

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.08.004

转化生长因子- $\beta 3$ 基因重组腺病毒载体的构建及表达

邱 林, 吴清华, 肖 军, 李明勇

(重庆医科大学附属儿童医院烧伤整形科, 重庆 400014)

【摘 要】目的: 构建含有转化生长因子- $\beta 3$ (Transforming growth factor- $\beta 3$, TGF- $\beta 3$) 和增强型绿色荧光蛋白 (Enhanced green fluorescent protein, EGFP) 的腺病毒载体, 使其转染兔骨髓间充质干细胞 (Mesenchymal stem cells, MSCs), 并在细胞内得到表达。方法: 将含有 TGF- $\beta 3$ 基因克隆至含有 EGFP 的穿梭质粒, 通过在感受态菌 DH5 α 内同源重组, 构建 pAdxsi-EGFP-TGF- $\beta 3$ 。Pac I 酶切线性化 pAdxsi-EGFP-TGF- $\beta 3$ 转染 HEK293 细胞, 多轮“乒乓感染法”扩增收集 pAdxsi-EGFP-TGF- $\beta 3$ 病毒液, 氯化铯梯度离心纯化, PCR 和荧光显微镜观察 EGFP 的表达并检测重组腺病毒液的滴度。测定重组腺病毒液转染 MSCs 细胞转染效率, Western blot 检测 TGF- $\beta 3$ 蛋白表达。结果: 成功构建携带 TGF- $\beta 3$ 和 EGFP 的重组腺病毒载体 pAdxsi-EGFP-TGF- $\beta 3$, PCR 和绿色荧光证实病毒包装成功, 并具有感染力, 病毒滴度为 2×10^{10} pfu/ml。Western blot 检测表明 Adxsi-EGFP-TGF- $\beta 3$ 感染的兔骨髓 MSCs 细胞有效表达 TGF- $\beta 3$ 。结论: 含有 TGF- $\beta 3$ 和 EGFP 的腺病毒载体 pAdxsi-EGFP-TGF- $\beta 3$ 构建成功和 TGF- $\beta 3$ 蛋白在兔骨髓 MSCs 中有效表达, 为进一步研究转染 TGF- $\beta 3$ 基因的兔骨髓 MSCs 减轻创面愈合后瘢痕组织增生提供实验基础。

【关键词】转化生长因子- $\beta 3$ 基因; 增强型绿色荧光蛋白; 腺病毒载体

【中国图书分类法分类号】Q953.5

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-01-05

Construction and expression of recombinant adenovirus vector carrying transforming growth factor- $\beta 3$ gene

QIU Lin, WU Qinghua, XIAO Jun, LI Mingyong

(Department of Burns and Plastic Surgery, the Children's Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To construct the recombinant adenovirus vector containing transforming growth factor- $\beta 3$ (TGF- $\beta 3$) and enhanced green fluorescent protein (EGFP) in order to transfect rabbit bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs). Methods: The cDNA TGF- $\beta 3$ was integrated into the shuttle vector of pAdxsi-CMV with EGFP, then the product was transfected into package cell HEK 293 and the recombinant adenovirus vector expressing TGF- $\beta 3$ gene was generated. The expression of EGFP was identified by PCR and fluorescent microscopy. The titer of pAdxsi-EGFP-TGF- $\beta 3$ was tested with end-point dilution assay and its transfection efficacy was examined. The expression of TGF- $\beta 3$ was detected by Western blot. Results: The recombinant adenovirus vector pAdxsi-EGFP-TGF- $\beta 3$ containing TGF- $\beta 3$ and EGFP was constructed successfully. PCR analysis showed that TGF- $\beta 3$ cDNA was inserted into the recombinant adenoviral plasmid. The recombinant virus vector was collected by packaging HEK293 cells. The titer of pAdxsi-EGFP-TGF- $\beta 3$ was 2×10^{10} pfu/ml. Western blot demonstrated that TGF- $\beta 3$ was expressed in rabbit bone marrow MSCs. Conclusions: EGFP-TGF- $\beta 3$ recombinant adenovirus vector is successful constructed and TGF- $\beta 3$ protein is effectively expressed in rabbit bone marrow MSCs, which provides the basis for research of gene therapy in preventing hypertrophic scar after wound healing.

【Key words】transforming growth factor- $\beta 3$ (TGF- $\beta 3$); enhanced green fluorescent protein (EGFP); adenovirus vector

转化生长因子- β (Transforming growth factor- β , TGF- β) 在组织损伤后的修复和重建过程中起着重要的作用, 不同的 TGF- β 亚型在此过程中起着不同作用, TGF- $\beta 1$ 和 TGF- $\beta 2$ 具有刺激 I 型胶原的

合成与成熟的作用, 从而促进创伤愈合, 但过度表达时导致病理性瘢痕的形成。另一亚类 TGF- $\beta 3$ 通过与 TGF- $\beta 1$ 、TGF- $\beta 2$ 等竞争转化生长因子- β II 型受体 (TGF- β II R) 具有拮抗它们的作用, 动物实验观察到, TGF- $\beta 3$ 具有明显抑制增生性瘢痕的作用。重组腺病毒载体能有效地将外源 DNA 导入宿主细胞内并表达天然的、保持完整生物活性的抗原

作者介绍: 邱 林 (1968-), 女, 教授, 博士,

研究方向: 瘢痕的成因及治疗。

基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目 (编号: CSTC, 2008BB5391)。

蛋白^[1],所用的病毒载体为复制缺陷型腺病毒载体,既能感染复制状态的细胞,又能感染非复制状态的细胞,且腺病毒不整合到宿主基因组上,无插入诱变危险,相对安全^[2]。本实验通过构建 TGF- β 3 重组腺病毒载体,转染兔骨髓间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs),使其在细胞内得到表达,为 TGF- β 3 基因重组腺病毒用于基因治疗,加快创面愈合,减轻创面愈合后瘢痕的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

TGF- β 3 基因、pAdxsi 重组腺病毒骨架载体以及感受态的 DH5 α 均从诺赛基因组研究中心有限公司购买。所用限制性内切酶均购自 New England Biolabs 公司, T4 DNA ligase 为晶美生物公司的 MBI (Fermentas) 产品, CIP (Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal) 酶购自 Promega 公司, dNTPs (10 mmol/L) 购自上海生工生物工程技术有限公司, 引物合成于上海生工生物工程技术有限公司, 质粒小/中量提取纯化试剂盒、DNA 纯化试剂盒(柱离心型)、DNA 凝胶回收与纯化试剂盒(柱离心型)均购自威格拉斯生物技术(北京)有限公司, 1 kb DNA ladder 购自鼎国生物公司, DNA marker DL 4000 为大连宝生物 TaKaRa 产品, GAPDH 多克隆抗体购于 Santa Cruz, 鼠抗兔抗 CD29、CD45、CD105、CD166、HLA-DR, FITC 标记二抗, 购于武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 重组穿梭质粒的构建 以 TGF- β 3 原始质粒为模板, 设计引物扩增 TGF- β 3 目的基因。序列如下: F: 5'-CGGGGT-ACCACCATGAAGATGCACT-3', R: 5'-CGCGGATCCTCAGC-TACATTAC-3'。PCR 后在紫外灯下切取目的片段后用 *Kpn* I / *Bam* H I 酶切处理回收片段。将 pShuttle-CMV-EGFP 重组穿梭载体用 *Kpn* I / *Bam* H I 酶切, CIP 去磷酸化, 酶切后电泳在紫外灯下切下目的片段, 最后将处理好的载体片段和插入片段用 T4 DNA 连接酶进行连接, 取 3 μ l 连接产物转化入化学感受态细胞 DH5 α 菌株, 涂布到卡那霉素抗性固体培养基平皿转化, 挑取若干单克隆菌落, 接种到卡那霉素抗性液体培养基中, 振荡培养过夜, 随机挑选卡那霉素抗性菌落扩增后小量提取质粒, 用 *Kpn* I / *Bam* H I 酶切鉴定筛选重组穿梭质粒 pShuttle-EGFP-TGF- β 3。

1.2.2 重组腺病毒载体的构建 用 I-Ceu I + I-Sce I 双酶切处理 pAdxsi 载体, CIP 去磷酸化, 乙醇沉淀法回收载体。I-Ceu I + I-Sce I 双酶切处理插入片段 pShuttle-EGFP-TGF- β 3, 电泳紫外灯下回收含目的基因的插入片段, T4 DNA 连接酶连接载体片段和插入片段, 取连接产物转化化学感受态细胞 DH5 α 菌株, 涂布到氨卞抗性固体培养基平皿, 挑取若干单克隆菌落, 接种到氨卞抗性液体培养基中培养过夜, 将

对数生长期的菌液加入 LB 培养基中, 摇菌过夜, 大量提取质粒, 行重组腺病毒质粒 *Xho* I 酶切鉴定, 将鉴定正确的 pAdxsi-EGFP-TGF- β 3 质粒用 *Pac* I 限制性内切酶线性化后转染 HEK293 细胞。

1.2.3 重组腺病毒的包装、扩增和滴度的测定 转染前 1 d, 将 HEK293 细胞接种于 6 孔板中, 每孔 5×10^5 个细胞, 培养基为 100 ml/L 胎牛血清 DMEM, 置 37 $^{\circ}$ C 含 50 ml/L CO_2 的培养箱中培养过夜。

转染当天换液 HEK293 细胞, 取细胞生长至底面积的 80%~90% 时, 取重组腺病毒载体质粒 pAdxsi-EGFP-TGF- β 3 经 *Pac* I 酶切线性化后 Lipofectamine2000 脂质体按其说明书进行转染。逐日在荧光显微镜下观察增强型绿色荧光蛋白(Enhanced green fluorescent protein, EGFP)的表达, 7~10 d 后无菌收集包装细胞, 反复冻融 4 次(-80 $^{\circ}$ C~37 $^{\circ}$ C), 低温离心, 上清即含有成熟的病毒颗粒(原代病毒颗粒)。取 Adxsi-GFP-TGF- β 3 500 μ l, 感染 T250 培养瓶中 80% 融合的 HEK293 细胞(3×10^8 个), 3~5 d 后, 当约半数的 HEK293 细胞脱落时, 反复冻融 4 次以裂解细胞, 离心收集上清。为获得滴度更高的病毒, 同法进行重复感染, 将第 4 次收集的病毒上清用氯化铯密度梯度离心法纯化。将 HEK293 细胞以 1×10^6 个/孔密度接种 6 孔板, 培养至 80% 融合左右。取 $10^3 \sim 10^8$ 系列稀释病毒液, 每孔细胞加入 1 ml, 37 $^{\circ}$ C 感染 2 h 后, 添加含 200 ml/L 胎牛血清的 DMEM 培养基至 2 ml/孔, 继续培养 24 h 后, 在荧光显微镜下选定能观察到 EGFP 的最高稀释度培养孔进行计数, 病毒滴度(pfu/ml)=GFP 细胞阳性数 $\times$ 病毒上清稀释倍数。空载腺病毒 Adxsi-EGFP 用同样的方法进行包装、扩增、纯化及滴度测定, 于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.4 重组腺病毒的鉴定 PCR 检测重组腺病毒中的 TGF- β 3 基因, 设计引物为: 上游引物 F-CGGGGTATGAA-GATG-CACT, 下游引物 A-CGTTCACTACATTACG; GAPDH 上游引物 F-AACGGATTGCTCGTATTG, 下游引物 A-TGAAGTT-GTCGCTGTGGG。取 5 μ l 病毒液及 10 μ l 培养上清与 1 μ l 蛋白酶 K (20 g/L) 在 55 $^{\circ}$ C 作用 2 h, 煮沸 5 min, 冰浴中冷却 10 min, 离心后取 2.5 μ l 上清作模板进行 PCR 鉴定。PCR 反应参数为: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 40 个循环; 再于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.2.5 兔骨髓 MSCs 的培养和鉴定 新西兰大白兔 100 ml/L 水合氯醛 0.3 ml/kg 腹腔麻醉后, 双腿消毒区域脱毛, 常规碘伏消毒双腿大腿股骨至小腿胫骨区域, 取兔股骨上穿刺点: 股骨第 3 转子尖下方 0.3~0.5 cm 处, 与股骨轴线垂直从外向内上方穿入和胫骨前内侧穿刺点: 胫骨上部前内侧骨面, 距胫骨平台(胫骨近侧关节面)1.0~2.5 cm 的范围内穿刺, 按体积 1:1 吸取骨髓液于装有已消毒的抗凝 PBS 中(含肝素 800 U/ml), 3、5、7 号针头抽取骨髓液 3 遍后, 用 percoll 分离液轻置于骨髓液上, 离心 2 500 r/min, 20 min, 按体积比 1:4 吸取云雾状单个核细胞层于已消毒的 PBS 中, 离心 1 000 r/min, 5 min, 接种于细胞培养瓶 DME/F12(FBS100 ml/L)放入 37 $^{\circ}$ C, 体积分数 5% CO_2 孵箱内培养, 每 2 d 更换培养液, 传代

至 3 代待用。

第 3 代的贴壁细胞达到 80%~90% 融合后,用 0.25% 胰酶室温下消化,制成单细胞悬液,移入离心管,1 500 r/min 离心 5 min;弃上清,沉淀用 PBS 洗涤 3 次,制成 1×10^8 个/L 的细胞悬液,分别加入鼠抗兔抗 CD29、CD45、CD105、CD166、HLA-DR 抗体室温反应 30 min,磷酸盐缓冲液洗涤后与 FITC(标记二抗)避光反应 15 min,流式细胞仪测定,Cell-Quest 软件分析。

1.2.6 重组腺病毒感染效率的测定 以 1×10^5 个/孔将培养的 MSCs 细胞接种于 6 孔板,用感染复数(Multiplicity of infection, MOI)分别为 50、100、150、200 的病毒液感染,48 h 后在荧光显微镜下计数 EGFP 阳性细胞百分率。

1.2.7 Western blot 检测感染细胞 TGF- β 3 的表达 将兔骨髓 MSCs 细胞接种于 6 孔板中,每孔 1×10^5 个细胞,置 37 °C 含 50 ml/L CO₂ 的培养箱中培养 24 h 后去除培养基加入腺病毒悬液 200 μ l(MOI 为 100),无血清 DMEM 培养基 1 ml,2 h 后加入 3 ml 含 100 ml/L 胎牛血清 DMEM 培养基继续培养 10 h 后细胞裂解液处理细胞,离心后取上清,BCA 法测定蛋白质含量,100 ml/L SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白电转至 PVDF 膜上,封闭液封闭后,加入阳性内参 GAPDH 多克隆抗体和鼠抗兔 TGF- β 3 单克隆抗体,之后用辣根过氧化物酶结合的二抗结合,ECL 法显色后照相。

2 结果

2.1 重组腺病毒穿梭载体的构建

Kpn I/*Bam* H I 酶切含 TGF- β 3 的质粒切胶回收目的片段亚克隆入穿梭载体 pShuttle-CMV-EGFP 质粒中,挑取阳性克隆 *Kpn* I/*Bam* H I 酶切后得到 1.20 kb 和 5.10 kb 大小的片段,测序结果与 TGF- β 3 基因序列完全一致(图1),说明目的基因已经成功克隆入穿梭载体中,将该重组载体命名为 pShuttle-EGFP-TGF- β 3。

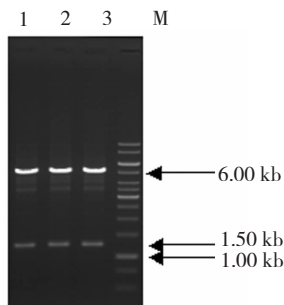


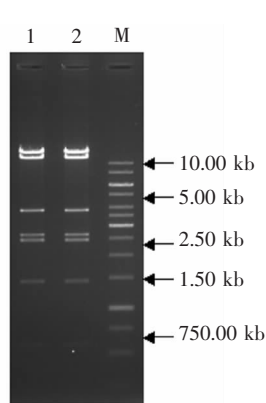
图 1 pShuttle-EGFP-TGF- β 3 电泳图

Fig.1 Gel electrophoresis of pShuttle-EGFP-TGF- β 3

2.2 重组腺病毒质粒的鉴定

将重组腺病毒质粒 pAdxsi-EGFP-TGF- β 3 *Xho* I 酶切,以 0.8% 琼脂糖凝胶电泳进行检测得到 14.00、11.80、3.80、2.66、2.47、1.45、0.60 kb 的阳性条带(图 2),将 pAdxsi 载体用

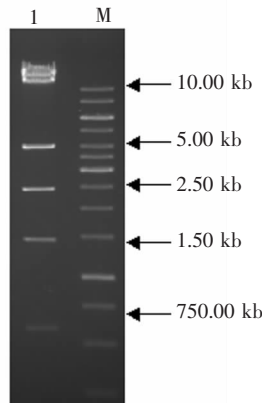
Xho I 酶切,以 0.8% 琼脂糖凝胶电泳进行检测得到 14.00、11.80、4.00、2.47、1.45、0.60 kb 阴性条带(图 3),证实重组腺病毒质粒 pAdxsi 成功。



M. DNA marker (1 kb DNA ladder); M. DNA marker (1 kb DNA ladder); 1, 2. pAdxsi-EGFP-TGF- β 3

图 2 pAdxsi-EGFP-TGF- β 3 鉴定结果

Fig.2 Identification of pAdxsi-EGFP-TGF- β 3



M. DNA marker (1 kb DNA ladder); 1. pAdxsi 载体

图 3 pAdxsi 载体 *Xho* I 酶切电泳图

Fig.3 Gel electrophoresis of pAdxsi vector cut by *Xho* I

2.3 腺病毒包装、扩增、纯化与滴度测定

将纯化后的重组相病毒载体 pAdxsi-EGFP-TGF- β 3 经 *Pac* I 酶切后转染 HEK293 细胞,转染 10 h 后,导致荧光显微镜下可见 HEK293 细胞中有绿色荧光表达,因腺病毒质粒中带有 EGFP 基因,24 h 后逐渐增多,10 d 后细胞呈现明显 CPE 现象:细胞变圆,变大,脱壁,互相拥抱成团,出现明显噬斑(图 4)。为获得高滴度的病毒,经多轮“乒乓转染法”冻融收集后采用 CsCl 密度梯度离心纯化,测定病毒滴度为 2×10^{10} pfu/ml。

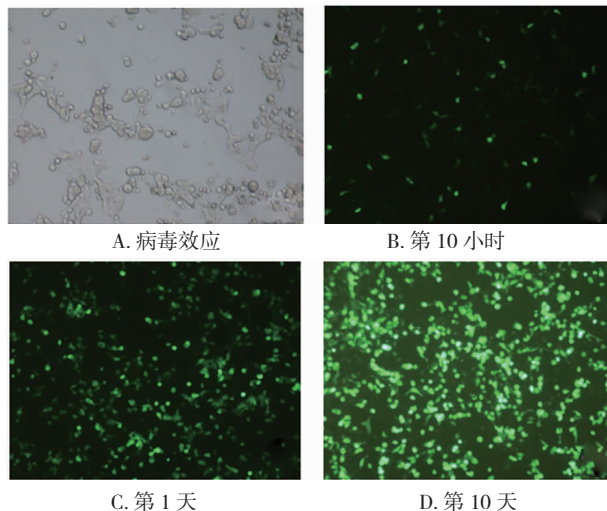


图 4 腺病毒在 HEK293 细胞的检测 (荧光显微镜及普通光镜, 20 $\times$)

Fig.4 Detection of adenovirus in HEK293 cell (Fluorescence microscope and microscope, 20 $\times$)

2.4 重组腺病毒的鉴定

提取重组腺病毒基因组 DNA,以 TGF- β 3 基因的特异引物进行 PCR,扩增出大小约为 1 300 bp 的片段,与 TGF- β 3 基因大小相符合,表明 TGF- β 3 基因已整合至腺病毒基因组中。

2.5 兔骨髓 MSCs 的培养和鉴定

倒置显微镜下观察,见兔骨髓 MSCs 接种 24 h 后开始贴壁,呈类圆形散在分布;72 h 后可见细胞呈多角形生长;7 d 可见明显分裂增殖的细胞,形成形态均一的细胞增殖集落;12~14 d,90%以上细胞趋于融合。传代 6~8 h 后细胞基本贴壁,24 h 后开始增殖,细胞集落增多,呈梭形漩涡状生长。7~9 d 后可传代,连续传代 2、3 次后细胞形态均一。流式细胞仪检测兔骨髓 MSCs 表面标志 CD29(96.12%)、CD105(97.16%)、CD166(95.74%)表达阳性,CD45(4.73%)、HLA-DR(2.71%)表达阴性。

2.6 重组腺病毒感染效率的测定

用 MOI 分别为 50、100、150、200 的空病毒 Adxsi-EGFP 感染兔骨髓 MSCs 细胞,培养 10 h 后可见荧光在显微镜下 EGFP 的表达(图 5),培养 24 h 后荧光表达增多,培养 48 h 后计数荧光表达结果 MOI 为 100 时几乎 100%细胞有病毒感染。

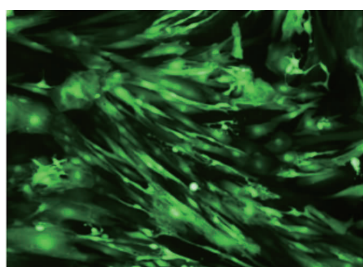
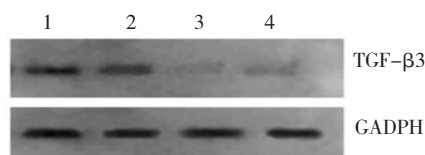


图 5 转染 Ad-TGF- β 3 MSCs 48 h
(倒置相差显微镜,100 $\times$)

Fig.5 MSCs transfected with Ad-TGF- β 3 after 48 h
(Inverted phase contrast microscope,100 $\times$)

2.7 Western blot 检测感染细胞 TGF- β 3 的表达

重组腺病毒 Ad-TGF- β 3 与 Ad-EGFP 感染兔骨髓 MSCs 细胞后,Western blot 检测感染细胞中 TGF- β 3 基因的表达,结果 Ad-EGFP 感染组未见蛋白表达,Ad-TGF- β 3 感染组可见 TGF- β 3 基因蛋白表达大小为 25 kD (图 6),说明 Ad-TGF- β 3 感染兔骨髓 MSCs 可以有效表达 TGF- β 3 基因。



1、2. Ad-TGF- β 3 感染兔骨髓 MSCs;3. Ad-EGFP 感染兔骨髓 MSCs;
4. 未转染兔骨髓 MSCs

图 6 Western blot 检测感染兔骨髓 MSCs 细胞 TGF- β 3 基因表达
Fig.6 Expression of TGF- β 3 gene in transfected MSCs detected by Western blot

3 讨论

创伤愈合过程中许多不同的细胞因子和生长因子在损伤、修复部位通过自分泌或旁分泌发挥不同的作用。但当这些因子表达过高或过低,即可能出现创伤愈合疤痕形成或创面愈合不良。TGF- β 是创伤愈合过程中重要的调控因子,分为 3 个亚类: TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3。TGF- β 1 是 1 种较为肯定的促进创伤愈合的生长因子,组织损伤后,TGF- β 1 首先由血小板脱颗粒释放到伤口周围,通过与细胞外基质(Extracellular matrix,ECM)相结合,TGF- β 1 被活化,活化的 TGF- β 1 具有单核细胞、中性粒细胞、成纤维细胞的强烈化学趋化作用,从而导致伤口处的炎症反应,而这些细胞又可产生、分泌更多 TGF- β 1;TGF- β 1 作用于损伤组织的成纤维细胞,促使其合成大量的 I、III 型胶原蛋白、FN、弹性蛋白、整合素、蛋白多糖等多种 ECM 成分,从而促进创伤的愈合^[3]。但机体严重创伤或反复感染时,TGF- β 1 大量分泌、过度表达时,引起以 I 型胶原为主的 ECM 过度沉积,导致增生性瘢痕和纤维化疾病的形成^[4]。TGF- β 3 作为 TGF- β 家族中的另一亚类通过与 TGF- β 1 竞争 TGF- β II R,拮抗 TGF- β 1 作用,使愈合创面中 III 型胶原比例增高,从而降低 I/III 型胶原比例,减轻伤口瘢痕、增加瘢痕弹性的作用^[5]。近年的研究表明在创面愈合后的瘢痕组织内,增生较轻的瘢痕中,III 型胶原含量较高接近正常皮肤内的含量,并与 TGF- β 3 调控作用密切相关。在创面愈合早期使用 TGF- β 3 基因转染靶细胞用于创面局部治疗,以减少创伤愈合后疤痕形成、提高创伤愈合质量。创伤愈合具有一定时限性,基因治疗中创伤局部的基因表达通常也应有其相应的时限性,因而在选择载体时应根据这一特性。

病毒载体是目前基因治疗运用较多的工具。常用的主要有:逆转录病毒、腺相关病毒及腺病毒。逆转录病毒在介导基因转染时自身也插入宿主细胞的染色体中,有致细胞突变可能;虽有报道腺相关病毒与人类病理过程无关,但仍然具有整合性^[6,7],其安全性有待证实。实验中选择重组腺病毒除具有能产生高滴度病毒、获得高效率的基因转染、不整合到宿主细胞中以及基因的承载量大的优点外,还具有不永久表达的特点而适合创伤愈合的基因治疗。

EGFP 是由 GFP 改造而来,含有 P64L 和 S65T 突

变和改造过的密码子,拥有更强激发荧光强度,更高的哺乳动物细胞内表达量和检测的灵敏度^[8,9]。实验中应用 EGFP 报告基因,将连接 EGFP 的穿梭质粒与骨架质粒 pAdxsi 载体克隆连接,构建 pAdxsi-EGFP-TGF- β 3,感染包装细胞 10 h 后荧光镜下即可见到绿色荧光出现,经多轮“乒乓感染法”后收集的病毒液可见到大量的绿色荧光。由于本实验中的病毒载体带有 EGFP 基因,能够表达绿色荧光蛋白,在重组腺病毒质粒转化后能观察到有无活性的重组腺病毒的产生以及在转染靶细胞中的表达,为研究提供方便。

较多的研究发现,兔骨髓 MSCs 移植于难愈性局部创面,能促进创面愈合,其机制可能与兔骨髓 MSCs 细胞刺激分泌的细胞因子通过增加修复细胞(成纤维细胞、血管内皮细胞、表皮细胞等)数量或分化为上述细胞完成^[10]。兔骨髓 MSCs 作为干细胞具有较强的自我更新、增殖能力和多分化潜能,且具有可移植性,具备作为组织工程种子的条件,因而选用兔骨髓 MSCs 作为基因转染靶细胞,本实验采用目前较为成熟的兔骨髓 MSCs 分离、纯化方法——密度梯度离心法,分离培养出形态均一的兔骨髓 MSCs。并用流式细胞仪测定其表达阳性和阴性的表面标志,获得纯化后的兔骨髓 MSCs 纯度高达 95% 以上。构建的 TGF- β 3 重组腺病毒转染兔骨髓 MSCs 的转染率几乎达 100%,通过 Western blot 检测发现转染 TGF- β 3 基因的兔骨髓 MSCs,可以稳定表达一定水平的 TGF- β 3 蛋白,因此,TGF- β 3 重组腺病毒载体的成功构建与其对兔骨髓 MSCs 转染成功为创伤愈合的基因治疗研究提供良好的基础。

参 考 文 献

[1] Arribillaga L, Sarobe P, Casares N, et al. Vaccination with an aden-

oviral vector encoding hepatitis C virus(HCV) NS3 protein protects against infection with HCV2 recombinant vaccinia virus[J]. Vaccine, 2002, 21(3-4):202-210.

[2] 陈邦党,张富春,孙美玉,等.草原兔尾鼠卵透明带 3 基因重组腺病毒载体的构建及表达[J].细胞与分子免疫学杂志,2007,23(8):707-710.

Chen B D, Zhang F C, Sun M Y, et al. Construction and expression of a recombinant adenovirus with LFP3[J]. Journal of Cellular and Molecular Immunology, 2007, 23(8):707-710.

[3] Park J S, Chu J S, Tsou A D, et al. The effect of matrix stiffness on the differentiation of mesenchymal stem cells in response to TGF- β [J]. Biomaterials, 2011, 32(16):3921-3930.

[4] Fan H, Tao H, Wu Y, et al. TGF- β 3 immobilized PLGA-gelatin/chondroitin sulfate/hyaluronic acid hybrid scaffold for cartilage regeneration [J]. Biomed Mater Res A, 2010, 95(4):982-992.

[5] Wu N N, Zhao Y Z, Yin Y B, et al. Identification and analysis of type II TGF- β receptors in BMP-9-induced osteogenic differentiation of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2010, 42(10):699-708.

[6] Grimm D, Kleinschmidt J A. Progress in adeno-associated virus type 2 vector production: promises and prospects for clinical use[J]. Hum Gene Ther, 1999, 10(15):2445-2450.

[7] Chen Y, Xie Y, Chan T, et al. Adjuvant effect of HER-2/neu-specific adenoviral vector stimulating CD8(+) T and natural killer cell responses on anti-HER-2/neu antibody therapy for well-established breast tumors in HER-2/neu transgenic mice[J]. Cancer Gene Ther, 2011, 3(13):1875-1881.

[8] Seibel N M, Eljouni J, Nalaskowski M M, et al. Nuclear localization of enhanced green fluorescent protein homomultimers[J]. Anal Biochem, 2007, 368(1):95-99.

[9] Sakai T, Tochio H, Inomata K, et al. Fluoroscopic assessment of protein leakage during Xenopus oocytes in-cell NMR experiment by co-injected EGFP[J]. Anal Biochem, 2007, 371(2):247-249.

[10] Tadokoro M, Matsushima A, Kotobuki N, et al. Bone morphogenetic protein-2 in biodegradable gelatin and β -tricalcium phosphate sponges enhances the in vivo bone-forming capability of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Tissue Eng Regen Med, 2011, 5(5):427-429.

(责任编辑:冉明会)

《重庆医科大学学报》

欢迎赐稿、订阅

网址:cyxb.alljournals.ac.cn

邮发代号:78-132