

慢病毒载体介导人缝隙连接蛋白 43 基因在大鼠骨髓间充质干细胞中的表达

林世荣, 陈良龙

(福建医科大学附属协和医院心血管内科, 福建省福州市 350001)

[关键词] 内科学; 慢病毒载体; 缝隙连接蛋白 43 基因; 绿色荧光蛋白; 骨髓间充质干细胞

[摘要] **目的** 构建带有缝隙连接蛋白 43 基因的慢病毒载体, 并实现该基因在大鼠骨髓间质干细胞中的表达。**方法** 通过逆转录聚合酶链反应获得人缝隙连接蛋白 43 基因, 利用 infusion 技术重组构建慢病毒载体质粒 FUGW-缝隙连接蛋白 43, 在脂质体介导下与包装质粒和包膜质粒 VSVG 共转染 293T 细胞包装生产慢病毒。所获慢病毒感染大鼠骨髓间充质干细胞后, 在荧光显微镜下观察缝隙连接蛋白 43 蛋白表达情况。**结果** 所获缝隙连接蛋白 43 基因经测序后与 GeneBank 报道序列完全一致; 重组慢病毒载体质粒 FUGW-缝隙连接蛋白 43 经鉴定正确; 三质粒共转染 293T 细胞成功, 收集、浓缩病毒后测定其滴度为 1×10^{11} TU/L; 感染大鼠骨髓间充质干细胞后荧光显微镜观察到胞膜位置点线状荧光分布。**结论** 成功构建带有缝隙连接蛋白 43 基因的慢病毒载体并实现在大鼠骨髓间充质干细胞中的表达, 为间充质干细胞移植治疗心肌梗死的应用奠定了基础。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Expression of Human Connexin43 Gene in Bone Mesenchymal Stem Cells of Rat Mediated by Lentiviral Vector

LIN Shi Rong, and CHEN Liang-Long

(Department of Cardiology, the Affiliated Union Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China)

[KEY WORDS] Lentiviral Vector; Connexin43 Gene; Green Fluorescence Protein; Bone Mesenchymal Stem Cells

[ABSTRACT] **Aim** To construct lentiviral vector carrying the connexin43 (Cx43) gene, and make it express in the rat bone mesenchymal stem cells (BMSC). **Methods** The cDNA of human Cx43 gene was obtained with reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The Cx43 gene was recombined to construct the transfer plasmid FUGW-Cx43 by infusion technique. The three-plasmid system of lentiviral vector was consisted of FUGW, the packaging plasmid, and the envelope plasmid VSVG, which were cotransfected to 293T cells mediated by lipofectamin 2000 to produce lentiviral particles. The rat BMSC were infected by obtained lentiviral particles. The expression of Cx43 protein was observed with fluorescent microscope. **Results** The result of sequencing showed that the cloned Cx43 gene was consistent with the sequence reported in GeneBank. The insertion of Cx43 gene in viral genome was confirmed by PCR. The FUGW-Cx43 plasmid was identified to have correct sequence. After the three plasmids of lentiviral vectors were cotransfected to the 293T cells, the supernatant was collected and concentrated, the titer of the lentiviral vector particles was found to be 1×10^{11} TU/L. Cx43 gene-modified rat BMSC show linear and stippled patterns of Cx43 expression on cell membrane. **Conclusion** Lentiviral vector carrying Cx43 gene has been successfully constructed. The infected rat BMSC are able to express the Cx43 protein. This will facilitate the following exploratory development of Cx43 gene modified stem cell-based cardiac repair.

骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSC)由于具有多向分化潜能及在体内可向急性损伤部位迁移的特性,成为干细胞治疗心肌梗死研究的热点^[1-4]。但研究也发现 BMSC 植入体内后无法与自体心肌细胞形成有效电机械偶联,难以发挥正常心肌功能^[1,2]。缝隙连接是心肌化学耦联和电耦联的结构基础,其主要结构蛋白为缝隙连接蛋白 43

(connexin43, Cx43),因此本研究尝试构建带有人 Cx43 慢病毒载体,并感染 BMSC,以期改善转染后干细胞植入心肌后与自体心肌细胞的整合。

1 材料与方法

1.1 主要材料

慢病毒载体重组质粒 pReceiver-Lv- Cx43 (Gene Copoeia), FUGW、pHelper 1.0 (gag/pol 元件)载体和 Helper 2.0 (VSVG 元件)载体(Genechem); T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 Age iv(NEB), Taq 聚合酶(Takara), infusion 交换酶(Clontech), Lipofectamine2000(In-

[收稿日期] 2007-12-11 [修回日期] 2008-02-03

[基金项目] 福建省教育厅科技资助项目(FJGX04016)

[作者简介] 林世荣, 博士研究生, E-mail 为 leopard862@hotmail.com。陈良龙, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 国务院特殊津贴专家, E-mail 为 lianglongchen@126.com。

vitrogen), polybrene (Sigma), 质粒抽提试剂盒 (Qia-gen)。胎牛血清 (PAA), DMEM 及胰酶-EDTA (Gibco)。其他试剂均为进口或国产化学分析纯。引物设计、合成由上海 GENECHM 生物公司完成。

1.2 引物设计与合成

根据载体 FUGW 要求在引物中加入 Age *iv* 酶切位点, 用于 PCR 钓取目的基因, 上游引物为 5'-GAT GAT GAC GAC AAA CCG GTC ATG GGT GAC TGG AGC GCC-3', 下游引物为 5'-TCA CCA TGG TGG CGA CCG GTT TGA TCT CCA GGT CAT CAG GC-3'。以下 Cx43 引物用于 PCR 鉴定目的基因重组连接的阳性克隆菌落及测序, 其中上游引物 (5'-TGG ATT CAG CTT GAG TGC TG-3') 位于目的基因, 下游引物 (5'-AGC GTA AAA GGA GCA ACA TAG-3') 位于载体, 产物大小为 1 435 bp。

1.3 目的基因的获取

以重组质粒 pReceiver-Lv-Cx43 为模板, 加入 Cx43 基因上、下游引物, 在 pfu 高保真 DNA 聚合酶作用下, 94℃预变性 30 s, 94℃变性 30 s → 60℃退火 30 s → 72℃延伸 60 s, 共 30 个循环, 72℃延伸 6 min 钓取 Cx43 基因。琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 FUGW-缝隙连接蛋白 43 重组质粒的构建

FUGW 真核表达载体在 Age *iv* 作用下, 37℃1 h 酶切, 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物及酶切回收的载体 DNA, 在 infusion 交换酶作用下, 于 23℃反应 15 min, 再于 42℃反应 15 min 制备克隆交换液。氯化钙制备 DH5α 感受态细胞, 取 200 μL 感受态细胞悬液, 加 2 μL 连接液, 转化, 挑取阳性克隆 PCR 鉴定, 克隆送上海英骏公司测序。

1.5 病毒包装

通过质粒中量抽提试剂盒制备 FUGW-Cx43、pHelper 1.0 和 pHelper2.0 等质粒。转染前 24 h, 用胰蛋白酶消化对数生长期的 293T 细胞, 以含 10% 血清的培养基调整细胞密度为 $6.0 \times 10^8/L$, 重新接种于 15 cm 细胞培养皿, 37℃、5% CO₂ 培养箱内培养。24 h 待细胞密度达 70%~80% 时即可用于转染。转染前 2 h 将细胞培养基更换为无血清培养基。慢病毒三质粒按 4: 3: 2 混合, 利用脂质体 Lipofectamine 2000 共转染 293T 细胞。培养 8 h 后更换为含 10% 血清的细胞培养基, 继续培养 48~72 h。

1.6 病毒收集、浓缩及滴度测定

48~72 h 后观察出现强绿色荧光并有细胞融合现象时收集上清, 离心浓缩至需要的病毒体积。将病毒浓缩液移出, 分装后保存在病毒管中, -80℃长期保存。取 100 μL 病毒液进行生物学滴度测定。

(1) 分别取 10 倍比稀释的病毒液 100 μL, 加入 96 细胞孔, 8 h 后, 换为新鲜培养基。4 天后, 观察细胞荧光及生长状况, 并收取细胞进行后续滴度测定。(2) 实时荧光定量 PCR 检测病毒滴度: 抽提细胞总 RNA, 逆转录获 cDNA。样品引物序列如下: 上游引物为 5'-AAG GAG GAC GGC AAC ATC-3', 下游引物为 5'-GAC TGG GTG CTC AGG TAG-3'; Actin 上游引物为 5'-GTG GAC ATC CGC AAA GAC-3', 下游引物为 5'-AAA GGG TGT AAC GCA ACT A-3'。两步法行实时荧光定量, 95℃预变性 15 s, 之后每一步 95℃变性 5 s → 60℃退火 30 s → 60℃延伸 30 s, 共 40 个循环。每次在延伸阶段读取吸光度值。PCR 结束后, 95℃变性 1 min。然后冷却至 55℃, 使 DNA 双链充分结合。从 55℃开始到 95℃, 每一步增加 0.5℃, 保持 30 s, 同时读取吸光度值, 制作熔解曲线。

1.7 大鼠骨髓间充质干细胞的分离和扩增培养

无菌条件下取 2 个月龄雄性 SD 大鼠股骨和胫骨, 充分冲洗骨髓腔, 加入适量含 10% 胎牛血清的低糖 DMEM, 转移入 15 mL 离心管, 离心 5~10 min, 弃上清, 加入适量含 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 完全培养基培养。当细胞汇合达 90% 以上时 0.25% 胰酶-EDTA 消化传代。

1.8 慢病毒感染大鼠骨髓间充质干细胞

弃去 BMSC 原培养液, 分别取空载体转染及重组载体转染病毒原液 300 μL, 加入转染增强剂 polybrene 至终浓度为 8 mg/L 感染大鼠 BMSC, 8 h 后更换为低糖 DMEM 完全培养基继续培养。48 h 后荧光显微镜下观察 Cx43 蛋白表达情况。

2 结果

2.1 真核载体 FUGW 单酶切线性化

电泳结果见酶切后载体较未酶切载体滞后, 说明已成功酶切为线性载体 (图 1)。

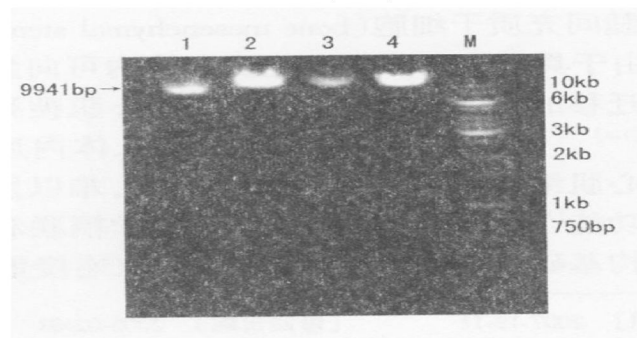


图 1. FUGW 载体 Age *iv* 酶切产物 M 为相对分子质量, 1 为 FUGW 载体, 2、3、4 为 FUGW 载体 Age *iv* 单酶切后产物。

2.2 缝隙连接蛋白 43 基因逆转录聚合酶链反应产物电泳结果

电泳结果可见 1 192 bp 处有特异条带, 与预计产物大小一致, 表明已成功钓取 Cx43 基因(图 2)。

2.3 重组质粒阳性克隆聚合酶链反应产物电泳鉴定结果

FUGW-Cx43 重组质粒阳性克隆 PCR 鉴定, 琼脂糖电泳可见 1 435 bp 目的片段, 与 PCR 预计产物大小一致, 初步确认成功构建重组质粒(图 2), 回收纯化测序结果正确无突变或缺失可进一步明确。

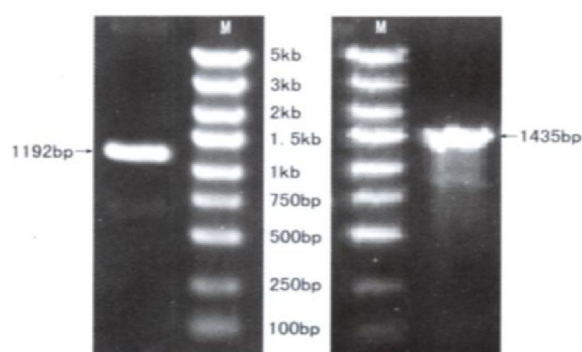


图 2. 缝隙连接蛋白 43 基因聚合酶链反应产物琼脂糖电泳图(左)及 FUGW-缝隙连接蛋白 43 重组质粒鉴定(右)

2.4 慢病毒包装结果

慢病毒载体三质粒共转染 293T 细胞后 48 h, 荧光显微镜观察可见强绿色荧光(图 3)。

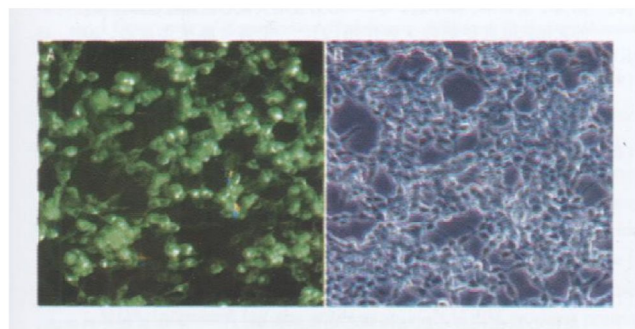


图 3. 三质粒共转染 293T 细胞后荧光显微镜观察结果 ($\times 100$) A 为荧光视野, B 为明视野。

2.5 病毒滴度测定结果

实时荧光定量 PCR 结果发现 10^{-5} μL 样品和其后更低稀释度样品之间基因表达有一定差异, 其后样品基因表达和空白对照组相比差异无显著性, 因此评估 10^{-5} μL 样品中仍有病毒颗粒, 该批病毒的滴度为 1×10^{11} TU/L(图 4)。

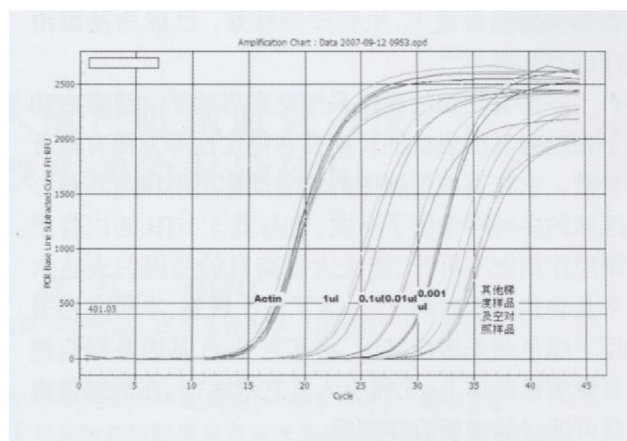


图 4. 实时荧光定量聚合酶链反应测定慢病毒滴度

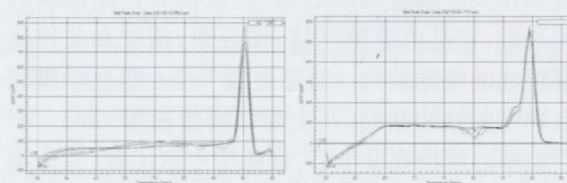


图 5. Actin(左)及样品(右)溶解曲线

2.6 含重组质粒慢病毒感染大鼠骨髓间充质干细胞缝隙连接蛋白 43 表达情况

病毒感染大鼠 BMSC 48 h 后荧光显微镜观察发现 Cx43-BMSC 组可见绿色荧光, 呈点线状(箭头处)分布于胞膜位置, 荧光随着细胞传代可持续。空载体组细胞膜位置未见绿色荧光表达(图 6)。

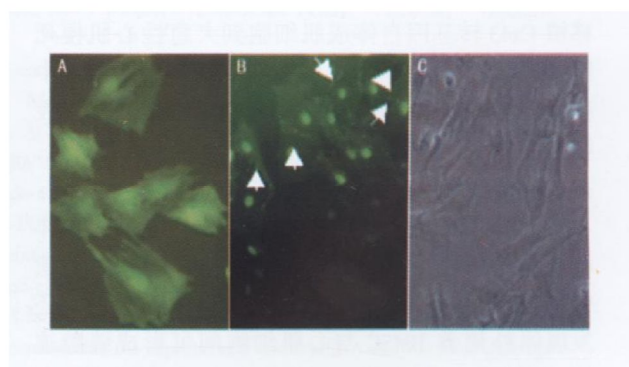


图 6. 病毒感染大鼠骨髓间充质干细胞 48 h 后缝隙连接蛋白 43 蛋白表达情况 A 为空载体组 ($\times 400$), B 为 Cx43-BMSC 组荧光视野 ($\times 200$), C 为 Cx43-BMSC 组明视野 ($\times 200$)。

3 讨论

慢病毒载体是一种以 1 型人类免疫缺陷病毒为基础构建的新型载体系统, 它可感染分裂和非分裂期细胞, 实现目的基因长期稳定表达, 感染效率高,

转移基因的容量大,生物安全性好,已成为基因治疗的首选载体^[5]。

本研究使用的载体采用泛素启动子。泛素启动子在增强基因表达的长期性和稳定性等方面有显著功效。它在真核细胞中的强启动作用不仅与其核心区域的多种转录因子有关,也与其 5' UTR 的内含子调控作用密不可分,能大大提高目的基因的表达水平及表达持续时间^[6,7]。为了便于观察,本研究还采用了绿色荧光蛋白基因,将其与 Cx43 基因共同构建至慢病毒载体上,无需引入其它示踪剂,在活细胞内就可通过显微镜直接观察。

心肌是一种合体组织,其功能与闰盘结构和功能密切相关。闰盘构成心肌电、机械和代谢耦联的结构基础,它是由缝隙连接、粘合膜、桥粒和非特化肌膜组成的特殊结构。缝隙连接^[8]是心肌化学耦联和电耦联的结构基础,其主要结构蛋白为 Cx43。研究^[9]发现心肌梗死发生后,梗死中心区 Cx43 完全消失,边缘带 Cx43 呈现不均匀消失,仅少量 Cx43 分布于岛状或半岛状存活心肌,这可能是心肌梗死后心功能异常的一个重要结构基础。因此, Cx43 作为细胞替代疗法的一个潜在靶点将具重要应用价值。

Suzuki 等^[10]研究表明 Cx43 基因修饰的成肌细胞可高表达 Cx43,并持续较长时间,肌细胞间缝隙连接明显增加,同时发现 Cx43 可促进成肌细胞的分化。Kizana 等^[11]发现转染 Cx43 基因的成纤维细胞可分化为具有电偶联的可兴奋细胞,染料传输试验亦提示缝隙连接形成。另有体内实验证实^[12],通过移植 Cx43 转基因自体成肌细胞到犬急性心肌梗死区,发现植入的转基因成肌细胞在宿主心肌组织中存活并有序排列,部分细胞间见闰盘形成。以上表明 Cx43 基因可能有助于移植细胞向心肌细胞分化,并改善移植细胞与宿主细胞间整合。

骨髓间充质干细胞(BMSC)来源广泛,具有自体 and 异体易获得性、体外可扩增性及多向分化潜能、遗传稳定及低免疫原性等优点。Valiunas 等^[13]研究还发现体外培养 BMSC 与心肌细胞间可形成缝隙连接。亦有研究^[14]表明通过静脉输入 BMSC 治疗心肌梗死,植入细胞可表达 Cx43。以上特点使得 BMSC 成为研究及临床治疗心肌梗死理想的种子细胞。但研究^[14,16]也发现,植入 BMSC 在心肌梗死及周边区 Cx43 表达量少或无,与自体心肌细胞难以形成有效电机械偶联。因此本研究将 Cx43 整合到 BMSC 基因组以期加强移植后 BMSC 与心肌细胞间整合。

本实验在转染 Cx43 后的 BMSC 中可见绿色荧

光呈点线状分布于胞膜位置,而空载体组细胞胞膜位置未见绿色荧光,表明 Cx43 基因已成功转染入大鼠 BMSC。在转染 Cx43 慢病毒大鼠 BMSC 中,胞核位置亦有较强绿色荧光,考虑重组质粒转染入大鼠 BMSC 后, Cx43 蛋白可能有 2 种存在形式,分别为 Cx43 单体蛋白及 Cx43-GFP 融合蛋白,单体蛋白主要分布于胞膜,而融合蛋白分布于胞核。

本研究成功构建带有 Cx43 基因第二代慢病毒载体,利用慢病毒载体将目的基因 Cx43 整合到 BMSC 基因组中并实现其表达。这些阶段性进展的取得为长期动态评估 Cx43 基因转染的 BMSC 移植对急性心肌梗死的疗效奠定了必不可少的基础。

[参考文献]

- [1] Laflamme MA, Murry CE. Regenerating the heart [J]. *Nat Biotechnol*, 2005, **23** (7): 845-856.
- [2] Stamm C, Westphal B, Kleine HD, et al. Autologous bone marrow stem cell transplantation for myocardial regeneration [J]. *Lancet*, 2003, **361** (9351): 45-46.
- [3] Dai W, Hale SL, Martin BJ, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects [J]. *Circulation*, 2005, **112** (2): 214-223.
- [4] Murry CE, Field LJ, Menasche P. Cell-based cardiac repair: reflections at the 10-year point [J]. *Circulation*, 2005, **112** (20): 3 174-183.
- [5] Cockrell AS, Kafri T. Gene delivery by lentivirus vectors [J]. *Mol Biotechnol*, 2007, **36** (3): 184-204.
- [6] Yew NS, Przybylska M, Ziegler RJ, et al. High and sustained transgene expression in vivo from plasmid vectors containing a hybrid ubiquitin promoter [J]. *Mol Ther*, 2001, **4** (1): 75-82.
- [7] Conaway RC, Brower CS, Conaway JW. Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation [J]. *Science*, 2002, **296** (5571): 1 254-258.
- [8] 杨军,全智华,谭小进,等.心力衰竭大鼠心脏缝隙连接蛋白 43 的变化及厄贝沙坦的干预作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (9): 683-686.
- [9] Huang XD, Sandusky GE, Zipes DP. Heterogeneous loss of connexin43 protein in ischemic dog hearts [J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 1999, **10** (1): 79-91.
- [10] Suzuki K, Brand NJ, Allen S, et al. Overexpression of connexin 43 in skeletal myoblasts: relevance to cell transplantation to the heart [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2001, **122** (4): 759-766.
- [11] Kizana E, Ginn SL, Allen DG, et al. Fibroblasts can be genetically modified to produce excitable cells capable of electrical coupling [J]. *Circulation*, 2005, **111** (4): 394-398.
- [12] 范慧敏,汪进益,刘中民,等. Cx43 转基因自体成肌细胞移植对犬急性心肌梗死后心肌结构和心功能的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2006, **23** (11): 1 328-330.
- [13] Valiunas V, Doronin S, Valiuniene L, et al. Human mesenchymal stem cells make cardiac connexins and form functional gap junctions [J]. *J Physiol*, 2004, **555** (Pt 3): 617-626.
- [14] Mills WR, Mal N, Kiedrowski MJ, et al. Stem cell therapy enhances electrical viability in myocardial infarction [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, **42** (2): 304-314.
- [15] Berry MF, Engler AJ, Woo YJ, et al. Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, **290** (6): H2 196-203.
- [16] 徐瑾,王彬尧,何奔,等.骨髓间充质干细胞治疗心肌梗死后心功能衰竭的远期疗效[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (7): 585-589.

(此文编辑 许雪梅)