

•基础研究•

LMP-1 基因慢病毒重组体对大鼠骨髓间充质干细胞的增殖影响及其表达

梁长生, 向川, 魏增永, 侯慧铭, 秦迎泽, 卫小春
(山西医科大学第二医院骨科, 山西 太原 030001)

【摘要】 目的:探讨 LMP-1 重组慢病毒载体体外转染大鼠骨髓间充质干细胞(BMSC)的方法,并检测 LMP-1 基因对 BMSC 增殖能力的影响及表达。方法:选取清洁级 4 周龄 SD 大鼠 6 只(雌雄不限),无菌条件下提取骨髓间充质干细胞并培养至第 3 代,设立空白对照组(未经特殊处理,只有第 3 代骨髓间充质干细胞)、慢病毒载体转染组(在未经特殊处理的第 3 代骨髓间充质干细胞中加入 PGC-FU-GFP 及转染试剂 Polybrene)和重组基因转染组(在未经特殊处理的第 3 代骨髓间充质干细胞中加入 PGC-FU-LMP-1-GFP 及转染试剂 Polybrene)进行转染。转染 48 h 后,通过免疫荧光显微镜观察荧光表达,流式细胞仪检测慢病毒的转染效率,采用 MTT 法评价慢病毒转染对 BMSC 增殖的影响;Western Blot 检测转染后基因的表达情况。结果:①成功培养出第 3 代 SD 大鼠 BMSC,以 100 的感染复数(MOI)转染,48 h 后免疫荧光显微镜下可见大量绿色荧光蛋白表达,转染效率达 67%;②不同时间点慢病毒载体转染组和重组基因转染组,与空白对照组细胞增殖比较差异无统计学意义;③Western Blot 检测示重组基因转染组 72 kDa 处有条特征带,其大小与 LMP-1 融合蛋白(~50 kDa+28 kDa=78 kDa)基本吻合。结论:经 LMP-1 基因慢病毒重组体转染大鼠骨髓间充质干细胞对其增殖活力没有影响并可有效表达 LMP-1。

【关键词】 基因组,病毒;骨髓细胞;细胞增殖;转染

DOI:10.3969/j.issn.1003-0034.2013.12.012

Effects of recombinant gene lentivirus containing LIM mineralization protein-1 on proliferation effect and expression of bone marrow mesenchymal stem cells in rats LIANG Chang-sheng, XIANG Chuan, WEI Zeng-yong, HOU Hui-ming, QIN Ying-ze, and WEI Xiao-chun. Department of Orthopaedics, the Second Hospital Affiliated to Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi, China

ABSTRACT **Objective:** To explore method of recombinant gene lentivirus containing LIM mineralization protein-1 (LMP-1) in transfecting bone marrow mesenchymal stem cells (BMSC), and to observe the effect of gene LMP-1 on proliferation effect and expression of BMSC. **Methods:** Six clean SD rats aged 4 weeks were selected, bone marrow mesenchymal stem cells were extracted under sterile conditions and cultured to the third generation, then divided into three groups: control group (the third generation of BMSC), lentiviral vector transfection group (PGC-FU-GFP and Polybrene were injected into the third generation of BMSC) and recombinant gene transfection group (PGC-FU-LMP-1-GFP and Polybrene transfection were injected into the third generation of BMSC). After 48 hours' transfection, fluorescent expression were detected under immuno-fluorescence microscopy; lentiviral transfection efficiency were detected by flow cytometry; effect of lentiviral transfection on BMSC were evaluated by MTT; gene expression of transfected cells were determined by Western Blot. **Results:** ①The third generation of BMSC was cultured successfully, and transfected with MOI:100. After 48 hours, green fluorescent expression were detected and transfection efficiency was 67% under immuno-fluorescence microscopy; ②Compared to control group, there were no statistical differences between control group and other two groups; ③Western blot teast showed that 72KDa specific band was observed in recombinant gene transfection group and its sizewas similar to LMP-1 fusion protein(50 kDa+28 kDa=78 kDa). **Conclusion:** There is no effect of recombinant gene lentivirus containing LIM on BMSC, and can effectively influence the expression of LMP-1.

KEYWORDS Genome, viral; Bone marrow cells; Cell proliferation; Transfection

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2013, 26(12):1023-1027 www.zggszz.com

基金项目:山西省自然科学基金资助项目(编号:2010011050-2)
Fund program:Natural Science Foundation of Shanxi Province (No. 2010011050-2)
通讯作者:向川 E-mail:xcml7275@163.com

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是主要累及中老年人的常见疾患,严重影响患者的生活质量。随着现代分子生物学和基因工程技术的迅速发展,基因治疗的方法为解决这一问题带来了希望^[1]。LIM 矿化

蛋白 1 (LIM mineralization protein-1, LMP-1) 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^[2]。实验^[3]证实 LMP-1 可促进 Runx2 mRNA 表达,使 BMP-2、4、6、7, BMP 受体和 TGF- β 1 合成增加,上述因子都具有成骨作用,这提示 LMP-1 可通过招募众多成骨因子共同参与成骨过程。因此,表明 LMP-1 具有促进成骨作用,而且可能会率先启动众多成骨因子的成骨级联效应。本实验以重组基因 PGC-FU-LMP-1-GFP 转染 BMSCs, 观察其对细胞活性的影响及基因表达,为今后临床开展 OP 的基因治疗提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 4 周龄清洁级 SD 大鼠 6 只 (雌雄不限), 体重 90~100 g, 由山西医科大学实验动物中心提供, 质量合格证号: SYXK(晋)2007-0021。饲养条件: 清洁型动物实验室, 室温为 22~24 $^{\circ}$ C, 相对湿度为 40%~65%, 每小时换新风 18 次。实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准。

1.2 药品与主要试剂及仪器 生物洁净工作台 (BCM-1000 型), -70 $^{\circ}$ C 超低温冰箱 (MDF-382E 型), 4 $^{\circ}$ C 普通冰箱 (BCD-215KA DZ 型), CO₂ 培养箱 (HF212 型), Western-Blot 电泳、转膜系统, 荧光显微 3.3RTV, 倒置光学显微镜 XS2-D 型, 高速冷冻离心机 5810R, 微量震荡器 (ZW-A 型), 酶标仪 Multiskan MK3 型等主要仪器由山西医科大学第二医院骨科重点实验室提供。LMP-1 一抗 (sc-9996) 和 LMP-1 二抗 (sc-2005) 购自 Santa Cruz 生物技术有限公司, PGC-FU-LMP-1-GFP 和 PGC-FU-GFP 由上海吉凯生物技术有限公司合成。DMEM-F12 培养液购自赛默飞世尔生物化学制品有限公司, 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司, PBS 缓冲液, 胰酶和 MTT 溶液均由山西医科大学第二医院骨科重点实验室提供。

1.3 实验方法

1.3.1 第 3 代 BMSCs 的获取 采用颈椎脱臼法处死大鼠, 用 95% 的乙醇浸泡 10 min, 用第 1 套消毒的手术器械在无菌条件下取其胫骨和股骨, 浸泡在无菌的 PBS 液中, 转移置于超净工作台。用已消毒的第 2 套手术器械刮除胫骨和股骨上的肌肉并用剪刀剪去两端, 显露髓腔。5 ml 无菌注射器吸取培养液 (青、链霉素各 100 μ /ml, 10% 小牛血清、低糖 DMEM) 冲洗胫骨和股骨的髓腔 30 次, 随后将该液体移入 20 ml 离心管中 1 000 r/min 离心 10 min。弃悬液, 加 5 ml 培养液, 吸管吹打成单细胞悬液。随后在计数板上计数后接种于培养瓶中, 最后置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 空气

孵箱中培养并标记为原代细胞。以后每 3 d 换液一次并用倒置显微镜观察。原代细胞达 80% 融合时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化 1 min。镜下观察细胞形态变化后, 加入培养液终止消化, 随后将培养瓶内液体用无菌吸管吸入无菌离心管, 1 000 r/min 离心 10 min。弃上清, 加入培养液将细胞重悬, 混合均匀, 以 1×10^4 /cm² 接种于培养瓶, 传代培养。再重复上述操作, 反复传代扩增, 转至第 3 代细胞为止。

1.3.2 实验分组 将培养的第 3 代细胞分为空白对照组 (骨髓间充质干细胞不做任何转染); 慢病毒载体转染组 (加入 PGC-FU-GFP 及转染试剂 Polybrene); 重组基因转染组 (加入 PGC-FU-LMP-1-GFP 及转染试剂 Polybrene)。

1.3.3 PGC-FU-LMP-1-GFP 在骨髓间充质干细胞中的转染 取铺满培养瓶底的第 3 代 BMSCs, 先用 PBS 液清洗 2 遍, 快速用 0.25% 胰蛋白酶消化, 按转染要求以 $(3\sim 5) \times 10^4$ /ml 分别接种于 96 孔培养板上的 3 组 (每孔 80 μ l, 每组 9 个孔, 共 27 个孔)。培养 1~2 d。按照实验设计, 以 MOI (感染复数) 分别为 10、50、100 配备病毒液。方法为取滴度为 2.00×10^8 TU/ml 的病毒液 (包括载体病毒液和含 LMP-1 的病毒液), 通过计算加入 Eni.S 一定比例分别稀释成 0.100×10^8 TU/ml、 0.500×10^8 TU/ml、 1.000×10^8 TU/ml。取稀释好的病毒液 10 μ l 分别加入到慢病毒载体转染组和重组基因转染组相应孔中 (MOI 为 10、50、100 的各 3 个孔)。取 2 μ l Polybrene (10 mg/ml) 用培养液稀释到 400 μ l, 慢病毒载体转染组和重组基因转染组各孔加入 10 μ l。将培养板放入温箱, 12 h 后观察细胞状态, 更换培养液。

1.4 观察项目与方法

1.4.1 转染效率的检测 将分离培养的大鼠骨髓间充质干细胞接种到 96 孔板, 以 MOI 值为 10、50、100 的重组慢病毒载体分别感染细胞, 48 h 后倒置荧光显微镜观察绿色荧光表达, 随后用 PBS 液冲洗 2 次后, 加入适量的胰酶, 3 min 内通过显微镜观察细胞悬浮后迅速加入等量细胞培养液中和, 随后置入离心管内, 1 000 r/min 离心 10 min 后弃上清液, 加入 500 μ l PBS 液, 轻轻摇晃, 把细胞混均匀。最后在流式细胞仪上测定该基因转染的表达率及平均荧光强度并寻求最佳转染比例。

1.4.2 细胞增殖能力的检测 通过转染效率的测定, 选 MOI 为 100 转染后的细胞采用 MTT 法测定第 1、3、5、7 天细胞的增殖情况。空白对照组、慢病毒载体转染组和重组基因转染组每个时间点 8 个孔, 重复 3 次。随后在每个时间点取出 1 块 96 孔培养板, 按组加入 5 mg/ml 的 MTT 溶液 20 μ l, 混匀, 在 5%

CO₂, 37℃培养箱继续培养 4 h 后吸弃孔内培养上清液,加入 DMSO 150 μl,震荡培养 10 min。用全自动酶联免疫检测仪测定在 490 nm 波长处的吸光度(OD 值)。

1.4.3 LMP-1 基因在大鼠骨髓间充质干细胞的表达 采用 Western Blot 法检测转染 LMP-1 的骨髓间充质干细胞中的蛋白表达水平,同 0 时与慢病毒载体转染组和空白对照组做阴性对照。将 3 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、二抗孵育后,检测免疫印迹。用 SuperE-CL Plus 超敏发光液产生化合光,通过 BIORAD Image Station 400 凝胶成像仪显像。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,实验数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,不同时间各组间增殖能力的影响采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs 的形态学特征 从大鼠四肢中得到的 BMSCs,24 h 后在显微镜下观察原代细胞为分散、克隆集落方式增殖。72 h 后观察细胞,呈长梭状,还存在少数的杂质细胞。当细胞贴壁达 80%以上时开始传代,直到第 3 代 BMSCs,其纯度可达 95%。(图 1)



图 1 第 3 代大鼠骨髓间充质干细胞(×100)

Fig.1 The third generation of bone marrow mesenchymal stem cells (×100)

2.2 转染 BMSCs 后的观察 PGC-FU-LMP-1-GFP 转染 BMSCs 48 h 后,在倒置荧光显微镜观察显示绿

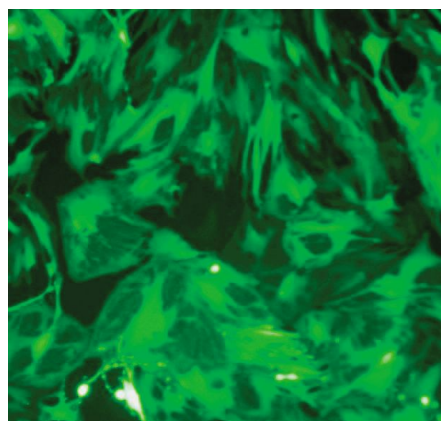


图 2 PGC-FU-LMP-1-GFP 转染 2 d 后的大鼠骨髓间充质干细胞(×200)

Fig.2 Bone marrow mesenchymal stem cells transfected by PGC-FU-LMP-1-GFP after two days(×200)

色荧光,且荧光强度相对较强(图 2)。

2.3 目的基因在 BMSCs 转染率的检测 PGC-FU-LMP-1-GFP 转染 48 h 后,制成单细胞悬液,在流式细胞仪上测定转染率。MOI 为 10、50、100 的转染率分别为 13.5%、48.9%和 67%(图 3-5)。

2.4 转染后对 BMSCs 增殖的影响(MOI 为 100) 慢病毒载体转染组和重组基因转染组转染后,通过 MTT 法测得结果与空白对照组比较,24 h 后,开始进入增殖期,此期细胞增殖活跃,第 5 天到达增殖高峰,从第 6 天开始细胞增殖开始下降,生长曲线和空白对照组基本相似。经统计学分析,不同时间点慢病毒载体转染组和重组基因转染组,相对于空白对照组细胞增殖差异无统计学意义(表 1,图 6)。

2.5 Western Blot 检测 LMP-1 蛋白的表达 空白对照组、慢病毒载体转染组和重组基因转染组均出现 38 kD 左右的 GAPDH 内参条带,只有重组基因转染组可以观察到 72 kD 附近有条特征带,其大小与 LMP-1 融合蛋白(~50 kDa+28 kDa=78 kDa)基本吻合,因此判断 LMP-1 在 BMSCs 中表达(图 7)。

3 讨论

骨质疏松症系由多种原因引起的一组骨病,其特点是单位体积内骨量减少,骨皮质变薄,骨小梁数目及大小均减少,髓腔增宽,骨荷载功能减弱,从而产生腰背、四肢疼痛,脊柱畸形,骨脆性增加,最终可

表 1 转染 24 h 后不同时间点 BMSCs 的 OD 值($\bar{x}\pm s$ n=8)

Tab.1 OD value of BMSCs at different time points after 24 hours' transfection($\bar{x}\pm s$, n=8)

组别	培养板孔数	第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 7 天
空白对照组	8	0.040±0.015	0.172±0.020	0.235±0.071	0.167±0.042
慢病毒载体转染组	8	0.028±0.010	0.150±0.020	0.213±0.027	0.154±0.088
重组基因转染组	8	0.026±0.012	0.155±0.021	0.208±0.043	0.167±0.054
F 值	-	1.151	1.122	0.732	0.424
P 值	-	0.083	0.092	0.121	0.502

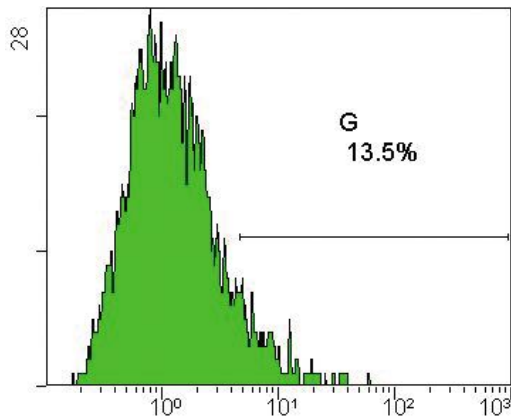


图 3 转染 48 h 后 BMSCs 的感染效率(MOI=10)
Fig.3 Transfection efficiency of BMSCs after 48 h (MOI=10)

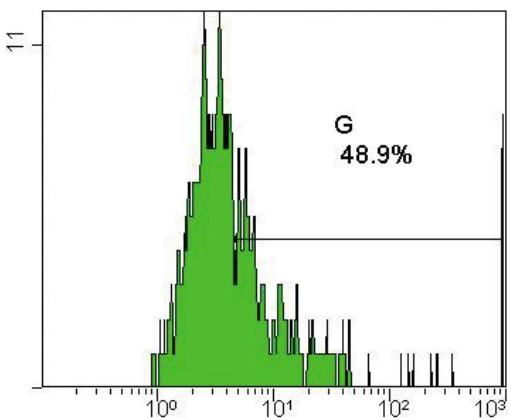


图 4 转染 48 h 后 BMSCs 的感染效率(MOI=50)
Fig.4 Transfection efficiency of BMSCs after 48 h (MOI=50)

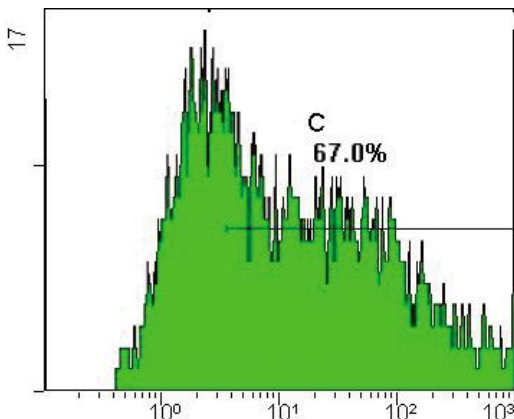


图 5 转染 48 h 后 BMSCs 的感染效率(MOI=100)
Fig.5 Transfection efficiency of BMSCs after 48 h (MOI=100)

导致骨折,多见于中、老年人^[4]。据 IOF(国际骨质疏松基金会)统计,全球约有 2 亿骨质疏松患者^[5]。骨质疏松作为老年性疾病越来越受到人们的关注,而且也是摆在科研工作者面前急需解决的问题^[6]。随着现代分子生物学技术的飞速发展,基因治疗骨质疏松等骨代谢疾病正成为当今研究的热点。目前大多数的研究都处在动物实验阶段,但却展示出诱人的前景。

3.1 重组基因在宿主细胞中高效表达 LMP-1 是

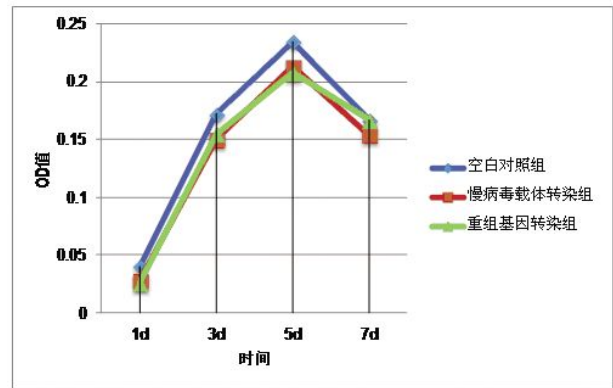
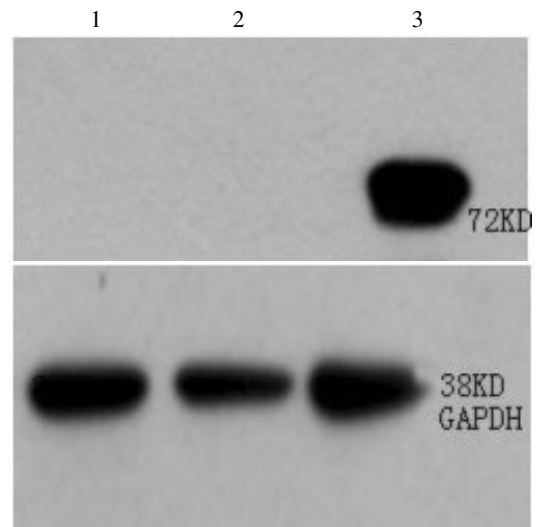


图 6 转染 24 h 后 1~7d MSCs 的增殖情况
Fig.6 Proliferation of BMSCs infected for 24 h after 1 to 7 d



1.空白对照组 2.慢病毒载体转染组 3.重组基因转染组

图 7 各组 LMP-1 蛋白表达 Western Blot 检测
Fig.7 Protein expression of LMP-1 in each group by Western Blot

1998 年首次发现的 LIM 蛋白家族成员之一^[7]。在动物实验方面, Boden 等^[8]利用兔子进行脊柱融合实验,显示 pCMV2 载体携带的 LMP-1 基因虽转染效率不高,但实验组仍获得 100%椎体融合,而对照组则无一例融合,说明 LMP-1 诱发了成骨过程中“瀑布”般的放大效应。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。因此,在本实验中,作为治疗骨代谢性疾病的种子细胞骨髓间充质干细胞被重组基因成功转染,并高效表达 LMP-1 基因,为运用 LMP-1 基因预防与治疗骨质疏松症提供了实验依据。

3.2 慢病毒载体对转染的影响 载体在基因治疗中起着至关重要的作用。本实验选择的慢病毒载体是目前阶段应用最多、最理想的病毒载体。目前使用的慢病毒载体多由人类免疫缺陷病毒 HIV-1 改进的,它不但可以感染分裂细胞,还可以感染非分裂细胞^[9]。此外,由于没有病毒蛋白的表达,在动物实验

中不会引起免疫反应;构建了自身失活型质粒(病毒 3'端 LTR 上的 U3 领域被删除),这样病毒基因组就不能被复制,进一步消除了产生可复制病毒的可能性,最大限度地提高了其生物学安全性^[10]。迄今为止,应用高敏感的检测技术尚未发现应用慢病毒载体转导基因时产生可复制病毒^[11-12]。因此,构建的慢病毒载体所表现出的生物安全性,为本实验提供了理想的基因转染工具。

总之,本实验从实验方法学的角度证实了慢病毒载体介导的 LMP-1 基因可高效转染 BMSCs,通过 Western Blot 检测结果,证实 LMP-1 在 BMSCs 高效稳定表达的特性,经流式细胞仪检测证实 MOI 值为 100 的情况下转染率最高并且稳定,同过通过 MTT 法检测分析得到病毒载体转染组和重组基因转染组转染后,与空白对照组比较并未对 BMSCs 的生长状态及增殖产生明显抑制。因此为下一步研究 LMP-1 在动物体内转染提供了坚实的实验基础。

参考文献

- [1] 许兵,刘慧,金红婷,等.经典骨质疏松症模型大鼠的肾虚证研究[J].中国骨伤,2012,25(9):766-770.
Xu B, Liu H, Jin HT, et al. Research on osteoporosis model rats with kidney deficiency syndrome[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2012, 25(9):766-770. Chinese with abstract in English.
- [2] Zhang Q, Wang X, Chen Z, et al. 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.
- [3] Minamide A, Boden SD, Viggesswarapu M, et al. 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.

- [4] 程伟,郭明冬,周文泉.骨质疏松症中医临床研究探讨[J].中国骨伤,2008,21(6):443-444.
Cheng W, Guo MD, Zhou WQ. Clinical research on osteoporosis by Traditional Chinese Medicine(TCM)[J]. Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2008, 21(6):443-444. Chinese.
- [5] Cole ZA, Dennison EM, Cooper C. Osteoporosis epidemiology update[J]. Curt Rheumatol Rep, 2008, 10:92-96.
- [6] Bergner U, Johell O, Redlund-Johell I. Changes in incidence and prevalence of vertebral fracture during 30 years[J]. Calcif Tissue Int, 1988, 42(5):293-296.
- [7] Boden SD. Biology of lumbar spine fusion and use of bone graft substitutes: present, future, and next generation[J]. Tissue Eng, 2000, 6(4):383-399.
- [8] Boden SD, Liu Y, Hair GA, et al. LMP-1, a LIM-domain protein, mediates BMP-6 effects on bone formation[J]. Endocrinology, 1998, 139(12):5125-5134.
- [9] Mouës CM, Heule F, Hovius SE. A review of topical negative pressure therapy in wound healing: sufficient evidence[J]. Am J Surg, 2011, 201(4):544-556.
- [10] Bai Y, Soda Y, Izawa K, et al. Effective transduction and stable transgene expression in human blood cells by a third-generation lentiviral vector[J]. Gene Ther, 2003, 10(17):1446-1457.
- [11] Segall H, Sutton RE. Detection of replication-competent lentiviral particles[J]. Methods Mol Biol, 2003, 229:87-94.
- [12] Esearpe P, Zayek N, Chin P, et al. Development of a sensitive assay for detection of replication competent recombinant lentivirus in large scale HIV-based vector preparations[J]. Mol Ther, 2003, 8(2):332-341.

(收稿日期:2013-04-25 本文编辑:李宜)

·读者·作者·编者·

本刊关于作者姓名排序的声明

凡投稿本刊的论文,其作者姓名及排序一旦在投稿时确定,在编排过程中不再作改动,特此告知。

《中国骨伤》杂志社