DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.12.002

Lenti-eGFP 体外转染兔角膜上皮细胞的实验研究

王继东[1],马晓辉[2],兰　芬[3],王　健[4],陈　余[5],范原铭[6],杜之渝[3]

(1. 重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆　400016;2. 山东省胸科医院呼吸内科,济南　250000;3. 重庆医科大学附属第二医院眼科,重庆　400010;4. 山东淄矿集团中心医院消化内科,淄博　255120;5. 山东淄矿集团中心医院普外科,淄博　255120;6. 重庆医科大学附属第一医院内分泌外科,重庆　400016)

【摘　要】目的:观察慢病毒载体(Lentivirus vectors,LVs)介导的增强型绿色荧光蛋白(Enhanced green fluorescence protein,eGFP)基因转染离体兔角膜上皮细胞对其生理功能的影响。方法:角膜上皮细胞的原代及传代培养并细胞鉴定。分正常细胞组(对照组)与转染细胞组。LVs 介导的 eGFP 基因(Lenti-eGFP)以最适感染复数(Multiples of infection,MOI)=100 转染角膜上皮细胞并成功传代,倒置荧光显微镜观察 eGFP 的表达情况。HE 染色光镜观察及透射电子显微镜观察 2 组细胞的形态及超微结构变化;计算 2 组细胞在传代第 2、3、4 天的细胞增殖率;流式细胞技术(Flow cytometer,FCM)检测 2 组角膜上皮细胞凋亡率的变化。结果:eGFP 于转染 48 h 即开始有表达,随着转染时间的延长其在角膜上皮细胞内的表达增强。细胞成功传代后,eGFP 仍明显表达于角膜上皮细胞。在最适感染复数,即 MOI=100 时,HE 染色光镜观察见转染组细胞形态规则,无异常核分裂像,与对照组角膜上皮细胞形态一致;透射电子显微镜观察转染组细胞超微结构与对照组细胞无明显差别。2 组细胞分别在传代第 2、3、4 天的增殖率差异无统计学意义($P>0.05$)。FCM 检测细胞凋亡率 2 组间无明显差异($P>0.05$)。结论:Lenti-eGFP 可以有效转染离体兔角膜上皮细胞,但对上皮的影响需要进一步探讨。

【关键词】慢病毒载体;基因转染;增强型绿色荧光蛋白;角膜上皮;细胞实验

【中国图书分类法分类号】Q789;R322.9　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2011-06-17

作者介绍:王继东(1979-),男,主治医师,博士,研究方向:妇科生殖与内分泌。

通信作者:杜之渝,男,教授,Email: kuanrenyk@yahoo.com.cn。

胞因子的表达,引发炎症,而炎症又能够诱导活性氧的生成,形成恶性循环[8]。Sarir 等[9]人的实验中,ROS 大量产生的同时细胞内 TLR4 表达也显著上升,而抗氧化剂可以抑制这一现象,提示氧化应激可以增加 TLR4 表达。TLR4 识别配体后经过细胞内一系列信号转导过程,最终活化 NF-κB,诱导靶基因表达。NF-κB 是一个多向性核转录调节因子,可调节与炎症、免疫及生长调控有关的蛋白基因的表达[10,11]。本实验结果提示在 Hcy 的作用下细胞内 NF-κB 含量以及 TLR4mRNA 和蛋白的表达都增加,而 Hcy 拮抗剂组无此相应改变,因而认为 HUVECs 在 Hcy 作用下产生大量 ROS,进而激活 TLR4/NF-κB 的表达引发炎症,这可能是 AS 发生发展的始动机制之一。

综上所述,Hcy 引起 HUVECs 损伤与 TLR4、NF-κB、MDA 和 SOD 等的表达密切相关,其中氧化应激起了重要的作用,这可能是 Hcy 引起 HUVECs 损伤又一重要机制。

参　考　文　献

[1] Kaul S,Zadeh A A,Shah P K.Homocysteine hypothesis for atherothrombotic cardiovascular disease:Not validated[J].JAm Coll Cardiol,2006,48(5):914-923.

[2] Taban-shomal O,Kilter H,Wagner A,et al.The cardiac effects of prolonged vitamin B12 and folic acid ficiency in rats[J].Cardiovasc Toxicol,2009,9(2):95-102.

[3] 王虹艳,曲　鹏,吕　申,等.Toll 样受体 4/核因子-κB 和氧化低密度脂蛋白受体 LOX-1 对单核内皮细胞粘附的影响[J].中华心血管杂志,2005,33(9):827-831.

[4] Kang Y J.Copper and homocysteine in cardiovascular diseasesκ[J].Pharmacol Ther,2011,129(3):321-331.

[5] 李　薇,杜军保.动脉粥样硬化发病机制研究进展[J].实用儿科临床杂志,2009,24(1):58-60.

[6] Lentz S R.Mechanism of homocysteine induced atherothrombosis[J].Thromb,2010,3(8):1646-1654.

[7] 蒋　晖,黄德嘉.同型半胱氨酸在动脉粥样硬化过程中的作用[J].华西医学,2003,18(4):604-605.

[8] 麦嘉仪,沈新南,魏　延,等.叶黄素对 D-半乳糖致小鼠氧化损伤的保护作用[J].中国预防医学杂志,2010,11(4):346-349.

[9] Sarir H,Mortaz E,Karimi K,et al.Cigarette smoke regulates the expression of TLR4 and IL-8 production by human maerophages[J].J Inflamm(Lond),2009,5(6):12.

[10] Dirks S H,van Deventer S J,Peppelenbosch M P.Lipopolysaccharide recognition,internalisation,signaling and other cellular effects[J].J Endotoxin Res,2001,571(1):55-61.

[11] Guha M,Mackman N.LPS induction of gene expression in human monocytes[J].Cell Signal,2001,13(2):85-94.

(责任编辑:冉明会)

Lenti-eGFP transfection into rabbit corneal epithelial cells in vitro

WANG Ji-dong[1], MA Xiao-hui[2], LAN Fen[3], WANG Jian[4], CHEN Yu[5], FAN Yuan-ming[6], DU Zhi-yu[3]

(1. Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University; 2. Department of Respiration Medicine, Shandong Province Chest Hospital; 3. Department of Ophthalmology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University; 4. Department of Digestion Medicine, Zibo Coal Central Hospital; 5. Department of General Surgery, Zibo Coal Central Hospital; 6. Department of Endocrine Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】*Objective*: To observe the influence on cell physiological function after lentivirus vectors mediated enhanced green fluorescence protein (eGFP) gene transfection into rabbit corneal epithelial cells in vitro. *Methods*: The primary and passage rabbit corneal epithelial cells were cultured and the cells were transfected by lentivirus vectors mediated eGFP gene (lenti-eGFP) with the optimum multiplicity of Infection (MOI)=100. After successful transfection, the expression of eGFP was examined through the inverted fluorescence microscope. The cellular morphology and ultra microstructures of the epithelial cells were observed by HE stain and transmission electron microscope. Furthermore, we calculated the proliferation rate of the normal (control) and transfected cells on 2, 3 d and 4 d since the culture. The apoptosis rate of both transfection cells and control cells was counted by Flow cytometer (FCM). *Results*: The eGFP began to express in the cells and was observed by the inverted fluorescence microscope 48 h after transfection and was still seen after the cells were subcultured. At MOI=100, the cellular morphology and ultra microstructure of infected cells were not changed significantly compared with the normal epithelial cells. The cell proliferation rate for the two groups on 2, 3 d and 4 d since the culture was 1.07 ± 0.14 vs 1.04 ± 0.19, 0.52 ± 0.06 vs 0.53 ± 0.05 and 0.23 ± 0.03 vs 0.21 ± 0.04 respectively. There was no significant difference in the cell proliferation rate between infected cells and control cells (P>0.05). The outcome of apoptosis rate (0.645 ± 0.040 vs 0.650 ± 0.030) suggested no significant difference in both normal and infected cells (P>0.05). *Conclusion*: Lenti-eGFP could transfect the rabbit epithelial cells ex vivo efficiently and the influence on the cells needs further discussion.

【Key words】lentivirus vectors; gene transfection; enhanced green fluorescence protein; corneal epithelial cell; cell experiment

临床上一些较常见的角膜病，如长期不愈的角膜溃疡、各种原因导致的角膜新生血管、角膜瘢痕及准分子激光原位角膜磨镶术（Laser in situ keratomileusis, LASIK）术后出现的上皮植入等疾病，目前还没有令人满意的治疗方法，而基因疗法的出现无疑为上述问题的解决带来了希望。角膜组织透明、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，在基因治疗领域具有巨大的潜力并可能会发挥先锋作用[1]。基因治疗的关键问题之一就是选择一种高效、稳定的基因载体。慢病毒载体（Lentivirus vectors, LVs）是一种高效的、可以在宿主细胞内长期稳定表达的病毒载体[2]。前期研究[3]已经证实 lenti-eGFP 可以有效地转染离体兔角膜上皮细胞，本部分实验主要探讨 lenti-eGFP 转染角膜上皮后对其增殖及凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂及设备

健康清洁级新西兰白兔 30 只（重庆医科大学实验动物中心提供），雌雄兼用，体重 1.8~2.5 kg。Lenti-eGFP 购自本元正阳基因技术有限公司；抗角蛋白（广谱）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；倒置荧光显微镜（Olympus，日本）、正置荧光显微镜（Olympus，日本）、透射电子显微镜（Hitachi-600 型，日本）、流式细胞仪（TACSCalibur 型，美国）等。

1.2 角膜上皮细胞的培养与鉴定

空气栓塞法处死实验兔，无菌操作取新鲜角膜组织，解剖显微镜下撕除角膜基质层及其以下组织，将上皮层剪成 10~15 块约 2 mm × 2 mm × 2 mm 大小，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。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 Lenti-eGFP 转染角膜上皮细胞

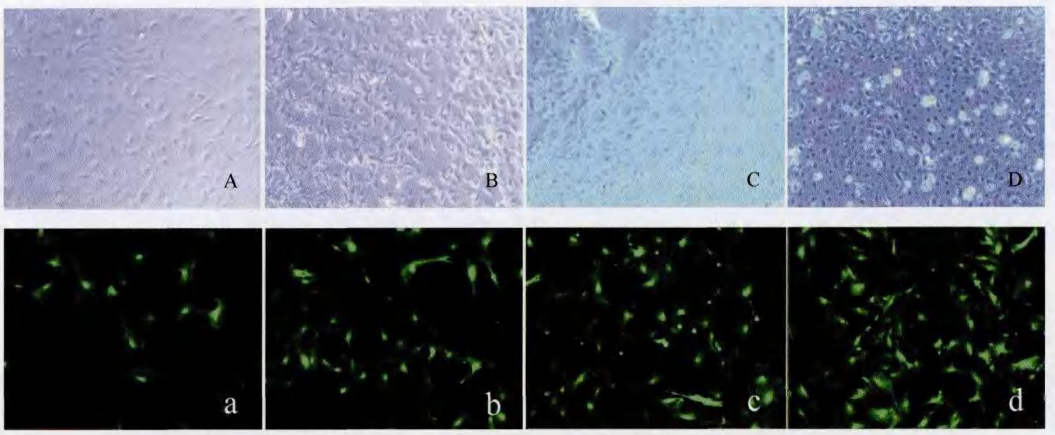
50 ml 培养瓶培养角膜上皮细胞覆盖率达 50% 时，以最佳 MOI=100 TU/cell 加入用 DMEM/F12 培养基稀释的 lenti-eGFP 约 1 ml；轻摇匀，37℃培养 2 h。感染 2 h 后，吸去含病毒的培养液，换上新鲜的完全培养液，继续 37℃培养，于转染 24 h 开始用倒置荧光显微镜观察 eGFP 的表达情况并拍照；约于转染 96 h 细胞达融合状态，待用。设正常传代角膜上皮细胞为对照组。对照组细胞在细胞生长汇合率达 50%时，只加 DMEM/F12 培养基 1 ml，其余操作同转染组细胞。

1.4 HE 染色光镜观察转染组角膜上皮细胞形态及结构的变化

Lenti-eGFP 转染 72 h，收集转染的角膜上皮细胞，常规制作细胞爬片。常规行苏木精-伊红染色（HE 染色），显微镜下观察并拍照。设正常角膜上皮细胞为对照。

1.5 透射电子显微镜观察转染组角膜上皮细胞超微结构

Lenti-eGFP 转染 72 h，收集上述转染组角膜上皮细胞及



对照组细胞传代第 1、2、3、4 天（A、B、C、D，×100）；转染组细胞传代第 1、2、3、4 天（a、b、c、d，×50）

图 1　2 组细胞不同培养时间观察结果

对照组角膜上皮细胞各约 10^6 个，以 1 200 r/min 离心 10 min，弃掉上清液，戊二醛 1 ml 固定，送重庆医科大学电镜室；经脱水、渗透、包埋、聚合、切片和染色等步骤行透射电镜观察并拍照。

1.6　计算 2 组细胞的增殖率

分别于传代后第 1、2、3、4 天倒置显微镜下观察，随机选取 5 个视野拍照并运用 Image J 软件行细胞计数取平均值作为当天细胞计数结果。计算第 2、3、4 天 2 组细胞的增殖率。计算公式为：P=（当日细胞数-前日细胞数）/前日细胞数。

1.7　流式细胞仪检测 lenti-eGFP 对角膜上皮细胞凋亡的影响

收集对照组与转染组处于对数生长期角膜上皮细胞，PBS 冲洗，1 200 r/min 离心 10 min，1.5 ml EP 管分装制成 1 ml 细胞悬液，每管细胞数约 1×10^6 个。将制备好的细胞样品送重庆医科大学生命科学院流式细胞室行 AnnexinV-PI 双标染色。实验重复 3 次。

1.8　数据统计

运用 SPSS16.0 统计软件对计量资料进行小样本均数统计及方差分析；所有数据采用均值±标准差表示；细胞增殖率结果采用两独立样本的组间比较 t 检验，细胞凋亡结果采用 *Kruskal-Wallis* 秩和检验，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　细胞培养及鉴定

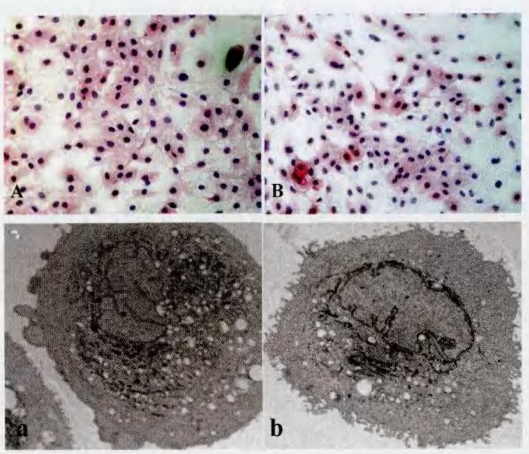
组织块培养第 2 天，上皮细胞自其周围爬出并贴壁生长，第 5 天进入对数生长期。传代细胞约需 5 d 达融合状态，细胞融合后呈规则的多角形态。运用免疫荧光法检测上皮细胞特异性蛋白-角蛋白，证实为上皮细胞。

2.2　Lenti-eGFP 转染角膜上皮细胞观察 eGFP 的表达

eGFP 于转染 48 h 后可在倒置荧光显微镜下观察到，并随着转染时间的延长，其表达增强。成功传代后仍可观察到 eGFP 的表达，并随着培养时间延长表达 eGFP 的细胞增多（图 1a~d），对照组细胞生长情况如图 1A~D。

2.3　HE 染色及电镜观察结果

HE 染色光镜下可见对照组与转染组细胞形态规整，呈规则的多角形态；细胞核较大，无异常核分裂像。2 组细胞光镜下形态无明显差别。透射电镜下可见细胞体积较大，胞膜上较多的纤毛结构，胞浆内较多空泡样结构，染色质伸展，弥散分布。2 组细胞超微结构无明显差别（图 2）。



A. 对照组细胞；B. 转染组细胞（HE，×100）；a. 对照组细胞；b. 转染组细胞（透射电镜，×7 000）

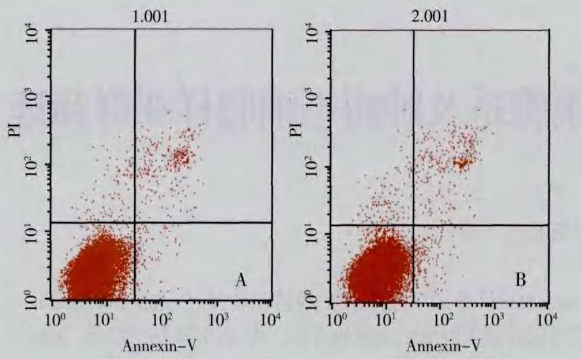
图 2　2 组细胞形态学观察结果

2.4　2 组细胞增殖率计算结果

对照组与转染组细胞于传代第 2 天的增殖率分别为：1.07 ± 0.14，1.04 ± 0.19；2 组间差异无统计学意义（P=0.826）；2 组细胞第 3 天增殖率分别为：0.52 ± 0.06，0.53 ± 0.05；2 组间差异无统计学意义（P=0.917）；2 组细胞第 4 天的增殖率分别为：0.23 ± 0.03，0.21 ± 0.04；2 组间差异无统计学意义（P=0.623）。

2.5　流式细胞仪检测结果

对照组与转染组细胞凋亡率（%）分别为 0.645 ± 0.040、0.650 ± 0.030；2 组间细胞凋亡率差别无统计学意义（P=0.914），如图 3。



A. 对照组　　B. 转染组

图 3　流式细胞技术检测结果

3　讨　论

LVs已经用于多种组织、细胞的基因转染实验[4-6]，但基因转染（治疗）的一个不能忽视的问题就是其应用对正常生理功能的影响。LVs 由于可以将自身及目的基因插入到宿主细胞的基因序列内，从而能够使目的基因长期高效地表达于宿主细胞。这是 LVs 区别于其他病毒载体系统的一个突出优势，但同时也出现了一种可能：因其携带的目的基因是随机地插入到宿主基因组内，而打乱正常的基因组序列，这就可能对细胞的生理功能产生一定的影响或造成不可逆的致命性损伤。虽然 LVs 已经有人用于临床试验并取得较好的治疗效果，在随访期间未发现有致病的 HIV 蛋白表达及致融合突变倾向，但此疗法的应用也仅限于那些目前的疗法不能治疗的艾滋病病人及其它一些基因病[7,8]。另有学者[9]发现在治疗基因病时有些患者出现白血病。研究人员在分析原因时推测，在该项临床试验中所使用的逆转录病毒（慢病毒）载体可能是造成这种情况的罪魁祸首，正是由于病毒的 DNA 整合到患者细胞的 DNA 上时插入到了一个促癌基因的附近，才导致这种情况的发生。

本实验从细胞形态学及 lenti-eGFP 对转染细胞增殖、凋亡的影响几个方面初步探讨 LVs 用于角膜上皮细胞转染对其生理功能的影响。我们在实验中发现，传代后的角膜上皮细胞无论是对照细胞还是转染细胞的体积均较大，在透射电镜下观察可见胞浆内有较多的空泡状结构。推测是细胞发生了水肿的病理改变。但两组细胞均出现了这种变化，所以我们不认为是 lenti-eGFP 转染细胞所导致的。对于 LVs 对宿主细胞损伤程度的检测，我们在后续实验中还要结合更为敏感的指标，如 LDH 释放试验等做进一步探讨。在对两组细胞相关功能变化的进一步检测后证实了我们的猜测，对照组与转染组细胞的增殖率与凋亡率差异均无统计学意义。

虽然本实验未发现 LVs 对角膜上皮细胞增殖与凋亡产生明显影响，但其应用的远期影响仍有待进一步观察[10]。为了降低 LVs 由于插入到宿主基因组而带来的风险[11]，多种改良的载体系统被相继报道，如自我失活载体、靶向插入载体、非整合载体以及假包膜 LVs 等[12]。

综上所述，我们认为 LVs 介导外源基因可以高效的转染离体兔角膜上皮细胞，但其用于动物实验的远期效果有待进一步研究。

参　考　文　献

[1] 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.

[2] Colella P, Cotugno G, Auricchio A. Ocular gene therapy: current progress and future prospects[J]. Trends in Molecular Medicine, 2008, 15(1): 23-31.

[3] 王继东，杜之渝，兰　芬. 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[J]. 第三军医大学学报，2010, 32(13): 1425-1428.

[4] Qin H, Chena C H, Khatibi N H, et al. Lentivirus-mediated transfer of MMP-9 shRNA provides neuroprotection following focal ischemic brain injury in rats[J]. Brain research, 2011, 1367: 347-359.

[5] Framea F M, Stefanie H, Davide P, et al. Development and limitations of lentivirus vectors as tools for tracking differentiation in prostate epithelial cells[J]. Experimental cell research, 2010, 316(19): 3161-3171.

[6] Hioki H, Kuramoto E, Konno M, et al. High-level transgene expression in neurons by lentivirus with tet-off system [J]. Neuroscience Research, 2009, 63 (2): 149-154.

[7] Levine B L, Humeau L M, Boyer J, et al. Gene transfer in humans using a conditionally replicating lentiviral vector[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(46): 17372-17377.

[8] Wang G P, Levine B L, Binder G K, et al. Analysis of lentiviral vector integration in HIV+ study subjects receiving autologous infusions of gene modified CD4+ T cells[J]. Mol Ther, 2009, 17(5): 844-850.

[9] Wu X, Li Y, Crise B, et al. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration[J]. Science, 2003, 300(5626): 1749-1751.

[10] Roybal J L, Santore M T, Flake A W. Stem cell and genetic therapies for the fetus[J]. Seminars in fetal & neonatal medicine, 2010, 15(1): 46-51.

[11] Lemiale F, Korokhov N. Lentiviral vectors for HIV disease prevention and treatment[J]. Vaccine, 2009, 27(25-26): 3443-3449.

[12] Cannon J R, Thomas S, Laura Montero, et al. Pseudotype-dependent lentiviral transduction of astrocytes or neurons in the rat substantia nigra[J]. Experimental Neurology, 2011, 228(1): 41-52.

（责任编辑：关蕴良）