

重组杆状病毒转导恒河猴骨髓间充质干细胞

刘正山^{1,2}, 张成^{1*}, 卢锡林¹, 许勇峰¹, 冯善伟^{1,2}, 周畅¹, 李勇², 程菲²

⁽¹⁾ 中山大学附属第一医院神经内科, 广州 510080)

⁽²⁾ 中山大学干细胞与组织工程研究中心, 广州 510080)

摘要: 【目的】研究重组杆状病毒(Bac-CMV-EGFP)能否能有效转导恒河猴骨髓间充质干细胞(rhesus Bone marrow-derived Mesenchymal Stem Cells, rBMSCs), 及杆状病毒转导后对细胞活力, 增殖及分化能力的影响。【方法】体外原代培养 rBMSCs, 不同剂量的杆状病毒转导 3 代以后的细胞, 并用流式细胞仪分别检测其转导效率。在较高的杆状病毒转导效率下, 检测 rBMSCs 细胞活力, 增殖及分化能力, 并与正常对照组细胞进行比较。【结果】杆状病毒在感染指数(Multiplicity Of Infection, MOI)为 300v.g/cell, 孵育温度为 25 度, 孵育时间为 4h 的转导条件下, 对 rBMSCs 转导效率可达 80% 左右。进一步检测后发现, 高效转导杆状病毒后的 rBMSCs 的细胞活力, 增殖及分化能力与未转导病毒细胞组无明显变化。【结论】重组杆状病毒可安全有效地基因修饰 rBMSCs, 且不影响其生物特性, 为今后的体内基因治疗灵长类动物模型试验奠定了基础。

关键词: 重组杆状病毒, 恒河猴骨髓间充质干细胞, 转导, 绿色荧光蛋白

中图分类号: R373.9 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 04-0539-06

经基因载体修饰的干细胞是基因治疗一种新的途径。杆状病毒早期常被人们用来转导昆虫细胞, 并大规模生产重组目的蛋白^[1]。Thomas 等^[2]指出重组杆状病毒作为基因载体具有众多优点: 重组杆状病毒易于构建及扩增。对哺乳动物细胞无毒性作用。可瞬时、稳定的转导靶细胞并有效表达目的基因。在宿主细胞中不能自主复制。载体容量较大(38kb)。可同时表达多个目的基因。表达的目的蛋白可在宿主细胞中经过一系列正确的转录后修饰。重组杆状病毒直接注射入体内常被血清灭活而降低了其基因治疗作用, 若是将其转入干细胞内, 使其在胞内表达目的蛋白而又避免被血清灭活, 从而提高其基因治疗疗效。Shoji 等^[3, 4]的研究表明重组杆状病毒可有效转导多种哺乳动物细胞。Yi-Chen 等^[5]将重组杆状病毒转导人的骨髓间充质干细胞的研究表明, 杆状病毒亦可高效转导人的骨髓间充质干细胞, 且不影响其增殖及分化能力。

然而, 杆状病毒是一种新型病毒载体, 其各种生物特性对人体健康安全与否, 还有待进一步研究。恒河猴是一种灵长类动物, 若是杆状病毒亦可有效转导 rBMSCs 且不改变其生物特性, 再将经杆状病毒基因修饰的 rBMSCs 移植入恒河猴体内以治疗各种疾病模型及评价杆状病毒在其体内的安全性, 可为今后杆状病毒应用于人体疾病治疗研究疗效及安全与否奠定一定的基础。

Shoji 等^[3]的研究表明, 杆状病毒对于不同种类的哺乳动物细胞的转导效率差异明显, 其是否亦可有效转导 rBMSCs, 目前国内外还没有相关报道。我们的研究是为了证实, 杆状病毒是否可有效转导 rBMSCs 且对其生物特性是否有影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试验试剂来源: 低糖 DMEM 培养基(Gibco,

*通讯作者。Tel: +86-20-87333055; Fax: +86-20-87333122; E-mail: zhangch6@mail.sysu.edu.cn

作者简介: 刘正山(1981-), 男, 安徽人, 硕士研究生, 主要从事神经肌肉遗传病方面的研究。E-mail: 314711687@163.com

收稿日期: 2007-11-05; 修回日期: 2007-12-26

美国), 胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS, Gibco), 无钙镁 PBS(Gibco), 胰酶(Sigma, 德国), 青霉素和链霉素(Sigma), 苕盼蓝(Sigma), 培养瓶, 离心管及培养皿(Corning, 美国), 牛血清蛋白(BSA, Sigma), 维生素 C(Sigma), 地塞米松(Sigma), 吡啶美辛(Sigma), β -磷酸甘油(Sigma), 氯胺酮(Sigma), 淋巴细胞分离液(Sigma)。

1.1.2 重组杆状病毒及恒河猴骨髓: 带有绿色荧光蛋白基因的重组杆状病毒(BacV-CMV-EGFP, 滴度为 1×10^{11} v.g/mL)由华中农业大学农业微生物国家重点实验室惠赠。恒河猴骨髓来源于 1~2 岁的雄性恒河猴, 其饲养于中山大学中山医学院实验动物中心二级动物室, 相关动物实验遵守中山大学动物实验管理条例。

1.2 rBMSCs 原代培养及传代

1~2 岁的恒河猴经氯胺酮(4mg/kg, IM)麻醉下, 在其后肢长骨取 1.5mL 的骨髓。经淋巴细胞分离液分离之后取单核细胞, 用含 10%FBS, 100 U/mL 青霉素和 100 μ g /mL 链霉素的低糖 DMEM 冲悬并至于培养瓶中, 放置 5%CO₂, 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱原代培养。3 天换液 1 次, 待贴壁细胞长至 80%后, 用 PBS 洗 2 遍之后, 0.25% 的胰酶消化并 1:2 传代。当 P5~P8 代 rBMSCs 长至 90% 左右, 0.25% 的胰酶消化后, 按 1:3 的比例传至培养皿中, 当培养皿中的细胞长至 80%左右后, 进行后续病毒转导, 细胞增殖, 细胞活力及分化实验。

1.3 重组杆状病毒体外转导 rBMSCs

当培养皿中的 rBMSCs 长至 80%, 即细胞数约为 4×10^5 个时, 吸去培养基, 无钙镁 PBS 洗 2 遍之后加重重组杆状病毒, 依据病毒数与细胞数的比值, 调整不同的 MOI 值, 即 MOI 分别为 50、100、200、300、500v.g/cell 时, 加 0.5mL 无钙镁 PBS 冲悬后, 放置 25 摇床孵育 4h。4h 后吸去病毒悬液, 并用 PBS 洗 2 遍后加完全培养基置于细胞培养箱培养。2d 后用流式细胞仪检测重组杆状病毒的转导效率。每组实验单独重复 3 次。

1.4 流式细胞仪检测杆状病毒转导效率

转导重组杆状病毒的 rBMSCs, 2 天后置于倒置荧光显微镜下, 采用蓝光激发观察, 摄像。转导重组杆状病毒的 rBMSCs, 2 天后用 0.25% 胰酶消化, 吸管移至离心管于 1200r/min 离心 6min, 用 0.5mL 含 5% 牛血清蛋白的 PBS 重新悬浮, 并吹散为单细胞悬液后使用流式细胞仪(FACSCalibur, Becton-Dickinson, 美国)检测报告基因转导效率及阳性细胞平均荧光强

度, 用 Cell-Quest 软件对其结果进行分析。每个细胞样品约 $(4\sim5) \times 10^5$ 个细胞, 每组检测单独重复 3 次, 以未经杆状病毒转导的 rBMSCs 作为阴性对照。

1.5 rBMSCs 细胞增殖及活性检测

经细胞计数仪计数后, 取 2×10^5 个杆状病毒转导或未转导的 rBMSCs 接种于培养皿中, 并于接种后的第 1 天, 胰酶消化后, 吹打混匀为单细胞悬液后用细胞计数仪计数, 用 0.4% 台盼蓝检测 2 组细胞活力。接种后的第 3、5、7、9 天用同样的方法检测 2 组细胞的数量及细胞活力。

1.6 rBMSCs 成脂, 成骨诱导分化潜能鉴定

将经杆状病毒转导或未转导的 rBMSCs 传至培养皿中, 待其长至 70%后, 吸去培养基并用 PBS 洗 2 遍之后加入以下成脂或成骨诱导液进行诱导: (1) 成脂诱导液: 低糖 DMEM, 含终浓度为 10%胎牛血清, 50 μ g/mL 维生素 C, 10^{-7} mol/L 地塞米松, 50 μ g/mL 吡啶美辛; (2) 成骨诱导液: 低糖 DMEM, 含终浓度为 10%胎牛血清, 50 μ g/mL 维生素 C, 10^{-8} mol/L 地塞米松, 10 mM/L β -磷酸甘油。每 3d 换一次诱导液, 3 周后用油红 O 对成脂诱导液诱导细胞染色, 以确定是否有脂肪样细胞形成; 用茜素红对成骨诱导液诱导细胞染色, 以确定是否有骨样细胞形成。

1.7 统计学处理

所有数据均采用均数表示, 应用 SPSS13.0 统计软件, 采用 LSD 检验进行统计分析。

2 结果

2.1 重组杆状病毒可有效转导 rBMSCs

原代 rBMSCs 经 3 次以上传代后, 呈现较均一的梭形细胞及漩涡样生长(图 1-A)。P5~P8 代 rBMSCs 传至培养皿中, 待其长至 80%左右后, 转导不同剂量的杆状病毒(分别为 50, 100, 200, 300, 500v.g/cell)。2d 后, 用倒置荧光显微镜观察并摄像, 结果如图 1-B、C、D、E、F 所示。

随着病毒剂量的加大(MOI 值增加), 平均每个视野表达绿色荧光蛋白的 rBMSCs 数量亦随之增加。流式细胞仪检测结果进一步表明, 在孵育时间(4h)和孵育温度(37 $^{\circ}$ C)一定时, 当杆状病毒的 MOI 值为 50、100、200、300、500v.g/cell 时, 其对 rBMSCs 的平均转导效率分别为 19.0%、42.5%、60.4%、78.2%、76.2%; 阳性细胞平均荧光强度为 51.4、135.1、193.8、287.3、246.8(图 2-B、C、D、E、F), 随着杆状病毒的 MOI 增大, 其对 rBMSCs 的转导效率及阳性细胞平均荧光强度亦随之增高。

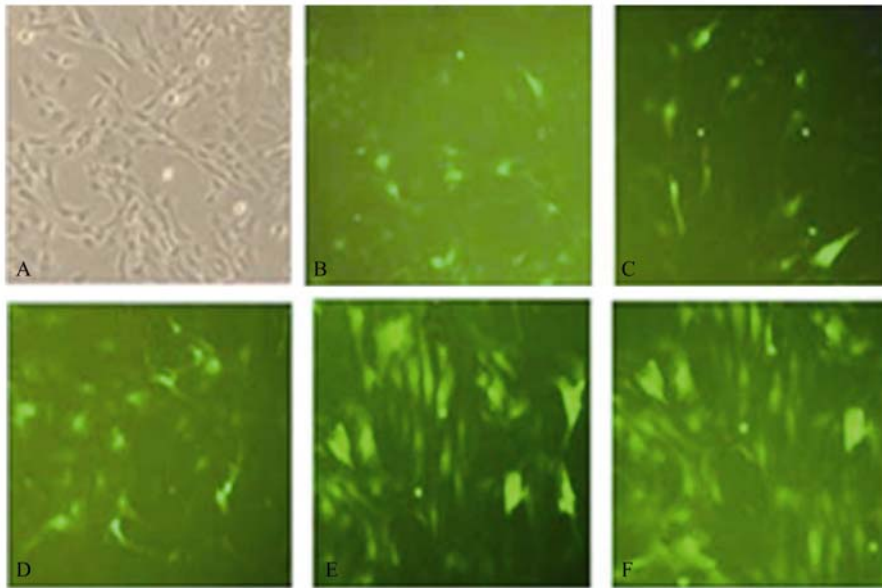


图 1 杆状病毒以不同 MOI 值转导 rBMSCs 后其胞内 GFP 表达情况(100×)

Fig. 1 rBMSCs transduced with various MOI of baculovirus expressed different level of GFP(100 ×). A: The normal morphous of rBMSCs showed morphologically homogeneous fibroblast-like cells. B, C, D, E, F: The rBMSCs expressed GFP, which were transduced with various dose of baculovirus (B: MOI was 50v.g/cell; C: MOI was 100v.g/cell; D: MOI was 200v.g/cell; E: MOI was 300v.g/cell; F: MOI was 500v.g/cell).

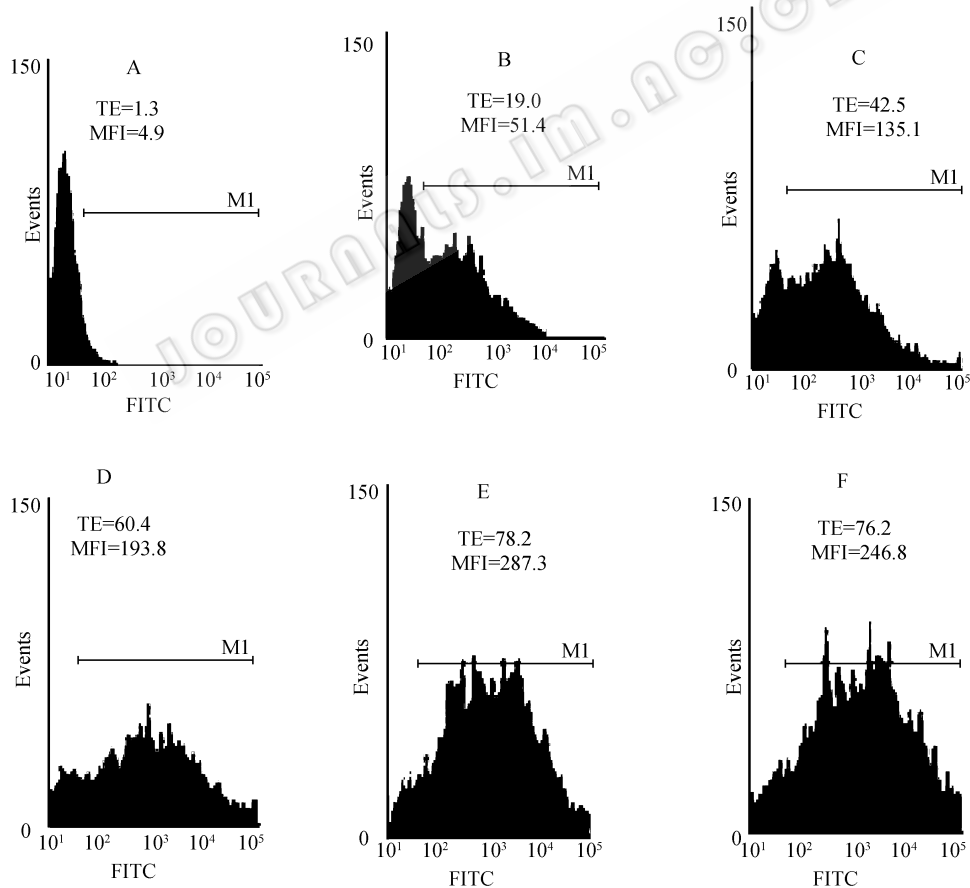


图 2 流式细胞仪检测杆状病毒在不同 MOI 下对 rBMSCs 的转导效率

Fig. 2 The flow cytometry detected the transductive efficiency of rBMSCs transduced by various MOI of baculovirus. A: The rBMSCs untransduced with baculovirus were detected by flow cytometry as a control group. B, C, D, E, F: The Transductive Efficiency (TE) of baculovirus to rBMSCs was 19.0% (B: MOI was 50v.g/cell), 42.5% (C: MOI was 100v.g/cell), 60.4% (D: MOI was 200v.g/cell), 78.2% (E: MOI was 300v.g/cell), 76.2% (MOI was 500v.g/cell); and the mean fluorescence intensity (MFI) was 51.4 (B), 135.1 (C), 193.8 (D), 287.3(E), 246.8(F).

2.2 杆状病毒不影响 rBMSCs 的细胞活性及增殖能力
细胞计数仪计数 2 组细胞 1、3、5、7、9d 后的细胞数量, 结果发现前 3d 杆状病毒转导组 rBMSCs 生长增殖能力比未转导病毒组稍有停滞, 而 3d 之后 2 组细胞增殖能力无明显差别(图 3, $P>0.05$)。台盼蓝染色检测结果表明, 转导组 rBMSCs 活力与对照未转导病毒组细胞活力无明显差别(表 1, $P>0.05$)。

表 1 重组杆状病毒转导后对 rBMSCs 细胞活性的影响
Table 1 The influence of transducing baculovirus to the rBMSCs of viability

t/d	1	3	5	7	9
transduced groups	95.32%	96.64%	96.85%	95.09%	97.62%
control groups	97.63%	97.56%	95.81%	96.07%	96.14%

The viability of the rBMSCs transduced with baculovirus or not were assessed by 0.4% trypan blue, and their results were compared ($P>0.05$).

2.3 杆状病毒不影响 rBMSCs 的成脂成骨分化能力
病毒转导组及对照组 rBMSCs 经成脂成骨诱导液

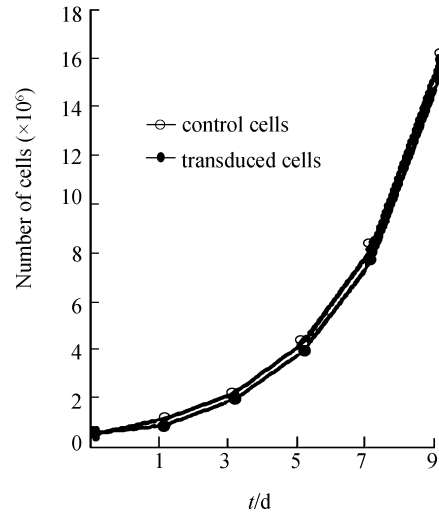


图 3 重组杆状病毒转导后对 rBMSCs 增殖的影响
Fig. 3 The influence of transducing baculovirus to the rBMSCs of proliferation. The rBMSCs transduced with baculovirus(+) or not (+) were calculated with the haemocytometer, respectively. The proliferative capacity of the rBMSCs transduced by baculovirus were compared with the control cells' ($P>0.05$).

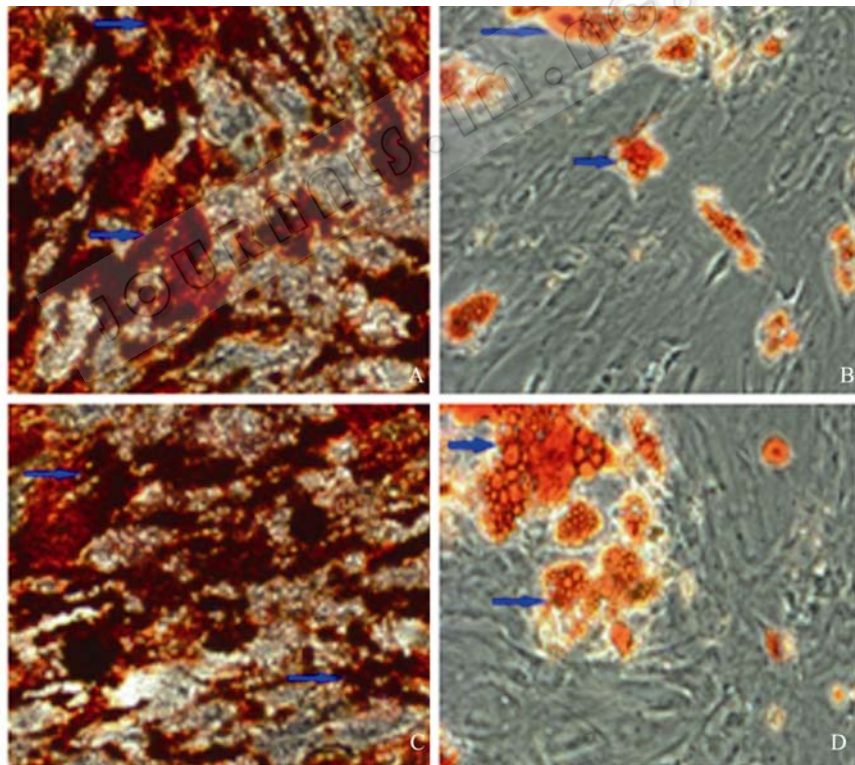


图 4 baculovirus 转导(A、C)及未转导(B、D)组 rBMSCs 进行成骨成脂诱导分化(100×)

Fig. 4 The rBMSCs (transduced with baculovirus A, C or not B, D) were induced into osteocytes and adipocytes(100×). The rBMSCs transduced with baculovirus (A) or not (B) were stained with alizarin red to detect foci of mineral deposition in the osteogenic cells(as indicated by the arrowhead); the rBMSCs transduced with baculovirus (C) or not (D) were stained with Oil red O to detect neutral lipid accumulation within the adipogenic cells(as indicated by the arrowhead). There were no obvious differences between these two groups.

诱导 3 周之后,分别用油红 O 和茜素红染色鉴定后发现:无论是病毒转导组(图 4-A、C)或未转导组(图 4-B、D) rBMSCs, 都可以于体外诱导形成脂肪样或骨样细胞,且成脂和成骨能力在两组间无明显差别。

3 讨论

我们的研究于国内外首次证实了重组杆状病毒在体外可有效转导 rBMSCs,且随着 MOI 值的增加,杆状病毒对 rBMSCs 的转导效率亦随之增加。杆状病毒 MOI 值越高,每个细胞接触并胞吞病毒的几率就越大,随之杆状病毒的转导效率亦升高^[6]。而当杆状病毒的 MOI 值超过 300v.g/cell 后,其对于 rBMSCs 的转导效率不再升高,甚至有降低的趋势。Van Loo 等^[7]指出杆状病毒进入细胞之后,还依赖于肌动蛋白丝等辅助运动进入细胞核,过高的病毒进入细胞之后可能会抑止肌动蛋白丝的辅助运动,而使得进入细胞核的病毒数下降而降低了病毒转导效率。重组杆状病毒在 MOI 为 300v.g/cell, 孵育为温度 25℃, 孵育时间为 4h 时,对 rBMSCs 的转导效率可达 80%左右,明显高于慢病毒对于成年猴骨髓间充质干细胞的转导效率^[8]。

Detrait 等^[9]发现基因载体在宿主细胞内高效表达常常会诱导宿主细胞凋亡。我们的研究进一步证实了高效转导重组杆状病毒的 rBMSCs 的细胞增殖能力,细胞活性与对照组无明显差别。虽然病毒转导后前 3 天细胞计数,发现病毒转导组细胞数稍低于对照组细胞数,但 3 天之后的细胞计数表明,2 组间的细胞增殖能力相似。Ho 等^[10]用重组杆状病毒转导大鼠的成骨细胞亦发现有类似的现象,这可能是由于重组杆状病毒在靶细胞内高效表达绿色荧光蛋白抑止了细胞的活性所致,而重组杆状病毒是一种瞬时基因表达载体,随着时间的延长,其在靶细胞内表达目的蛋白会随之下落,对细胞的抑制也随之减弱。我们同时证实了重组杆状病毒转导的 rBMSCs,仍保持成脂成骨分化潜能。Christos 等^[11]将重组杆状病毒转导哺乳动物细胞后,通过实时定量 PCR 检测靶细胞的多种目的基因,并与未转导病毒细胞相比较,发现其基因水平无明显变化,进一步从分子水平证实了重组杆状病毒转导哺乳动物细胞后不会影响其自身基因的表达。

重组杆状病毒作为基因载体具有众多优势^[2],且其又可于体外高效转导 rBMSCs 而不影响它的增殖和分化能力,为杆状病毒应用于猴体内基因治疗试验奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA, *et al.* Baculovirus expression vectors: a laboratory manual. Oxford University Press: Oxford, 1992
- [2] Thomas A, Kost J, Patrick Condreay, *et al.* Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors. *Trends Biotechnol*, 2002, 20: 4-22
- [3] Shoji I, Aizaki H, Tani H, *et al.* Efficient gene transfer into various mammalian cells, including non-hepatic cells, by baculovirus vectors. *J Gen Virol*, 1997, 78: 2657-2664
- [4] Yap CC, Ishii K, Aoki YA, *et al.* Hybrid baculovirus T7 RNA polymerase system for recovery of an infectious virus from cDNA. *Virology*, 1997, 231: 192-200
- [5] Yi-Chen Ho, Yao-Chi Chung, Shiaw-Min Hwang, *et al.* Transgene expression and differentiation of baculovirus-transduced human mesenchymal stem cells. *J Gene Med*, 2005, 7: 860-868.
- [6] Ching-Suei Hsu, Yi-Chen Ho, Kuei-Chun Wang, *et al.* Investigation of Optimal Transduction Conditions for Baculovirus-Mediated Gene Delivery Into Mammalian Cells. *Wiley Periodicals*, 2004, 10: 1002-1021
- [7] Van Loo ND, Fortunati E, Ehlert E, *et al.* Baculovirus infection of nondividing mammalian cells: mechanisms of entry and nuclear transport of capsids. *J Virol*, 2001, 75: 961-970
- [8] Lee CI, Kohn DB, Ekert JE, *et al.* Morphological analysis and lentiviral transduction of fetal monkey bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Mol Ther*, 2004, 9: 112-123.
- [9] Detrait ER, Bowers WJ, Halterman MW, *et al.* Reporter gene transfer induces apoptosis in primary cortical neurons. *Mol Ther*, 2002, 5: 723-730.
- [10] Ho YC, Chen HC, Wang KC, *et al.* Highly efficient baculovirus mediated gene transfer into rat chondrocytes. *Biotechnol Bioeng*, 2004, 88: 643-651.
- [11] Christos Kenoutis, Rodica C, *et al.* Baculovirus-Mediated Gene Delivery into Mammalian Cells Does Not Alter Their Transcriptional and Differentiating Potential but Is Accompanied by Early Viral Gene Expression. *J Virol*, 2006, 28: 4135-4146.

Transduction of rhesus bone marrow mesenchymal stem cells by recombinant baculovirus

Zhengshan Liu^{1,2}, Cheng Zhang^{1*}, Xilin Lu¹, Yongfeng Xu¹, Shanwei Feng^{1,2},
Chang Zhou¹, Yong Li², Fei Cheng²

¹Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

²Center for Stem Cell Biology and Tissue Engineering of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

Abstract: [Objective] To investigate whether the recombinant baculovirus (Bac-CMV-EGFP) can effectively transduce into rhesus Bone-marrow derived Mesenchymal Stem Cells (rBMSCs) in vitro, and whether there are some efficiency to the rBMSCs of viability, proliferational and differentiability capacity after recombinant baculovirus transducing. [Methods] The rBMSCs were cultured in vitro. After passaged more than three times, the rBMSCs were transduced with various dose of baculovirus (Multiplicity Of Infection, MOI, the MOI is 50, 100, 200, 300, and 500 vector genome (vg)/cell, respectively). We used flow cytometry to detect different transductive efficiency of various dose of baculovirus to rBMSCs. Under a suitable dose of baculovirus (300v.g/cell), we studied cell viability, proliferation and differentiation capacity, and compared results with the control. [Results] Baculovirus could be transduced into rBMSCs in vitro. The transductive efficiency reached about 80% when the MOI was 300v.g/cell, at 25 °C, and incubated for 4 h. Furthermore, under a higher transductive efficiency of baculovirus, there were no obvious influence to the rBMSCs of viability, proliferation and differentiation capacity compared with that of the control. [Conclusion] The baculovirus can be safely and effectively transduced into rBMSCs in vitro, without any negative efficiency to cell viability, proliferation and differentiation capacity.

Keywords: recombinant baculovirus; rhesus bone marrow mesenchymal stem cells; transduction; green fluorescent protein

*Corresponding author. Tel: +86-20-87333055; Fax: +86-20-87333122; E-mail: zhangch6@mail.sysu.edu.cn

Received: 2 November 2007/ Revised: 26 December 2007

科学出版社生命科学新书推介(2008-01)

细胞传感器

王平等著

978-7-03-020666-4 ¥65.00 2008年1月4日出版

本书介绍了作者近年来进行的有关细胞传感器方面的研究成果及目前国际上在此领域的研究进展。全书共10章,分别论述了细胞的生理特性及其选择与培养、细胞传感器机理及模型分析,以及微电极阵列(MEA)细胞传感器、场效应晶体管(FET)细胞传感器、光寻址电位细胞传感器(LAPCS)、膜片钳细胞传感器、免疫细胞传感器、嗅觉与味觉细胞传感器的工作原理及在生物医学等领域中的应用,最后介绍了细胞传感器的发展趋势。其中大部分内容属于当今国际上的研究热点和前沿。

本书适合于生物医学传感技术有关的生物医学工程、生物化学传感技术、神经生理学、电子信息科学,以及人工智能等科学工作者,也适合于对交叉学科感兴趣的科技工作者阅读参考。

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址:北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编:100717

联系人:阮芯 联系电话:010-64034622(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目

