

hBM P-7 基因重组腺相关病毒载体的构建及人牙髓细胞转染的研究

西安交通大学口腔医院(西安 710004) 石建峰 李 昂 饶国洲 厉 强*

摘 要 目的: 构建人骨形成蛋白-7 (hBM P-7) 基因重组腺相关病毒载体, 并转染牙髓细胞, 为牙组织损伤修复的基因治疗做探索性研究。方法: 以含 hBM P-7 全长 cDNA 的载体 pTcDNA-hBM P-7 为模板进行 PCR 扩增, 将回收产物和 pAAV RES-hrGFP 分别双酶切后连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 获得重组质粒 pAAV RES-hrGFP-hBM P-7。采用磷酸钙共沉淀法转染 293 细胞进行病毒包装, 收获的病毒液按氯仿处理、PEG/NaCl 沉淀、酚: 氯仿反复抽提法浓缩纯化, 斑点杂交法测病毒滴度, 并转染体外培养的牙髓细胞。结果: 酶切鉴定和测序结果表明, hBM P-7 基因成功克隆入 pAAV RES-hrGFP 载体中。在 293 细胞中包装出重组腺相关病毒载体 rAAV RES-hBM P-7, 物理滴度为 3.0×10^{11} v. g/ml。rAAV 转染牙髓细胞后 GFP 表达逐渐增强, 可持续表达达到 4 周以后。结论: 重组腺相关病毒载体 rAAV RES-hBM P-7, 能有效转染牙髓细胞表达目的基因, 可用于牙组织工程基因治疗的研究。

关键词 转染 细胞 牙髓 基因重排 骨形态发生蛋白质类

Construction of the recombined adeno-associated viral vector of hBM P-7 and transfection of dental pulp cells

Hospital of Stomatology, Xi'an Jiaotong University (Xi'an 710004)

Shi Jianfeng Li Ang Rao Guozhou et al

ABSTRACT Objectives: To construct the recombined adeno-associated viral vector of human bone morphogenetic protein-7 (hBM P-7) and transfect dental pulp cells; To explore the new gene therapy for repairing the tooth tissue damage. Methods: The moulds which contained hBM P-7 vector were amplified by PCR. The reclaimed productions and pAAV RES-hrGFP were digested and integrated, bacillus coli DH5 α competent cells were transformed, and recombinant plasmid pAAV RES-hrGFP-hBM P-7 was obtained. 293 cells were virus-enclosed by the calcium phosphate precipitation method and the virus fluid was obtained and processed by chloroform precipitate treatment, PEG8000/NaCl precipitation and chloroform extraction for purification. Virus titer and transfection of dental pulp cells cultured in vitro were identified by dot blot hybridization method. Results: Calcium phosphate coprecipitation methods were used in 293 cells and adeno-associated viral vector rAAV RES-hBM P-7 was recombined. Green fluorescent protein expressing reached peak on day 6 in dental pulp cells after transfection by rAAV RES-hBM P-7 and the expression lasted for 4 weeks. Conclusion: The recombined adeno-associated viral vector of human bone morphogenetic protein-7 (hBM P-7) was constructed successfully, which can transfect dental pulp cells effectively. The hBM P-7 and dental pulp cells can be applied to gene therapy research.

KEY WORDS Transfection Cells Dental pulp Gene rearrangement Bone morphogenetic proteins

骨形成蛋白 (Bone morphogenetic proteins, BMPs) 是目前发现的惟一的一类具有异位成骨能力的细胞因子, 属于转化生长因子- β 超家族的成员, 可促进骨、软骨、牙本质等硬组织的形成及缺损的修复。研究表明, 人骨形成蛋白-7 (hBM P-7) 具有诱导牙髓细胞分

化为成牙本质细胞的作用, 在牙本质复合体形成及牙髓断面修复过程中起重要作用^[1]。本实验试图构建 hBM P-7 基因重组腺相关病毒载体 pAAV-RES-hrGFP-hBM P-7, 并体外转染牙髓细胞, 为研究牙组织基因治疗方式作基础性实验。

材料与方法

1 实验材料 含 hBM P-7 全长 cDNA 的质粒

* 西安交通大学医学院第二附属医院

PTcDNA-hBMP-7 由西安先锋生物技术公司合成提供, pAAV-RES-hrGFP 质粒, 293 细胞购自美国 Stratagene 公司; 质粒 pAAV-RC、pHelper 由西安交通大学第二医院骨科时志斌博士馈赠; 大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存; 磷酸钙法细胞转染试剂盒购自碧云天 (Beyotime) 公司; 地高辛标记试剂盒购自 Fementas 公司 (立陶宛)。DMEM 培养基购自 Gibco; BamHI, SalI, T4 连接酶, Trizol Reagent kit, PCR 试剂盒购自日本 Takara 公司; 引物合成 (北京三博远志生物技术公司)。

2 目的基的 hBMP-7 的获得 从 Gen bank 中检索到 hBMP-7 的序列 (NM-001719), 选择 CDS 区设计引物, 以含 hBMP-7 全长 cDNA 的质粒 PTcDNA-hBMP-7 为模板进行 PCR 扩增。上游引物 P₁ 5'-CGGGA TCCA TGCA CGT GCGCTCA CTGCG-3' 插入 BamHI 的酶切位点, 下游引物 P₂ 5'-GCGTCGACCTA GTGGCA GCCA CA GGCCCGGA CC-3' 插入 SalI 的酶切位点。PCR 条件为: 94 预变性 2min, 94 变性 30s, 53 退火 30s, 72 延伸 30s, 共 35 个循环, 回收产物。

3 重组腺相关病毒质粒 pAAV-RES-hrGFP-hBMP-7 的构建 将腺相关病毒真核表达质粒 pAAV-RES-hrGFP 和含目的基因的 PCR 回收产物, 分别用 BamHI+SalI 进行双酶切, 将回收的酶切产物 16 T4 连接酶连接过夜。用连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 转化产物涂氨苄青霉素 (+) 平板, 37 培养 18h, 筛选阳性克隆接种 LB 液体培养基, 进行质粒大提。取部分所获质粒进行双酶切鉴定和测序, 命名 pAAV-RES-hrGFP-hBMP-7。

4 rAAV 的制备 选用生长至对数期的 293 细胞, 转染前 30~60min, 吸去细胞培养液, 加入新鲜的不含抗生素的 DMEM 培养基 6ml。分别取大量制备的纯度 1.80 以上 (A₂₆₀/A₂₈₀) 的病毒质粒 pAAV-RES-hrGFP-hBMP-7、辅助质粒 pAAV-Helper 和包装质粒 pAAV-RC 各 10 μ l (1 μ g/ μ l), 加入到 200 μ l 氯化钙溶液中, 按磷酸钙法细胞转染试剂盒说明转染 293 细胞。在 37、含 5% 二氧化碳的细胞培养箱内培养, 16h 后吸去含磷酸钙沉淀的培养液, 加入 6ml 新鲜的含 10 胎牛血清的 DMEM 培养基, 继续培养 72h。收集培养瓶中的细胞, -20 冰冻, 37 融化, 反复三次使细胞完全裂解, 氯仿变性, 终浓度 1mol/L NaCl 和终浓度 10 PEG8000 各沉淀 1 次。酚-氯仿抽提^[2], 得到初步浓缩纯化的 rAAV。以点杂交法确定病毒滴度。命名为 rAAV-RES-hBMP-7。

5 rAAV 转染牙髓细胞 取临床因正畸需要拔

除的健康牙齿, 按组织块法培养牙髓细胞。将获得的第 4 代牙髓细胞, 按 1 \times 10⁵/孔接种于 24 孔培养板中, 37、5% CO₂ 培养至细胞 80% 融合, 弃去旧培养液, 用含有氨苄青霉素 (100U/ml) 和链霉素 (100 μ g/ml) 的无血清高糖 DMEM 培养基洗涤细胞 3 次。转染孔分别加入 200 μ l 含 rAAV-RES-hBMP-7 病毒载体 (MOI=1 \times 10⁵) 的无血清高糖 DMEM 培养基, 对照孔不加病毒载体。孵育 2h 后, 吸去含病毒载体的培养基, 更换含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基继续培养, 每隔 12h 倒置荧光显微镜下观测绿色荧光蛋白的表达, 并随机计数多个视野的细胞总数和发 GFP 荧光的细胞数。

结果

1 hBMP-7 的获得 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果显示, 1312bp 位置有 DNA 条带, 与 hBMP-7 基因长度相符合 (见图 1)。

2 重组质粒 pAAV-RES-hrGFP-hBMP-7 的鉴定 将 pAAV-RES-hrGFP-hBMP-7 用 BamHI+SalI 双酶切鉴定, 电泳图谱显示 6100bp 和 1312bp 两条 DNA 条带 (见图 2), 与病毒载体质粒及 hBMP-7 大小一致。测序鉴定结果 (上海英骏生物技术公司) 也证实 hBMP-7 基因已成功连接到 pAAV-RES-hrGFP 载体上, 并与 Gene bank 中检索的原始序列完全一致。

3 rAAV 的包装、浓缩及滴度测定 采用磷酸钙三质粒共沉淀法, 将重组病毒质粒转入 293 细胞。与对照组相比, 转染组培养基颜色从红色变为橙黄色, 并有发绿色荧光的细胞出现, 证明病毒已经开始在 293 细胞中包装。收获的病毒液经浓缩纯化后, 采用地高辛标记试剂盒标记的 GFP 探针, 通过斑点杂交法, 对比标准质粒和 rAAV-RES-hBMP-7 病毒 DNA 斑点密度的大小, 估算出病毒的物理滴度约为 3.0 \times 10¹¹ v. g/ml, 能够用于后继的实验。

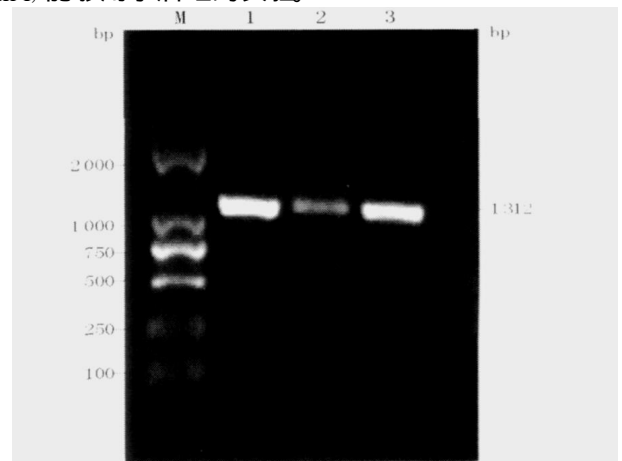


图 1 hBMP-7 基因 PCR 扩增电泳图谱 M: DL 2000; 1, 2, 3: hBMP-7 基因

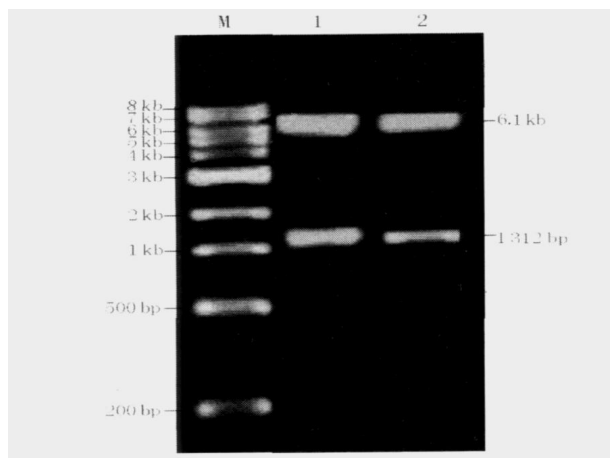


图 2 pAAV RES-hrGFP-hBM P-7 用 BamH1+ SalI 双酶切 M:DNAM arker, 1, 2 pAAV RES-hrGFP-hBM P-7 双酶切段

4 牙髓细胞的分离培养及 rAAV 的转染 采用组织块法进行人牙髓细胞体外培养中, 7d 左右细胞开始从组织块中游出。倒置显微镜下观察细胞主要是成纤维细胞, 14d 时达到 70% 融合, 细胞排列成单层, 局部呈典型的“漩涡状”排列。此时进行传代培养。rAAV RES-hBM P-7 感染第 4 代牙髓细胞后, 24h 内就有产生绿色荧光的细胞出现, 第 6 天达到高峰。计数多个视野中发光细胞所占比率, 平均后得到第 6 天 rAAV 的转染率约为 84.6%。以后荧光强度逐渐下降, 观察至第 4 周, 仍有绿色荧光发生。

讨论

基因治疗的关键环节是选择安全有效的载体, 将目的基因导入宿主细胞, 使外源基因在宿主体内持续稳定表达。重组腺相关病毒(rAAV)载体是目前发现的惟一一类能将其基因定点整合到宿主细胞染色体上的病毒, 其基因组结构简单, 是全长 4681bp 的单链线状 DNA, 仅编码产生 rep 和 cap 两种蛋白^[3], 不编码任何引起免疫反应的病毒蛋白, 针对 AAV 核衣壳的抗体也不影响再次接种载体, 因此免疫原性很低, 甚至没有免疫原性。目前所用的 rAAV 载体大多是在 AAV-2 的基础上, 去除了结构基因 rep 和 cap, 仅保留对病毒的包装和整合不可缺少的 ITR (末端反转重复序列), 外源基因和启动子克隆在 ITR 之间^[4]。本实验中采用的 AAV Helper-Free System 中, 病毒载体 pAAV RES-hrGFP, 包含一个标记基因 hrGFP, 是 GFP 的基因修饰型, 荧光强度极大增强, 其上游含一个内核糖体进入位点 (Internal ribosome entry site, RES), 作为一个双顺反子表达载体可快速有效地表达目的基因和报告基因。同时有加入一个 CMV 作为促进子, 更加促进了目的基因和报告基因的表达。AAV 结构基因 rep 和 cap 由 pAAV-RC 提供, 辅助质粒 pHelper 则含有拯救病毒

所需的腺病毒基因 E2A、E4 和 VA RNA 基因。本组使用此系统在 293 细胞中包装出滴度为 3.0×10^{11} v. g/ml 的 rAAV, 又避免了野生型 AAV 和腺病毒的污染, 并且通过荧光活性细胞计数定性估计出 rAAV 感染效率约为 84.6%。

BM P₇ 存在于骨、牙本质中, 它能刺激间充质干细胞向成软骨细胞、成骨细胞及成牙本质细胞方向分化^[5]。其中 BM P-7 具有较强的骨诱导能力及维持软骨细胞的表型, 促进细胞外基质如蛋白多糖和 II 型胶原合成的能力^[6]。Rutherford 等在用含 BM P₇ 的复合材料作为盖髓剂的研究中, 发现窝洞内有骨样修复性牙本质形成。在磨牙根分叉区病变的动物模型中, Ripamondli 等用复合有骨形成蛋白-7 的 I 型胶原作为仿生支架, 观察到有新生的牙槽骨、骨样牙本质形成。但是, BM P-7 作为一种细胞因子, 在体外使用时容易失活, 且不能达到持续治疗的目的。为探索其在体内持续表达方式及承载细胞, 本组构建了含 BM P-7 基因的 rAAV 载体, 并转染了牙髓细胞。牙髓细胞的主要成分是成纤维细胞, 此外还有组织细胞、成牙本质细胞和未分化的间充质细胞。其中未分化的间充质细胞在体外受牙本质基质、坏死组织、牙髓微环境等影响, 可分化为成牙本质细胞, 再形成牙本质桥, 其功能类似骨髓基质干细胞^[7]。牙髓细胞表面具有 BM P₇ 的受体, BM P₇ 能与之结合, 诱导牙髓细胞发生一系列胞内级联反应, 形成牙本质牙髓样复合体^[8]。

本实验成功构建了 hBM P-7 基因重组腺相关病毒载体 pAAV-RES-hrGFP-hBM P-7, 并在 293 细胞内包装出具有感染性的 rAAV。体外转染牙髓细胞, 通过 GFP 的表达, 说明 rAAV 载体可将 BM P₇ 整合进牙髓细胞基因组, 为实现 BM P₇ 在体内的稳定表达奠定了基础。可用于牙组织工程基因治疗的研究。

参考文献

- [1] Hidaka C, Goodrich LR, Chen CT, et al. Acceleration of cartilage repair by genetically modified chondrocytes over expressing bone morphogenetic protein-7 [J]. J Orthop Res, 2003; 21(4): 573-583
- [2] 吴小兵, 董小岩, 伍志坚, 等. 一种快速分离腺病毒伴随病毒的方法. 科学通报, 2000, 45(3): 2071-2075
- [3] Chiriva-Internati M, Liu Y, Salati E, et al. Efficient generation cytotoxic T lymphocytes against cervical cancer cells by adeno-associated virus/human papillomavirus type 16E7 antigen gene transduction into dendritic cells [J]. Eur J Immunol, 2002, 32(1): 30-38
- [4] Joseph E, Rabinowitz, Samulski RJ. Building a better vector: the manipulation of AAV virions [J]. Virology,

(下转第 79 页)

异,甚至病死率还低于无假体者。因此,多数学者认为乳房假体植入是安全、无害的。

3 免疫性疾病 虽有报道认为,硅胶假体有增加病人患结缔组织病或风湿病的危险,但这一结论尚未被多数学者接受。疏水的硅胶成分通过假体囊壁外渗量甚微,并主要被巨噬细胞吞噬,局限于包膜囊内。即便是假体包膜破裂,漏出的硅凝胶通常也被限制在周围的瘢痕性包膜内。数周后外露的硅凝胶被新的瘢痕包围,分割形成微小的异物肉芽肿。因此,对全身影响是有限的。当然最终的结论有待于大规模流行病学的研究结果。本组结果表明,在SSM术后即时乳房再造,患者早期的免疫功能未发生明显变化,但更长时间的情况仍须继续观察和评判。

综上所述,对于早期乳腺癌患者在实施保留皮肤的乳腺癌切除术后,采用自体组织移植或硅胶假体植入方式即时乳房再造,患者细胞免疫功能无明显变化。在平均 11 月的随访中,未出现肿瘤复发和免疫性疾病,包膜挛缩的发生率较低。因此,可以说作为一种创伤小、恢复快的乳房再造方式,只要适应证选择得当,硅胶假体植入式即时乳房再造是一种较为安全、可靠的方法。

参考文献

- [1] 毕爱华, 龚非力主编 医学免疫学 北京: 人民军医出版社, 1995: 12-248
- [2] 陈明水, 陈强, 叶韵斌, 等 乳腺癌病人细胞免疫功能的变化及其意义 福建医药杂志, 2003, 25(3): 18-20
- [3] Ludwig CU, Hartmann D, Landmann R, *et al*. Unaltered immunocompetence in patients with non-disseminated breast cancer at the time of diagnosis [J] Cancer, 1985, 55(8): 1673-1678
- [4] McCluskey DR, Roy AD, Abram WP, *et al*. T lymphocyte subsets in the peripheral blood of patients with benign and malignant breast disease [J] Br J Cancer, 1983, 47(2): 307-309
- [5] Schroder W, Vering A, Stegmuller M, *et al*. Lymphocyte subsets in patients with ovarian and breast cancer [J]. Eur J Gynaecol Oncol, 1997, 18(6): 474-479
- [6] 赵金鹏, 姜洪池, 吴祥松, 等 I~II 期乳腺癌患者机体细胞免疫功能的探讨 哈尔滨医科大学学报 2000, 34(1): 18-20
- [7] 万华, 邹强, 董佳容, 等 乳腺癌患者免疫指标检测及其临床意义 肿瘤, 2006, 26(3): 279-281
- [8] 孙林, 温江涛, 刘海红 乳腺癌患者外周血 T 淋巴细胞及 NK 细胞的检测及其临床意义 现代肿瘤医学, 2006, 14(9): 1069-1071
- [9] 杨金巧, 赵俊玲, 范伟 乳腺癌患者外周血多项免疫指标的流式细胞仪检测及其临床意义 华西医学, 1999, 14(1): 35-37
- [10] Berkel H, Birdsell DC, Jenkins H. Breast augmentation: A risk factor for breast cancer? N Engl J Med, 1992, 326(25): 1649-1653
- [11] Birdsell DC, Jenkins H, Berkel H, *et al*. Breast cancer diagnosis and survival in women with or without breast implants Plast Reconstr Surg, 1993, 92(5): 795-800
- [12] Petit JY, Le MG, Mouriesse H, *et al*. Can breast reconstruction with gel-filled silicone implants increase the risk of death and second primary cancer in patients treated by mastectomy for breast cancer [J] Plast Reconstr Surg, 1994, 94(1): 115-119

(收稿: 2007-08-02)

(上接第 75 页)

- 2000, 278(5): 301-308
- [5] Klein-Nulend J, Louwense R T, Heyligers IC, *et al*. Osteogenic protein (OP₂₁, BMP-7) stimulates cartilage differentiation of human and goat perichondrium tissue in vitro [J] J Biomed Res, 1998, 40(4): 614-620
- [6] Vignall RL, Lo SH, Reddi AH. Regulation of articular chondrocyte phenotype by bone morphogenetic protein 7, interleukin 1, and cellular context is dependent on the cytoskeleton [J] Exp Cell Res, 2002, 272(1): 322-334
- [7] Yooung CS, Terada S, Vacanti JP, *et al*. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth J Dent Res, 2002, 81(10): 695-700
- [8] Shiba H, Nakanishi K, Rashid F, *et al*. Proliferative ability and alkaline phosphatase activity with in vivo cellular aging in human pulp cells J Endod, 2003, 29(3): 9-11

(收稿: 2007-09-28)