmented tissue engineering of the musculoskeletal system. Clin Orthop,1999,367(suppl):410-418

5 Moutsatsos IK, Turgeman G, Zhou S, et al. Exogenously regulated stem cell-mediated gene therapy for bone regeneration. Mol Ther, 2001,3(4):449-461

6 蒋欣泉,陈传俊,张志愿. 基因修饰的组织工程化骨研究进展. 国外医学口腔医学分册,2002,29(4):199-201

(2001-11-21 收稿,2002-06-17 修回)

(本文编辑 王 晴)

开封市卫生学校招生

开封市卫生学校是一所全日制普通中等专业学校。创建于 1959 年,建筑面积 58 044 m², 有实验中心、微机中心、有线网络播放系统、地面卫星接收站、电子阅览室、语音室等,教学实验设备价值 800 多万元,图书馆藏书 14 万余册。学校治学严谨,师资力量雄厚,现有中、高级职称教师 110 人。另有供学生实习的附属口腔整形专科医院,并在全国 20 余个省市 40 余所医院建有实习基地。在河南省卫生厅、教育厅组织的全省中专教学质量综合评比中名列前茅。

2003 年我校面向社会招收普通中专学生及"3+2"分段高职班学生。普通中专开设专业有:口腔医学、口腔工艺技术、护理、助产、妇幼保健、中西医结合等。"3+2"分段高职班开设专业有:口腔医学、护理。学生考试成绩合格,分别颁发国家承认学历的中专、大专毕业证书(可上网查询)。我校还与新乡医学院等高等院校联办有口腔医学、临床医学、高护等成人大专班。中专毕业生可对口考试升入普通高等医学院校或成人高等医学院校深造。毕业后颁发国家承认学历的普通大专毕业证书或成人大专毕业证书。

学校地址:开封市滨河路中段 28 号　联系电话:0378-2636016;0378-2954447

网　　址:http://www.kfwx.com　电子邮件:kfwx@sohu.com

传　　真:0378-2636006　联系人:朱秦元　马和平