文章编号:1000-5404(2010)13-1425-04

论著

慢病毒载体介导增强型绿色荧光蛋白转导兔角膜上皮细胞的体外实验研究

王继东,杜之渝,兰 芬 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院眼科中心)

[摘要] 目的 观察慢病毒载体(lentiviral vectors, LVs)用于兔角膜上皮细胞基因转染的有效性。**方法** 兔角膜上皮细胞的原代及传代培养并做细胞鉴定;慢病毒载体介导的增强型绿色荧光蛋白(lenti-EGFP)以不同的感染复数(multiplicity of infection, MOI=0、1、10、50、100、500)转染实验细胞,寻找最佳转染剂量;于转染后24、48、72、96 h运用倒置荧光显微镜观察不同MOI下增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescence protein, EGFP)的表达并计算细胞转染率;RT-PCR方法检测EGFP基因的表达情况。**结果** EGFP于转染48 h即开始有表达,随着转染时间的延长其表达增强。MOI=1、10、50、100时,角膜上皮细胞转染率随着感染复数的增加而增加,分别为(4.5±0.6)%、(30.4±0.9)%、(51.9±1.4)%、(75.4±0.7)%,各组间差异显著($P<0.05$);MOI在100与500时,转染率差异不显著($P>0.05$),即最适感染复数为100。RT-PCR结果提示转染细胞组EGFP基因有表达。**结论** 慢病毒载体能够有效转染离体兔角膜上皮细胞。

[关键词] 慢病毒;基因转染;角膜上皮;有效性;细胞实验
[中图法分类号] R322.91; R394-33; R394.2 **[文献标志码]** A

Lentivirus vector-mediated enhanced green fluorescence protein transfection on *in vitro* corneal epithelial cells of rabbits

Wang Jidong, Du Zhiyu, Lan Fen (Center of Ophthalmology, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

[Abstract] Objective To observe the effect of lentivirus vector-medicated enhanced green fluorescence protein (EGFP) transfection on *in vitro* corneal epithelial cells. Methods Primary corneal epithelial cells of rabbits were cultured and transfected with lentivirus vector into different multiplicity of infection (MOI) in order to find the best transfection dose. After 24, 48, 72, and 96 h of transfection, expression of EGFP was observed under microscope and detected by RT-PCR. The transfection rate of corneal epithelial cells was calculated in different MOI. Results EGFP was expressed in corneal epithelial cells 48 h after transfection, which increased with the increasing transfection time. The transfection rate of corneal epithelial cells was 4.5% ± 0.6%, 30.4% ±0.9%, 51.9% ±1.4%, and 75.4% ±0.7%, respectively, when MOI was 1, 10, 50, and 100($P<0.05$). However, no difference was found in the transfection rate of corneal epithelial cells when MOI was 100 and 500. The optimol MOI was 100. RT-PCR showed that EGFP gene was expressed in transfected corneal epithelial cells. Conclusion Lentivirus vector can effectively transfect corneal epithelial cells *in vitro*.

[Key words] lentivirus ; gene transfection; corneal epithelial cell; effectiveness; *in vitro*

Corresponding author: Du Zhiyu, E-mail:cqkryk@hotmail.com

角膜透明、无血管、位置表浅易于观察,作为基因治疗的靶组织具有独特的优势,而寻找合适的基因转染载体是基因治疗的关键。近年出现的慢病毒载体(lentiral vectors, LVs)越来越受到人们的关注。慢病毒载体可以将携带基因转移到各种分裂和非分裂细胞,比其他载体拥有更多的优势,包括稳定融入宿主细胞基因组中,可有效感染多种类型的细胞并可携带相对大容量的治疗基因等。一些研究已经证明慢病毒载体可以在骨髓基质、乳腺、鼻腔上皮及胚胎干细胞等组织细胞中实现有效和持续的转基因表达[1-4],并于2004年已经用于人体的临床研究[5]。本实验通过探讨慢病毒载体转染兔角膜上皮细胞的有效性,期望获

[通信作者] 杜之渝,E-mail:cqkryk@hotmail.com

得用于角膜组织基因转染的理想载体。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂及设备

健康新西兰白兔30只(重庆医科大学实验动物中心提供),雌雄不拘,体质量1.8~2.5 kg。lenti-EGFP购自本元正阳基因技术有限公司,DMEM/F12培养基、0.25%胰酶/EDTA消化液购自HyClone公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,角蛋白抗体(Pan Cytokeratin)及荧光标记二抗(羊抗小鼠IgG-FITC)购自博士德生物公司,RT-PCR试剂盒购自宝生物工程有限公司。倒置荧光显微镜(Olympus,日本),凝胶成像系统(Bio-Rad,美国),电泳仪(Bio-Rad,美国)。

1.2 角膜上皮细胞的培养与鉴定

空气栓塞法处死实验兔,取新鲜角膜组织,解剖显微镜下撕除角膜基质层,上皮层剪成4~6块约2 mm×2 mm×2 mm置于50 ml玻璃培养瓶中,10%胎牛血清培养液(DMEM/F12培养基配制)原代组织块法培养并传代。制作细胞爬片行HE染色,并以上皮细胞的特异性蛋白——角蛋白抗体运用免疫荧光法对培养细胞进行细胞鉴定。

1.3 最佳感染复数测定

96孔板培养的角膜上皮细胞覆盖率达50%时,以不同的感染复数(multiplicity of infection,MOI),即MOI值0、1、10、50、100及500加入DMEM/F12培养基稀释的lenti-EGFP 100 μl;轻摇匀,37 ℃培养2 h后,吸去含病毒的培养液,换上新鲜的完全培养液,继续37 ℃培养。每个感染复数设3个复孔。感染后第3天,在倒置荧光显微镜下观察增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescence protein,EGFP)表达并拍照,计算不同MOI值的细胞转染率。

1.4 不同感染复数在不同时间点EGFP的表达观察

96孔板培养的角膜上皮细胞覆盖率达50%时,以不同的MOI值0、1、10、50、100加入DMEM/F12培养基稀释的lenti-EGFP 100μl;转染方法同1.3。分别于转染后24、48、72、96 h在倒置荧光显微镜下观察EGFP的表达。

1.5 RT-PCR检测EGFP基因

50 ml培养瓶培养角膜上皮细胞,转染方法同上。于转染96 h细胞达融合状态时提取细胞总RNA,行RT-PCR及凝胶电泳分析。目的基因EGFP及内参β-actin的引物及相关信息如下:EGFP引物序列:正义链5′-GCGAGGGCGATGCCACCTAC-3′,反义链5′-CGGTTCACCAGGGTGTCGCC-3′;退火温度62 ℃;产物大小268 bp。β-actin引物序列:正义链5′-AATGCATCCT-GCACCACCA-3′,反义链5′-GTAGCCATATTCATTGTCATA-3′;退火温度55 ℃;产物大小515 bp。以对数生长期传代的角膜上皮细胞,即MOI=0为对照组。

1.6 统计学分析

所有数据采用$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 16.0统计软件对计量资料进行小样本均数统计及方差齐性检验。对不同MOI的细胞组间转染率差异分析采用Kruskal-Wallis秩和检验。

2 结果

2.1 角膜上皮细胞的培养及鉴定

组织块培养第2天,上皮细胞自其周围爬出并贴壁生长,第5天进入对数生长期(图1A)。细胞融合后呈规则的六角形态(图1B)。细胞爬片HE染色可见:细胞形态规整呈多角形态。通过角蛋白抗体免疫荧光法检测证实为上皮细胞:角蛋白正常表达于上皮细胞的细胞质内,因此细胞质发绿色荧光,而细胞核不发荧光(图1C)。

2.2 细胞转染的最佳感染复数测定

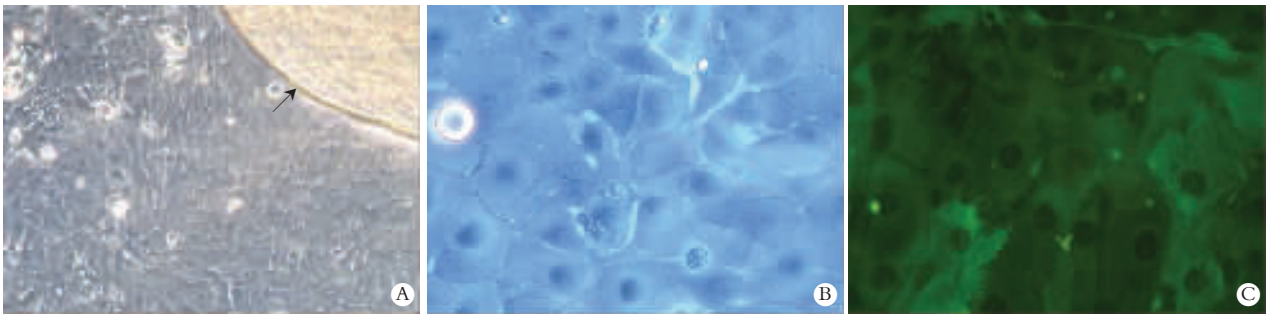
MOI值为1、10、50、100时,细胞转染率分别为(4.5±0.6)%、(30.4±0.9)%、(51.9±1.4)%、(75.4±0.7)%;各感染复数组间细胞转染率的差异有统计学意义($P=0.016$);并且细胞转染率呈剂量依赖性,即随着MOI值的增大,细胞转染率增加。MOI为500时,细胞转染率为(75.3±0.8)%,与MOI为100时的细胞转染率差异不显著($P=0.827$);即MOI=100时,细胞转染率就已经达到最大值,即(75.4±0.7)%。

2.3 细胞转染的时效观察

角膜上皮细胞于转染48 h各感染复数组均可观察到EGFP不同程度的表达(MOI=0无表达)。在同一时间观察点随着感染复数增加,EGFP表达增强;在同一感染复数下随着转染时间的延长,EGFP的表达增强(图2)。

2.4 RT-PCR检测EGFP基因的表达

电泳结果提示对照细胞组(MOI=0)没有EGFP基因的扩增条带出现,而转染细胞组在大约270 bp的位置有明亮的扩增条带出现,即说明有EGFP基因的表达(图3)。



A:角膜上皮原代培养第5天(倒置荧光显微镜 ×50) ↑:角膜组织块;B:原代细胞传代后第7天(倒置荧光显微镜 ×200);C:角膜上皮细胞鉴定结果(免疫荧光 ×200)

图1 兔角膜上皮细胞体外培养及鉴定结果

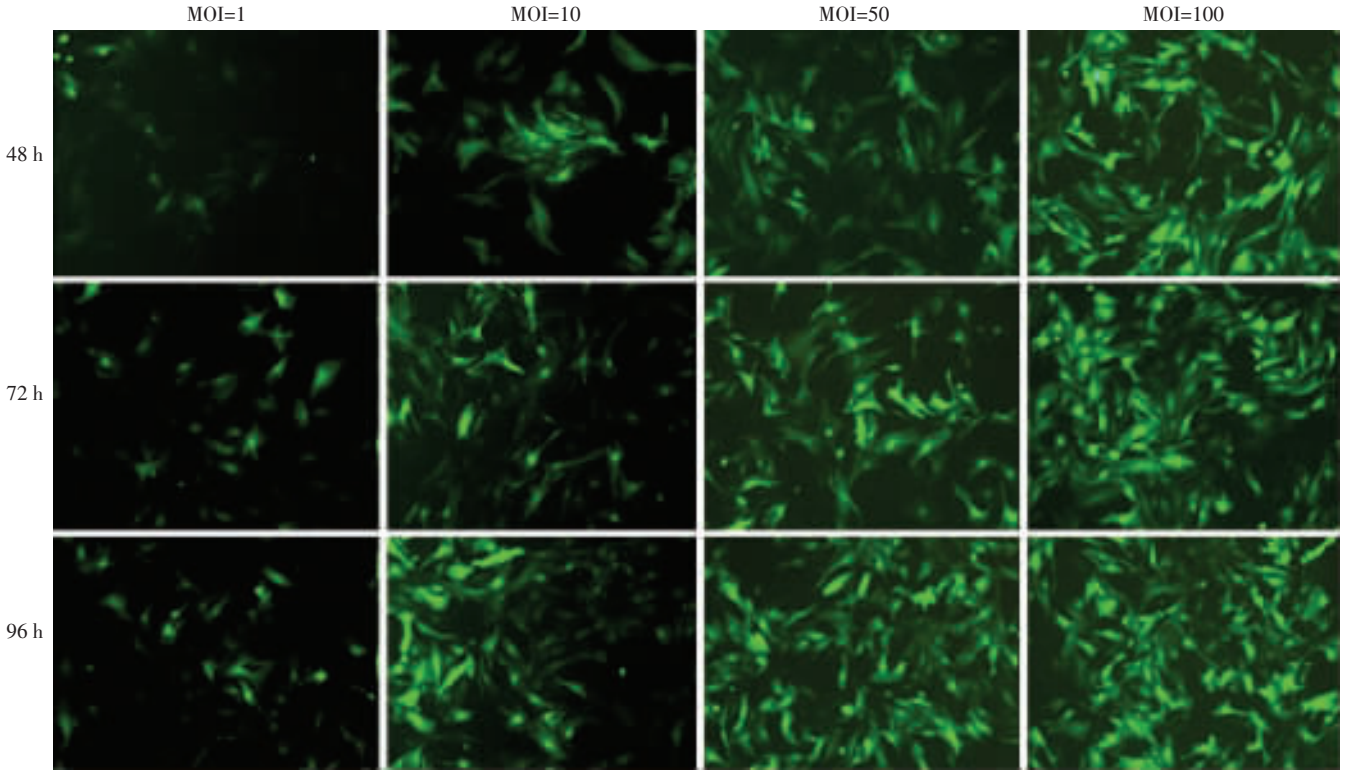
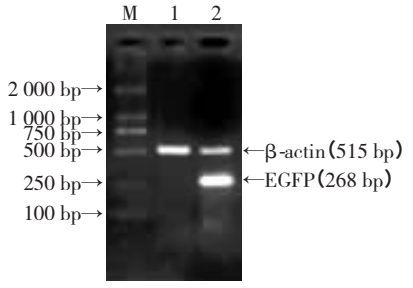


图 2　不同感染复数、不同转染时间观察绿色荧光蛋白基因在兔角膜上皮细胞内的表达　（倒置荧光显微镜 ×50）



M:DNA 标准;1:对照组;2:转染组

图 3　RT-PCR 检测兔角膜上皮细胞 EGFP 基因的表达

3　讨论

临床上一些较常见的角膜病,如长期不愈的角膜溃疡、角膜新生血管、角膜瘢痕及角膜营养不良等先天性角膜疾病,目前还没有令人满意的治疗方法,而基因疗法的出现为上述问题的解决带来了希望[6]。由于角膜具有组织结构相对简单、透明便于观察、位于眼前部容易进行技术操作等特点,使之成为一种理想的基因修饰组织模型,在基因治疗领域具有巨大的潜力并可能发挥先锋作用,使基因疗法最终得以实现[7]。角膜病的基因治疗策略主要就是通过合适的载体系统将目的基因转移到角膜组织内,或眼周或全身,然后通过表达的转基因蛋白影响先天性或获得性角膜病[8]。虽然角膜病的基因治疗已有一些相关报道,如澳大利亚的 Parker 等[9]通过慢病毒介导的增强型黄色荧光蛋白基因(LV-SV40-eYFP)转染大鼠及绵羊的角膜内皮细胞观察发现:eYFP 基因可以在绵羊角膜内皮细胞内稳定持续地表达 28 d,而在大鼠可长达 60 d,但基因治疗的可控性、安全性、更有效的载体以及外源基因的长期稳定表达等方面还有大量的研究工作等待开展[10]。

基因治疗面临的主要挑战之一就是发展有效的基因治疗载体。目前用于基因转染的病毒载体大多集中于腺病毒、腺相关病毒等,而以慢病毒为载体用于角膜上皮组织、细胞的基因转染有待深入探究。慢病毒载体(lentiviral vector, LVs)是在 HIV-1 病毒基础上改造而成的病毒载体系统,它能高效地将目的基因(或 RNAi)导入动物和人的原代细胞或细胞系[11]。慢病毒载体基因组是正链 RNA,其基因组进入细胞后,在细细胞质中被其自身携带的反转录酶反转录为 DNA,形成 DNA 整合前复合体,进入细胞核后,DNA 整合到细胞基因组中。整合后的 DNA 再转录成 mRNA,回到细胞质中,表达目的蛋白或产生 RNA 干扰。慢病毒载体的结构特点决定了其携带的目的基因可以长期、稳定地表达于宿主细胞内。而腺病毒载体系统携带的外源基因不整合到宿主基因组内,只在细胞质内表达,这决定了其携带的目的基因不能长期稳定地表达于宿主细胞内[12]。目前角膜上皮细胞通过病毒和非病毒等

各种载体系统进行的遗传修饰已取得了很大进展,尽管取得了这些进步,大部分载体都存在基因转移不足、目的基因表达不稳定等情况。当然,慢病毒载体也存在一些不足[13],例如目前的慢病毒载体携带的目的基因不能超过8.5 kb,病毒滴度比较低等情况。本实验以慢病毒为载体,观察其携带的报告基因——EGFP在角膜上皮细胞的转染时效性,期望获得较理想的用于角膜组织的基因转染载体。

基因转染实验对目的细胞的状态要求较高。我们在实验中发现,角膜上皮的原代细胞生长较快,但在传代过程中经常出现不贴壁的情况而导致传代的失败。我们通过提高胰酶浓度、缩短消化时间以及更换培养基等方法解决了角膜上皮细胞传代这个对于基因转染实验的关键性问题。

实验结果表明,lenti-EGFP于转染角膜上皮细胞第3天在最适感染复数下(MOI=100)细胞转染率可达到73%,并随着转染时间的延长转染率继续增加;这与Watanabe等[14]报道的实验结果是一致的,说明慢病毒载体对于角膜上皮细胞是一种较高效地基因转染载体。我们发现,lenti-EGFP转染细胞24 h还不能明显地观察到EGFP的表达,这与腺病毒载体介导的基因转染于24 h即可观察到目的基因的表达是不同的。这可能与慢病毒载体的结构特点有关:其基因组是RNA,需要反转录为DNA,并插入细胞染色体后才能表达。美国学者Wang等[15]曾经报道慢病毒载体携带的GFP在离体的人角膜组织原位表达长达60 d,本实验由于是体外细胞实验,因细胞生长的局限性而不能观察到慢病毒载体这方面的优势。

本实验也是将常规的报告基因——增强型绿色荧光蛋白作为观察的目标,在倒置荧光显微镜下可以直接观察其表达情况。同时,我们又通过RT-PCR的方法再次证实了EGFP基因在细胞内的表达。我们在GeneBank中查得EGFP的mRNA序列,再通过PUBMED的在线引物设计工具——Primer-BLAST设计一对引物,其目的产物的大小为268 bp。RT-PCR的最终结果提示细胞转染组在大约270 bp的位置有明亮的扩增条带出现,这与引物的预期产物大小是一致的,因此我们可以认为此条带即为EGFP基因在转染细胞内的表达。

综上所述,慢病毒载体可以有效的转染离体兔角膜上皮细胞。但其应用的安全性问题还有待进一步的探讨。

参考文献:

[1] Pawelczyk E, Jordan E K, Balakumaran A, *et al*. *In vivo* transfer of intracellular labels from locally implanted bone marrow stromal cells to resident tissue macrophages[J]. PLoS One, 2009, 4(8): e6712.

[2] Siwko S K, Bu W, Gutierrez C, *et al*. Lentivirus-mediated oncogene introduction into mammary cells in vivo induces tumors[J]. Neoplasia, 2008, 10(7): 653-662.

[3] 李宁, 朱宝长, 朱宛宛, 等. 慢病毒介导绿色荧光蛋白转染人胚胎干细胞及其培养[J]. 基础医学与临床, 2008, 28(10): 1083-1087.

[4] Patrick L S, Ariadna C A, Kim A B, *et al*. Lentivirus vector can be readministered to nasal epithelia without blocking immune responses [J]. J Virol, 2008, 82(21): 10684-10692.

[5] Humeau L M, Binder G K, Lu X, *et al*. Efficient lentiviral vector-mediated control of HIV-1 replication in CD4 lymphocytes from diverse HIV + infected patients grouped according to CD4 count and viral load [J]. Mol Ther , 2004, 9(6): 902-913.

[6] Yoon KC, Bae JA, Park HJ, *et al*. Subconjunctival gene delivery of the transcription factor GA-binding protein delays corneal neovascularization in a mouse model[J]. Gene Ther, 2009, 16(8): 973-981.

[7] Jun A S, Larkin D F. Prospects for gene therapy in corneal disease [J]. Eye, 2003, 17(8): 906-911.

[8] Williams K A, Coster D J. Gene therapy for diseases of the cornea- a review[J]. Clin Experiment Ophthalmol, 2010, 38(2): 93-103.

[9] Parker D G, Kaufmann C, Brereton H M, *et al*. Lentivirus-mediated gene transfer to the rat, ovine and human cornea[J]. Gene Ther, 2007, 14(9): 760-767.

[10] Birraux J, Wildhaber B E, Jond C, *et al*. *Ex vivo* hepatocyte gene therapy: increased biosafety protocol for transduction in suspension with lentiviral vectors and immediate transplantation (SLIT)[J]. Transplantation, 2010, 89(1): 127-9.

[11] Jeon H J, Oh T K, Kim O H, *et al*. Delivery of factor VIII gene into skeletal muscle cells using lentiviral vector [J]. Yonsei Med J, 2010, 51(1): 52-7.

[12] Pluta K, Kacprzak M M. Use of HIV as a gene transfer vector [J]. Acta Biochim Pol, 2009, 56(4): 531-95.

[13] Nanou A, Azzouz M. Gene therapy for neurodegenerative diseases based on lentiviral vectors[J]. Prog Brain Res, 2009, 175: 187-200.

[14] Watanabe K, Yamato M, Hayashida Y, *et al*. Development of transplantable genetically modified corneal epithelial cell sheets for gene therapy[J]. Biomaterials, 2007 , 28(4): 745-749.

[15] Wang X, Appukuttan B, Ott S, *et al*. Efficient and sustained transgene expression in human corneal cells mediated by a lentiviral vector [J]. Gene Ther, 2000, 7(3): 196-200.

(**收稿**:2009-11-20;**修回**:2009-12-19)

(编辑 张 维)