

· 基础研究 ·

LMP-1 基因慢病毒载体构建及其在大鼠骨髓间充质干细胞的表达

侯慧铭, 向川, 郭丽, 张桦栋

(山西医科大学第二医院骨科, 山西 太原 030001)

【摘要】 目的: 构建人 LMP-1 重组慢病毒载体, 体外转染大鼠骨髓间充质干细胞, 检测 LMP-1 基因在大鼠骨髓间充质干细胞的表达。方法: 利用 PCR 法从 cDNA 文库中钓取 LMP-1 基因, 将其与经 Age I 酶切线性化的慢病毒载体 pGC-FU-EGFP 相连接, 转化感受态大肠杆菌, 筛选出阳性克隆 pGC-FU-LMP-1-EGFP, 基因测序对其鉴定。经 293T 细胞包装后, 收集富含病毒颗粒 LV-LMP-1-EGFP 的细胞上清, 浓缩并标定滴度, RT-PCR 检测并鉴定。以最佳 MOI 值体外转染大鼠骨髓间充质干细胞, 荧光显微镜观察转染是否成功, 流式细胞仪检测转染效率, RT-PCR 和 Western blot 检测转染细胞 LMP-1 基因的表达。结果: ①基因测序及 RT-PCR 检测证实携带人 LMP-1 基因的慢病毒载体构建成功, 包装后获得滴度为 2×10^8 TU/ml 的 LV-LMP-1-EGFP。②以 MOI=100 转染大鼠骨髓间充质干细胞, 荧光显微镜下可见大量绿色荧光蛋白表达, 转染效率可达 93.5%, 经 RT-PCR 与 Western blot 检测, 被转染细胞内有 LMP-1 基因表达。结论: 成功构建携带人 LMP-1 基因的慢病毒载体, 可高效转染大鼠骨髓间充质干细胞, 被转染细胞可高效表达 LMP-1 基因。

【关键词】 慢病毒; LMP-1; 骨髓间充质干细胞; 骨质疏松

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2013.10.012

Construction of lentivirus vector containing human LIM mineralization protein-1 (LMP-1) and its expression in rat bone mesenchymal stem cells HOU Hui-ming, XIANG Chuan, GUO Li, and ZHANG Hua-dong. Department of Orthopaedics, the Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi, China

ABSTRACT Objective: To construct a recombinant lentivirus vector of human LMP-1 and detect the expression of LMP-1 in infected rat bone mesenchymal stem cells. **Methods:** LMP-1 gene from the cDNA library were extracted by Polymerase Chain Reaction (PCR). The LMP-1 genes were connected into lentiviral vectors pGC-FU-EGFP which was linearized by Age I enzyme to produce recombinant lentivirus vector called as pGC-FU-LMP-1-EGFP, then packaged by 293T cells. The virus supernatant containing LV-LMP-1-EGFP was harvested, concentrated and titrated. The rat BMSCs were transfected with recombinant lentivirus LV-LMP-1-EGFP at the most appropriate MOI. The mRNA and protein expression of LMP-1 were detected by RT-PCR and Western blot. **Results:** ①LV-LMP-1-EGFP was recombined successfully and the titer reached 2×10^8 TU/ml. ②The efficiency of infection was 93.5%, which was get after LV-LMP-1-EGFP infected rat BMSCs at the most appropriate MOI=100. The expression of LMP-1 gene was confirmed by RT-PCR and Western blot. **Conclusion:** Lentivirus vector containing human LMP-1 gene is constructed successfully, which can transfected efficiently into rat BMSCs, and the infected rat BMSCs can effectively express LMP-1.

KEYWORDS Lentivirus; LMP-1; Bone mesenchymal stem cells; Osteoporosis

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2013, 26(10): 841-844 www.zggszz.com

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是一种中老年人常见的代谢性疾病, 以骨量下降、骨微结构改变、骨脆性增加从而易发骨折为特征。OP 导致的疼痛与骨折严重影响患者生活质量。随着基因工程与分子生物学的发展, 基因重组技术为预防和治疗 OP 带来希望。LMP-1 是成骨分化的正调节因子, 能够促进

成骨细胞分泌骨钙素及形成骨结节, 并可招募众多成骨因子共同参与成骨过程^[1]。本研究试图构建人 LMP-1 基因重组慢病毒载体, 并检测 LMP-1 基因在被感染大鼠骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 中的表达, 为运用 LMP-1 基因治疗骨质疏松症提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与主要试剂 SD 大鼠 3 只 (由山西医科大学动物中心提供), 雌雄不限, 4~6 周龄, 体重 100~150 g。cDNA 文库购自 Biomics 公司; pGC-FU-

基金项目: 山西省自然科学基金资助项目 (编号: 2010011050-2)

Fund program: Provided by the Natural Science Foundation of Shanxi Province (No. 2010011050-2)

通讯作者: 向川 E-mail: xcml7275@163.com

EGFP 质粒、pHelper1.0 质粒、pHelper2.0 质粒、大肠杆菌 DH5 α 、Age I 酶和 293T 细胞均购自上海吉凯基因化学技术有限公司。RT-PCR 所需引物及试剂购自 Takara 公司; Western blotting 试剂购自碧云天公司; LMP-1 一抗、二抗购自 SANTA 公司; DMEM 购自赛默飞世尔生物化学制品公司。

1.2 LMP-1 基因片段获取 引物设计: LMP-1-Age I -F: 5'-GAG GAT CCC CGG GTA CCG GTC GCC ACC ATG GAT TCC TTC AAA GTA GTG-3', LMP-1-Age I -R: 5'-TCA CCA TGG TGG CGA CCG GCA CAT GAG AGA AGG CAT G-3', 利用 PCR 法从购买的 cDNA 文库中钓取携带有 Age I 酶切位点的 LMP-1 基因片段。

1.3 大鼠骨髓间充质干细胞制备 取 SD 大鼠 3 只, 10% 水合氯醛腹腔注射 (300 μ l/100 g), 麻醉后颈椎脱臼处死, 75% 乙醇浸泡 10 min。无菌条件下取出大鼠双侧肱骨、股骨及胫骨, 剪去骨端两侧, 用 DMEM 培养液反复冲洗骨髓腔直到骨头发白为止。将获取的细胞悬液接种于 25 ml 培养瓶中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 培养箱中培养, 传至 3 代用于慢病毒转染。

1.4 观察项目与方法

1.4.1 LMP-1 基因慢病毒载体构建 将获取的人 LMP-1 基因于经 Age I 酶切线性化的 pGC-FU-EGFP 相连接, 转化用氯化钙制备的新鲜大肠杆菌感受态细胞, 经 PCR 筛选出阳性克隆 pGC-FU-LMP-1-EGFP, 对其行基因测序。PCR 筛选及测序引物合成, LMP-1-SEQF: 5'CTTCTGCCACCATCCTATG3', 该引物位于目的基因中, Ubi-F: 5'GGGTCAATATG-TAATTTTCAGTG3', 位于 Ubiquitin 启动子中, EGFP-N-R: 5'CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG3' 位于 EGFP 基因 N 端。

1.4.2 慢病毒载体包装与鉴定 将重组的 pGC-FU-LMP-1-EGFP 质粒、pHelper1.0 质粒、pHelper2.0 质粒分别进行高纯度无内毒素抽提, 共转染 293T 细胞, 转染后 8 h 更换为完全培养基, 48 h 后收集富含已包装重组慢病毒颗粒 LV-LMP-1-EGFP 的细胞上清液, 提取 RNA, 根据 Takara 一步法试剂盒说明行 RT-PCR 后酶切鉴定。

1.4.3 慢病毒载体滴度标定 将获取的含 LV-LMP-1-EGFP 的细胞上清浓缩后行逐孔稀释法标定滴度。准备 10 个无菌 EP 管, 在每个管内加入 90 μ l 无血清培养基, 将病毒上清 10 μ l 加入第 1 个 EP 管中。混匀后, 取 10 μ l 加入到第 2 个孔中, 继续操作直到最后一个管。第 1 个 EP 管中加入 10 μ l 病毒液, 记为 1E+1 μ l; 第 2 个 EP 管中进行了第 1 次

10 倍稀释, 记为 1E+0 μ l; 第 3 个 EP 管中进行了第 2 次 10 倍稀释, 记为 1E-1 μ l; 依次类推。将 293T 细胞以 4 \times 10 4 个细胞接种于 96 孔板, 接种 10 孔, 每孔体积 100 μ l。培养 24 h 后吸出 90 μ l 培养基丢弃, 加入 90 μ l 稀释好的病毒溶液, 放入培养箱培养; 96 h 后荧光显微镜计数每孔绿色荧光蛋白阳性细胞数。滴度计算公式: 绿色荧光蛋白阳性细胞数/病毒原液量。

1.4.4 慢病毒转染大鼠 BMSCs 将分离培养的大鼠 BMSCs 接种到 6 孔板, 待长至融合度约 70% 左右, 以 MOI 值 f 分别为 30、50、100 的重组慢病毒载体分别感染细胞, 72 h 后荧光显微镜观察绿色荧光表达, 确定最佳感染效率, 并用流式细胞仪测定感染效率。

1.4.5 LMP-1 基因在大鼠 BMSCs 的表达 以最佳 MOI 值感染的大鼠 BMSCs 作为实验组, 同时将未作转染的细胞作为对照组。① RT-PCR 检测 LMP-1 基因的表达。用 Primer premir 5.0 和 Oligo 6.0 软件设计 PCR 特异性引物, 仅扩增 LMP-1 基因部分, 约为 470 p, 引物设计为 LMP-1-F: 5'CAGCCGGTTCA-GAGCAAAC3', LMP-1-R: 5'GCCAGTCTCTGTGT-TCTCC3'。试剂盒提取两组细胞中总 RNA, 紫外分光光度计检测总 RNA 量及纯度。用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板, 利用扩增试剂盒及 BIORAD Real-Time -PCR 仪进行 PCR 扩增反应, 并对结果进行分析。② 慢病毒转染 14 d 后行 Western blot 检测人 LMP-1 基因编码蛋白的表达。将两组细胞在冰浴环境中蛋白裂解液裂解、匀浆后离心, SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 将蛋白转至 PVDF 膜上。经封闭、与一抗孵育、与相应二抗孵育后, 检测免疫印迹。用 SuperECL Plus 超敏发光液产生化合光, 通过 BIORAD Image Station 400 凝胶成像仪显像。

2 结果

2.1 LMP-1 基因慢病毒载体构建 将人 LMP-1 基因于经 Age I 酶切线性化载体 pGC-FU-EGFP 连接后, 成功构建 pGC-FU-LMP-1-EGFP。经基因测序与对比分析, LMP-1 基因序列与 GeneBank 中序列完全一致。

2.2 慢病毒载体包装与鉴定 由 pGC-FU-LMP-1-EGFP、pHelper1.0、pHelper2.0 3 种质粒共转染 293T 细胞, 获得重组 LV-LMP-1-EGFP, 行 RT-PCR 后酶切鉴定, 对酶切产物行琼脂糖凝胶电泳, 结果在 1.0 kb 至 1.5 kb 区间出现特异性条带, 与基因库中源序列 1 417 相符。由图 1 看出 LV-LMP-1-EGFP 构建成功。

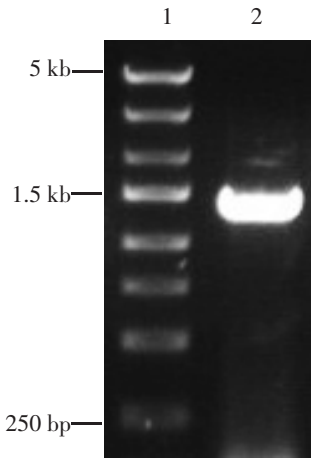


图 1 重组 LV-LMP-1-EGFP 酶切鉴定 1:Marker 2:重组慢病毒酶切产物

Fig.1 The enzyme cutting identification of recombinant LV-LMP-1-EGFP 1:Marker 2:The enzyme-digested products of recombinant lentiviral vector

2.3 慢病毒载体滴度标定 通过逐孔稀释法测定,在病毒原液量为 $1E-5$ 的细胞孔中出现 2 个绿色荧光蛋白阳性细胞,得到的病毒滴度为 2×10^8 TU/ml。

2.4 慢病毒转染大鼠 BMSCs 用重组慢病毒 LV-LMP-1-EGFP,以 MOI 值为 30、50、100 分别转染大鼠 BMSCs 72 h 后,荧光显微镜观察,比较被转染各组细胞,发现在 MOI=100 时,在不明显影响细胞生长情况下,绿色荧光蛋白阳性细胞数最多(图 2)。经流式细胞仪检测感染效率为 93.5%。

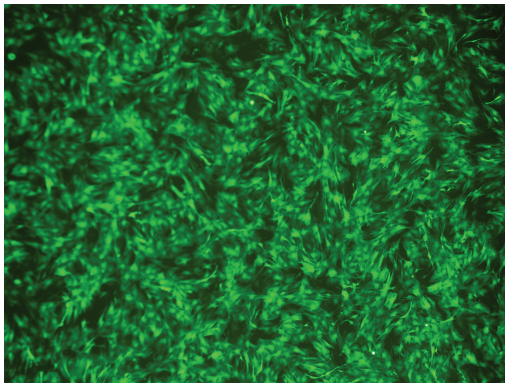


图 2 LV-LMP-1-EGFP 感染 72 h 后的大鼠 BMSCs(x40)

Fig.2 Bone mesenchymal stem cells infected with LV-LMP-1-EGFP for 72 hours(x40)

2.5 LMP-1 基因在大鼠 BMSCs 的表达 以最佳 MOI 值 100 转染的大鼠 BMSCs 作为实验组,未转染组作为对照组。

2.5.1 RT-PCR 检测 LMP-1 mRNA 表达 转染 72 h 后行 RT-PCR 检测,结果显示实验组在 500 bp 时出现特异性条带,符合药物治理论结果 470 bp,而对照组未发现 LMP-1 基因 mRNA 表达(图 3)。

2.5.2 Western blot 检测 LMP-1 基因编码蛋白表

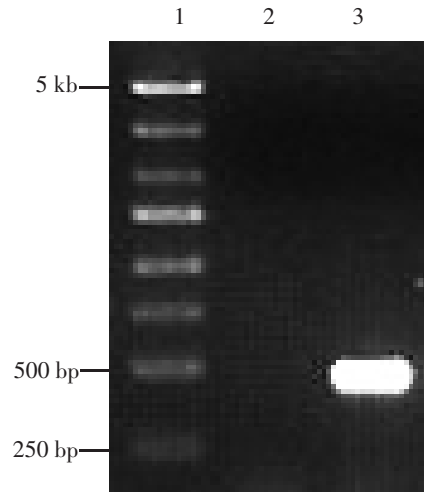


图 3 RT-PCR 检测两组 LMP-1 mRNA 表达 1:Marker 2:对照组 3:实验组

Fig.3 mRNA expression of LMP-1 in two groups by RT-PCR 1:Marker 2:Control group 3:Experiment group

达 转染 14 d 后提取实验组与对照组细胞总蛋白行 Western blot 检测,结果显示在实验组在 7 200 bp 附近有一特异性条带,与 LMP-1 融合蛋白 5 000bp+2 800 bp=7 800 bp 相吻合,对照组未发现明显条带(图 4)。

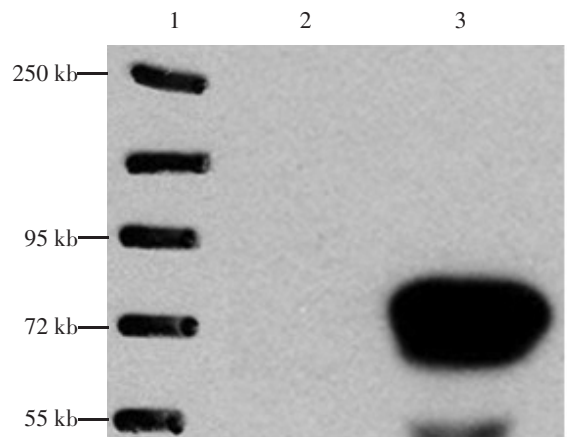


图 4 Western blot 检测两组 LMP-1 蛋白表达 1:Marker 2:对照组 3:实验组

Fig.4 Protein expression of LMP-1 in two groups by Western blot 1:Marker 2:Control group 3:Experiment group

3 讨论

3.1 骨质疏松症研究进展 骨质疏松症是最常见的代谢性骨病,其特点是体内骨吸收增加而骨形成减少,从而导致骨量减少,骨密度降低,骨脆性增加,骨折危险性增大。OP 是年龄相关性疾病,主要累及中老年人,女性居多,其引发的疼痛及 OP 骨折严重影响患者的生活质量。调查显示^[2]:全世界约 2 亿人患有 OP,我国 50 岁以上 OP 患者近 7 000 万人。当前 OP 主要依靠药物治疗,如抗骨吸收类、促骨形成类等,种类虽多,但有许多缺陷:如疗程长、疗效不确

切、费用高昂、易产生不良反应、患者依从性差,尤其是某些药物在 OP 领域的应用尚存在很大争议。随着基因工程与分子生物学的发展,利用基因工程技术将功能基因片段整合到基因载体内,再将基因载体转染入种子细胞,通过转基因的种子细胞持续大量分泌功能基因产物来治疗疾病,为更好地预防和治疗 OP 带来了希望。

3.2 慢病毒载体的应用 慢病毒(Lentivirus)载体是以人类免疫缺陷型病毒(HIV)为基础发展起来的基因治疗载体^[3]。它对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力^[4],整合于靶细胞的目的基因可长期稳达^[5]。本研究所采用的是第 3 代慢病毒载体系统,用外源性目的基因将慢病毒中的毒性基因取代。因此,构建的慢病毒具有很好的生物安全性^[3]。鉴于其高效性与安全性,慢病毒成为有效基因传递的理想工具,具有广阔应用前景^[6]。

3.3 BMSCs 的成骨分化特性 BMSCs 是成体干细胞之一,主要存在于骨髓基质中,BMSCs 具有干细胞的特性,可不断自我更新增殖,也可在一定条件下分化为软骨细胞、成骨细胞、肌细胞等^[7]。而含治疗基因的 BMSCs 不仅可以表达有用的骨诱导蛋白,而且自身可以分化成为成骨细胞等参与骨重建,它可以通过自分泌及基质诱导自身成骨分化、通过旁分泌基质诱导附近的干细胞向成骨分化^[8]。而且 BMSCs 来源充足,取材容易,基于以上特性,本研究将其作为 OP 基因治疗的种子细胞。

3.4 LMP-1 基因的成骨作用 LIM 矿化蛋白 1 (LIM mineralization protein-1, LMP-1) 是 1998 年首次发现的 LIM 蛋白家族成员之一^[9]。LMP-1 是成骨细胞分化的正调节因子,主要在骨骼中表达,促进成骨细胞分泌骨钙素及形成骨结节,在骨钙化阶段起重要作用^[1]。目前 LMP-1 促进成骨的机制尚不清楚,但已证实^[10]LMP-1 可促进 Runx2 mRNA 表达,使 BMP-2,4,6,7, BMP 受体和 TGF-β1 合成增加,上述因子都具有成骨作用,这提示 LMP-1 可能通过招募众多成骨因子共同参与成骨过程。LMP-1 是一种细胞内蛋白,没有相应受体,外源性重组 LMP-1 在体内没有活性,只有通过基因转染途径进入宿主细胞才能合成有活性的 LMP-1^[11]。

本研究成功构建携带人 LMP-1 基因慢病毒载

体 LV-LMP-1-EGFP, 作为治疗骨代谢性疾病种子细胞的 BMSCs 被成功转染,并高效表达 LMP-1 基因,为进一步的体内实验奠定基础,也为运用 LMP-1 基因预防与治疗骨质疏松症提供了实验依据。

参考文献

- [1] Zhang Q, Wang X, Chen Z. Semi-quantitative RT-PCR analysis of LIM mineralization protein 1 and its associated molecules in cultured human dental pulp cells[J]. Arch Oral Biol, 2007, 52(8):720-726.
- [2] Zhu HM, Fang JQ, Luo XZ. Bone mass epidemiology: bone mass change and mean peak bone mass for mainland China[J]. International osteoporosis conference China bone and joint decade, 2007, 10:4-18.
- [3] Lim FY, Kobinger GP, Weiner DJ, et al. Human fetal trachea-SCID mouse xenografts: efficacy of vesicular stomatitis virus-G pseudotyped lentiviral-mediated gene transfer[J]. J Pediatr Surg, 2003, 38(6):834-839.
- [4] Aldini L, Blomer U, Gallay P, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector[J]. Science, 1996, 27(2):263-267.
- [5] Cockrell AS, Kafri T. Gene delivery by lentiviral vectors[J]. Mol Biotechnol, 2007, 36(3):184-204.
- [6] 胡明, 马远征, 李大伟, 等. 慢病毒介导的 RNA 干扰技术构建人胚椎间盘髓核上皮膜蛋白-1 基因低表达细胞模型[J]. 中国骨伤, 2012, 25(10):842-845.
Hu M, Ma YZ, Li DW, et al. Construction of Epithelia membrane Protein 1 gene-deficient in human fetal nucleus pulposus cell model by lentivirus-mediated RNA interference[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2012, 25(10):842-845. Chinese with abstract in English.
- [7] Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cell: clinical applications and biological characterization[J]. Int J Biochem Cell Bid, 2004, 36(4):568-584.
- [8] Pelled G, Turgeman G, Aslan H, et al. Mesenchymal stem for bone gene therapy and tissue engineering[J]. Curr Pharm Des, 2002, 8(21):1917-1928.
- [9] Boden SD, Liu YS, Gregory AH. LMP-1, A LIM-domain protein, mediates BMP-6 effects on bone formation[J]. Endocrinology, 1998, 139(12):5125-5134.
- [10] Minamide A, Boden SD, Viggswarapu M. Mechanism of bone formation with gene therapy of the cDNA encoding for the intracellular protein LMP-1[J]. J Bone Joint Surg Am, 2003, 85(6):1030-1039.
- [11] Scott DB. Biology of lumbar spine fusion and use of bone graft substitutes: present, future, and next generation[J]. Tissue Engineering, 2000, 6(4):383-399.

(收稿日期:2013-01-17 本文编辑:李宜)