

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01499

腺相关病毒介导增强型绿色荧光蛋白基因体外转染兔结膜上皮细胞

苏莉¹, 崔红平^{2*}, 李艳红², 高新蕊²

1. 上海交通大学附属第一人民医院眼科, 上海 200080

2. 同济大学附属上海市第十人民医院眼科, 上海 200072

[摘要] **目的:** 研究 2 型重组腺相关病毒 (recombinant adeno-associated virus 2, rAAV2) 载体介导增强型绿色荧光蛋白基因 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 对体外培养兔结膜上皮细胞的转染和表达情况, 为后续研究提供依据。 **方法:** 体外培养兔结膜上皮细胞, rAAV2-EGFP 按感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 10^4 、 10^5 、 10^6 转染第 2 代兔结膜上皮细胞, 转染后第 1、3、5、7 日倒置荧光显微镜下观察细胞中 EGFP 表达情况, 计算转染率。MTT 方法检测 rAAV2-EGFP 转染对细胞增殖的影响。 **结果:** 随着 MOI 值增大及转染时间延长, EGFP 表达效率逐渐增高, 转染后第 7~8 日达到高峰并维持。MTT 检测各 MOI 组与对照组差别无统计学意义。 **结论:** rAAV2 载体可以介导 EGFP 基因高效稳定转染兔结膜上皮细胞, 并且对细胞增殖无影响。

[关键词] 腺相关病毒; 绿色荧光蛋白; 结膜上皮细胞; 荧光蛋白质示踪

[中图分类号] R 943.43 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)12-1499-04

Transfection of rabbit conjunctival epithelial cells with adeno-associated virus mediated enhanced green fluorescent protein

SU Li¹, CUI Hong-ping^{2*}, LI Yan-hong², GAO Xin-rui²

1. Department of Ophthalmology, Shanghai First People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China

2. Department of Ophthalmology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072

[ABSTRACT] **Objective:** To transfect rabbit conjunctival epithelial cells *in vitro* with recombinant adeno-associated virus 2-mediated enhanced green fluorescent protein (rAAV2-EGFP), so as to lay a foundation for studying the proliferation and differentiation of conjunctival epithelial stem cells. **Methods:** Rabbit conjunctival epithelial cells were cultured *in vitro*. The second passage of rabbit conjunctival epithelial cells were transfected with rAAV2-EGFP in various multiplicity of infection (MOI= 10^4 , 10^5 , 10^6). The expression of green fluorescent protein was examined 1, 3, 5, and 7 days after transfection and the transfection rate was calculated. MTT assay was used to study the influence of rAAV2-EGFP on the growth of cells. **Results:** With the increase of MOI value and the prolongation of transfection, the expression of EGFP was gradually increased and reached its peak on 7-8 days after transfection. MTT assay showed that there was no significant difference between the MOI group and the control group. **Conclusion:** rAAV2-EGFP can efficiently transfect rabbit conjunctival epithelial cells and have no influence on the proliferation of the cells.

[KEY WORDS] adeno-associated virus; green fluorescent protein; conjunctival epithelial cell; fluorescent protein tracing

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(12):1499-1502]

结膜上皮、角膜上皮及泪膜共同构成眼表面, 健康的眼表面对于维持正常的视力具有重要作用。结膜上皮和角膜上皮的自我更新分别来自于各自的干细胞^[1]。目前角膜上皮干细胞已经定位明确, 其特异性干细胞标志、细胞生物学特性和临床应用已经取得丰硕的成果, 但对结膜上皮干细胞的研究尚处

于起步阶段, 对结膜上皮干细胞存在的部位、鉴定尚存在争议, 对其增殖分化的研究尚不深入。近年来, 绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 示踪技术在胚胎干细胞和成体干细胞的研究中得到广泛应用, 是一种理想的活细胞示踪剂。2 型腺相关病毒 (adeno-associated virus 2, AAV2) 是在眼科基因治

[收稿日期] 2008-05-22 **[接受日期]** 2008-10-02

[基金项目] 国家自然科学基金(30570954), Supported by National Natural Science Foundation of China (30570954).

[作者简介] 苏莉, 博士生, E-mail: sujilin615@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-66301690, E-mail: hpcuistar@gmail.com

疗中应用广泛的载体。本研究利用 2 型腺相关病毒为载体介导增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 基因体外转染兔结膜上皮细胞,为进一步利用示踪技术研究结膜上皮干细胞的鉴别、定位及其增殖分化的调控奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要仪器及试剂 CO₂ 培养箱 (Thermo 公司);倒置显微镜 (Olympus 公司);倒置相差荧光显微镜 (ZEISS);激光共聚焦荧光显微镜 (ZEISS);Bio-Kit 全自动酶标仪。rAAV2-EGFP 病毒颗粒购自本元正阳基因技术有限公司,滴度为 1×10^{15} vector genome/L;F12 培养基、Dispase II、胰蛋白酶 (Gibco 公司);胎牛血清 (杭州四季青生物医药有限公司);一抗:单克隆抗体 Pan-cytokeratin (武汉博士德公司);二抗:羊抗小鼠 IgG-FITC;正常山羊血清 (武汉博士德公司);二甲基噻唑二苯基四唑溴盐 (MTT, Sigma 公司);二甲基亚砜 (DMSO, Sigma 公司)。

1.2 兔结膜上皮细胞的体外培养和鉴定 新西兰大白兔,雌雄不限,体质量 2~3 kg,购于同济大学动物实验中心。取兔结膜上皮组织,用 Dispase II 消化法分离得到纯净的结膜上皮细胞,制成细胞悬液后接种于培养瓶内,置于 37℃,体积分数 5%CO₂ 的培养箱中培养,每 2 d 换液 1 次。培养 5~7 d,待细胞完全融合后,部分应用 0.25%胰蛋白酶消化传代。部分细胞应用 Pan-cytokeratin 单克隆抗体鉴定。

1.3 rAAV2-EGFP 转染兔结膜上皮细胞 取第 2 代细胞,按 10^5 /ml 的细胞密度接种于 6 孔板。用含 10%胎牛血清的培养液继续培养 24 h 后细胞贴壁,观察细胞状态良好。取 2 孔计数细胞。无血清的 F12 培养基清洗细胞 2 次,按感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 10^4 、 10^5 、 10^6 计算所需 rAAV2-EGFP 病毒体积,分别加入无血清 F12 培养基稀释至总体积均为 500 μ l,将上述病毒混合液加入细胞中转染,每组 3 孔,置于 37℃、体积分数 5%CO₂ 的培养箱中培养 1 h 后,去掉培养液,加入含 10%胎牛血清的培养液继续培养。同一批细胞,按照上述方法操作,但不进行病毒转染 (MOI=0) 作为对照。

1.4 兔结膜上皮细胞形态和 EGFP 表达 转染后每日于倒置显微镜下观察细胞形态和生长情况,细胞融合后按 1:2 传代。转染后第 1、3、5、7 日在倒置荧光显微镜 490 nm 激发光下观察结膜上皮细胞中 EGFP 的表达情况。以转染 EGFP 后在蓝光激发下发出绿色荧光的细胞为阳性细胞,按每个随机高倍视野计数 200 个细胞中阳性细胞的个数,计算出

各组在各个时间点的阳性细胞平均百分率,即转染率。当 EGFP 稳定表达以后,用激光共聚焦荧光显微镜照相。

1.5 MTT 法检测 rAAV2-EGFP 转染对兔结膜上皮细胞增殖的影响 以 0.25%胰蛋白酶消化生长至 90%融合的兔结膜上皮细胞,按每孔 3×10^4 个细胞接种于 96 孔板,常规细胞培养 1 d 后,按 MOI = 10^4 、 10^5 、 10^6 分别加入 rAAV2-EGFP (转染方法同 1.4 项下),未转染组作对照,每组设 5 个平行孔,再培养 5 d 后,每孔加入 MTT 溶液 20 μ l,继续培养 4 h 后终止培养,弃上清,然后每孔加入 150 μ l DM-SO,震荡 10 min,于酶标仪测定 570 nm 各孔光密度值 (D 值)。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 11.0 统计软件进行方差分析和均数比较的 *t* 检验,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, *P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 结膜上皮细胞形态观察及免疫组化鉴定 细胞接种后第 3 日多数细胞贴壁,伸出伪足,变成扁平的椭圆形,梭形或者不规则形,部分细胞连接成小片状。约 7 d 左右细胞已基本融合成片。细胞经传代培养 2~4 代,生长良好。实验组各 MOI 孔细胞转染后生长情况正常 (图 1A),细胞形态与对照组比较未见明显改变。免疫组化鉴定兔结膜上皮细胞:Pan-cytokeratin 染色阳性 (图 1B),阴性对照组不显色。

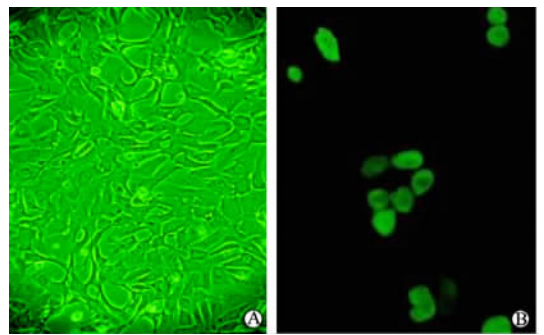


图 1 rAAV2-EGFP 转染兔结膜上皮细胞后形态学观察 (A) 及免疫组化鉴定 (B)

Fig 1 Rabbit conjunctival epithelial cells three days after transfection with rAAV2-EGFP

A: Morphology of cells; B: Pan-cytokeratin immunofluorescent staining in the cells. Original magnification: $\times 300$ (A), $\times 600$ (B)

2.2 EGFP 在兔结膜上皮细胞中的表达 rAAV2-EGFP 转染兔结膜上皮细胞后第 1 日,按 MOI 为 10^5 、 10^6 方式转染的细胞开始出现 EGFP 表达,转染

后第 3 日, MOI 为 10^4 组的细胞也开始出现较弱的 EGFP 表达。EGFP 表达阳性的细胞在 490 nm 波长激发光下发出绿色荧光, 弥漫于整个胞质(图 2)。MOI 值越大, 转染效率越高。随着时间的延长, 细胞

中 EGFP 的表达强度增强, 表达 EGFP 的阳性细胞数增加, 转染后第 7~8 日表达达到高峰并维持, 各 MOI 组转染率比较差异有统计学意义($P < 0.01$, 表 1), 对照组未见任何 EGFP 的表达。



图 2 rAAV2-EGFP 转染兔结膜上皮细胞后第 5 日激光共聚焦显微镜照片

Fig 2 Rabbit conjunctival epithelial cells five days after transfection with rAAV2-EGFP as photographed by laser confocal microscope

A: EGFP positive cells show green fluorescence in the cytoplasm; B: Growth of conjunctival epithelial cells of the same visual field; C: The combination of A and B. Original magnification: $\times 600$

表 1 各 MOI 组 rAAV2-EGFP 转染兔结膜上皮细胞的转染效率

Tab 1 Transfection efficiencies of rabbit conjunctival epithelial cells by various MOI of rAAV2-EGFP

($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

MOI	Day 1	Day 3	Day 5	Day 7
10^4	0.00 \pm 0.00	5.00 \pm 0.41**	10.57 \pm 0.71**	29.72 \pm 0.65**
10^5	3.12 \pm 0.65**	23.08 \pm 0.57**	41.50 \pm 0.85**	62.25 \pm 0.98**
10^6	10.88 \pm 0.63**	32.72 \pm 0.43**	73.00 \pm 0.87**	83.50 \pm 0.96**
Control	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00

** $P < 0.01$ vs control group

2.3 MTT 法检测 rAAV2-EGFP 对兔结膜上皮细胞增殖的影响 rAAV2-EGFP 按 MOI = 10^4 、 10^5 、 10^6 转染兔结膜上皮细胞后继续培养 5 d 后行 MTT 检测, 酶标仪测定 570 nm 各孔光密度值(D 值), 经 SPSS 统计软件行各 MOI 组与对照组间独立样本 t 检验, 各转染组与对照组间差别无统计学意义。

3 讨论

近年来, 随着胚胎干细胞和各种成体干细胞研究的兴起, 干细胞示踪技术得到广泛的应用, 其中绿色荧光蛋白基因作为活细胞示踪剂应用广泛。绿色荧光蛋白作为一种新的标记基因, 已成功应用于多种基因转移系统和靶细胞, 近年来广泛应用于干细胞移植、干细胞特性研究及眼部基因治疗中, 是一种有效的活细胞示踪剂。GFP 在眼表结膜上皮干细胞的研究中也得到一定的应用。Nagasaki 等^[2]发现在 GF-PU 小鼠中, 球结膜处的结膜上皮干细胞是均匀分布的而不是集中分布在某一部位。目前尚未见利用 EGFP 示踪体外培养结膜上皮细胞的报道。本实验中

发现 GFP 可以稳定示踪体外培养结膜上皮细胞, 并且标记效率较高, 表达持续时间长。GFP 示踪技术在结膜上皮干细胞研究中应用的突出优势在于可以对眼前段进行活体时相荧光显微镜观察。目前关于结膜上皮干细胞的增殖与分化研究尚不深入, 对于结膜上皮干细胞的定位存在争议^[3-4], 利用 GFP 示踪技术可以对体外培养的结膜上皮干细胞在体内基质微环境中的增殖与分化进行研究, 为结膜上皮干细胞的定位和增殖分化调控因素的研究以及结膜上皮干细胞体内移植的应用研究提供了可靠的依据。

腺相关病毒是目前已知动物病毒载体中最简单的线状单链 DNA 病毒, 具有无致病作用、定向整合、高效转染增殖和非增殖细胞、免疫原性低等优点^[5], 是用于眼部转基因的理想载体, 在目前眼部基因治疗中应用广泛^[6-8]。本实验中发现 AAV 转染结膜上皮细胞后, 对细胞生长和形态等无明显影响, 因此 AAV 载体可以安全有效地应用于眼表上皮细胞的研究。

综上所述, AAV 载体可以携带 EGFP 报告基因

稳定高效转染结膜上皮细胞,并且不影响细胞的增殖与生长,为 AAV 载体介导 EGFP 基因转染结膜上皮干细胞示踪结膜上皮干细胞的定位、增殖与分化研究奠定了基础。

[参考文献]

[1] Wei Z G, Wu R L, Lavker R M, Sun T T. *In vitro* growth and differentiation of rabbit bulbar, fornix, and palpebral conjunctival epithelia. Implications on conjunctival epithelial transdifferentiation and stem cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1993, 34:1814-1828.

[2] Nagasaki T, Zhao J. Uniform distribution of epithelial stem cells in the bulbar conjunctiva[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46:126-132.

[3] Cheng W S, IshiKana M, Yamaki K. Palpebral conjunctiva contain more slow-cycling stem cells that have large proliferative capacity; implication for conjunctival epithelial homeostasis[J].

Jpn J Ophthalmol, 2003, 47:119-128.

[4] Tsubota K, Shimmura S, Shinozaki N, Holland E J, Shimazaki J. Clinical application of living-related conjunctival-limbal allograft[J]. Am J Ophthalmol, 2002, 133:134-135.

[5] Martin K R, Klein R L, Quigley H A. Gene delivery to the eye using adeno-associated viral vectors[J]. Methods, 2002, 28:267-275.

[6] 王峰, 王继群, 苏颖, 山艳春, 赵世光, 滕岩. 重组腺相关病毒介导 NgR(DN) 基因促进损伤后视神经轴突再生的实验研究[J]. 中华医学杂志, 2007, 87:2856-2860.

[7] Khani S C, Pawlyk B S, Bulgakov O V, Kasperek E, Young J E, Adamian M, et al. AAV-mediated expression targeting of rod and cone photoreceptors with a human rhodopsin kinase promoter[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48:3954-3961.

[8] Mancuso K, Hendrickson A E, Connor T B Jr, Mauck M C, Kinsella J J, Hauswirth W W, et al. Recombinant adeno-associated virus targets passenger gene expression to cones in primate retina[J]. J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis, 2007, 24:1411-1416.

[本文编辑] 贾泽军

· 读者 作者 编者 ·

中草药名称中文、拉丁文及英文对照表(十)

汉语拼音名	中文名	拉丁名	英文名
Huangjingzi	黄荆子	<i>Fructus Viticis Negundo</i>	Negundo Chastetree Fruit
Huangkaikou	黄开口	<i>Herba Lysimachiae Klattianae</i>	Whorleaf Loosestrife Herb
Huanglian	黄连	<i>Rhizoma Coptidis</i>	Golden Thread
Huanglu	黄庐	<i>Ramulus et Folium Cotini Cogygiae</i>	Common Smoketree Twig and Leaf
Huangmaoercao	黄毛耳草	<i>Herba Hedyotidis Chrysotrichae</i>	Goldhair Hedyotis Herb
Huangqi	黄芪	<i>Radix Astragali</i>	Root
Huangqin	黄芩	<i>Radix Scutellariae</i>	Baical Skullcap Root
Huangshukui	黄蜀葵	<i>Radix Abelmoschi Manihot</i>	Sunset Abelmoschus Root
Huangsuomei	黄锁梅	<i>Radix Rubi Obcordati</i>	Obcordate Raspberry Root
Huangteng	黄藤	<i>Caulis Fibraureae</i>	Common Fibraurea Stem
Huangyangmu	黄杨木	<i>Ramulus Buxi Sinicae</i>	Chinese Box Twig
Huangyaozi	黄药子	<i>Rhizoma Dioscoreae Bulbiferae</i>	Airpotato Yam Rhizome
Huangyuanhua	黄芫花	<i>Flos et Folium Wikstroemiae Chamaedaphnis</i>	Lowdaphne Stringbush Flower and Leaf
Huanliancao	还亮草	<i>Herba Delphinii Anthriscifolii</i>	Chervil Larkspur Herb
Huaruishi	花蕊石	<i>Ophicalcinitum</i>	Ophiscite
Huashi	滑石	<i>Talcum</i>	Talc
Hubeibeimu	湖北贝母	<i>Bulbus Fritillariae Hupehensis</i>	Hupeh Fritillary Bulb
Huci	虎刺	<i>Herba Damnacanthi</i>	Indian Damnacanthus Herb
Huercao	虎耳草	<i>Herba Saxifragae</i>	Saxifraga
Huhuanglian	胡黄连	<i>Rhizoma Picrorhizae</i>	Figwortflower Picrorhiza Rhizome
Huihao	蛔蒿	<i>Santonica</i>	Wormseed
Hujiao	胡椒	<i>Fructus Piperis</i>	Pepper
Hujisheng	槲寄生	<i>Herba Visci</i>	Coloed Mistletoe Herb
Hulu	葫芦	<i>Pericarpium Lagenariae</i>	Bottle Gourd Peel
Huluba	葫芦巴	<i>Semen Trigonellae</i>	Common Fenugreek Seed
Hulucha	葫芦茶	<i>Herba Tadehagi Triquetri</i>	Triquetrous Tadehagi Herb
Huomaren	火麻仁	<i>Fructus Cannabis</i>	Hemp Fruit
Huotanmu	火炭母	<i>Herba Polygoni Chinensis</i>	Chinese Knotweed Herb
Huoxiang	藿香	<i>Herba Agastaches</i>	Wrinkled Gianthyssop Herb
Huoyangle	火殃勒	<i>Caulis Euphorbiae Antiquori</i>	Ancients Euphorbia Stem
Hupo	琥珀	<i>Succinum</i>	Amber
Hutaoren	胡桃仁	<i>Semen Juglandis</i>	English Walnut Seed
Hutuiziye	胡颓子叶	<i>Folium Elaeagni</i>	Thorny Elaeagnus Leaf
Huzhang	虎杖	<i>Rhizoma Polygoni Cuspidati</i>	Giant Knotweed Rhizome
Huzhangcao	虎掌草	<i>Radix Anemones Rivularis</i>	Brooklet Anemone Root