

• 专题 •

阳离子脂质体介导重组人骨形态发生蛋白-2 基因转染的兔骨骼肌干细胞体外成骨分化的实验研究

尚咏 伍骥 卢世璧 袁玫

[摘要] 目的 初步探讨阳离子脂质体介导的重组人骨形态发生蛋白-2 (rhBMP-2) 基因对兔骨骼肌干细胞 (SMSCs) 体外成骨活性的影响。方法 pEGFP-rhBMP-2 的扩增、浓度及纯度鉴定。脂质体包裹质粒 DNA, 转染 SMSCs 后测定转染率。检测 rhBMP-2、碱性磷酸酶 (ALP) 和 I 型胶原的表达。结果 脂质体介导 pEGFP-rhBMP-2 SMSCs 转染后最大转染率为 14.18%, rhBMP-2、ALP 和 I 型胶原的表达呈阳性, 而 pEGFP 转染的细胞和未染细胞 rhBMP-2、ALP 和 I 型胶原的表达弱阳性。结论 SMSCs 是一种较理想的骨组织工程种子细胞。脂质体介导质粒 rhBMP-2 的基因转移安全性好, 但转染率相对较低。

[关键词] 骨形态发生蛋白; 阳离子脂质体; 骨骼肌干细胞; 基因治疗; 骨缺损; 兔

Osteoinductivity of recombinant human bone morphogenetic protein 2 gene mediated with cationic liposome transfer in skeletal muscle stem cells of rabbits in vitro SHANG Yong, WU Ji, LU Shi-bi, et al. Department of Orthopaedics, the Air Force General Hospital, Beijing 100036, China

[Abstract] **Objective** To evaluate the osteoinductivity of cationic liposome mediated recombinant human bone morphogenetic protein 2 gene (rhBMP-2) transfer in skeletal muscle stem cells (SMSCs) of rabbits. **Methods** SMSCs were transferred by pAGFP-rhBMP-2-liposome complex. Gene transferred SMSCs were evaluated with immunohistochemistry. **Results** The transfection rate of SMSCs transferred by cationic liposome mediated pAGFP-rhBMP-2 was 14.18%. Positive stain of rhBMP-2, alkaline phosphatase (ALP), collagen I had been found in the transferred SMSCs. **Conclusion** Quantity of SMSCs is enough to be target cells of gene therapy. Cationic liposome can mediated bone morphogenetic protein-2 gene transfected SMSCs in vitro. Compared with AdrhBMP-2, the transfection rate of liposome mediated bone morphogenetic protein-2 gene transfected SMSCs is lower.

[Key words] bone morphogenetic protein; cationic liposome; skeletal muscle stem cells; gene therapy; bone defect; rabbit

中图分类号: R318.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-9771(2005)01-0001-03

[本文著录格式] 尚咏, 伍骥, 卢世璧, 等. 阳离子脂质体介导重组人骨形态发生蛋白-2 基因转染的兔骨骼肌干细胞体外成骨分化的实验研究[J]. 中国康复理论与实践, 2005, 11(1): 1-3.

脂质体是非病毒基因载体, 与利用病毒转导进行基因转移相比, 脂质体介导具有以下优势: ①脂质体和基因的复合过程比较容易, 易于大量生产; ②易被降解, 无毒、无免疫原性; ③DNA 或 RNA 可得到保护, 不被灭活或核酸酶降解; ④转染过程方便易行, 重现性好。但转染率较病毒载体低是其劣势。本研究拟用新一代阳离子脂质体 Lipofect AMINE 2000 介导质粒重组人骨形态发生蛋白-2 (rhBMP-2) 基因转染兔骨骼肌干细胞 (SMSCs), 对其转染效率和活性基因的表达做初步探讨。

1 材料和方法

1.1 基因的提取、浓度和纯度鉴定 采用碱裂解法-中和法, 应用质粒快速提取盒 (博大泰克) 进行。质粒快速提取盒组成: STE 缓冲液 (溶液 1) 5 ml; Lysis Buffer (溶液 2) 10 ml; 3 M NaAc, pH=4.80 (溶液 3) 10 ml; 结合缓冲液 22 ml; 浓缩漂洗液 2×10 ml; 洗脱缓冲液 5 ml; 离心吸附柱 50 个; 废液收集管 50 个; RNase A (10 mg/ml) 100 μ l。

1.1.1 实验准备 使用试剂盒前, 先在每 5 ml 溶液 1 中加入 RNase A 100 μ l, 使 RNase A 终浓度为 0.2 mg/ml, 溶液 1 使用完毕立即置于 4 $^{\circ}$ C 保存。浓缩漂洗

液在使用前按照 1:3 的比例加入无水乙醇。提取质粒实验前, 检查溶液 2 及结合缓冲液是否有高盐结晶。一般而言, 室温下放置溶液 2 及结合缓冲液即可。

1.1.2 操作步骤 收集 1.5~3 ml 含有重组、扩增 pArhBMP-2 质粒的大肠杆菌菌液 (由清华大学生命科学院常志杰教授惠赠) 沉淀于 1.5 ml 离心管中, 加入溶液 1 100 μ l, 振荡至彻底悬浮。加入溶液 2 150 μ l, 立即轻柔颠倒离心管数次, 使菌体充分裂解, 裂解后的菌体变得清凉。随后将离心管室温放置 1~2 min (时间勿超)。加入溶液 3 150 μ l, 立即轻柔颠倒离心管数次, 室温放置 5 min。12000 r/min 离心 12 min, 取上清。将结合缓冲液 420 μ l 加入离心吸附柱中, 将上清加入离心吸附柱中 (尽量去除杂质), 混匀, 12000 r/min 离心 30 s, 弃废液收集管中的废液。加入漂洗液 750 μ l 于离心吸附柱中, 12000 r/min 离心 1 min, 弃废液, 共 2 次。再次 12000 r/min 离心 2 min, 尽量除去漂洗液。小心取出离心吸附柱, 套入干净的 1.5 ml 离心管中, 加入洗脱缓冲液 50 μ l, 室温放置 2~5 min 后, 12000 r/min 离心 1 min。

将洗脱下的 pArhBMP-2 和 pAGFP 进行浓度和纯度鉴定, 得到浓度为 7.5 μ g/ml 的质粒 DNA, OD=1.8。

1.2 SMSCs 的分离培养 取新西兰大白兔, 体重 2~2.5 kg, 雌雄不限。氯胺酮 10 mg/kg, 肌注。双侧股外侧剃毛, 常规消毒, 铺单后, 于股外侧切口 1.5 cm 显露

作者单位: 1. 100036 北京市, 空军总医院骨科 (尚咏、伍骥); 2. 100853 北京市, 解放军总医院骨科 (卢世璧、袁玫)。作者简介: 尚咏 (1968-), 男, 山西安泽县人, 博士, 主治医师, 主要研究方向: 骨组织工程及关节外科。

股外侧肌,切取股外侧肌 $2 \times 0.8 \times 0.5$ cm(约 5 g),立即放入无菌瓶内(预加 Hanks 液 10 ml)。

于层流超净台中将切取的肌肉放入培养皿中,冷 D-Hanks 液冲洗 3 次,电子天平称约 5 g。尽量剔除脂肪、肌膜结缔组织和微血管丝,用 Hanks 液充分洗去残留血液后,剪成约 1 mm^3 肌粒。采用改良的 Johnson 酶消化法,用 0.1% 的 I 型胶原酶消化 20~30 min。弃上清;加 0.25% 胰蛋白酶 9 ml,磁力搅拌器搅拌 30~40 min,1000 r/min 离心 10 min,取沉淀反复吹打后依次滤过 100、200、400 目的不锈钢网,滤液 1000 r/min 离心 10 min,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 重悬细胞,吸入 100 ml 培养瓶中,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液 9 ml,采用差速贴壁法去除早期贴壁的成纤维细胞和其它非肌卫星细胞。各培养瓶编号后置于 37°C 、5% CO_2 、95% 相对湿度的培养箱中培养。5 d 后首次更换培养液,以后每 3 d 换液 1 次。直至传至第 5 代。

纯化后的细胞接种于培养瓶中盖玻片上,加入 DMEM 培养基进行培养。待细胞长满盖玻片后取出盖玻片,常规处理后进行 Desmin 和 Myosin 染色鉴定,证实为 SMCs。

1.3 脂质体介导质粒 DNA 转染

1.3.1 材料和仪器 第 3 代 SMCs; pArhBMP-2 和 pAGFP; 第 3 代阳离子脂质体 LipofectAMINE 2000 (LF2000, Invitrogen 公司)。

1.3.2 实验分组 转染 pArhBMP-2 组、转染 pAGFP 组及未染组,每组各 2 块板。

1.3.3 转染步骤(Invitrogen 公司推荐) 转染前 1 天,细胞经胰酶消化和计数后接种 24 孔板, 8×10^4 /孔。每孔加入 0.5 ml 含血清的 DMEM(无抗生素)。每孔细胞加质粒 DNA 0.8 μg (50 μl 无血清培养基稀释)、LF2000 2 μl 、无血清 DMEM 培养基 50 μl , 室温下孵育 5 min。将稀释的 LF2000 与质粒 DNA 在 5 min 内混匀(超时活力会下降)。室温下孵育 15 min。去除培养基,每孔加入无血清培养基 0.5 ml 并直接加入 DNA-LF2000 复合物 100 μl , 前后轻摇培养板使混匀, 37°C 、5% CO_2 孵箱里培养 4~5 h 后,每孔再加入含 20% FBS 的 DMEM 0.5 ml, 使孔内的 FBS 浓度为 10%。培养 24 h 或培养到测定转染效率前。无需去除复合物或更换培养基,且 4~5 h 后可以更换而不会降低转染率。

1.4 光镜下转染率测定 染后 24 h 取出 pAGFP 组培养板,荧光显微镜下观察每个取景框内发绿色荧光细胞的数占总细胞数(需转换为普通光源)的比值,共观察 6 个视野,求均值。

1.5 流式细胞光度计(FCM)转染率测定 取出 pAGFP 组培养板 2 块,分 2 组检测样本结果求均值;未染组培养板 1 块作为上机检测时空白对照。

pArhBMP-2 组倒掉培养液,每孔用冷 PBS 液 1 ml 轻轻冲洗细胞 2 次后去掉,加胰蛋白酶液 0.2 ml, 37°C 1 min,用滴管吹打培养孔底部使细胞最大程度的游离;每孔加含血清的培养基 1 ml,用滴管吹打数次后用吸管将细胞悬液移到离心管内,1500 r/min 离心 5 min,弃上清;细胞重悬于冷 PBS 3 ml 中,搅匀,FCM 检测(转染细胞可发出绿色荧光,无需染料标记)。

1.6 形态学观察 取 pArhBMP-2 组培养板 1 块,脂质体介导转染后,置 37°C 、5% CO_2 的培养箱内培养 24 h 后清洗掉脂质体/DNA 复合物,换培养基继续培养 72 h 后观察细胞生长状态。

1.7 生物学特性的鉴定 于染后第 4 天,将 pArhBMP-2 组和未染组培养板中的细胞接种于盖玻片上培养 1 d,行 rhBMP-2 免疫组化染色及 I 型胶原免疫组化染色;碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)组化染色。

2 结果

2.1 细胞转染率 倒置荧光显微镜下测定染后 24 h SMCs 转染率为 18.43%。FCM 检测,染后 1 日瞬时转染率为 14.18%。

2.2 形态学变化 转染后 72 h,细胞外观大部分仍呈梭形,可见少量多突起细胞,细胞较大,单核或多核,胞浆中似有颗粒,细胞形态多样,较小。多角型细胞中含有大量基质并分泌至胞外,未见细胞大量凋亡现象。倒置荧光显微镜下,pAGFP 组可见梭型或多角型的发绿色荧光的细胞,在分裂的细胞中仍有荧光。这可能说明了质粒 DNA 会整合入宿主细胞染色体上,随宿主细胞分裂而复制,故在子代细胞中可以表达标记基因,这也是细胞筛选阳性克隆,达到稳定转染的前提。由于流式细胞仪检测不到发荧光较弱的细胞,故实际转染率应比流式细胞仪所测定的转染率要高。

2.3 生物学特性 少部分细胞 rhBMP-2 强阳性(约 18%)和弱阳性细胞(约 20%),部分细胞 ALP 阳性,部分细胞分泌 I 型胶原;未染组细胞 rhBMP-2、ALP 阴性,I 型胶原染色弱阳性。

3 讨论

脂质体(liposome)是由脂质双分子层组成的环形封闭囊泡,无毒、无免疫原性,它进入细胞的方式主要是通过内吞作用。自从 1973 年应用脂质体包裹生物分子成功地导入细胞后,人们开始将各种生物大分子包裹在脂质体中。实验研究证明,脂质体作为基因载体可将各种 DNA 转入细菌、真菌、植物和动物细胞,并可在受体细胞中表达。其转化效率和脂质体被细胞内吞及脂质体进入细胞后其包裹物的释放效率有关,其中聚阳离子脂质体已成为将外源基因转入真核细胞的常规载体,并被一些国家批准作为基因治疗的载体进入临床实验。Boden 观察到,脂质体搭载骨诱导蛋白 LIM 矿化蛋白-1(LMP-1)基因可促进腰椎融合^[1]。但

与病毒载体转染率相比,脂质体介导的基因转染率较低。一些学者使用阳离子脂质体转染哺乳动物细胞,转染率从 1 %至 15 %^[2-5]。

为了提高转染率,Randal^[6]设计了阳离子脂质体 3 步转染法,获得 70 %的转染率。步骤为:①使用中性去垢剂(溶血卵磷脂)在胞膜上制造微小孔隙以增加膜的通透性;②先将特殊配体(转铁蛋白)与多聚阳离子核(多聚-1-赖氨酸)共价结合作为支架与带阴电核 DNA 相互作用形成复合物;③DNA/配体-多聚-1-赖氨酸复合物通过配体和细胞膜上的受体相互作用而紧密结合。然后阳离子脂质体通过疏水作用穿过通透性加大的细胞膜进入细胞。

本实验以脂质体作为基因介导载体,介导质粒 rhBMP-2 基因转染兔 SMSCs 的转染率及染后的 rhBMP-2 表达做了初步的研究。在倒置荧光显微镜下测得瞬时转染率为 18.43 %,而流式细胞仪检测结果为 14.18 %,这可能是由于流式细胞仪检测不到发荧光较弱的细胞所致。免疫组化染色显示,rhBMP-2 强

阳性和弱阳性的细胞数约占总细胞的 38 %,这可能是部分质粒 rhBMP-2 基因整合到宿主细胞染色体上,并在细胞分裂后的两个子细胞同时表达。转染 SMSCs 表达 ALP 和 I 型胶原,表明脂质体介导的 rhBMP-2 基因转染 SMSCs 不仅可有效表达 rhBMP-2 细胞活性因子,而且也可自我诱导向成骨细胞转化。

[参考文献]

- [1] Boden SD, Titus L, Hair G, et al. Lumbar spine fusion by local gene therapy with a cDNA encoding a novel osteoinductive protein (LMP-1) [J]. Spine, 1998, 23(23): 2486.
- [2] Cooper MJ. Noninfectious gene transfer and expression systems for cancer gene therapy [J]. Semin Oncol, 1996, 23: 172 - 187.
- [3] Felgner PL, Gadek TR, Holm M, et al. Lipofection: a highly efficient, lipid mediated DNA transfection procedure [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84: 7413 - 7417.
- [4] Goomer RS, Holst BD, Jones FS, et al. The regulation of L-CAM by HOX4.4 and HNF1a [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 7985 - 7989.
- [5] Goomer RS, Maris T, Lee MC, et al. High efficiency transfection of chondrocytes: a first step to ex-vivo gene therapy to repair articular cartilage defects [J]. Trans Orthop Res Soc, 1999, 45: 796. Abstract.
- [6] Randal SG, Thira MM, Gelberman R, et al. Nonviral in vivo gene therapy for tissue engineering of articular cartilage and tendon repair [J]. Clin Orth Relat Res, 2000, 379: S189 - S200.

(收稿日期: 2004-12-01)