

破骨细胞转基因永生化的初步探讨

李斌斌 于世凤

【摘要】 目的 通过转基因技术建立破骨细胞永生化的细胞系。方法 经 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 诱导, 获得小鼠骨髓来源的破骨前体细胞。脂质体法(Fugene 6)将猿猴病毒 40(SV40)和绿色荧光蛋白(GFP)质粒分别转染入破骨前体细胞, G418 筛选抗性克隆; 同时将 GFP 转染入逆转录病毒包装细胞(PT67)中, 作为方法对照。继而, 用含有 GFP 的逆转录病毒感染破骨前体细胞, G418 筛选抗性克隆。结果 获得小鼠骨髓来源的破骨前体细胞。Fugene 6 转染 SV40 和 GFP 到破骨前体细胞后, G418 筛选未获得阳性克隆, 但 GFP 转染 PT67 细胞后获得阳性克隆和含有 GFP 的逆转录病毒。将含有 GFP 的逆转录病毒感染破骨前体细胞, G418 筛选未获得阳性克隆。结论 通过破骨细胞转基因永生化的方法是一个非常有意义的研究课题, 但是难度较大。可以初步认为: 脂质体和逆转录病毒载体的方法不是破骨细胞转基因的最佳方法。

【关键词】 破骨细胞; 转基因; 永生化的

A Study on immortalization of osteoclasts LI Binbin, YU Shifeng. Department of Oral Pathology, School of Stomatology, Beijing University, Beijing, 100081, China

【Abstract】 Objective To build an immortalized osteoclast cell line by the method of transgene. **Methods** The osteoclast precursors were derived from the mouse bone marrow cells in the presence of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ *in vitro*. Transfection of two plasmids (SV40 and GFP) into the above cells respectively was performed using liposome (Fugene 6). G418 was used to select the resistant cell clones. At the same time, the GFP plasmid was introduced into the retrovirus packing cells (PT67) as a contrast. Then the osteoclast precursors were infected using the retrovirus containing GFP. G418 was used to select the resistant cell clones. **Results** Firstly, no G418-resistant cell cloned after the transfection of the GFP and SV40 into osteoclast precursors by Fugene 6. But the resistant cell cloned after transfection of GFP into PT67 cells by Fugene 6. Secondly, no positive infected cell cloned in the presence of the retrovirus containing GFP. **Conclusions** The cell immortalization by means of transgene is a plausible way to obtain the osteoclast cell lines although it is challenging. Liposome and retrovirus vector are not the best choice for osteoclasts to transgene.

【Key words】 Osteoclast; Transgene; immortalization

破骨细胞是骨吸收的唯一功能细胞, 因此研究破骨细胞的表型特点及其功能调控, 对于临床上防治以骨吸收为表征的局部和全身疾病, 促进骨愈合具有非常重要的意义。体外分离培养破骨细胞是研究破骨细胞特性的重要手段。传统方法在以往对破骨细胞形态、结构、功能及其骨吸收调控的研究中曾起到了积极的推动作用。主要包括以下几种方法: ①骨组织培养法。②机械分离骨髓腔内破骨细胞法。③骨髓长期诱导培养法。④从骨巨细胞瘤中分离破骨细胞法。但通过以上几种方法获得的破骨细胞数量少, 寿命短, 纯度低, 不利于进一步研究破骨细胞。因而对破骨细胞细胞和分子水平的深层次探

讨需要建立稳定的、具有破骨细胞特点和功能的细胞系。

细胞永生化的 (immortalization) 也称不死性, 是细胞获得持续生长增殖能力的特性^[1]。在体外培养中, 正常细胞的寿命是有限的, 会不可逆地进入老化期 (senescence), 即 M_1 期^[2], 表现为增殖停止, 但仍然保持细胞代谢活力。在此期间, 细胞如果接受某些基因介入, 可使其转化并继续增殖, 生命期延长。但经过一段时间的群体倍增后, 细胞又会停止生长, 进入危机期 (crisis), 即 M_2 ^[3] 期。只有进一步逃离 M_2 期继续增殖的细胞才是具有无限增殖特性的永生化的细胞。因此我们设想通过基因转移技术使破骨细胞或其前体细胞突破老化期 (M_1 期) 和危机期 (M_2 期), 获得破骨细胞永生化的细胞系, 以解决传统分离培养破骨细胞方法存在的局限, 为进一步研究破

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目 (编号 39830430)
作者单位: 100081 北京, 北京大学口腔医学院

骨细胞性骨吸收的基因调控机制奠定技术基础。同时,由于永生化解破骨细胞在体外可以多次传代,具有相对稳定的增殖特性和功能状态,会对体外实验的标准化和科学化有较大的突破。

材料和方法

1. 质粒

pLxSN-eGFP(6.4 kb): pLxSN 质粒上带有加强型绿色荧光蛋白 GFP(pLxSN 质粒上含有 LTR,以 5'-LTR 驱动目的基因转录,SV40 启动子控制 neo 基因转录以供选择,同时具有氨苄青霉素抗性)。pZipSV40Tag(11.5 kb): pZip 质粒上带有 SV40 大 T 抗原(pZip 质粒上含有 LTR,以 5'-LTR 驱动目的基因转录,SV40 启动子控制 neo 基因转录以供选择,同时具有氨苄青霉素抗性)。以上两种质粒均由北京大学医学部干细胞中心白云博士惠赠。

2. 逆转录病毒包装细胞系

RetroPack PT67 细胞系:一种成纤维细胞细胞系,含 Moloney 鼠白血病病毒基因 gag, pol 和 env。由北京大学人民医院中心实验室何湘君副教授惠赠。

3. 方法

(1) pLxSN-eGFP 和 pZipSV40Tag 质粒的大量制备和纯化

用 QIAGEN 大量提取质粒 DNA 试剂盒提取质粒,紫外分光光度仪定量,分别用 EcoRI、BamHI(购于华美生物技术公司)酶切鉴定,备用。

(2) 破骨前体细胞的获得

将 3 周龄 ICR 小鼠(购自国家计生委动物室)乙醚麻醉下断颈处死,无菌条件下取四肢长骨,于含抗生素(青霉素 1 000 U/ml,链霉素 1 mg/ml)的 Hank's 液中,去净附着的结缔组织,剪断长骨两端,用完全 a-MEM 培养液(含 15% 胎牛血清,100 U/ml 青霉素,100 μg/ml 链霉素)冲洗骨髓腔,收集含骨髓细胞的培养液,以 1.5×10^6 /ml 的细胞浓度接种于 35 mm 培养皿中,加入 1×10^{-8} 1,25(OH)₂D₃(中国协和医科大学内分泌实验室周学瀛教授惠赠)。置于 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养。48 h 后进行质粒转染。

(3) 分别将 pLxSN-eGFP 和 pZipSV40Tag 两种质粒转染入破骨前体细胞

3 μl Fugene6(由何湘君惠赠)一滴滴加到 97 μl 无血清的 a-MEM 培养液中,室温放置 5 min。然后将 1 μg 质粒 DNA 加到另一 Ep 管中。将稀释的 Fugene6 加到含 DNA 的 Ep 管中,轻微混合,室温放置

15 min。将以上混合物加到含破骨细胞的培养皿中,轻微悬转使其分布均匀。置于 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养。24 h 后换成新鲜培养液。48 h 后将转染 pLxSN-eGFP 的破骨细胞置于倒置荧光显微镜下观察绿色荧光的表达。设未转染质粒的破骨前体细胞为阴性对照。将转染 pZipSV40Tag 质粒的破骨细胞用 500 mg/ml 的 G418 筛选。每 3 d 更换 1 次培养液。设未转染质粒的破骨前体细胞为阴性对照。同样方法将质粒 pLxSN-eGFP 转染入 PT67 包装细胞中,作为阳性对照。

(4) 含 GFP 的逆转录病毒的包装及感染筛选

如上所述,将质粒 pLxSN-eGFP 转染入 PT67 包装细胞中,两周后出现抗性克隆,挑出抗性克隆并扩大培养。收集细胞上清液即为含 GFP 的逆转录病毒。将病毒原液按 1:10 加到接种破骨前体细胞的培养皿中,再加终浓度 8 μg/ml 的 polybrene(由何湘君副教授惠赠),置于 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养 2 h(期间要不断晃动培养皿以使病毒液和细胞接触均匀)。2 h 后补充培养液继续培养。24 h 后换新鲜培养液,48 h 后在倒置荧光显微镜下观察。

结 果

1. 大量提取的 pLxSN-eGFP 和 pZipSV40Tag 两种质粒的 CD260/280 均大于 1.80,浓度为 1.0 μg/μl。酶切后得到正确片段。

2. 小鼠骨髓细胞在加入 1,25(OH)₂D₃ 3 d 后出现了个别多核细胞,但以单核细胞占多数。第 8 天,多核细胞达到最多。

3. pLxSN-eGFP 质粒转染入破骨前体细胞 48 h 后倒置荧光显微镜下未见到发绿色荧光的阳性细胞。而对照组 PT67 细胞在转染 pLxSN-eGFP 后可以观察到发绿色荧光的细胞(图 1)。



图 1 PT67 转染 pLxSN-eGFP 后发绿色荧光 pZipSV40Tag 质粒转染入破骨前体细胞,加 G418 筛选后未发现抗性克隆。

4. 含 GFP 的逆转录病毒感染破骨前体细胞后, 倒置荧光显微镜下未见到阳性细胞。

讨 论

SV40 是 60 年代初发现分离的猴肾病毒, 人为其自然宿主, 由结构蛋白 (VP1, VP2, VP3) 和两种抗原 (LT 和 st) 组成^[4]。LT 抗原为细胞转化启动所必需, 对转化起决定作用。st 抗原对细胞的转化是非必需的, 但可以起到加强的作用, 两者共同维持转化表型。SV40 早期转录区基因编码 LT 和 st 抗原。将 SV40 早期转录区基因导入细胞内是最常用的细胞永生化的方法, 通过这种方法已先后使支气管、肝内胆管、宫颈等上皮细胞永生。SV40 大 T 抗原中至少有 4 个区域与调控细胞生长速率有关, 其介导的永生机制是多方面的。它能灭活 3 种细胞生长抑制因子 pRB, p53, SEN6 的功能, 同时其介导的永生需要端粒酶活性的稳定^[5]。1998 年 Chen 等对骨髓来源的破骨前体细胞转染 SV40Tag, 建立了破骨前体细胞永生细胞系——MOCP-5, 并且认为 MOCP-5 与 MS12 共同培养后, 95% 的细胞可以形成 TRAP⁺ 多核的破骨样细胞^[6]。因此, 我们选用 pZ-*ipSV40Tag* 质粒转染入小鼠骨髓来源的破骨前体细胞。采用的 Fugene6 是脂质体的新类型, 对血清不敏感, 转染效率高于同类产品。结果发现同样浓度的 pLxSN-eGFP 在破骨前体细胞中不表达, 而在 PT67 细胞中表达。因此我们认为以脂质体为介质转移外源基因入破骨细胞的方法难以奏效。

进而我们又包装了含 GFP 的逆转录病毒, 将其感染破骨前体细胞, 作为下一步包装含 SV40 逆转录病毒的方法对照。遗憾的是未发现阳性细胞。逆转录病毒载体是现今最为普遍的基因转移载体, 它能够整合入宿主染色体, 因而感染效率较高, 但它只能感染复制分裂期的细胞。细胞分裂增殖越旺盛, 其感染效率越高。我们采用骨髓诱导出的破骨前体细胞为宿主细胞, 目的就是希望保持其一定的增殖能力。但从含 GFP 病毒感染破骨细胞出现阴性结果的情况来看, 这种破骨前体细胞的增殖能力很有限。推测这一阶段的破骨细胞即已失去增殖能力, 其向成熟破骨细胞的发展过程只是破骨细胞特有表型的分化过程, 而没有破骨细胞的增殖^[7]。同时, 也存在另一个可能性, 即由于整合位点的随机性, 造成基因表达水平的差异。另一方面, 小鼠骨髓来源的破骨前体细胞数量较少, 纯度不高, 也限制了病毒感染的

效率。综合考虑以上因素, 我们认为逆转录病毒载体不是破骨细胞转基因永生化的最佳载体。

总之, 破骨细胞永生这一课题难度较大, 文献鲜有报道。但其原理是可行的。它可以突破破骨细胞研究领域长期以来亟需解决但又未能解决的方法学上的局限。因此我们认为在这一课题上的进一步尝试是非常有意义的。考虑可以从以下几点入手。

①寻找更合适的病毒载体形式。如利用腺相关病毒可以感染静止期细胞的特点, 将永生基因构建到腺相关病毒载体上, 包装出腺相关病毒, 再感染破骨细胞。

②构建转基因动物的模型。将带有特殊启动子的外源基因显微注射到受精卵, 使其在后代的特定组织中表达, 取其骨髓细胞, 体外诱导分化即成永生化的破骨细胞。Boyce^[8] 和 Hentunen^[9] 在这一方面都进行了成功的尝试。

③利用细胞内转导肽的特定结构域 (一般 10 ~ 30 个氨基酸), 将其一结构域与某些蛋白、多肽、寡核苷酸等化合物结合或融合表达, 使这些生物大分子以非受体依赖方式进入细胞^[10]。

④进一步探索体外纯化破骨细胞的方法, 提高宿主细胞的数量和纯度, 以提高转基因的效率。

参 考 文 献

- 1 Anton R, Kordower JH, Maidment NT, et al. Neural-targeted gene therapy for rodent and primate hemiparkinsonism. *Exp Neurol*, 1994, 127: 207-218.
- 2 Shay JW, Wright WE, Werbin H. Defining the molecular mechanisms of human cell immortalization. *Biochim Biophys Acta*, 1991, 1072: 1-7.
- 3 Lustig AJ. Crisis intervention: the role of telomerase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 3339-3341.
- 4 Fanning E, Knippen R. Function of simian virus 40 large tumor antigen. *Ann Rev Biochem*, 1992, 61: 55.
- 5 Hara E, Tsurui H, Shinozaki A, et al. Cooperative effect of antisense-Rb, antisense-p53 oligomers on the extension of life span in human diploid fibroblasts, TIC-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 179: 528-534.
- 6 Chen W, Li YP. Generation of mouse osteoclastogenic cell lines immortalized with SV40 large T antigen. *J Bone Miner Res*, 1998, 13: 1112-1123.
- 7 Kurihara N, Chenu C, Miller M, et al. Identification committed mononuclear precursors for osteoclast-like cells formed in long term human marrow cultures. *Endocrinology*, 1991, 126: 2733-2741.
- 8 Boyce BF, Wright K, Reddy SV, et al. Targeting simian virus 40 T antigen to the osteoclast in transgenic mice causes osteoclast tumors and transformation and apoptosis of osteoclast. *Endocrinology*, 1995, 136: 5751-5759.
- 9 Hentunen TA, Reddy SV, Boyce BF, et al. Immortalization of osteoclast precursors by targeting bcl-xl and simian virus 40 large T antigen to the osteoclast lineage in transgenic mice. *J Clin Invest*, 1998, 102: 88-99.
- 10 Ford KG, Souberbielle BE, Darling D, et al. Protein transduction: an alternative to genetic intervention? *Gene Therapy*, 2001, 8: 1-4.

(收稿日期: 2002-01-04)