

绿色荧光蛋白基因转染骨髓间质干细胞

蒋文慧, 马爱群, 王亭忠, 董安平, 赵晓鸽, 许正云, 耿涛, 郑小璞

(西安交通大学第一医院心血管内科 教育部环境与疾病相关基因重点实验室, 陕西省西安市 710061)

[关键词] 病理学与病理生理学; 干细胞示踪; 基因转染; 绿色荧光蛋白基因; 骨髓间质干细胞; 脂质体

[摘要] 目的 建立以增强型绿色荧光蛋白基因示踪骨髓间质干细胞的方法。方法 采用密度梯度离心法分离、培养骨髓间质干细胞, 以脂质体介导法转染增强型绿色荧光蛋白基因的表达质粒, 荧光显微镜观察基因表达及转染效率。结果 绿色荧光蛋白在基因转染 12 h 后开始表达, 48~72 h 达高峰, 并在 1 周内有较强的表达, 以后逐渐减弱, 4 周左右仍有少量表达, 转染效率与质粒、脂质体的浓度有关, 外缘基因导入后不影响骨髓间质干细胞的生长和增殖。结论 脂质体介导的绿色荧光蛋白基因转染骨髓间质干细胞后能安全、有效地表达, 转染效率为 20%~30%, 是一种较为理想的干细胞示踪方法。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Transfection of Enhanced Green Fluorescent Protein Gene into Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

JIANG Wen-Hui, MA Ai-Qun, WANG Ting-Zhong, DONG An-Ping, ZHAO Xiao-Ge, XU Zheng-Yun, GENG Tao, and ZHENG Xiao-Pu

(Cardiovascular Department, the First Hospital of Xi'an Jiaotong University; Key Laboratory of Environment and Genes Related to Diseases, Ministry of Education, Xi'an 710061, China)

[KEY WORDS] Green Fluorescent Protein; Mesenchymal Stem Cells; Lipofectamine; Gene Transfection

[ABSTRACT] **Aim** To establish a method for tracking bone marrow mesenchymal stem cells (MSC) through transfection of enhanced green fluorescence protein (EGFP) gene. **Methods** Mesenchymal stem cells were isolated from bone marrow and purified by density centrifuge in vitro. The cultured cells were transferred with the expressing plasmid of EGFP (pEGFP) by means of lipofectamine media methods. The transient expression and transfection efficiency were subsequently observed by fluorescent microscopy. **Results** The expression of EGFP was initially found in 12 h after transfection, reached optimal state in 48~72 h, remained strong express within 1 week and then became weak for 4 weeks. The efficiency of transfection was correlated with the concentration of plasmid and lipofectamine respectively. Particularly, the growth and proliferation of mesenchymal stem cells wasn't disturbed by EGFP gene transfection. **Conclusions** EGFP transfected by lipofectamine media could be safely expressed in MSC in vitro. The efficiency of transfection could reach 20%~30% with proper concentration of plasmid and lipofectamine. EGFP as a report gene to label stem cells was an ideal method for tracking.

近年来, 骨髓间质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSC) 在组织工程及细胞和基因治疗中开始广泛应用, 也成为促进心肌、血管再生的重要靶细胞^[1-4]。绿色荧光蛋白基因 (green fluorescent protein, GFP) 作为一种新型的报告基因, 具有高效、稳定、无毒、易于检测等特性, 能在活细胞中直观地观察其表达, 可较快筛选其修饰的细胞^[5,6]。本研究应用带有增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 基因的表达质粒 (plasmid of enhanced green fluorescent protein, pEGFP) 转染 MSC, 建立一个

较好的标记基因条件, 从而为研究 MSC 的生物学行为提供新的示踪方法, 并为揭示 MSC 对心肌、血管损伤的修复机制, 进一步提高其治疗效应。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株 pEGFP-N3 质粒 (Clontech 公司, 美国); DH5α 大肠杆菌菌株 (本校微生物实验室提供)。

1.1.2 主要试剂 脂质体 Lipofectamine2000 (Invitrogen 公司, 美国), 低糖 DMEM (Gibco 公司, 美国); 胎牛血清 (杭州四季青生物公司); 淋巴细胞分离液 (Pharmacia 公司, 美国); 胰蛋白酶 (Amresco 公司, 美国); 中量质粒抽提试剂盒 (碧云天公司); Bam HI 内切酶、DNA marker (Fermentas, 立陶宛)。

[收稿日期] 2004-09-13 [修回日期] 2005-08-29

[基金项目] 西安交通大学教育振兴行动计划 (XY10 082008)

[作者简介] 蒋文慧, 博士研究生, 讲师, 研究方向为干细胞与心肌再生, E-mail 为 jwhfq@163.com。通讯作者马爱群, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事冠心病和心力衰竭的研究, Email 为 maaqun108@hotmail.com。王亭忠, 博士研究生。

1.1.3 主要仪器和设备 YJ-875S 型超净工作台(苏州净化设备厂); D-63450 C02 恒温孵育箱、D-37520 超速低温离心机(Hareas 公司, 德国); IMP-2 型倒置显微镜(Olympus 公司, 日本); 荧光显微镜(Leica, 德国); 培养瓶及培养板(Gibco 公司, 美国)。

1.2 质粒的扩增、提取及鉴定

取大肠杆菌 DH5 α 用氯化钙法制备感受态细菌, 将 pEGFP-N₃ 质粒转化感受态细菌, 37℃培养 24 h, 挑取单菌落接种到含卡那霉素(50 mg/L)的 LB 液体培养基中, 37℃震荡(220 r/min)培养过夜, 取菌液 10 mL, 按照碧云天质粒抽提试剂盒说明书用碱裂解法提取质粒 DNA。分光光度计测定质粒 DNA 浓度, 取 2 μ L 质粒 DNA 用 Bam HI 酶切, 1% 琼脂糖电泳鉴定酶切结果。

1.3 骨髓间质干细胞的分离、培养

无菌条件下从新西兰兔胫骨近端内侧抽取骨髓 2 mL, 置入含肝素(100 ku/L)抗凝培养液中, 200 目滤网过滤, Percoll(密度 1.073)分离, 密度梯度离心(2 400 r/min, 20 min), 吸取中间的单核细胞层, PBS 洗涤 2 次, 以 5×10^8 /L 密度接种于 50 mL 的培养瓶中, 置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。24 h 后换液, 弃取未贴壁细胞, 以后每 3 天换液 1 次, 细胞接近汇合时传代。

1.4 基因转染

转染前一天, 将细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化, 以 2×10^8 个/L 的细胞密度接种到预置盖玻片的六孔板内, 37℃培养过夜, 当细胞生长接近 70%~80% 汇合时进行基因转染。第一步配制不同浓度的质粒 DNA-脂质体复合物, 分别将一定量的 pEGFP-N₃ 质粒 DNA 和脂质体 Lipofectamine 2000 加入 100 μ L 的无血清 DMEM 培养液(不含抗生素)中, 轻柔摇动, 然后充分混合, 室温放置 30 min 后, 加 800 μ L 无血清培养液, 轻柔摇动混匀; 第二步将欲转染的细胞以无血清的培养液洗涤 1 次后, 再将已配置好的质粒 DNA-脂质体复合物滴加到细胞表面; 第三步为放置在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 5 h 后, 吸尽转染培养液, 加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基。于转染后的 24 h、48 h、72 h、1 周、2 周、3 周及 4 周荧光显微镜下观察。转染同时设对照组, 仅加无血清培养基, 不加转染培养液。分组见表 1。

1.5 荧光显微镜观察

取出盖玻片后以 PBS 漂洗 2 次, 倒置在载玻片上, 荧光显微镜下观察, 每个标本任取 3 个高倍镜视野, 统计荧光细胞数目和同一视野下明场中的总细胞数, 计算转染效率, 计算平均值。

表 1. 质粒 pEGFP-N₃ 脂质体复合物的配制分组

分 组	④ (四)						⑧ (七) ⑩				⑪
质粒 DNA (μL)	5	10	15	5	10	15	5	10	15	0	
脂质体 (μL)	5	5	5	10	10	10	15	15	15	0	

2 结果

2.1 增强型绿色荧光蛋白基因表达质粒的鉴定

提取的 pEGFP-N₃ 质粒, 用分光光度计测定的浓度为 0.25 g/L, OD₂₆₀: OD₂₈₀ = 1.8。经 Bam HI 酶切后呈线性, 电泳仅显示单一条带, 大小为 4.7 kb。根据 pEGFP-N₃ 图谱分析, 其仅含有单一的 Bam HI 酶切位点, 片段长度为 4.7 kb, 故证实所获质粒为 pEGFP-N₃(图 1, Figure 1)。

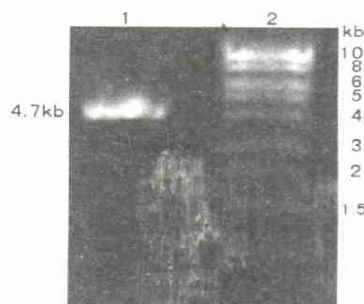


图 1. 表达载体 pEGFP-N₃ 的酶切鉴定 1 为 pEGFP-N₃/Bam HI, 2 为 DNA marker。

Figure 1. Restrictive enzyme digestion analysis of expression vector pEGFP-N₃

2.2 体外培养的骨髓间质干细胞

原代培养的 MSC 为贴壁生长的长梭形细胞, 呈集落生长, 培养至 7~10 天细胞汇合, 经胰酶消化后传代, 细胞于 24 h 后可完全贴壁, 呈均一生长(图 2, Figure 2), 5~6 天汇合后可再次传代。体外扩增 5 代细胞数为 1×10^8 个, 体现其强大的增殖能力。

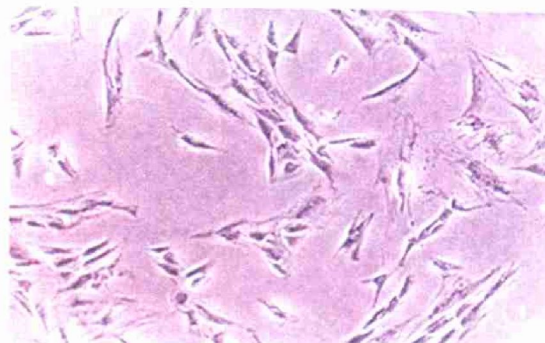


图 2. 传代后的骨髓间质干细胞 ($\times 100$)

Figure 2. Secondary cells of cultured MSC

2.3 骨髓间质干细胞表达绿色荧光蛋白基因

转染 12 h 后即可见发较弱绿色荧光的细胞, 48 ~ 72 h 阳性细胞明显增多, 强度增强, 第 1 组转染效率达 20% ~ 30%, 多为明亮的绿色荧光, 少数呈黄绿色(图 3, Figure 3), 在 1 周内有较强的表达, 1 周后表达绿色荧光的细胞逐渐减少, 到 4 周时仍可见少量散在的荧光。除第 4 组(对照组, 未见荧光表达)外, 其他质粒 DNA、脂质体浓度较低组转染效率低, 而质粒 DNA、脂质体浓度较高组则有较多细胞死亡。



图 3. 增强型绿色荧光蛋白基因在骨髓间质干细胞中的表达 (×100)

Figure 3. The expression of EGFP in pEGFP-N3 transfected MSC

2.4 表达增强型绿色荧光蛋白基因的骨髓间质干细胞的状态

pEGFP-N3 在脂质体介导下转染 MSC 后, 阳性细胞发绿色荧光, 呈“全细胞型”, 同一时间点观察, 可见处于增殖、分裂状态的各期细胞(图 4, Figure 4), 细胞的生长和增殖不受影响。

3 讨论

骨髓间质干细胞(MSC)是近年来干细胞研究领域中最引人注目的一种成体干细胞, 具有多分化潜能, 它不仅可分化为间质组织, 而且近期的研究还发现可向心肌细胞、神经细胞、肝细胞等非来源组织的细胞分化, 具有类似胚胎细胞的多能性^[7,8], 且取材方便, 因而作为组织工程“种子细胞”有广泛的应用前景^[9]。近年来, 人们尝试应用 MSC 修复心肌损伤, 达到心肌和血管的再生, 以改善心功能, 动物实验和小样本的临床实验已初步证明了干细胞疗法的有效性^[10,11]。但 MSC 向特定组织归巢和多向分化潜能的分子机制仍是一个需要探索的课题, 而寻找一个高效的、便于进行活细胞示踪标记的工具对研究 MSC 的生物学行为至关重要。



图 4. 同一时间点处于增殖、分裂状态的骨髓间质干细胞(×400)

Figure 4. Proliferation and abruption of MSC with EGFP at the same time

绿色荧光蛋白基因(GFP)是一种新型报告分子, 不需反应底物即可产生绿色荧光, 敏感性强且性质稳定, 不干扰细胞功能, 容易检测, 可以进行活细胞的实时定位观察, 已成为研究活细胞形态、生理、生化及分子水平变化的新工具^[12-14]。EGFP 是 GFP 的一个突变体, 使 GFP 的荧光强度提高 35 倍, 从而大大增强了 GFP 作为报告基因的检测灵敏度^[10]。虽然近年来广泛采用的标记基因还有细菌 β 半乳糖苷酶基因(β -gal)、氯霉素乙酰基转移酶基因(CAT)以及萤火虫荧光素酶基因等, 但是要检测这些基因的编码产物必须对细胞进行固定并作特殊染色或其他处理, 不仅操作烦琐复杂, 不适合活细胞, 更无法作活体研究^[12,13]。本研究将 EGFP 的表达质粒转染培养的 MSC, 细胞无需任何处理即可用荧光显微镜进行动态观察, 转染 12 h 后即可见较弱绿色荧光的细胞, 48~72 h 阳性细胞明显增多, 强度增强, 1 周内有较强的表达, 荧光呈胞浆和核弥漫性分布, 且同一时间点可见到处于增殖分裂状态的不同细胞, 未见有明显的细胞毒性, 进而提示 EGFP 是研究干细胞生命现象的一种简便途径。

应用 EGFP 作为示踪分子时, 不同的表达载体转染不同的细胞, 效率不同, 病毒载体转染效率较高, 但有较强的免疫原性, 表达质粒比病毒载体更为安全^[15]。脂质体法是近年开发的更加简便高效的方法, 其能被 DNA 的磷酸根所吸附形成 DNA-脂质体复合物, 同样也能被表面带负电荷的细胞膜吸附将 DNA 导入细胞^[16]。我们的实验发现, 质粒、脂质

体浓度过低, 转染效率降低; 而浓度过高时, 不仅转染效率降低, 且容易出现细胞脱落和坏死, 说明高浓度对细胞存在毒性; 当脂质体-DNA 复合物孵育时间过长时, 可见细胞形态的变化, 甚至细胞漂浮(死亡), 同时转染效率也降低。因此, 转染效率与质粒浓度、脂质体的浓度及脂质体-DNA 复合物孵育时间密切相关。在合适的质粒和脂质体浓度下, 可以达到 30% 的转染效率, 并在 1 周内有较强的表达, 瞬时表达持续时间可达到 4 周, 如果用 G418 进一步筛选, 有望获得稳定表达的细胞克隆, 必将成为研究干细胞行为的一个十分有用的工具。

本研究应用 EGFP 基因转染 MSC, 在合适的质粒和脂质体浓度下, 可得到较高的瞬时表达, 且转染细胞的生物学特性未受影响, 通过荧光倒置显微镜可方便观察, 初步建立了一套细胞标记技术平台, 从而为组织工程技术修复体内损伤机制的研究, 提供了有效的工具, 对更深入地探讨骨髓 MSC 向损伤心肌组织归巢和向功能细胞分化的机制, 奠定了实验基础^[17, 18]。

[参考文献]

- [1] Jiang YH, Jahagirda BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keenek CD, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 2002, **418** (4): 41-49
- [2] Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: Biology and potential clinical uses. *Experimental Hematology*, 2000, **28** (8): 875-884

- [3] 蒋文慧, 马爱群. 干细胞循环及其潜在应用前景. *中华医学杂志*, 2003, **83** (21): 1 923-925
- [4] 蒋小英, 高广道, 王新风. 骨髓干细胞向心肌细胞分化的研究现状. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (1): 103-105
- [5] Lippincott-Schwartz J, Patterson GH. Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science*, 2003, **300** (5616): 87-91
- [6] Stephens DJ, Allan VJ. Light microscopy techniques for live cell imaging. *Science*, 2003, **300** (5616): 82-86
- [7] Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol*, 1999, **181** (1): 67-73
- [8] Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, 2001, **105** (3): 367-377
- [9] Barry FP, Murphy J M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2004, **36** (4): 568-584
- [10] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 2001, **410** (6829): 701-705
- [11] 蒋文慧, 马爱群. 干细胞动员治疗缺血性心脏病研究进展. *中国循环杂志*, 2003, **83** (21): 1 923-925
- [12] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 1994, **263** (5148): 802-805
- [13] Weijer CJ. Visualizing signals moving in cells. *Science*, 2003, **300** (5616): 96-100
- [14] Stephens DJ, Allan VJ. Light microscopy techniques for live cell imaging. *Science*, 2003, **300** (5616): 82-86
- [15] Riede CL, Khodjakov A. Mitosis through the microscope: advances in seeing inside live dividing cells. *Science*, 2003, **300** (5616): 91-96
- [16] Swedlow JR, Goldberg I, Brauner E, Sorger PK. Informatics and quantitative analysis in biological imaging. *Science*, 2003, **300** (5616): 100-102
- [17] Wollert KC, Drexler H. Clinical applications of stem cells for the heart. *Circ Res*, 2005, **96** (1): 151-163
- [18] Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res*, 2004, **95** (1): 9-20

(此文编辑 文玉珊)