

· 基础研究 ·

慢病毒介导 SOX9 基因转染骨髓间充质细胞中的基因表达

白洁玉, 梁大川, 程鹏, 杨自权, 卫小春
(山西医科大学第二医院骨科, 山西 太原 030001)

【摘要】 目的: 构建携带小鼠 SOX9 基因的慢病毒载体, 体外转染小鼠骨髓间充质细胞, 观察小鼠 SOX9 基因在小鼠间充质细胞中的表达。方法: 从含有小鼠 SOX9 基因的质粒提取总 RNA, 利用 RT-PCR 方法扩增目的基因。连接目的基因与经 Age-I 酶切线性化的慢病毒载体, 转化感受态的大肠杆菌对质粒进行扩增, 筛出阳性转化子, 经 293T 细胞包装, 收集病毒后, 通过基因测序和限制性核酸内切酶酶切的方法对质粒进行鉴定。Lenti-SOX9-EGFP 体外转染小鼠骨髓间充质细胞, 利用倒置荧光显微镜观察转染是否成功, 并通过流式细胞仪测定转染效率。同时利用 RT-PCR 和 Western Blot 检测小鼠 SOX9 基因的表达。结果: 成功构建了携带 SOX9 基因慢病毒载体, Lenti-SOX9-EGFP 能高效转染小鼠骨髓间充质细胞。RT-PCR 和 Western Blot 检测显示经 SOX9 基因转染的小鼠骨髓间充质细胞表达目的基因产物。结论: 利用慢病毒介导 SOX9 基因成功地转染小鼠骨髓间充质细胞, 而且 SOX9 基因在小鼠骨髓间充质细胞中得到表达, 这为 SOX9 修复软骨损伤的进一步研究奠定了基础。

【关键词】 骨关节炎; 细胞介导免疫; 慢病毒属; SOX9 基因; 骨髓间充质细胞

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2013.07.016

Gene expression of bone mesenchymal stem cells transduced by the lentiviral vector of SOX9 gene BAI Jie-yu, LIANG Da-chuan, CHENG Peng, YANG Zi-quan, and WEI Xiao-chun. Department of Orthopaedics, the Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi, China

ABSTRACT Objective: To construct one lentiviral vector containing mouse SRY-related high mobility group-box gene 9 (SOX9) and transfect the murine bone mesenchymal stem cells (mBMSCs) in vitro and observe the expression of target gene. **Methods:** RNA from the vectors containing mouse SOX9 gene were extracted and SOX9 genes were amplified by reverse transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). The SOX9 genes were connected into lentiviral vectors pGC-FU. Then pGC-FU-SOX9 transduced into 293T cells to produce recombinant lentivirus called as Lenti-SOX9-EGFP. mBMSCs were transfected. The expression of target gene was detected by immunofluorescence, RT-PCR and Western Blot. **Results:** Lenti-SOX9-EGFP was recombined successfully and transduced efficiently into mBMSCs. The expression of SOX9 gene was confirmed by RT-PCR and Western Blot. **Conclusion:** Lentiviral vector of mouse SOX9 gene can transfect successfully into mBMSCs. Meanwhile, SOX9 gene may be expressed in mBMSCs. This will provide the target cells for the following study about SOX9 gene repairing cartilage injury.

KEYWORDS Osteoarthritis; Cell-mediated immunity; Lentivirus; SOX9 gene; Bone mesenchymal stem cells

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2013, 26(7):597-600 www.zggszz.com

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是由于软骨退变引起的, 所以随着人口老龄化的加剧, 骨关节炎的发病率及患病率也在逐渐增加, 这给国家和社会带来沉重的负担^[1-2]。基因增强组织工程技术的建立和发

展, 为运用修复软骨的方法治疗骨关节炎带来希望。SOX9 是软骨分化过程中的一个关键的转录因子^[3], 可以促进间充质细胞向软骨分化并修复软骨损伤^[4]。本研究试图构建携带 SOX9 基因的慢病毒载体, 并检测目的基因在经转染的小鼠骨髓间充质细胞中的表达状况。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 限制性内切酶购自美国 New England Biolab 公司。DMEM/F12 培养基及胎牛血清购自英国 Gibco 公司。琼脂糖购自赛百盛公司。PCR 引物有捷瑞生物公司合成。RNA 提取试剂 Trizol 及

基金项目: 国际科技合作项目(编号: 2010DFA32450); 国家自然科学基金资助项目(编号: 30973048); 国家人事部及山西省人事厅留学回国人员科技活动择优资助项目; 山西省留学基金项目(编号: 107); 山西省自然科学基金资助项目(编号: 2010011050-6)

Fund program: International Scientific and Technological Cooperation Program(No. 2010DFA32450)

通讯作者: 杨自权 E-mail: yzqonline@126.com

Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。抗体购自 Santa Cruz 公司,BCA 蛋白定量分析试剂盒购自 Hyclone 公司,蛋白提取试剂盒购自凯基生物公司。

1.2 细胞株、菌株与质粒 293T 细胞、大肠杆菌菌株 DH5 α 、pGC-FU 质粒、pHelper 1.0 质粒、pHelper 2.0 质粒、含 SOX9 基因的质粒购自 Gene Chem 公司。

1.3 干预措施

1.3.1 目的基因片段的获取 用 Trizol 从含 SOX9 基因的质粒中提取总 RNA;设计引物:SOX9-9-Age I-F:5' -GAGGATCCCCGGGTACCGGTCGCCACCAT GAATCTCCTGCACCCCTTC -3' (含 Age I 酶切位点),SOX9 -Age I -R:5' -TCACCATGGTGGCGAC-CGGGGTCTGGTGGAGCTGTGTG-3' (含 Age I 酶切位点)。利用 RT-PCR 方法扩增得到含有 Age I 酶切位点的 SOX9 基因(1521 bp)。

1.3.2 小鼠骨髓间充质细胞的分离与培养 无菌操作下取出小鼠(雌雄不限,4~6 周龄)双侧胫骨及股骨,剪掉两侧骨端,用完全培养基反复冲洗髓腔至变白,将冲洗获得的细胞悬液接种于 T25 培养瓶中,在 37 $^{\circ}$ C,5%CO $_2$,100%饱和湿度的条件下进行培养。传至 3 代时细胞性状稳定后用于基因转染。

1.4 观察项目与方法

1.4.1 慢病毒载体的构建 将经扩增获得的 SOX9 基因连接到经 Age I 酶切线性化的 pGC-FU 质粒中,构建 pGC-FU-SOX9 质粒。之后转化感受态的大肠杆菌对质粒进行扩增,经 PCR 筛选后获得重组慢病毒质粒 pGC-FU-SOX9,基因测序鉴定。PCR 筛选及基因测序的引物为:Ubi-F:5' -GGGTCAATAT-GTAATTTTCAGTG-3' (位于 Ubiquitin 启动子中),EGFP-N-R:5' -CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG-3' (位于 EGFP 基因的 N 端)。引物 Ubi-F 与 EGFP-N-R 分别位于 pGC-FU-SOX9 质粒的两端。

1.4.2 重组慢病毒的产生与鉴定 pGC-FU-SOX9 质粒、pHelper 1.0 质粒、pHelper 2.0 质粒分别进行高纯度无内毒素提取后,共转染 293T 细胞,培养 2 d 后收集富含慢病毒颗粒的上清,此时产生的病毒即为重组慢病毒 Lenti-SOX9-EGFP。之后,用 Trizol 提取病毒总 RNA,RT-PCR 后酶切鉴定。将获得的病毒上清逐次稀释 10 倍,共稀释 7 次,获得 8 个梯度的病毒上清,依次转染 293T 细胞,培养 4 d 后观察荧光表达情况。荧光细胞数随着稀释倍数的增加而减少,计数出现荧光细胞的最大稀释倍数(10n)孔内的荧光细胞数(m),病毒的滴度:m \times 10 n TU/ml。

1.4.3 目的基因在小鼠骨髓间充质细胞中的表达

经转染预实验得到最佳转染复数 MOI 为 50。按 MOI=50 转染细胞,作为实验组,未转染的细胞作为对照组。①培养 72 h 后,倒置荧光显微镜下观察荧光的表达情况,并用流式细胞仪测定转染效率。②转染 72 h 后,分别提取细胞总 RNA。RT-PCR 检测 SOX9 基因的表达。设计引物为 SOX9-F:5' -GAGCCAGGCCAGTCCCAGCG -3'; SOX9-R:5' -CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG-3'(445 bp)。③转染 2 周后,分别提取细胞总蛋白,测定蛋白浓度后调整其终浓度为 2 μ g/ μ l,-70 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。Western Blot 测定目的基因所编码蛋白的表达。一抗为小鼠抗小鼠 GFP 单克隆抗体 1:2000 稀释,二抗为羊抗小鼠酶标抗体 1:5000 稀释。每个样品各取 80 μ g 总蛋白上样,经 10%SDS-PAGE 电泳,电转移至 PVDF 膜。封闭液(含 5%脱脂牛奶)室温封闭 1 h 后,加入一抗室温孵育 2 h,二抗室温孵育 2 h,洗膜 3 次后,ECL 显色,凝胶成像系统扫描显像。

2 结果

2.1 慢病毒载体的构建 SOX9 基因与 pGC-FU 质粒经酶切后,成功连接形成重组慢病毒质粒 pGC-FU-SOX9。经基因测序比对分析显示,目的基因序列与基因库中的源序列完全吻合。

2.2 重组慢病毒的产生与鉴定 pGC-FU-SOX9 质粒、pHelper 1.0 质粒和 pHelper 2.0 质粒经 293T 细胞包装后产生重组慢病毒 Lenti-SOX9-EGFP。通过逐孔稀释法测定病毒滴度,滴度为 2 \times 10 8 TU/ml。提取病毒总 RNA,RT-PCR 后酶切重组慢病毒。对酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳,结果在 1.5 kb 处出现一条带。该结果与基因库中的源序列大小(1 521 bp)相符(图 1),证明所获得的慢病毒载体为 Lenti-SOX9-EGFP。

2.3 目的基因在小鼠骨髓间充质细胞中的表达

2.3.1 荧光显微镜观察 重组慢病毒 Lenti-SOX9-EGFP 转染小鼠骨髓间充质细胞 72 h 后,置倒置荧光显微镜下观察,发现绿荧光的表达,未转染的细胞作为对照(图 2)。经流式细胞仪测定转染效率为 76.6%。

2.3.2 RT-PCR 结果 小鼠骨髓间充质细胞被重组慢病毒 Lenti-SOX9-EGFP 转染后 72 h,提取细胞总 RNA 进行 RT-PCR 分析。结果显示转染组出现一大小为 445 bp 的条带,符合预期结果。而未转染组没有发现 SOX9 基因的表达(图 3)。

2.3.3 Western Blot 结果 转染后 2 周提取细胞总蛋白进行免疫印迹分析,结果显示 SOX9 基因转染组可检测到阳性条带(72 000-95 000),其大小与 SOX9 融合蛋白(55 000+28 000=83 000)相吻合。对

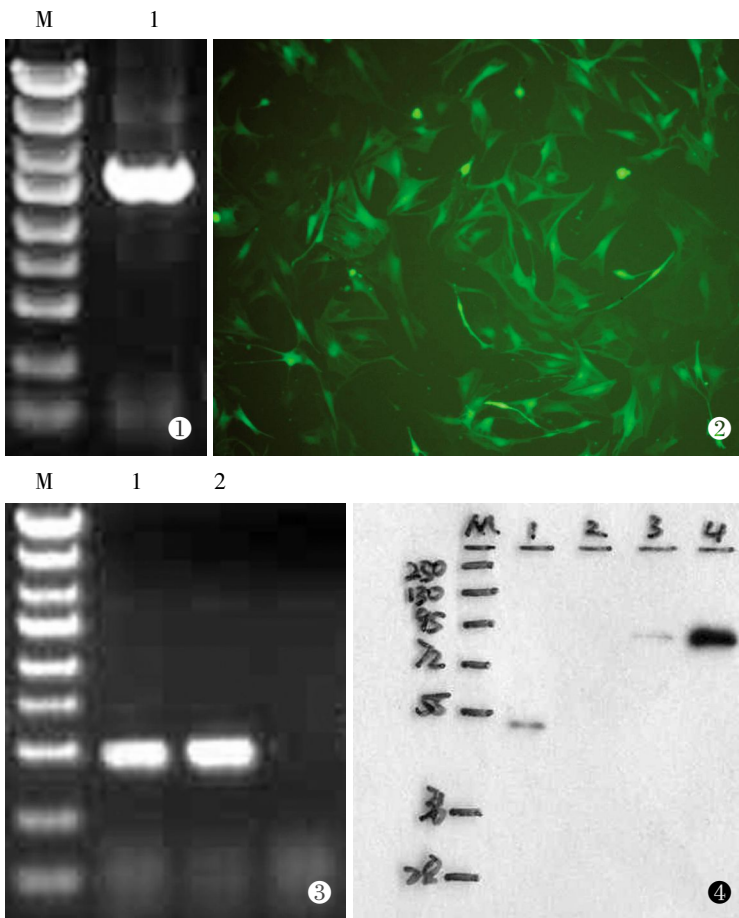


图 1 重组慢病毒酶切鉴定 M: 自上而下分别为 5 kb, 3 kb, 2 kb, 1.5 kb, 1 kb, 750 bp, 500 bp, 250 bp, 100 bp; 1: 重组慢病毒酶切产物 图 2 基因转染 72 h 后荧光显微镜观察 图 3 基因转染 72 h 后 RT-PCR 检测 M: 自上而下分别为 5 kb, 3 kb, 2 kb, 1.5 kb, 1 kb, 750 bp, 500 bp, 250 bp, 100 bp; 1: 实验组; 2: 对照组 图 4 基因转染 2 周后 Western Blot 检测 M: 自上而下分别为 250 kd, 130 kd, 95 kd, 72 kd, 55 kd, 36 kd, 28 kd; 1: 实验组; 2: 对照组

Fig.1 The enzyme cutting identification of recombinant lentiviral vector M: 5 kb, 3 kb, 2 kb, 1.5 kb, 1 kb, 750 bp, 500 bp, 250 bp, 100 bp from upper to inferior mark, respectively; 1: The enzyme-digested products of recombinant lentiviral vector **Fig.2** Fluorescence microscopic appearance at 72 hours after transfection **Fig.3** Electrophoresis result of RT-PCR at 72 hours after transfection M: 5 kb, 3 kb, 2 kb, 1.5 kb, 1 kb, 750 bp, 500 bp, 250 bp, 100 bp from upper to inferior mark, respectively; 1: Experimental group; 2: Control group **Fig.4** Electrophoresis result of Western Blotting at two weeks after transfection M: 250 kd, 130 kd, 95 kd, 72 kd, 55 kd, 36 kd, 28 kd from upper to inferior mark, respectively; 1: Experimental group; 2: Control group

对照组未检测到明确的阳性条带(图 4)。

3 讨论

骨关节炎是中老年人最常见的一种慢性关节疾病。关节软骨损伤为本病特征性病理改变,也是本病最基本的病理变化。关节软骨为透明软骨,是一种特殊分化的结缔组织。成年软骨不仅缺乏神经血管,而且还缺乏能迁移、增殖并参与组织损伤修复反应的未分化细胞。它仅有的细胞类型是高度分化的软骨细胞,该软骨细胞不仅数量少,而且被周围致密的胶原-蛋白多糖基质包裹而限制了它的迁移增殖能

力^[5]。因此,以关节软骨损伤为特征的骨关节炎的愈合能力有限,随着年龄的增加往往会造成严重的后果,如致畸致残和行动受限等^[6]。目前常用的处理方法,即使是手术的方法也不能取得令人满意的效果。基因增强组织工程技术将基因治疗技术引入组织工程,把编码特定功能因子的基因转入种子细胞,使经基因转染细胞表达目的基因,产生相应的功能产物,促进种子细胞的增殖、分化及发挥正常的生理功能,有望解决上述问题^[7]。

SOX9 是 SOX 基因家族 E 亚组中的一员,具有典型的转录因子结构^[8]。在胚胎发育过程中,SOX9 基因可以决定间充质细胞的聚集和向软骨细胞的分化^[9],促进软骨细胞的增殖^[10],调控软骨主要基质成分基因,如 Col 9a1、Col 9a2 和 Col 11a2 等的表达^[11]。目前的研究还发现,使用 SOX9 转染兔骨髓间充质细胞后,可使细胞内软骨特异性的分子如 II 型胶原、aggrecan 和蛋白聚糖等的表达明显升高^[12]。因此,SOX9 具有促进间充质细胞向软骨分化并修复软骨损伤的作用。

慢病毒载体属于一种新型的逆转录病毒载体,它来源于人类免疫缺陷病毒^[13]。尽管人类免疫缺陷病毒具有严重的致病性,但是,新型的慢病毒载体中的毒性基因已被外源基因替代,属于假型病毒^[14]。本实验所用的慢病毒载体为第 3 代慢病毒载体系统,它感染宿主细胞后不会再感染其他细胞,也不会利用宿主细胞产生新的病毒颗粒,故该病毒具有极高的生物安全性^[15]。慢病毒载体的最大优势在于可以同时高效感染分裂期和非分裂期的细胞^[16],而且目的基因可以在宿主细胞中持续稳定表达^[17]。因此,慢病毒成为目前基因治疗技术中较理想的载体^[18]。

综上所述,本实验中携带小鼠 SOX9 基因的慢病毒载体被成功构建,并且高效转染小鼠骨髓间充质细胞获得稳定表达 SOX9 的宿主细胞。这为进一步研究 SOX9 基因促进骨髓间充质细胞成软骨分化治疗骨关节炎奠定了实验基础。

参考文献

- [1] Bruno F, Pascal H, Sylvie B, et al. Impact of osteoarthritis: results of nationwide survey of 10 000 patients consulting for OA[J]. Joint Bone Spine, 2005, 72(3): 235-240.
- [2] Pearle AD, Warren RF, Rodeo SA. Basic science of articular carti-

lage and osteoarthritis[J]. Clin Sports Med, 2005, 24: 1-12.

[3] Coustry F, Oh CD, Hattori T, et al. The dimerization domain of SOX9 is required for transcription activation of a chondrocyte-specific chromatin DNA template[J]. Nucleic Acids Research, 2010, 38(18): 6018-6028.

[4] Tsuchiya H, Kitoh H, Sugiura F, et al. Chondrogenesis enhanced by overexpression of SOX9 gene in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 301(2): 338-343.

[5] Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte matrix interactions[J]. Instr Course Lect, 1998, 47: 477-486.

[6] Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering-current challenges and expanding opportunities[J]. Science, 2002, 295(5557): 1009-1014.

[7] Trippel SB, Ghivizzani SC, Nixon AJ. Gene-based approaches for the repair of articular cartilage[J]. Gene Ther, 2004, 11: 351-359.

[8] Wegner M. From head to toes; the multiple facets of SOX proteins [J]. Nucleic Acids Res, 1999, 27(6): 1409-1420.

[9] Bi W, Deng JM, Zhang Z, et al. SOX9 is required for cartilage formation[J]. Nat Genet, 1999, 22(1): 85-89.

[10] Lefebvre V, Smits P. Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation[J]. Birth Defects Res C Embryo Today, 2005, 75(3): 200-212.

[11] de Crombrughe B, Lefebvre V, Behringer RR, et al. Transcriptional mechanisms of chondrocyte differentiation[J]. Matrix Biol, 2000, 19(5): 389-394.

[12] 杨自权, 何俊仁, 李刚, 等. SOX9 基因转染对骨髓间充质干细胞成软骨分化的影响[J]. 中华风湿病学杂志, 2008, 12(7): 445-448.

Yang ZQ, He JR, Li G, et al. Chondrogenesis of rabbit mesenchymal stem cells by overexpressing SOX9 gene[J]. Zhonghua Feng Shi Bing Xue Za Zhi, 2008, 12(7): 445-448. Chinese.

[13] Lever AM, Strappe PM, Zhao J. Lentiviral vectors[J]. J Biomed Sci, 2004, 11(4): 439-449.

[14] Apolonia L, Waddington SN, Fernandes C, et al. Stable gene transfer to muscle using non-integrating lentiviral vectors[J]. Mol Ther, 2007, 15(11): 1947-1954.

[15] 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.

[16] Relph K, Harrington K, Pandha H. Recent developments and current status of gene therapy using viral vectors in the United Kingdom[J]. BMJ, 2004, 329(7470): 839-842.

[17] Miyoshi H, Takahashi M, Gage FH, et al. Stable and efficient gene transfer into the retina using an HIV-based lentiviral vector[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(19): 10319-10323.

[18] 胡明, 马远征, 李大伟, 等. 慢病毒介导的 RNA 干扰技术构建人胚胎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.

(收稿日期: 2012-08-25 本文编辑: 王玉蔓)

·读者·作者·编者·

《中国骨伤》杂志正式启用稿件远程处理系统通知

《中国骨伤》杂志已于 2010 年 1 月正式启用稿件远程处理系统。通过网站 <http://www.zggszz.com> 可实现不限时在线投稿、审稿、编辑、退修、查询等工作。本刊将不再接受纸质版和电子信箱的投稿。

欢迎广大的作者、读者和编者登录本刊网站, 进入稿件处理系统进行网上投稿、审稿和稿件查询等工作。咨询电话: 010-84020925。

《中国骨伤》杂志社