

[文章编号] 1674-8115(2011)05-0538-05

· 论著 ·

人釉原蛋白基因转导对人骨髓基质细胞增殖和碱性磷酸酶合成的影响

胡景超, 束 蓉, 宋忠臣, 程 岚

(上海交通大学 医学院附属第九人民医院牙周科 上海市口腔医学研究所 上海 200011)

[摘要] 目的 观察慢病毒介导的人釉原蛋白(hAm)基因转导对人骨髓基质细胞(hBMSCs)增殖及细胞成骨分化标志物碱性磷酸酶(ALP)合成的影响。方法 采用RT-PCR技术获取hAm编码基因,扩增产物与携带绿色荧光蛋白(GFP)的慢病毒载体质粒(FUGW)连接构建重组慢病毒载体质粒FUAmW,以聚乙烯亚胺(PEI)法三质粒共转染293T细胞组装获取慢病毒,并感染hBMSCs(目的基因转导组);以感染FUGW和未感染病毒的hBMSCs分别作为对照基因转导组和空白对照组。流式细胞仪测定慢病毒感染效率,RT-PCR鉴定细胞hAm表达;MTT比色法检测细胞增殖;慢病毒感染后第7天,倒置相差显微镜观察各组细胞ALP染色情况;感染后第4、7、10天,采用RT-PCR技术检测各组hBMSCs内ALP mRNA表达。结果 目的基因转导组细胞FUAmW的感染效率达40.29%,RT-PCR检测到540 bp的目的基因产物条带;细胞增殖水平显著高于对照基因转导组和空白对照组($P < 0.05$);慢病毒感染后第7天,目的基因转导组ALP染色阳性细胞数量明显少于对照基因转导组和空白对照组;感染后第4、7、10天,目的基因转导组细胞ALP mRNA表达显著低于对照基因转导组和空白对照组。结论 导入外源性Am基因能刺激hBMSCs增殖,但细胞内ALP mRNA表达下调。

[关键词] 骨髓基质细胞;重组慢病毒载体;釉原蛋白;基因转导

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2011.05.003

[中图分类号] R329; Q786

[文献标志码] A

Effects of human amelogenin gene transduction on proliferation and synthesis of alkaline phosphatase of human bone marrow stromal cells

HU Jing-chao, SHU Rong, SONG Zhong-chen, CHENG Lan

(Department of Periodontology, the Ninth People's Hospital, College of Stomatology, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai Research Institute of Stomatology, Shanghai 200011, China)

[Abstract] Objective To investigate the effects of lentivirus-mediated human amelogenin (hAm) gene transduction on proliferation and synthesis of alkaline phosphatase (ALP) of human bone marrow stromal cells (hBMSCs). Methods RT-PCR was adopted to obtain hAm encoding gene, and recombinant lentivirus vector plasmid FUAmW was constructed by connection of amplified products with lentivirus vector plasmid (FUGW) carrying green fluorescent protein (GFP). Recombinant lentivirus was prepared from 293T cells by polyethylenimine (PEI)-mediated transient cotransfection, and hBMSCs were infected with generated lentivirus (target gene transduction group). hBMSCs with FUGW infection and those without virus infection were served as control gene transduction group and blank control group, respectively. The infection efficiency of lentivirus was analysed by flow cytometry, and the expression of hAm in cells was detected by RT-PCR. Cell proliferation was determined by MTT colorimetric assay. ALP staining was observed with inverted phase contrast microscopy 7 d after lentivirus infection. The expression of ALP mRNA in hBMSCs was detected by RT-PCR 4 d, 7 d and 10 d after infection. Results In target gene transduction group, the infection efficiency of FUAmW was 40.29%, 540 bp strap of target gene was detected by RT-PCR, and cell proliferation was significantly higher than that in control gene transduction group and blank control group ($P < 0.05$). The number of cells with positive ALP staining in target gene transduction group was significantly smaller than those in control gene transduction group and blank control group 7 d after lentivirus infection, and the expression of ALP mRNA in target gene transduction group was significantly lower than that in control gene

[基金项目] 国家自然科学基金(30672315,30801292)(National Natural Science Foundation of China,30672315,30801292)。

[作者简介] 胡景超(1982—),男,博士生;电子信箱:hujingchao117@hotmail.com。

[通信作者] 束 蓉,电子信箱:shurong123@hotmail.com。

transduction group and blank control group 4 d, 7 d and 10 d after infection. **Conclusion** Lentivirus-mediated transduction with Am gene may enhance the proliferation of hBMSCs, while reduce the expression of ALP mRNA in cells.

[Key words] bone marrow stromal cell; recombinant lentivirus vector; amelogenin; gene transduction

牙周骨缺损的修复,尤其是牙周新附着的形成,是牙周病学研究的重要课题。尽管目前临床上的修复方法较多,但传统的牙周治疗结果尚不够理想。基因强化组织工程技术的发展为牙周组织修复重建提供了新的途径^[1]。种子细胞是组织工程研究的重要组成部分,骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells,bMSCs)因具有易获取、便于体外培养扩增、有明确的成骨潜能和较强的传代增殖能力,以及外源目的基因易于导入等诸多优势,是目前骨缺损基因治疗较为理想的靶细胞。

釉基质蛋白(enamel matrix proteins,EMPs)是牙齿发育期Hertwig上皮根鞘内层细胞分泌的一种调控牙齿矿化的基质蛋白,具有促进牙周组织再生作用。EMPs在牙齿的胚胎发育过程中,不仅参与牙釉质的发育,还与牙骨质和牙周膜的发育密切相关。釉原蛋白(amelogenin,Am)在EMPs中约占90%,是促进牙周再生的活性部分。本实验构建人釉原蛋白(human amelogenin,hAm)慢病毒载体并感染人骨髓基质细胞(human bone marrow stromal cells,hBMSCs),观察hAm基因转导对hBMSCs生物学特性的影响,为探索Am基因修饰种子细胞在牙周组织工程的应用提供实验和理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

DMEM培养基(Gibco,美国);胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);胰酶(Amresco);肝素注射液(12 500 U/mL)(江苏常州千红生化制药有限公司);碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)检测试剂盒(上海仁宝医用试剂研究有限公司);CO₂细胞培养箱(Thermo Life Sciences);倒置相差显微镜(Leica)。携带绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)的慢病毒载体质粒(FUGW)(复旦大学生命科学学院遗传学研究所)。

1.2 hBMSCs的分离和培养

采用全骨髓法培养hBMSCs。在无菌条件下,于健康成年志愿者髂嵴抽取骨髓,加入含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养液(1 mL抽吸物:20 mL培养液),吹打混匀后接种于培养皿,置CO₂细胞培养箱中,在37 °C、50 mL/L CO₂和饱和湿度条件下培养。5 d后全量换液,除去未贴壁的血细胞。以后每2~3 d

全量换液1次,待细胞达到80%左右融合后用2.5 g/L胰蛋白酶和0.2 g/L EDTA消化,传代培养。取培养第5代的细胞用于后续实验。

1.3 慢病毒载体的构建和包装

1.3.1 慢病毒载体的构建以TRIzol法提取合法引产胎儿(21周胎龄)的乳牙胚组织总RNA。采用RT-PCR技术获得hAm成熟肽基因序列全长,并在两端引入酶切位点BamH I和EcoR I。hAm-BamH I引物:5'-ATAGGATCCATGCCTCTACCACCTCATCCTG-3';hAm-EcoR I引物:5'-CCGGAATTCTTAATCCACTTCCTCCCGCTTG-3'。采用PCR技术体外扩增hAm成熟肽编码区。将扩增产物与慢病毒载体转移质粒FUGW分别用BamH I和EcoR I双酶切后连接,构建重组慢病毒载体质粒FUAmW。

1.3.2 病毒包装以聚乙烯亚胺(polyethylenimine,PEI)法介导三质粒共转染293T细胞,在细胞内包装获取慢病毒。转染前24 h,将293T细胞以1×10⁵/mL密度接种于6孔板上,待细胞生长达到约80%融合时开始转染。在两个1.5 mL的EP管中混合下列溶液:a管,按照4:3:2混合重组慢病毒载体质粒FUAmW或FUGW、包装质粒CMV△R 8.2和包膜质粒VSV-G,2×HEPES溶液;b管,PEI溶液,2×HEPES溶液。将a、b管混合后,加入无血清DMEM培养液,2~4 h后换液,36~48 h收集病毒上清,获取能表达GFP和hAm的重组慢病毒。

1.4 目的细胞基因转导及相关检测

1.4.1 慢病毒感染目的细胞取第5代生长良好的hBMSCs,以1×10⁵/mL密度接种于6孔板,置于CO₂细胞培养箱中,在37 °C、50 mL/L CO₂和饱和湿度条件下培养24 h,待细胞生长达70%~80%融合时分别加入FUAmW(目的基因转导组)和FUGW(对照基因转导组)病毒上清,以加入含100 mL/L FBS的DMEM培养液而不感染病毒的hBMSCs作为空白对照组,继续培养6 h后换液。感染72 h后,荧光显微镜观察细胞GFP表达;收集目的基因转导组hBMSCs,流式细胞仪检测GFP表达阳性率,计算慢病毒感染效率。

1.4.2 RT-PCR检测目的基因hAm表达TRIzol抽提各组细胞总RNA,采用Prime Script RT enzyme反转录总RNA为cDNA,以此cDNA为模板,用目的基因hAm引物进行RT-PCR,检测hAm在hBMSCs中

的表达, β -actin 为内参照。hAm 引物: 5'-ATAGGATC CATGCCTCTACCAACCTCATGGCTG-3' (上游), 5'-CCG GAATTCTTAATCCACTTCCTCCCGCTTG-3' (下游); β -actin 引物: 5'-CCTGTGGCATCCACGAACT-3' (上游), 5'-GAAGCATTGCGGTGGACGA-3' (下游)。

1.4.3 MTT 比色法检测细胞增殖 取第 5 代生长良好的 hBMSCs, 以 1×10^4 /mL 密度加入 96 孔板(每孔 200 μ L, 每组设 5 个复孔), 置 CO₂ 细胞培养箱中, 在 37 °C、50 mL/L CO₂ 和饱和湿度条件下培养 24 h, 弃去培养液及未贴壁的细胞。分组处理同 1.4.1。6 h 后全部更换含 100 mL/L FBS 的 DMEM 培养液, 每孔 200 μ L。分别于培养第 0~8 天, 每孔加入 MTT 溶液 20 μ L, 37 °C 继续孵育 4 h, 小心吸弃孔内培养液, 每孔加入二甲亚砜 150 μ L, 振荡 10 min, 在酶联免疫检测仪上测定各孔 D(490 nm)。

1.4.4 细胞 ALP 染色 取第 5 代生长良好的 hBMSCs, 以 1×10^5 /mL 密度接种于 6 孔板中。分组处理同 1.4.1, 分别加入成骨诱导培养基, 置 CO₂ 细胞培养箱中, 在 37 °C、50 mL/L CO₂ 和饱和湿度条件下培养, 7 d 后进行 ALP 染色检测。按试剂盒说明书固定标本, 加底物, 37 °C 染色 45 min, 复染; 出现亮红色颗粒为阳性染色。

1.4.5 RT-PCR 检测细胞 ALP mRNA 表达 取第 5 代生长良好的 hBMSCs, 于分组(同 1.4.1)诱导培养后 1、4、7、10 d 收集细胞, TRIzol 法抽提总 RNA, 反转录产生 cDNA, 以此为模板, 用 ALP 引物进行 RT-PCR, 检测 hBMSCs 中 ALP mRNA 的表达; β -actin 作为内参。引物序列: 5'-CCCAAAGGCTTCTTCT TG-3' (上游), 5'-CTGGTAGTTGTTGTGAGC-3' (下游)。

1.5 统计学处理

采用 SAS 6.12 软件进行统计学分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析和 SNK 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hBMSCs 慢病毒感染效率及目的基因表达

流式细胞仪检测结果显示: 目的基因转导组细胞 GFP 表达阳性, 即 FUAmW 的中位感染效率为 40.29% (图 1)。RT-PCR 结果显示: 目的基因转导组可见有 540 bp 的目的基因(hAm mRNA)扩增产物条带(图 2)。

2.2 细胞生长特性

hBMSCs 经传代培养后, 可见贴壁生长的细胞呈

梭形或不规则三角形, 排列呈涡旋状或放射状。选取第 5 代 hBMSCs 进行实验, 对照基因转导组和空白对照组细胞形态无明显变化, 仍为长梭形, 并呈漩涡状生长(图 3A); 目的基因转导组细胞形态变得粗大, 并由长梭形转变为多角形, 细胞转为集落性生长, 集落中细胞相互伸出伪足联系(图 3B)。根据 MTT 比色法检测结果显示: 目的基因转导组细胞增殖曲线呈抛物线样, 检测第 6 天细胞增殖达高峰, 第 7 天后回落; 对照基因转导组和空白对照组细胞增殖曲线较平缓, 分别于检测第 7 和第 8 天达高峰。统计分析结果表明: 细胞增殖检测第 6、7、8 天, 目的基因转导组细胞增殖水平均显著高于对照基因转导组($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$) (图 4)。

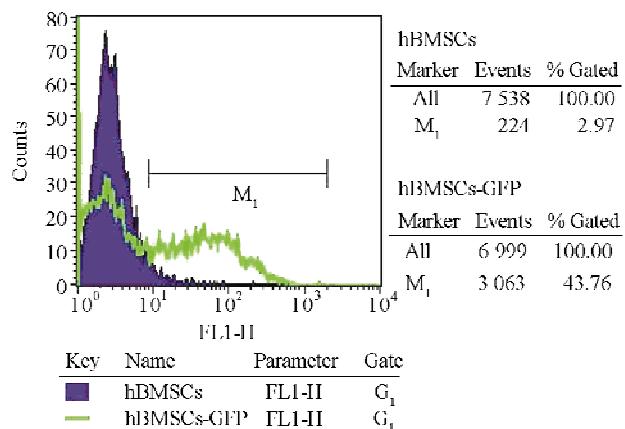
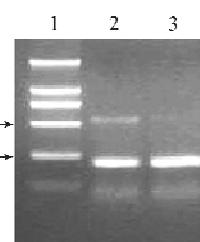


图 1 流式细胞仪分析慢病毒感染 hBMSCs 效率

Fig 1 Infection efficiency of hBMSCs analysed by flow cytometry



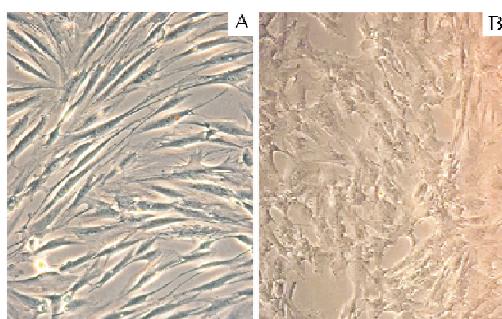
1. Marker; 2. 目的基因转导组; 3. 对照基因转导组。

图 2 RT-PCR 检测 hBMSCs 内 hAm mRNA 表达

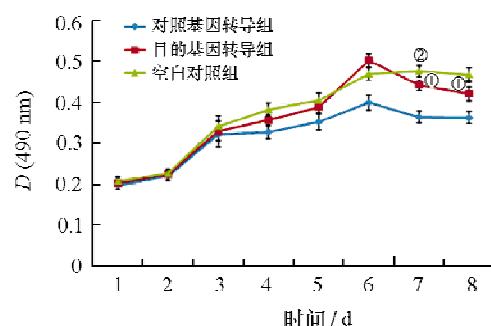
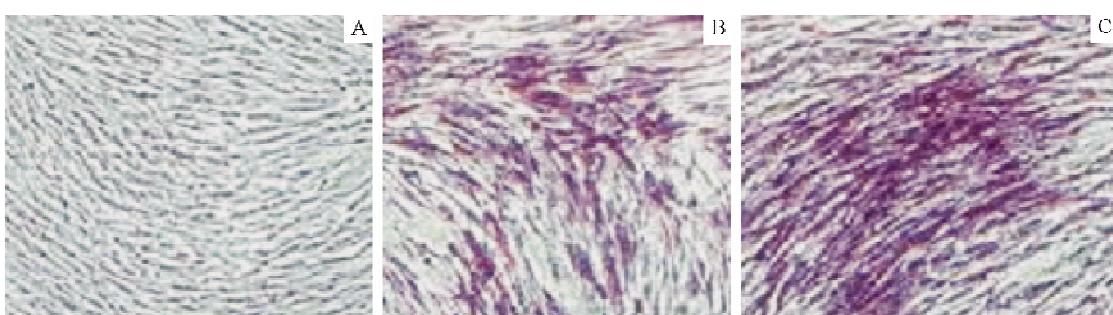
Fig 2 Expression of hAm mRNA in hBMSCs detected by RT-PCR

2.3 ALP 染色和 ALP mRNA 表达

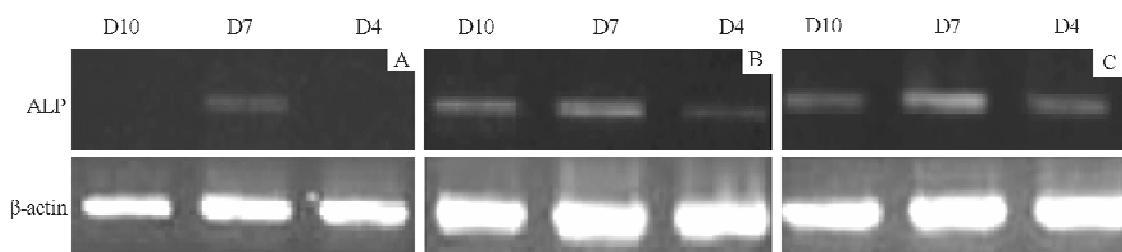
慢病毒感染 7 d 后细胞行 ALP 染色, 结果显示目的基因转导组 ALP 染色阳性细胞较少, 呈稀疏条索状分布; 而空白对照组和对照基因转导组 ALP 染色阳性细胞数量较多, 呈条索状或片状分布(图 5)。RT-PCR 检测结果显示: 慢病毒感染后第 4、7、10 天目的基因转导组 hBMSCs 内 ALP mRNA 表达均明显低于对照基因转导组和空白对照组(图 6)。



A. 空白对照组; B. FUA mW 感染后 72 h 目的基因转导组。

图 3 倒置相差显微镜观察第 5 代 hBMSCs $\times 100$
Fig 3 hBMSCs (PS) observed by inverted microscopy $\times 100$  $^{①} P < 0.05, ^{②} P < 0.01$ 与对照基因转导组比较。图 4 MTT 比色法检测 hBMSCs 的增殖情况
Fig 4 Proliferation of hBMSCs detected by MTT method

A. 目的基因转导组; B. 对照基因转导组; C. 空白对照组。

图 5 倒置相差显微镜观察各组 hBMSCs 的 ALP 染色情况 $\times 100$
Fig 5 ALP staining of hBMSCs in each group observed by inverted microscopy $\times 100$ 

A. 目的基因转导组; B. 对照基因转导组; C. 空白对照组。

图 6 RT-PCR 检测 hBMSCs 内 ALP mRNA 表达
Fig 6 Expression of ALP mRNA in hBMSCs detected by RT-PCR

3 讨 论

种子细胞是组织工程的基本要素之一, bMSCs 来源广泛, 取材方便, 容易在体外培养, 生长稳定, 并具有明确的成骨潜能, 在组织工程中显示出良好的应用前景。同时, 该细胞增殖能力强, 外源基因容易导入, 也使其适用于生长因子的基因治疗^[2]。基因修饰的本质是向细胞导入特异性基因, 以合成和分泌目的基因产物^[3]。本实验采用重组慢病毒作为载体, 将 hAm 基因导入 hBMSCs, 发现其在 hBMSCs 中持续表达。细胞在导入外源基因后, 细胞合成的生长因子可以在胞内与自身的靶受体结合, 同时可以

在胞外作用于周围的细胞靶受体^[4], 并通过自分泌和旁分泌方式, 增强基因产物的效果。另外, 细胞表达转基因产物, 通过翻译后的修饰作用可能比直接应用外源性蛋白具有更高的生物学活性。

bMSCs 能在体外快速、大量扩增并且保持干细胞的特性, 包括增殖和多向分化的能力。研究证实 EMPs 可通过促进细胞的增殖和分化, 使受损牙周组织再生。本课题组前期研究^[5]发现: 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EMPs 对 BMSCs 的增殖具有促进作用。Lyngstadaas 等^[6]发现: 用 EMPs 处理牙周膜细胞后, 细胞间的 cAMP 信号表达增加, 促进了细胞分泌转化生长因子 β_1 、白介素 6 和血小板衍生生长因子 AB, 从而促进

细胞增殖。BMSCs 与牙周膜成纤维细胞同属于间充质来源细胞, 对 EMPs 的反应可能具有较多的生物反应相似性^[7]。Am 作为 EMPs 的主要组成部分(约占 90%), 对 BMSCs 的作用尚不明确。本研究发现:携带 hAm 基因的慢病毒载体感染 hBMSCs 后, 目的基因转导组 hBMSCs 增殖水平显著高于对照基因转导组, 并于培养后第 6 天达高峰。细胞增殖是细胞维持自我更新的基础。影响细胞增殖和分化的因素非常多, 主要包括化学因素(各类生长激素、化学药物和离子成分等)、生长因子、转录因子以及胞外基质与细胞的相互作用等。Li 等^[8]研究发现:重组 Am 能够促进牙周膜成纤维细胞增殖和迁移, 且存在剂量依赖性; 促进牙龈成纤维细胞增殖, 抑制其迁移, 对细胞黏附则无明显影响; 抑制牙龈上皮细胞黏附、增殖和迁移, 且与剂量相关。Hatakeyama 等^[9]通过体外细胞实验证明了重组 Am 和富含亮氨酸的釉原蛋白肽(leucine-rich amelogenin peptide, LRAP)可以明显刺激成牙骨质细胞和牙周膜细胞的增殖及迁移。但 Am 促进 BMSCs 增殖的原因尚需深入探讨。

本研究结果显示:目的基因转导组 hBMSCs 在 hAm 基因的作用下, 与对照基因转导组相比其 ALP mRNA 表达水平下调, 与前期研究中 EMPs 的作用类似。ALP 是一类磷酸酯酶的总称, 是成骨细胞早期分化的标志物。骨组织中含有大量的 ALP, 分布于成骨细胞周围及其表面, 极易释放入血, 因而当成骨细胞增殖、骨生长亢进时会出现血清 ALP 活性上升, 因此未成熟动物的血清 ALP 活性较成熟动物高。在人体内, 血清中骨型 ALP 的含量随年龄变化而发生改变, 年龄越小血清骨型 ALP 含量越高, 常是成年人的数倍。ALP mRNA 表达上调是细胞成骨分化的标志。本研究发现:在 hAm 基因作用下, hBMSCs 的 ALP mRNA 表达水平下调, 提示 hAm 可能并不会促进 hBMSCs 向成骨细胞分化。Gao 等^[10]提出, 成牙骨质细胞和成骨细胞是两种细胞类型, 成牙骨质细胞的标志之一就是极低的 ALP mRNA 表达水平。研究^[11-12]发现:牙周膜成纤维细胞有较弱的 ALP 活性, 而成牙骨质细胞未检出 ALP 活性。Cattaneo 等^[12]发现:人牙周膜成纤维细胞在 EMPs 作用下最终会失去 ALP 活性, 认为人牙周膜成纤维细胞在与 EMPs 接触后可发生分化, 具备再生新牙周组织的能力。但上述研究均未阐述 Am 单独作用下靶细胞的改变。本实验中, 目的基因转导组 hBMSCs 的 ALP 染色和 ALPmRNA 表达均较对照组明显减弱, 即

hAm 基因转导能够抑制 hBMSCs 胞内 ALP 合成。

本研究结果提示:hAm 基因产物似乎不能直接诱导 hBMSCs 的成骨分化, 可能是通过促进细胞增殖或作为信号分子促进牙周组织的再生, 但其在无细胞性牙骨质生成过程中的确切作用及其机制尚需进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Zhang Y, Song J, Shi B, et al. Combination of scaffold and adenovirus vectors expressing bone morphogenetic protein-7 for alveolar bone regeneration at dental implant defects [J]. Biomaterials, 2007, 28(31): 4635-4642.
- [2] Turgeman G, Pittman DD, Müller R, et al. Engineered human mesenchymal stem cells: a novel platform for skeletal cell mediated gene therapy[J]. J Gene Med, 2001, 3(3): 240-251.
- [3] Nussenbaum B, Teknos TN, Chepeha DB. Tissue engineering: the current status of this futuristic modality in head neck reconstruction [J]. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg, 2004, 12(4): 311-315.
- [4] Morizono K, De Ugarte DA, Zhu M, et al. Multilineage cells from adipose tissue as gene delivery vehicles [J]. Hum Gene Ther, 2003, 14(1): 59-66.
- [5] 宋爱梅, 束蓉, 谢玉峰, 等. 釉基质蛋白对猪骨髓基质细胞增殖和根面附着生长的影响[J]. 实用口腔医学杂志, 2006, 22(5): 679-682.
- [6] Lyngstadaas SP, Lundberg E, Ekdahl H, et al. Autocrine growth factors in human periodontal ligament cells cultured on enamel matrix derivative [J]. J Clin Periodontol, 2001, 28(2): 181-188.
- [7] Kramer PR, Nares S, Kramer SF, et al. Mesenchymal stem cells acquire characteristics of cells in the periodontal ligament *in vitro* [J]. J Dent Res, 2004, 83(1): 27-34.
- [8] Li XT, Shu R, Liu D, et al. Different effects of 25-kDa amelogenin on the proliferation, attachment and migration of various periodontal cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 394(3): 581-586.
- [9] Hatakeyama J, Philp D, Hatakeyama Y, et al. Amelogenin-mediated regulation of osteoclastogenesis, and periodontal cell proliferation and migration[J]. J Dent Res, 2006, 85(2): 144-149.
- [10] Gao J, Symons AL, Haase H, et al. Should cementoblasts express alkaline phosphatase activity? Preliminary study of rat cementoblasts *in vitro* [J]. J Periodontol, 1999, 70(9): 951-959.
- [11] Tenorio D, Crucley A, Hughes FJ. Immunocytochemical investigation of the rat cementoblast phenotype[J]. J Periodont Res, 1993, 28(6 Pt 1): 411-419.
- [12] Cattaneo V, Rota C, Silvestri M, et al. Effect of enamel matrix derivative on human periodontal fibroblasts: proliferation, morphology and root surface colonization. An *in vitro* study [J]. J Periodont Res, 2003, 38(6): 568-574.