论著

文章编号:1000-5404(2006)24-2396-04

逆转录病毒载体介导Fn-TPO基因修饰人骨髓间充质干细胞

于 洁,张 磊,莫 姝,杨 光,李 欣,宪 莹 (重庆医科大学儿童医院血液肿瘤科,重庆 400014)

提 要:目的 应用逆转录病毒载体介导纤维连接蛋白-血小板生成素(Fn-TPO)基因修饰人骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs),观察Fn-TPO基因修饰对于骨髓MSCs的影响。**方法** 构建携带Fn-TPO基因的重组逆转录病毒载体,并以其对骨髓MSCs进行体外基因修饰;台盼蓝拒染法计数活细胞数检测基因修饰后骨髓MSCs的体外增殖能力,RT-PCR检测Fn-TPO基因在骨髓MSCs中的表达情况,MTT法检测基因修饰后骨髓MSCs黏附造血细胞的能力,ELISA检测基因修饰后骨髓MSCs分泌至细胞培养液中的TPO浓度。**结果** 成功构建携Fn-TPO基因的重组逆转录病毒载体且以该逆转录病毒载体对骨髓MSCs进行体外基因修饰;Fn-TPO基因在骨髓MSCs内能够正常转录;基因修饰后的骨髓MSCs体外增殖能力无明显改变($P>0.05$);黏附造血细胞能力增强($P=0.01$),分泌TPO的能力增强且不随培养时间延长而显著减弱($P<0.01$),但受细胞生长状态影响。**结论** 成功应用携带Fn-TPO基因的逆转录病毒载体对人骨髓MSCs进行基因修饰,使基因修饰后骨髓MSCs黏附造血细胞分泌TPO能力增强。

关键词: 骨髓间充质干细胞;纤维连接蛋白;血小板生成素;逆转录病毒载体;基因修饰

中图法分类号: R329.2;R373;R394.2 **文献标识码:** A

Retroviral vector mediated fibronectin-thrombopoietin gene modification to human bone marrow mesenchymal stem cells

YU Jie, ZHANG Lei, MOU Shu, YANG Guang, LI Xin, XIAN Ying (Department of Hematology, Children's Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To modify human bone morrow mesenchymal stem cells (MSCs) with fibronectin-thrombopoietin (Fn-TPO) gene carried retroviral vector and investigate the influence of Fn-TPO gene modification on human bone marrow MSCs. **Methods** The retroviral vector containing Fn-TPO gene was constructed and transfected into bone marrow MSCs. The proliferation capacity of bone marrow MSCs after gene modification was assayed by trypan blue exclusion assay. The transcription of Fn-TPO gene was assayed by RT-PCR. The capacity of bone marrow MSCs to adhere hematopoietic cells was assayed by MTT and the concentration of TPO in the bone marrow MSCs culture supernatant was assayed by ELISA. **Results** Retroviral vector containing Fn-TPO gene was successfully constructed and modified bone morrow MSCs. Fn-TPO gene was expressed by bone morrow MSCs after gene modification. The viability of MSCs had no significant difference between pre-gene-modified and post-gene-modified ($P>0.05$). The adhering ability of gene modified bone marrow MSCs to hematopoietic cells was reinforced ($P=0.01$). The concentration of TPO in the bone morrow MSCs culture supernatant rose from (5.58 ± 0.37) ng/ml to (7.46 ± 0.59) ng/ml ($P<0.01$) and would not significantly decline in short time period, but was influenced by MSCs growth status. **Conclusion** Human bone morrow MSCs was successfully modified by Fn-TPO gene carried retroviral vector and the status of gene modified MSCs was assayed. This would facilitate further study of fibronectin and thrombopoietin genes on hematopoietic regulation and hematological system diseases.

Key words: mesenchymal stem cells; fibronectin; thrombopoietin; retroviral vector; gene modification

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30100095)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30100095)

作者简介: 于 洁(1963-),女,山东省文登县人,博士,主任医师,教授,主要从事小儿血液病及肿瘤疾病的基础与临床方面的研究。电话:(023)63632756-3518,E-mail: yujic167@yahoo.com

收稿日期: 2006-05-26;**修回日期:** 2006-06-24

骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)是存在于骨髓中的一群具有多向分化潜能的均质性干细胞,由其分化而来的骨髓基质细胞作为造血微环境的主要成分,对造血细胞的增殖和分化发挥重要的调控作用[1,2]。造血细胞与基质细胞间相互黏附是基质细胞对造血细胞发挥支持作用的基础,也是造血细胞得以自我更新、分化的决定性因素之一,这种黏附作用主要是通过黏附分子(主要为整合素家族)与其配体纤维连接蛋白(fibronectin, Fn)相结合而介导。基质细胞分泌的各种细胞因子是造血微环境的重要组成部分,其中血小板生成素(thrombopoietin, TPO)是造血生成过程中关键的造血调控因子之一,具有显著的早期造血调控作用。本课题组采用基因重组技术,构建携带 TPO 基因和 Fn 基因功能片段的重组逆转录病毒载体,以该载体在体外对正常骨髓 MSCs 进行基因修饰,获得分泌 TPO 及黏附造血细胞能力增强的骨髓 MSCs,为进一步研究 Fn 及 TPO 基因在造血调控及血液系统疾病治疗中的作用奠定基础。

1　材料与方法

1.1　质粒和细胞系

pMSCVpuro 真核表达质粒为 Clontech 公司产品。PA317 细胞和 NIH3T3 细胞由本院儿科研究所保存。

1.2　主要试剂

限制性内切酶、连接酶、RT-PCR 试剂盒和总 RNA 提取试剂盒等为 TaKaRa 公司产品;人 TPO ELISA 试剂盒为 R&D 公司产品;MTT 为 Sigma 公司产品;DMEM-F12 培养基为 Hyclone 公司产品,胎牛血清为 PAA 公司(奥地利)产品。

1.3　重组逆转录病毒载体的构建与鉴定

载体的构建:① TPO 基因 cDNA 的制备:培养表达 TPO 基因的 FBMD-1 细胞,提取总 RNA,用 RT-PCR 得到 TPO cDNA,将 TPO cDNA 克隆到 TA 克隆。② 构建 Fn-Retrovirus open vector 系统:合成 Fn 的 C-4 (5′-CCCAAGCTTATGCGTGGAGACAGCCTCGAGATCGATGG -3′) 和 CS-24 (5′-CCGCTCGAGGACGAGCTTCCCCAACTGGTAACCCTTCCACACCCCAATCTTCATGGACCAGAGATCTTGGATGTTCCTTCCATCGATGG -3′) 的核苷酸片段,以上 2 种核苷酸片段插入 pMSCVpuro 真核表达质粒,得到 Fn-Retrovirus open vector(pMSCV-Fnopen)。③ PCR 扩增 TPO cDNA,酶切消化后插入 pMSCV-Fnopen,得到携带目的基因的逆转录病毒载体 pMSCV-FnTPO(puro)。

载体的鉴定:重组逆转录病毒载体构建完成以后分别以酶切(*Eco*R Ⅰ)、梯度 PCR (退火温度:50 ~ 60 ℃,目的基因特异性引物:上游特异性引物:5′-CCCTTGAACCTCCTCGTTCGACC-3′,下游特异性引物:5′-GAGACGTGCTACTTCCATTTGTC-3′)和基因测序(大连 TaKaRa 公司)等方法进行鉴定。连接反应,质粒提取及鉴定方法参见《分子克隆实验指南》。

1.4　包装细胞转染、病毒上清制备及病毒滴度测定

采用脂质体介导的基因转移方法以 pMSCV-FnTPO 转染 PA317 包装细胞,含 5 μg/ml 嘌呤霉素的选择培养基筛选,获得抗性克隆后,扩增转染后 PA317,待细胞融合度达 90% 左右时收集逆转录病毒上清,0.45 μm 滤膜过滤,储存于 -80 ℃备用,同时以 NIH3T3 细胞进行病毒滴度测定。

1.5　人骨髓 MSCs 的分离纯化与体外扩增

采用全骨髓贴壁培养法筛选骨髓 MSCs,传至 3 代以后的细胞中骨髓 MSCs 的纯度可达 90% 以上。本实验选用第 4 代骨髓 MSC 用于以下实验。

1.6　携 Fn-TPO 基因逆转录病毒上清体外基因修饰骨髓 MSCs

将骨髓 MSCs 1.0×10^5/ml 接种于 6 cm 培养板,细胞融合度达 50% 左右时,加入含 Polybrene 4 μg/ml 的逆转录病毒上清,于 37 ℃、5% CO_2 饱和湿度条件下培养 6 h 后,更换新鲜培养基继续培养 12 h,重复 1 次转染过程,以新鲜培养基继续培养 48 h 后,以嘌呤霉素 1.0 μg/ml 进行筛选,3 d 后换新鲜培养基继续培养,同时收集存活细胞检测逆转录病毒转染骨髓 MSCs 转染率,计算公式如下。

转染率 = 嘌呤霉素筛选后存活细胞/接种细胞总数 × 100%

1.7　基因修饰后骨髓 MSCs 生长状态检测

倒置显微镜下观察基因修饰后骨髓 MSCs 细胞形态,同时将基因修饰后骨髓 MSCs 以 3.0×10^4/ml 细胞密度接种至 75 ml 培养瓶,1 周后胰酶消化、悬浮细胞,经台盼蓝拒染法计数活细胞数反映细胞增殖能力。

1.8　基因修饰后骨髓 MSCs 对目的基因表达的检测

收集基因修饰后骨髓 MSCs,提取细胞总 RNA,RT-PCR 方法检测 Fn-TPO 基因在骨髓 MSCs 中的表达情况。所用引物序列:上游特异性引物:5′-CAACCAGTCGGTAGATGTCAA-3′;下游特异性引物:3′-AGCCCCAGGAGGGATGAGA-5′。

1.9　基因修饰后骨髓 MSCs 对造血细胞的黏附能力的检测

采用 MTT 法,以吸光度值反映骨髓 MSCs 分泌 Fn 及黏附骨髓单个核细胞的能力;骨髓 MSCs 黏附造血细胞的能力越强,则对应的吸光度值越大。

1.10　基因修饰后骨髓 MSCs 分泌 TPO 能力检测

收集相同条件下的基因修饰和未修饰的骨髓 MSCs 培养上清,以人 TPO ELISA 试剂盒测定不同时间(第 4、5 代细胞更换新鲜培养液 24 h 后)收集的细胞培养上清中 TPO 的浓度。

1.11　统计学分析

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用统计软件 SPSS 11.5 进行 t 检验及方差分析。

2　结果

2.1　携带 Fn-TPO 融合基因的重组逆转录病毒载体的鉴定

以限制性内切酶 *Eco*R Ⅰ酶切重组逆转录病毒载体,凝胶电泳显示有 2 条清晰条带,1 条约 6.5 kb,为 pMSCVpuro 载体,另 1 条约 1.1 kb,为插入载体中的目的基因,结果表明质粒的大小及基本结构符合预期设计(图 1)。梯度 PCR 后凝胶电泳显示各种退火温度条件下均有清晰条带跑出,大小约 1.7 kb(图 2),将该 PCR 产物送测序,测序结果与 GenBank 提供 Fn 及 TPO 进行比对证实送检样品中包含 TPO 基因和 Fn 基因 C4、

C24 功能片段，携带 Fn-TPO 融合基因的重组逆转录病毒载体构建成功。

2.2 逆转录病毒滴度测定

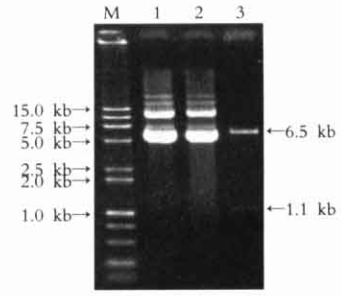
脂质体法介导 pMSCV-FnTPO 转染 PA317 细胞后，经嘌呤霉素筛选并用其上清感染 NIH3T3 细胞，计算病毒滴度为 1.0×10^6 cfu/ml。结果表明 pMSCV-FnTPO 重组逆转录病毒载体经包装细胞包装后可产生较高滴度的逆转录病毒，该逆转录病毒具有将目的基因整合至靶细胞基因组中的能力。

2.3 人骨髓 MSCs 的体外纯化、培养及扩增

骨髓单个核细胞接种 48 h 后可见少量细胞贴壁，然后逐渐融合成片。1 周以后，培养瓶底铺满呈长梭形、漩涡状分布的细胞。该细胞传代 3～4 次后即可得到纯度达 90% 以上的人骨髓 MSCs，但体外培养至第 5 代以后细胞变的宽大、扁平。

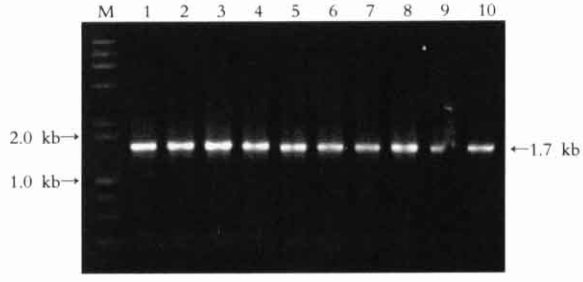
2.4 逆转录病毒上清体外转染骨髓 MSCs 的效率及基因修饰后骨髓 MSCs 生长状态检测

骨髓 MSCs 经逆转录病毒上清转染 2 次后，其转染率达 (10.0±2.1)%。基因修饰后骨髓 MSCs 以嘌呤霉素筛选后换用新鲜培养基继续培养，初始 24～48 h，未死亡骨髓 MSCs 生长缓慢，少量细胞凋亡。1 周左右细胞进入对数生长期(图 3)，3.0×10^4/ml 基因修饰/未修饰骨髓 MSCs 经 1 周培养扩增后，台盼蓝拒染法计数活细胞数分别为 $(6.92\pm0.77)\times10^4$/ml、$(7.18\pm0.89)\times10^4$/ml($P>0.05$)。



M：DNA 标准；1，2：pMSCV-FnTPO(puro) 质粒初级抽提产物；3：pMSCV-FnTPO(puro) 质粒经 *Eco*R Ⅰ 酶切后

图 1 pMSCV-FnTPO(puro) 酶切鉴定电泳图



M：DNA 标准；1－10：不同退火温度(50～60 ℃)的 PCR 产物

图 2 pMSCV-FnTPO(puro) 梯度 PCR 电泳图

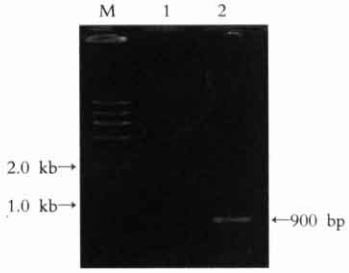


A：选择培养基筛选 3 d；B：筛选后 MSCs 培养 1 周；C：MSCs 达 80% 以上融合

图 3 逆转录病毒转染后不同时期的骨髓 MSCs (LM×100)

2.5 基因修饰后骨髓 MSCs 对 Fn-TPO 融合基因的表达

RT-PCR 检测显示逆转录病毒载体转导的 Fn-TPO 融合基因能够在骨髓 MSCs 中正常转录(图 4)。



M：DNA 标准；1：未经基因修饰骨髓 MSCs(对照)；2：基因修饰后骨髓 MSCs

图 4 基因修饰后骨髓 MSCs 总 RNA RT-PCR 产物凝胶电泳图

2.6 基因修饰后骨髓 MSCs 对造血细胞的黏附能力

基因修饰后骨髓 MSCs 组和未经基因修饰骨髓 MSCs 组 490 nm 处吸光度值分别为 (0.188±0.018) 和 (0.167±0.017)，两组间差别有显著统计学意义($P=0.01$)，说明基因修饰后骨髓 MSCs 黏附造血细胞的能力显著增强。

2.7 基因修饰后骨髓 MSCs 分泌 TPO 能力

基因修饰后的骨髓 MSCs 培养上清中 TPO 浓度为 (7.46±0.59) ng/ml，显著高于未经基因修饰的骨髓 MSCs [(5.58±0.37) ng/ml，$P<0.01$]，且基因修饰后的骨髓 MSCs 对 TPO 的高表达不随细胞培养时间的延长而显著减弱($P<0.01$)。未经基因修饰骨髓 MSCs F5 分泌 TPO 能力较未经基因修饰骨髓 MSCs F4 有所下降[分别为 (4.84±0.29)、(5.58±0.37) ng/ml，$P<0.05$]，与细胞形态学改变相符，说明 MSCs 分泌 TPO

的能力与其生长状态关系密切。

3　讨论

骨髓造血微环境是造血细胞得以自我更新、分化的场所，而骨髓 MSCs 及由其分化而来的基质细胞是骨髓造血微环境的重要组成部分，它们通过分泌多种细胞因子、产生细胞外基质和介导细胞与细胞间相互接触为原始造血细胞维持其自我更新及向多系分化提供必需的支持[1-4]。Fn 是骨髓 MSCs 产生的细胞外基质的主要成分之一，它通过与造血细胞表面 Fn 受体相结合从而对处于不同发育阶段的造血细胞进行调控[5,6]。TPO 是调节巨核细胞/血小板生成的最主要调节因素，也是一个早期造血促进因子，它的生物学效应由其受体 C-Mpl 介导。有研究认为 TPO 的造血调控作用与 Fn 密切关系，Fn 基因重组功能片段能够增强 TPO 介导的巨核细胞生成作用[7]。

MSCs 以其具有自我更新、多系分化和体外分离培养较容易等优点，而成为一种理想的基因治疗靶细胞。逆转录病毒载体是基因转导的理想载体，它具有安全、低毒，能够将目的基因整合至靶细胞基因组中，使目的基因在靶细胞中稳定表达等优点，在基因功能的研究中得到较广泛的应用。我们应用基因重组技术，将 Fn 基因中 C-4 和 CS-24 DNA 片段与 TPO 基因构建在逆转录病毒载体上，产生融合蛋白，这样在 C-4 和 CS-24 黏附细胞的同时，TPO 也将直接对靶细胞产生作用。Fn 功能片段与 TPO 构成融合蛋白，将 2 种基因的作用融为一体，使二者可以更好的发挥协作作用，避免了进行双基因转染时可能出现的基因表达相互牵制、基因表达产物不能发挥良好协同作用等不利因素。本研究结果显示，Fn-TPO 基因修饰后的骨髓 MSCs 可以更有效的黏附造血细胞，这可能与外源性 Fn 基因细胞结合区整合到 MSCs 基因组内以后使 MSCs 分泌的 Fn 黏附细胞能力增强有关，但具体机制还有待进一步探讨。基因修饰后骨髓 MSCs 分泌 TPO 的能力增强，而且这种高分泌 TPO 的能力不随细胞培养时间的延长而明显减弱，证明通过 Fn-TPO 基因对骨髓 MSCs 进行修饰后，可使骨髓 MSCs 在形态及其他功能不发生显著改变的同时其分泌某种细胞因子的能力增强，这与相关研究结果相符[8,9]，再一次证明将骨髓 MSCs 作为一种基因治疗种子细胞的可行性。

本研究首次将 Fn 基因功能片段与造血调控密切相关的 TPO 基因通过基因重组的手段构建入逆转录病毒载体内，并通过该载体对骨髓 MSCs 进行体外基因修饰，使基因修饰后骨髓 MSCs 黏附造血细胞、分泌 TPO 的能力增强，为进一步研究基因 Fn、TPO 基因及基因修饰后骨髓 MSCs 在造血调控及血液系统疾病治疗中的作用奠定良好的基础。

参考文献：

[1] MAJUMDAR M K, THIEDE M A, HAYNESWORTH SE, *et al*. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages[J]. J Hematother Stem Cell Res, 2000, 9(6): 841 - 848.

[2] 赵智刚，唐晓琼，黎纬明，等. 冻存前后骨髓间充质干细胞的生物学特性和支持造血的研究[J]. 中国实验血液学杂志，2006，14(2)：304 - 307.

[3] 法宪恩，王利霞，侯剑峰，等. 人骨髓间充质干细胞体外培养及生物学特性观察[J]. 郑州大学学报：医学版，2005，40(3)：445 - 447.

[4] 李　强，单建林，许建中，等. 微载体在培养人骨髓间充质干细胞成骨诱导中的作用[J]. 第三军医大学学报，2005，27(16)：1644 - 1647.

[5] DAO M A, HASHINO K, KATO I, *et al*. Adhesion to fibronectin maintains regenerative capacity during *ex vivo* culture and transduction of human hematopoietic stem and progenitor cells[J]. Blood, 1998, 92(12): 4612 - 4621.

[6] VAN-DER-LOO J C, XIAO X, MCMILLIN D, *et al*. VLA-5 is expressed by mouse and human long-term repopulating hematopoietic cells and mediates adhesion to extracellular matrix protein fibronectin[J]. J Clin Invest, 1998, 102(5): 1051 - 1061.

[7] FOX N E, KAUSHANSKY K. Engagement of integrin alpha4beta1 enhances thrombopoietin-induced megakaryopoiesis[J]. Exp Hematol, 2005, 33(1): 94 - 99.

[8] BAXTER M A, WYNN R F, DEAKIN J A, *et al*. Retrovirally mediated correction of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from patients with mucopolysaccharidosis type I[J]. Blood, 2002, 99(5): 1857 - 1859.

[9] XIE C G, WANG J F, XIANG Y, *et al*. Marrow mesenchymal stem cells transduced with TPO/FL genes as support for *ex vivo* expansion of hematopoietic stem/progenitor cells[J]. Cell Mol Life Sci, 2005, 62(21): 2495 - 2507.

（编辑　陈聪连）