

· 实验研究 ·

SV40LTag 诱导鼠骨骺软骨细胞稳定分化的实验研究

李欣¹, 黄仕龙², 金润铭¹

(1. 华中科技大学同济医学院附属协和医院儿科, 湖北 武汉 430022;
2. 南方医科大附属深圳宝安医院骨科, 广东 深圳 518101)

[摘 要] **目的** 建立稳定分化大鼠骨骺软骨细胞株, 为细胞替代治疗和基因治疗小儿生长发育迟缓提供稳定的细胞来源。**方法** 利用脂质体介导的基因转染技术将含有猿肾病毒 40 大 T 抗原(simian virus 40 large T antigen gene, SV40LTag)基因的质粒 pEGFP-IRES2-SV40LTag 转染原代培养的新生大鼠骨骺软骨细胞, G418 筛选, 抗性克隆扩大培养传代。应用 II 型胶原、X 型胶原和 SV40LTag 抗体进行细胞鉴定, 体外检测其分化能力, 观察细胞的形态及其生长状况, 绘制细胞生长曲线。用 RT-PCR、Southern blot 和免疫细胞化学法鉴定 SV40LTag 在转染细胞中的表达。**结果** 转染后获得了阳性细胞克隆, 免疫细胞化学证实为具有较强增殖能力和多分化潜能的骨骺软骨细胞。经 Southern 印迹杂交证实, SV40LTag 已稳定转入骨骺软骨细胞, 表达 mRNA 及其蛋白。**结论** SV40LTag 导入可诱导骨骺软骨细胞稳定分化, 为细胞替代治疗和基因治疗小儿生长发育迟缓等疾病提供稳定的细胞来源。
[中国当代儿科杂志, 2008, 10(1): 51-54]

[关 键 词] 软骨细胞; 永生化; 猿肾病毒 40
[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2008)01-0051-04

Immortalization of rat epiphysis cartilage cells induced by simian virus 40 large T antigen gene transfection

LI Xin, HUANG Shi-Long, JIN Run-Ming. Department of Pediatrics, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430022, China (Email: doctorlixin@hotmail.com)

Abstract: Objective To establish immortalized epiphysis cartilage cell strains in order to provide a stable cell resource for cell substitution and gene therapies of growth retardation. **Methods** Plasmid pEGFP-IRES2-SV40LTag containing simian virus 40 large T antigen gene was transfected into primarily cultured epiphysis cartilage cells of the newborn rat using the lipofectin transfection method. Colonies were isolated by G418 selection and cultured to immortalized cell strains. Fibroblast growth factor receptor-3(FGFR-3), anti-collagen type II and type X antibodies were used to identify cultured cells and to investigate the capability of differentiation of the transfected cells. SV40LTag expression in expanded cell strains was identified by RT-PCR, Southern blot and immunocytochemistry method. **Results** Anti-G418 cell clone was obtained, which was confirmed as FGFR-3 positive epiphysis cartilage cells with the capability of stable proliferation. mRNA and protein of SV40LTag were expressed in transfected cells after stable transfection. The transfected cells were expanded to immortalized cell strains and named as immortalized epiphysis cartilage cells. The immortalized cells were elliptic or triangular, with two or three short axons. The immortalized epiphysis cartilage cell strains had stable biological characters. **Conclusions** SV40LTag gene transfection can immortalize epiphysis cartilage cells. The establishment of FGFR-3 positive immortalized epiphysis cartilage cell strains may provide a stable cell resource for cell substitution and gene therapies of growth retardation.
[Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10(1): 51-54]

Key words: Chondrocyte; Immortalization; Simian virus 40 large T antigen gene

生长发育迟缓是儿科中较常见的疾病^[1], 目前对它的治疗手段有限, 效果欠佳, 因此, 必须寻找新的研究切入点。本实验试图从骨骺软骨细胞生长方面作为突破口, 运用细胞替代治疗和基因治疗, 探索和寻找治疗生长发育迟缓的新途径。但由于骨骺软骨细胞来源有限, 并且增殖能力低, 代谢缓慢, 体外培养增殖传代次数有限, 因此, 建立永生化骨骺软骨细胞系, 是软骨细胞库建立及软骨细胞工程必须解决的前提。在本研究中, 我们拟将猿肾病毒 40 大 T 抗原基因(simian virus 40 large T antigen gene, SV40LTag)转染至原代培养的大鼠骨骺软骨细胞, 以期建立永生化骨骺软骨细胞株(imortalized

[收稿日期] 2007-06-18; [修回日期] 2007-08-02
[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30571872)。
[作者简介] 李欣, 女, 博士研究生, 主治医师。主攻方向: 小儿遗传代谢及血液系统疾病。
[通讯作者] 金润铭, 教授, 华中科技大学同济医学院附属协和医院儿科, 邮编: 430022。

epiphysis cartilage cell strain)。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 出生 24 h 内的 SD 新生大鼠,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 DMEM/F12 培养基、脂质体 LipofectamineTM 2000 和 Trizol 试剂盒购自 GIBCO 公司;胎牛血清购自 Hyclone 公司;G418、维生素 C (L-ascorbic acid) 购自 Amresco 公司;逆转录酶 MML-V、琼脂糖、核酸分子量 DNAmarker 购自美国 promega 公司;dNTP、OligodT、RNA 酶抑制剂、DEPC、BamHI、EcoRI、TaqDNA 聚合酶,购自 MBI Fermentas 公司;兔抗鼠 anti-collagen typeII、typeX 抗体购自美国 Calbiochem 公司、SV40 抗体购自 NeoMarkers 公司;DAB 免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥公司。质粒 pEGFP-IRES2-SV40LTag 由协和医院儿科实验室自行构建。

1.2 方法

1.2.1 原代骨髓软骨细胞的分离与培养 无菌分离新生 SD 大鼠股骨和胫骨,去除软组织,锐性分离骨髓与骨干之间膨大、半透明组织,参考 Boyan 等^[2]的方法并做适当改良,分离骨髓软骨细胞并制成单细胞悬液,台盼蓝染色后细胞计数,于每培养瓶中(25 cm² 培养瓶)加入 1×10^5 个细胞,应用 10% FBS、50 μg/mL 维生素 C 的 DMEM/F12 培养基中,置 37℃,5% CO₂,100% 湿度培养箱中培养,24 h 后换液,以后每 72 h 换液一次,细胞融合至 75% ~ 80% 时 0.25% 胰蛋白酶消化传代。取第 4 代细胞鉴定和后续实验^[3]。

1.2.2 Lipofectamine 介导的转染 按 LipofectamineTM 2000 转染试剂盒说明书步骤操作。转染 24 h 前将骨髓软骨细胞传至 12 孔板中并将培养基换成无抗生素培养基。在 2 个 Eppendorf 管中各加入 100 μL DMEM/F12 培养基,然后分别加入脂质体和真核表达质粒 pEGFP-IRES2-SV40LTag 混匀,室温下 5 ~ 10 min。轻轻混合两管,置 37℃ 30 min,加入骨髓软骨细胞中置 37℃、5% CO₂ 培养箱中转染 6 h 后换正常培养基。

1.2.3 转染细胞的筛选及扩大培养 细胞转染后 24 h,按照预实验结果,以 G418 300 μg/mL 进行压力筛选 12 ~ 14 d,荧光显微镜观察细胞生长状况,并照相,抗性克隆以含 G418 200 μg/mL 的 DMEM/F12 培养基扩大培养。按常规方法进行细胞的传代、

冻存和复苏,采用“慢冻、快融”的方法定期液氮冻存、复苏细胞,复苏后行台盼蓝染色,计算活细胞率。

1.2.4 转染细胞的鉴定 贴壁生长的细胞采用多聚甲醛固定,应用 SV40Tag 抗体、骨髓软骨细胞的特异标志物 FGFR-3 抗体,软骨细胞的标志 II 型胶原和 X 型胶原抗体^[4,5]进行 FITC/TRITC 细胞免疫荧光方法进行鉴定,HRP/DAB 法检测转染细胞的分化情况。

1.2.5 细胞的生长曲线分析 将第 8 代、第 12 代和第 30 代稳定分化骨髓软骨细胞(The immortalized epiphysis cartilage cell)按 1×10^4 个/孔接种于 24 孔板,每隔 24 h 常规消化 3 孔细胞并计数,取平均值绘制生长曲线,按以下公式计算细胞群体倍增时间(population doubling time, PDT): $PDT = [Lg2 / (LgN_t - LgN_0)] \times t$,其中 N_t 和 N_0 分别代表接种后和培养 t 小时后的细胞数。

1.2.6 Southern 印迹杂交 用蛋白酶 K 法分离制备原代骨髓软骨细胞和第 30 代稳定分化骨髓软骨细胞的基因组 DNA,BamH I 和 EcoR I 进行酶切。1% 琼脂糖凝胶电泳后,将 DNA 转移至硝酸纤维素膜上,按常规法进行预杂交、杂交、洗膜、放射自显影。

1.2.7 RT-PCR Trizol 试剂盒提取原代骨髓软骨细胞和第 30 代稳定分化的骨髓软骨细胞的 RNA,进行逆转录,质粒 pCMVSV40T/PUR 作阳性对照。根据 SV40LTag 基因序列设计引物,上游:5'-TATGTTTCAG GTTCAGGG-3',下游:5'-TGGAAT-AGTCACCATGAATG-3',产物为 558bp 大小片段。反应条件:94℃ 预变性 5 min,然后 94℃ 30 s,52℃ 45 s,72℃ 60 s,30 个循环,72℃ 延伸 7 min。PCR 产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

2 结果

2.1 形态学观察

体外培养的稳定分化骨髓软骨细胞的形态以梭形或三角形为主,有两到三个短的突起。与原代培养的骨髓软骨细胞相比,细胞胞体较小,胞核较大,呈圆形,胞质较少。可见到细胞的分裂相和增殖细胞,并可观察到细胞迁移现象。实验观察骨髓软骨细胞的转染效率,一般约 15% ~ 20% 左右,细胞表达的 GFP 强弱不等(图 1A)。一般 5 ~ 6 d 传代 1 次,细胞经消化传代后,以单个细胞形式贴壁继续培养。传代、复苏和冻存不改变细胞的形态及增殖能力,复苏存活率约 80% ~ 90%,第 30 代稳定分化骨髓软骨细胞表达 GFP 比较均一稳定(图 1B)。

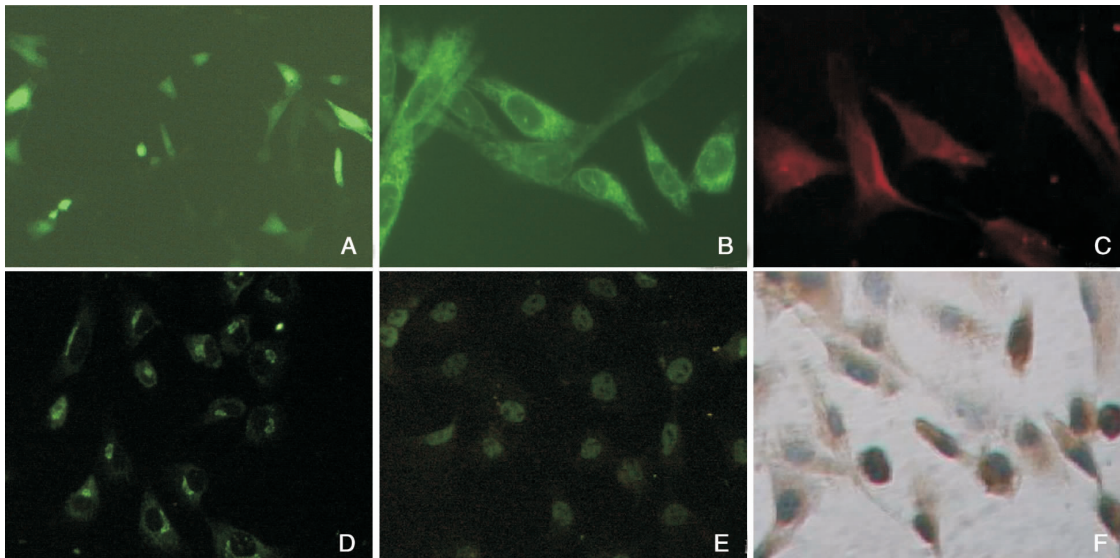


图 1 形态学观察 A:原代骨髓软骨细胞转染 48 h 后,表达 GFP 强弱不等,转染效率不高(100 ×);B:经筛选传代,第 30 代稳定分化骨髓软骨细胞,表达 GFP 均一稳定(400 ×);C:第 30 代稳定分化骨髓软骨细胞 FGFR-3 抗体免疫细胞化学鉴定染色(200 ×);D:第 30 代稳定分化骨髓软骨细胞免疫细胞化学鉴定,II 型胶原表达于胞浆,胞核呈空泡状(200 ×);E:第 30 代稳定分化骨髓软骨细胞免疫细胞化学鉴定,X 型胶原表达于胞核,胞浆不着色(200 ×);F:第 30 代稳定分化骨髓软骨细胞 SV40Tag 抗体免疫细胞化学鉴定表明转染筛选后细胞 SV40LTag 表达为阳性(100 ×)。

2.2 免疫细胞化学检测

免疫细胞化学检测可见细胞呈 FGFR-3 染色阳性,细胞染色部位主要在胞膜,而胞核着色很淡呈空泡状(图 1C);TRITC 标记免疫荧光显示 II 型胶原表达在胞浆中,胞核不着色(图 1D);而 X 型胶原表达在胞核,胞浆不着色(图 1E);证实贴壁培养的细胞为 FGFR-3 阳性骨髓软骨细胞,同时细胞 SV40LTag 表达均为阳性(图 1F)。

2.3 RT-PCR 和 Southern 分析

应用 SV40 cDNA 为探针,对稳定分化骨髓软骨细胞进行 Southern 印迹分析,结果显示经 BamH I 和 EcoR I 酶切后电泳杂交,稳定分化骨髓软骨细胞在 2.3kb 处出现阳性杂交信号,而原代细胞无杂交信号,表明 SV40LTag 已成功转入稳定分化骨髓软骨细胞基因组中。对第 30 代稳定分化骨髓软骨细胞提取 RNA 进行 RT-PCR,结果显示在约 558bp 处有一特异性扩增条带,与阳性对照条带相同,而未转染的原代细胞未见条带,说明稳定分化骨髓软骨细胞中存在 SV40LTag 在转录水平的表达(图 2)。

2.4 细胞生长曲线

正常培养条件下,原代和稳定分化骨髓软骨细胞的生长曲线均呈“S”形,第 30 代稳定分化骨髓软骨细胞的增殖速度明显快于第 8 和第 12 代骨髓软骨细胞。原代骨髓软骨细胞第 10 代后增殖速度明显变慢、停止,细胞出现衰老现象(图 3)。

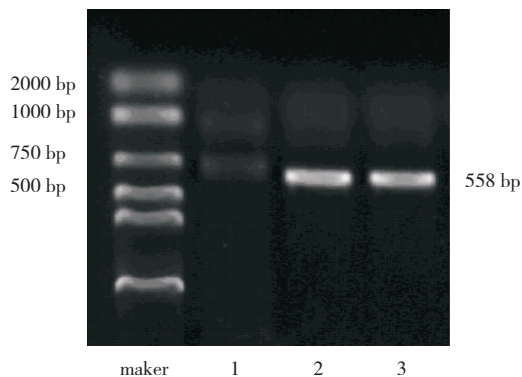


图 2 RT-PCR 检测培养细胞 SV40Tag mRNA 的表达 1 原代骨髓软骨细胞;2 质粒 pEGFP-IRES2-PTHrp;3 第 30 代稳定分化骨髓软骨细胞。

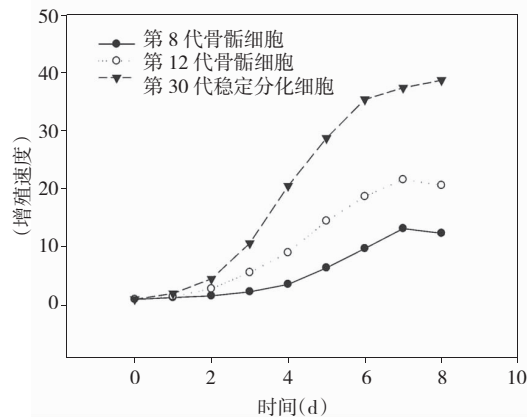


图 3 大鼠稳定分化骨髓软骨细胞与原代细胞的生长曲线。

3 讨论

细胞替代治疗是指向机体组织中植入同种或异种细胞,或者激活内源性细胞再生功能以达到治疗的目的。长骨的干骺端有一层软骨,为骺软骨;骨骺软骨细胞不断分裂增殖,形成新的软骨,而靠近骨干部位的软骨形成了骨组织,这样骨骼就逐渐变长,人的身体也就不断地长高^[6,7]。如骨骺完全被骨组织所代替,骨骺与骨干完全融合,骨骼即不再增长。当这种替代过程发生过早,即可导致身材矮小。如果我们能够在体外建立稳定分化的骨骺软骨细胞株,再通过细胞替代治疗的方法将稳定分化的骨骺软骨细胞植入体内,有望重新刺激骨骺生长,成为治疗身材矮小一种新的尝试。

近年来细胞永生化的技术不断发展和成熟使建立永生化的骨骺软骨细胞成为可能。永生化骨骺软骨细胞在体外培养中能够自我更新和无限扩增,可以为细胞移植提供大量表型、基因型稳定的骨骺软骨细胞,且报告基因和治疗基因更加易于在细胞内稳定表达,这必将为骨骺软骨细胞实验研究提供一种全新的方法和技术。SV40LTag 基因是目前较为常用且有效的体外永生化细胞的基因片段之一^[8]。本研究利用脂质体介导的基因转染技术将含有 SV40LTag 的质粒转染体外培养的大鼠骨骺软骨细胞,经 G418 筛选后挑选阳性克隆扩大培养并连续传代,建立了稳定分化的大鼠骨骺软骨细胞株。获得的 FGFR-3 阳性的骨骺软骨细胞,具有骨骺软骨细胞的基本特性,常规培养下未观察到明显的分化现象。II 型胶原和 X 型胶原免疫细胞染色法证实所培养的细胞具有骨骺软骨细胞的自我更新能力和多向分化潜能。经 Southern 印迹杂交证实,SV40LTag 已稳定转入稳定分化骨骺软骨细胞基因组中,并检测到转录水平和蛋白水平的表达。这些结果说明 SV40LTag 能成功的介导体外培养骨骺软骨细胞的永生化,提高原代细胞成系的效率。同时我们的结果已经证实,SV40LTag 基因的导入除提高转化细胞的生长速率外,仍能使细胞保留其原始细胞的许多分化表型。

SV40 是上世纪 60 年代初发现分离的猿肾细胞病毒,为 5.2 kb 双环状的 DNA 病毒。其基因组分为早期基因(包括大 T 抗原及小 t 抗原)和晚期基因(包括 vp1, vp2, vp3 基因)前者编码转录活化因子(transcription activators),刺激病毒和宿主细胞的转

录与增殖;后者负责编码病毒的结构蛋白,然后包装病毒的基因组,并形成病毒颗粒。近年来,SV40 介导细胞永生化的机制得到了广泛的研究。目前的研究结果证实 SV40LTag 可以通过与生长抑制因子 pRB、p53 和 SEN6 相互作用,使细胞周期中老化期(senescence)机制失效,延长细胞寿命,并使细胞最终度过危机期(crisis)实现永生化^[9]。

本研究证实利用 SV40LTag 诱导原代大鼠骨骺静止区的骨骺软骨细胞的永生化是一种可行的、可重复的方法,通过这种方法建立的永生化骨骺软骨细胞株保留了原代骨骺软骨细胞的基本特性,不仅为骨骺软骨细胞的基础研究提供了大量的细胞模型,而且为身材矮小患儿的细胞移植治疗以及作为外源基因载体所进行基因治疗提供了稳定的细胞来源。

[参 考 文 献]

[1] 王琳琳,倪桂臣,朱逞,颜纯,吴玉筠,刘颖,等. 生长发育迟缓与胰岛素样生长因子的关系[J]. 中国实用儿科杂志,1999, 14(2):89-91.

[2] Boyan BD, Schwartz Z, Swain LD, Carnes DL Jr, Zislis T. Differential expression of phenotype by resting zone and growth region costochondral chondrocytes *in vitro* [J]. Bone, 1988, 9(3):185-194.

[3] Schwartz Z, Ehland H, Sylvia VL, Larsson D, Hardin RR, Bingham V, et al. 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 and 24R, 25-dihydroxyvitamin D3 modulate growth plate chondrocyte physiology via protein kinase C-dependent phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase [J]. Endocrinology, 2002, 143(7):2775-2786.

[4] Bruckner P, Horler I, Mendler M, Houze Y, Winterhalter KH, Eich-Bender SG, et al. Induction and prevention of chondrocyte hypertrophy in culture [J]. J Cell Biol, 1989, 109(5):2537-2545.

[5] Castagnola P, Dozin B, Moro G, Cancedda R. Changes in the expression of collagen genes show two stages in chondrocyte differentiation *in vitro* [J]. J Cell Biol, 1988, 106(2):461-467.

[6] Ye L, Mishina Y, Chen D, Huang H, Dallas SL, Dallas MR, et al. Dmp1-deficient mice display severe defects in cartilage formation responsible for a chondrodysplasia-like phenotype [J]. J Biol Chem, 2005, 280(7):6197-6203.

[7] Ytrehus B, Ekman S, Carlson CS, Teige J, Reinholt FP. Focal changes in blood supply during normal epiphyseal growth are central in the pathogenesis of osteochondrosis in pigs [J]. Bone, 2004, 35(6):1294-1306.

[8] Jha KK, Banga S, Palejwala V, Ozer HL. SV40-mediated immortalization [J]. Exp Cell Res, 1998, 245(1):1-7.

[9] Rajan N, Pruden DL, Kaznari H, Cao Q, Anderson BE, Duncan JL, et al. Characterization of an immortalized human vaginal epithelial cell line [J]. J Urol, 2000, 163(2):616-622.

(本文编辑:吉耕中)