

重组腺相关病毒介导人端粒酶逆转录酶基因 转染对人髓核细胞功能的影响

吴剑宏, 阮狄克, 王德利, 张超, 何勃, 王超锋, 张燕, 辛洪奎, 顾韬, 徐成, 刘玥
(海军总医院骨科 100048 北京市)

【摘要】目的:研究重组腺相关病毒介导人端粒酶逆转录酶基因(recombinant adenoassociated virus vector-mediated human telomerase reverse transcriptase, rAAV-hTERT)转染对体外培养人髓核细胞功能的影响。**方法:**利用机械与酶消化的方法获得均一性的人椎间盘髓核细胞, 将构建好的 rAAV-hTERT 转染 P2 代体外单层培养的髓核细胞。用重组腺相关病毒-增强型绿色荧光蛋白(recombinant adenoassociated virus vector-mediated enhanced green fluorescent protein, rAAV-EGFP)作为标记基因观察细胞转染效率, 按感染复数(multiplicity of infection, MOI) 10^3 、 10^4 、 10^5 病毒基因组拷贝数/细胞(vector genomes/cell, v.g/cell)设组, 流式细胞仪检测, 筛选病毒转染的最佳 MOI; 设立 rAAV-hTERT 转染组、AAV 空病毒转染组及空白细胞对照组, 用反转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reareaction, RT-PCR)及免疫印迹(Western-blot)方法检测 rAAV-hTERT 转染后 hTERT 基因在髓核细胞内的表达, 实时定量聚合酶链反应(real-time quantitative PCR)及酶联免疫法(enzyme linked immunosorbent, ELISA)检测髓核细胞合成Ⅱ型胶原及蛋白多糖能力的变化。**结果:**rAAV-EGFP 转染细胞后第 7 天时, MOI 为 10^5 v.g/cell 组转染效率可达 73.9%, 明显高于 MOI 10^3 、 10^4 v.g/cell 组($P<0.05$); rAAV-hTERT 转染组在转染后的第 7、60、90、120 天均可检测到 hTERT 基因的表达, 而其他两组则无表达; 转染 rAAV-hTERT 后 120d 之前, rAAV-hTERT 转染组分泌蛋白多糖及Ⅱ型胶原较其他两组均明显增高($P<0.05$), 而两对照组之间则始终无明显差异($P>0.05$)。**结论:**rAAV-hTERT 能成功转染人椎间盘髓核细胞并正确表达, rAAV-hTERT 转染能有效延长髓核细胞分泌Ⅱ型胶原及蛋白多糖功能。

【关键词】髓核细胞; 腺相关病毒; 人端粒酶逆转录酶基因; 基因治疗

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2012.09.15

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2012)-09-0843-07

Effect on function of human nucleus pulposus(HNP) cells transfected by the recombinant adeno-associated virus vector-mediated human telomerase reverse transcriptase gene/WU Jianhong, RUAN Dike, WANG Deli, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2012, 22(9): 843-849

【Abstract】 Objectives: To investigate the effects on the function of HNP cells transfected by the rAAV-hTERT. **Methods:** The cultured homogeneous HNP cells were obtained and released by mechanical dissection and enzyme digestion. The second generation of HNP cells cultured in monolayer culture was transfected by rAAV-hTERT. rAAV-EGFP was firstly used as mark gene to detect the efficiency of the transduction at MOI 10^3 , 10^4 , 10^5 vector genomes/cell(v.g/cell) by flow cytometry. Three groups were designed for the experiment: (1)group 1: HNP cells transfected by rAAV-hTERT; (2)control 1: HNP cells transfected by AAV; (3) control 2: HNP cells as noviral transduction group. The expression of the hTERT gene was determined by RT-PCR and Western-blot. Cellular matrix transcript/translated levels were determined by real-time quantitative PCR/Elisa, respectively. **Results:** The expression of the rAAV-EGFP was 73.9% for MOI(10^5 v.g/cell) group which was much higher than the MOI(10^3 , 10^4 v.g/cell) groups at 7 days after transfection. The expression of the rAAV-hTERT was successfully detected at 7, 60, 90, 120 days after transfection in rAAV-hTERT group, while not present in two controls. The expressional levels of collagen 2 and aggrecan of rAAV-hTERT group

基金项目:国家自然科学基金重点支持项目(批准号:30730095)

第一作者简介:男(1978-),主治医师,博士后,研究方向:脊柱外科

电话:(010)68780323 E-mail:wujianhong1978@yahoo.com.cn

通讯作者:阮狄克 E-mail:ruandike@yahoo.com.cn

were much higher than two controls in 120 days after transfection($P<0.05$), while the two controls showed no difference from the beginning to the end($P>0.05$). **Conclusions:** rAAV-hTERT can infect the HNP cells and also express in the transfected cells. The transfection of rAAV-hTERT can improve the cell potency to produce collagen 2 and aggrecan.

【Key words】 Nucleus pulposus cells; Adeno-associated virus; Human Telomerase reverse transcriptase gene; Gene therapy

【Author's address】 Department of Orthopedic Surgery, the Navy General Hospital, Beijing, 100048, China

椎间盘退变疾病的生物学治疗是近年来脊柱外科基础研究领域的热点之一^[1-3]。髓核细胞作为分泌髓核内基质的主要载体,其在正常髓核组织内数目较少^[4],在体外培养条件下容易发生去分化,丧失正常的细胞表型^[5],这就限制了髓核细胞生物学治疗的应用。因而,如何获得一个功能良好的髓核细胞是生物学治疗能否顺利开展的一个关键。随着对人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)基因研究的深入,通过将 hTERT 基因转入细胞,从而使细胞延长寿命,甚至使细胞“永生”成为可能^[6]。腺相关病毒是目前常用的一种转基因病毒载体^[7],回顾目前国内外文献,未检索到以重组腺相关病毒(rAAV)为载体介导 hTERT 基因转染人髓核细胞的相关研究报道。本研究旨在通过 rAAV 为载体介导 hTERT 基因转染人椎间盘髓核细胞,观察 hTERT 基因对髓核细胞合成和分泌细胞外基质能力的影响,为进一步的体内研究提供证据。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

DMEM 培养液 (Hyclone)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, Gibco), 0.25% Trypsin-EDTA (Gibco), Trizol 液 (Invitrogen), 胰蛋白酶、Ⅱ型胶原酶、PBS (碧云天)。PCR、RT-PCR 试剂盒 (Promega), 人Ⅱ型胶原及蛋白多糖 ELISA 试剂盒 (BD Pharmingen), 75 μ m 细胞滤膜 (Millipore), 6 孔培养板 (Corning), PCR 引物根据 PCR 引物设计原则,按照人 hTERT、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、人Ⅱ型胶原及蛋白多糖基因序列,利用 PrimePremier 5 软件设计,由北京博迈德生物公司合成。rAAV-hTERT(病毒滴度= 1×10^{12} v.g/ml)由北京五加和生物技术公司包装, rAAV-EGFP (病毒滴度= 5×10^{11} v.g/ml)由本元正阳公司包装。

1.2 人椎间盘髓核细胞的分离与培养

椎间盘髓核标本来源于 1 例 19 岁男性的正常椎间盘髓核组织(经患者本人同意并签署同意书),将标本用 PBS 清洗 2 遍后,仔细分离出髓核组织,将髓核组织修剪成 1mm³ 大小的组织块, 0.025% Ⅱ型胶原酶置于 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中消化 14~16h,将消化液用 75 μ m 的细胞滤膜过滤,收集细胞以 1×10^5 /孔的密度培养于 6 孔培养板,以 DMEM (10%FBS) 为培养液,置于 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱中,2~3d 换液一次。

1.3 rAAV-hTERT 转染体外培养人髓核细胞

用 rAAV-EGFP 作为标记基因观察二代髓核细胞的转染效率(转染方法同下),按感染复数(multiplicity of infection, MOI)分别为 10^3 、 10^4 、 10^5 v.g/cell 设组,流式细胞仪检测,筛选转染效率最高的 MOI,为 rAAV-hTERT 的转染提供最佳的 MOI。病毒转染方法:二代髓核细胞达到 70%~80% 融合时进行 rAAV-hTERT 转染,计数细胞,用 PBS 清洗细胞两次,按筛选出的最佳 MOI 数加入病毒转染液 2ml,置于 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱中培养 2h,弃去病毒转染液,无血清 DMEM 培养基清洗两次,加入 DMEM (10%FBS) 培养基,培养传代,于不同的时间点取出部分细胞进行检测,实验共分三组:(1)实验组:rAAV-hTERT 转染髓核细胞组;(2)对照组 1:rAAV 空病毒转染组;(3)对照组 2:髓核细胞空白对照组。

1.4 rAAV-hTERT 转染后转录水平的检测(RT-PCR)

用半定量反转录聚合酶链反应来检测 hTERT 基因及 GAPDH 基因(内参照)在 mRNA 水平上的表达,在转染后的第 7、60、90、120、150 天时各取 6 孔 rAAV-hTERT 转染髓核细胞、rAAV 空病毒转染及空白髓核细胞,将各组细胞各自混匀后,用 trizol 法提取各组 RNA,然后利用 AMV random dT primer 和 AMV 在 42℃ 条件下孵育 1h,将 RNA 反转录成 cDNA,以 cDNA 为模板在 PCR 仪上进行 PCR 反应,PCR 反应条件如

下: 95℃ 5min, 94℃ 45s, 56℃ 45s, 72℃ 45s, 33 个循环, 72℃ 10min。引物序列为: GAPDH 上游引物: 5'-GAAGGTCGGAGTCAACGG-3'; GAPDH 下游引物: 5'-GGAAGATGGTGATGGGATT-3'; hTERT 基因上游引物: 5'-GCCAGCATCATCAAACCC-3'; hTERT 基因下游引物: 5'-CCACGAAGTGTGCGCATGTAC-3', PCR 产物以 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.5 II 型胶原及蛋白多糖的 mRNA 检测 (real-time quantitative PCR)

在转染后的第 7、60、90、120、150 天各取六孔 rAAV-hTERT 转染髓核细胞、AAV 空病毒转染及空白髓核细胞, 将各组细胞各自混匀后, 用 trizol (Invitrogen) 法提取各组 RNA, 将 RNA 反转录成 cDNA, 方法同前, 以 cDNA 为模板, 按照 SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) 试剂盒说明书进行操作, ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪 (ABI) 上进行 PCR 反应。反应条件为: 95℃ 下预变性 2min, 然后 94℃ 变性 30s, 60℃ 复性 30s, 程序循环 50 次。引物序列为: II 型胶原: 上游引物 5'-GGCAATAGCAGGTTACGTACA-3', 下游引物 5'-CGATAACAGTCTTGCCCCACTT-3'; 蛋白多糖: 上游引物 5'-TCGAGGACAGCGAGGCC-3', 下游引物 5'-TCGAGGGTGTAGCGTGTAGAGA-3'。分析 rAAV-hTERT 转染髓核细胞相对于空白髓核细胞在表达量上的差异性。每次循环读取 CT 值。裂解反应为从 95℃ 到 60℃ 每 0.2℃ 读取 CT 值, 得到裂解曲线。以 GAPDH 作为内参, 用以标准化蛋白多糖和 II 型胶原 mRNA 含量。将各基因所获得的扩增循环数 (cycle threshold, CT) 同内参基因 CT 值做差来标准化。采用三复孔检测, 取 CT 平均值。用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算目的基因的相对表达量。实验单独重复三次 ($n=3$)。

1.6 rAAV-hTERT 转染后 hTERT 蛋白水平表达的检测 (western-blot)

在转染后的第 7、60、90、120、150 天各取 6 孔 rAAV-hTERT 转染髓核细胞、AAV 空病毒转染及空白髓核细胞, 以冷 PBS 洗涤 3 次后, 加入预冷的细胞裂解液 (1% NP-40, 20mmol/L Tris pH 7.4, 150mmol/L NaCl, 10% 甘油, 1mmol/L 苯甲基磺酰氟 (PMSF), 10ml 抑菌肽, 1g/ml 亮肽素, 500mmol/L 正磷酸钠), 混匀, 置于冰上 30min, 4℃ 12000r/min 离心 20min, 收集上清, BioRad 法蛋白

定量后调整蛋白浓度一致。加等量的 2×SDS 上样缓冲液, 94℃ 变性 10min, 配制 150L 的聚丙烯酰胺分离胶, 每孔上样 60g 蛋白, 电泳分离蛋白后, 转移至硝酸纤维素膜, 5% 的脱脂牛奶封闭 1h 后, 各样品用 8% SDS-PAGE 电泳分离后转移到硝酸纤维素膜。转移好的硝酸纤维素膜用 5% 脱脂奶粉 + TBS 37℃ 封闭 1h, 鼠抗人 hTERT 蛋白单抗 (1:1000, Abcam) 4℃ 孵育过夜, TBS/0.1% Tween-20 洗涤 3 次后, 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔/鼠 (1:2000, Abcam), 37℃ 孵育 1h, TBS/0.1% Tween-20 洗膜后, 用增强化学发光法检测目的条带的表达。图像扫描进行 Western blot 免疫印迹分析。另配置 120g/L 的分离胶, 按传统方法做内参 GAPDH 的 Western blot 免疫印迹。

1.7 髓核细胞培养上清液中 II 型胶原及蛋白多糖含量检测 (ELISA)

在转染后的第 7、21、60、90、120 天、150 天, 收集传代前 72h 内的细胞培养液上清, 每组细胞平均取 3 孔细胞培养上清, 每孔细胞培养液体积数为 2ml, 细胞融合状态为 80%~90%, 将 BDNF 标准品和细胞培养上清液加入 96 孔板, 每个样品设 3 个复孔, 根据试剂盒说明进行操作。

1.8 统计学分析

所有测量数据均用 SPSS 13.0 统计软件分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对灰度值变化比较采用单因素方差分析, 对流式检测结果、实时定量 PCR 结果及 ELISA 检测结果进行方差分析, 检验标准设 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 最佳转染效率的筛选及表达时效的观察

流式细胞仪测定 rAAV-EGFP 转染荧光强度表达结果显示, MOI 为 10^5 v.g/cell 转染组的转染效率最高 (图 1a~c) ($P < 0.05$), 转染髓核细胞第 7 天时, 转染效率可达到 73.9% (图 1a), 但随着细胞传代次数的增加, 绿色荧光表达阳性细胞比例呈逐渐减少趋势, 至培养第 150 天, 10^5 v.g/cell 转染组绿色荧光蛋白表达阳性率约 8.07% (图 1d)。

2.2 hTERT 基因 mRNA 及蛋白水平表达结果

RT-PCR 检测结果显示, 两对照组只有内参条带 (GAPDH, 220bp), 而 rAAV-hTERT 转染组在转染后的第 7、60、90、120 天均可检测到 hTERT 基因 (128bp) 的表达, 而在转染后第 150 天, 未能

检测到 hTERT 基因表达,western-blot 检测结果和 RT-PCR 检测结果显示了一致性。通过对 RT-PCR 及 western-blot 条带灰度值的比较分析,转染后第 7 天 hTERT 基因的表达的相对水平最高 ($P<0.05$),而随着细胞传代次数增加,hTERT 基因表达的相对水平逐渐降低(图 2)。

2.3 髓核细胞合成细胞外基质的 mRNA 检测 (real-time quantitative PCR)

定量 PCR 结果显示,Ⅱ型胶原及蛋白多糖的表达水平以转染后第 21 天为相对高点 ($P<0.05$),此后表达量随时间增加而递减,在转染后 90d 之前,实验组表达水平较对照组明显增高 ($P<0.05$),而从病毒转染 120d 后,实验组及对照组在Ⅱ型胶

原及蛋白多糖的 mRNA 表达水平上无统计学差异 ($P>0.05$)(表 1)。

2.4 髓核细胞培养上清液中Ⅱ型胶原及蛋白多糖含量检测

ELISA 检测结果显示,在转染后的各时间点中,实验组Ⅱ型胶原及蛋白多糖在转染后第 21 天达到最高 ($P<0.05$),之后呈逐渐下降趋势,在第 120 天前,Ⅱ型胶原及蛋白多糖表达量均较对照组明显增高 ($P<0.05$),而转染后 150d 时,实验组和对照组在Ⅱ型胶原及蛋白多糖表达量上无明显差异 ($P>0.05$)。两对照组则随着细胞培养代次及时间的增长,细胞外基质的合成一直呈下降趋势 (表 2)。

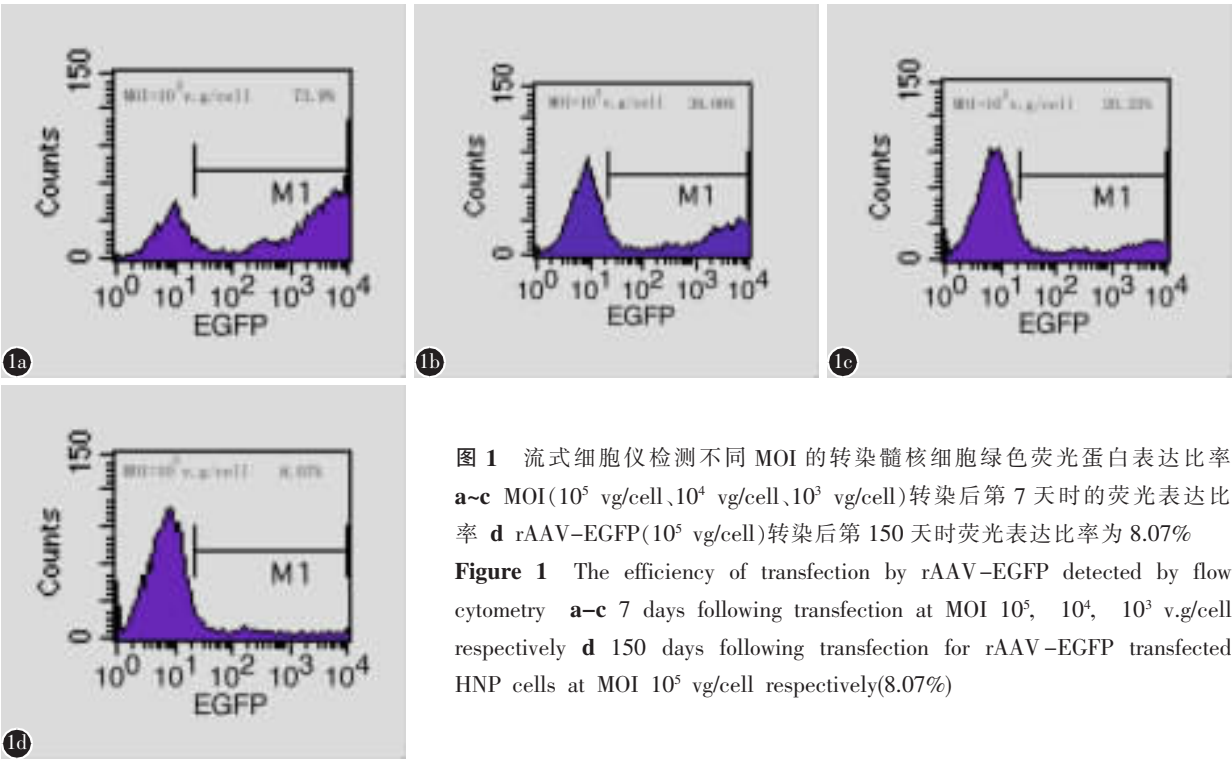


图 1 流式细胞仪检测不同 MOI 的转染髓核细胞绿色荧光蛋白表达比率
a~c MOI(10^5 vg/cell、 10^4 vg/cell、 10^3 vg/cell)转染后第 7 天时的荧光表达比率
d rAAV-EGFP(10^5 vg/cell)转染后第 150 天时荧光表达比率为 8.07%
Figure 1 The efficiency of transfection by rAAV-EGFP detected by flow cytometry a~c 7 days following transfection at MOI 10^5 , 10^4 , 10^3 v.g/cell respectively d 150 days following transfection for rAAV-EGFP transfected HNP cells at MOI 10^5 vg/cell respectively(8.07%)

表 1 实时定量 PCR 检测 rAAV-hTERT 转染组髓核细胞相对空白对照组髓核细胞在不同时间点的Ⅱ型胶原及蛋白多糖在 mRNA 表达水平上的差异

指标 Indexes	7d	21d	60d	90d	120d	150d
Ⅱ型胶原 Collagen Ⅱ	2.07±0.10 ^①	7.12±0.18 ^①	3.06±0.10 ^①	1.36±0.05 ^①	1.14±0.08	1.03±0.14
蛋白多糖 Aggrecan	1.21±0.04 ^①	2.57±0.12 ^①	2.14±0.05 ^①	1.61±0.04 ^①	0.92±0.02	0.90±0.03

注:①在同一时间点,相对于空白对照组, $P<0.05$
Note: ①rAAV-hTERT group relative to HNP group at the same time, $P<0.05$

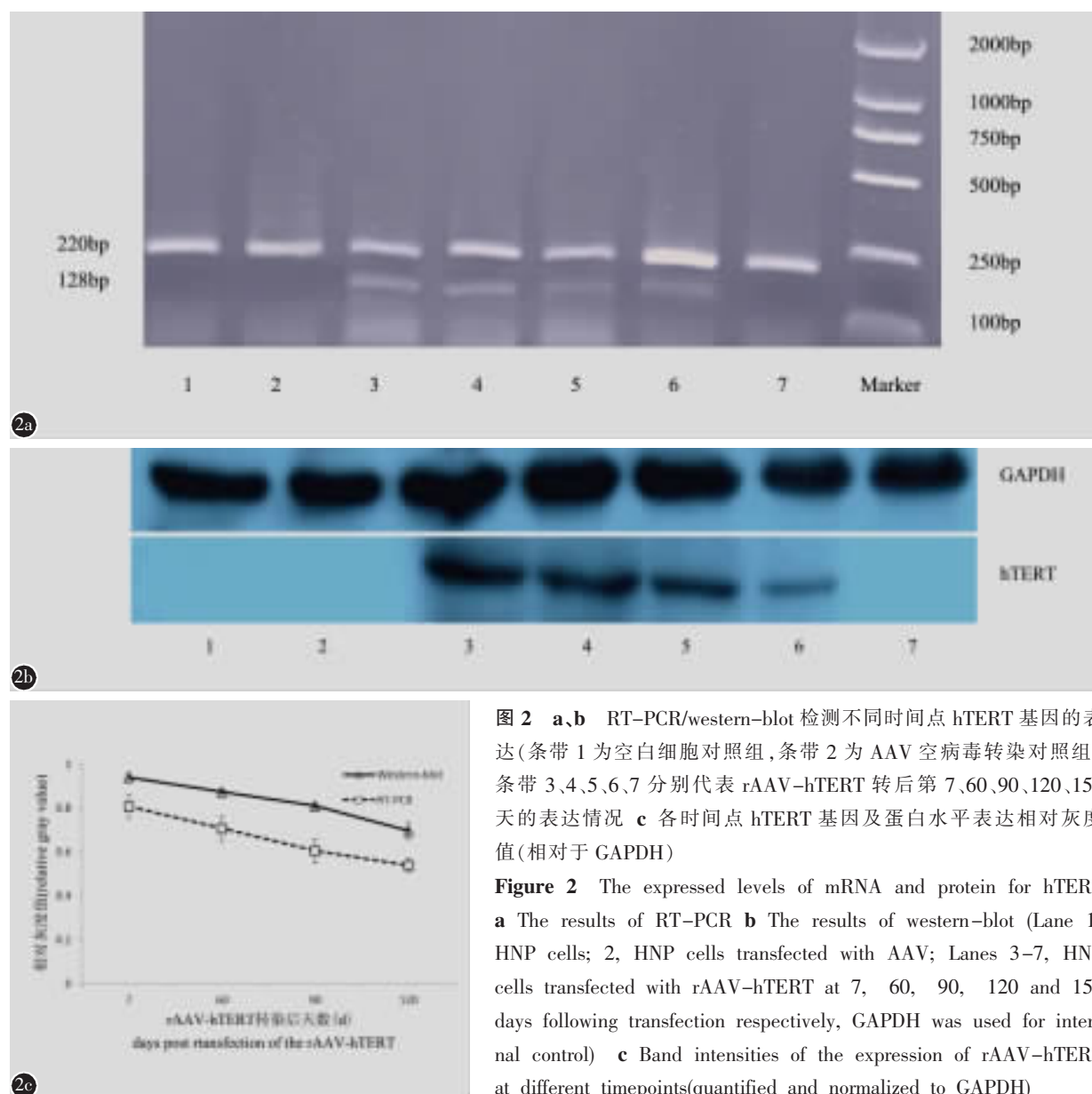


图2 a、b RT-PCR/western-blot 检测不同时间点 hTERT 基因的表达(条带 1 为空白细胞对照组,条带 2 为 AAV 空病毒转染对照组,条带 3、4、5、6、7 分别代表 rAAV-hTERT 转后第 7、60、90、120、150 天的表达情况 c 各时间点 hTERT 基因及蛋白水平表达相对灰度值(相对于 GAPDH)

Figure 2 The expressed levels of mRNA and protein for hTERT **a** The results of RT-PCR **b** The results of western-blot (Lane 1, HNP cells; 2, HNP cells transfected with AAV; Lanes 3-7, HNP cells transfected with rAAV-hTERT at 7, 60, 90, 120 and 150 days following transfection respectively, GAPDH was used for internal control) **c** Band intensities of the expression of rAAV-hTERT at different timepoints(quantified and normalized to GAPDH)

表 2 ELISA 检测各组细胞不同时间点分泌至细胞培养基中的蛋白多糖及 II 型胶原浓度变化(ng/ml)

Table 2 Elisa detection of concentrations for collagen II and aggrecan secreted into the culture medium at different time

天数 (days)	蛋白多糖 Aggrecan			II 型胶原 Collagen II		
	rAAV-hTERT 组 rAAV-hTERT group	AAV 组 AAV group	HNP 组 HNP group	rAAV-hTERT 组 rAAV-hTERT group	AAV 组 AAV group	HNP 组 HNP group
7	2.60±0.11	2.60±0.09	2.50±0.22	65.57±2.08 ^①	30.42±1.55	29.50±1.6
21	3.19±0.11 ^{①②}	1.79±0.11	1.74±0.13	79.04±2.31 ^{①②}	15.10±0.73	14.50±1.43
60	2.86±0.13 ^①	1.75±0.09	1.73±0.07	49.28±1.22 ^①	10.15±0.94	10.92±1.82
90	2.02±0.14 ^①	1.38±0.07	1.34±0.08	40.36±1.39 ^①	9.60±0.41	9.29±0.88
120	1.32±0.19 ^①	1.22±0.14	1.06±0.08	38.23±1.20 ^①	8.92±0.52	8.26±0.77
150	1.12±0.06	1.11±0.09	1.06±0.06	7.57±1.00	6.81±0.43	6.99±0.30

注:①与 AAV 组及 HNP 组同一时间点相比, $P<0.05$; ②与同组内其他时间点相比, $P<0.05$

Note: ①Compared with AAV group and HNP group at the same time, $P<0.05$; ②Compared with other time points in rAAV-hTERT group, $P<0.05$

3 讨论

我们通过 AAV 载体将 hTERT 基因导入体外培养人椎间盘髓核细胞,并证实导入的 hTERT 基因能在髓核细胞内正确表达,持续表达时间长达 120d 余。AAV 作为一个基因治疗领域应用非常广泛的病毒类载体,其优点在于:(1)低致病性,低免疫原性,安全性好。迄今为止尚未在人类和哺乳动物身上发现和 AAV 相关的疾病^[8,9],Lattermann 等对 AAV 在未经免疫的兔椎间盘内的相关免疫指标进行了检测后,认为 AAV 对于椎间盘髓核组织的转基因表达是非常有效的^[10];(2)表达时间长,其他的病毒类载体通常在转染后的几天内达到高峰,继而在几周内就失去基因的表达,而 AAV 已被证实在活体动物模型中的表达能维持数年甚至终身。Chung 等^[11]利用脂质体为载体将 hTERT 基因转染入牛椎间盘髓核细胞,结果达到了延长髓核细胞功能及寿命的作用,但是,脂质体属于非病毒类载体,它是一种瞬时表达系统,不能持久稳定表达目的基因,转染 2 个月时,就无法检测 hTERT 基因的表达,而我们以 rAAV-hTERT 转染髓核细胞,在转染后第 120 天,仍可检测到 hTERT 基因的表达,证实了 AAV 载体在表达的时效性上优于脂质体载体;(3)转染效率较高,能转染分裂期和非分裂期细胞^[12],本实验中通过对标记基因 EGFP 的检测,在转染后 7 天,EGFP 表达比率高达 73.9%。对于椎间盘退变这种慢性疾病来说,我们需要转基因能在髓核细胞内获得一个长期、安全、高效的表达,AAV 似乎能满足这些基本条件,这也是我们选择 AAV 作为基因治疗载体的主要原因。

实验中我们也发现,AAV 作为基因治疗的载体的表达也存在着时效性,表达效率会随着培养时间及传代次数的增加而逐渐衰减,hTERT 基因的相对表达高峰出现在转染后第 7 天,此后,随着培养时间的延长及传代次数的增加,hTERT 基因在髓核细胞内的表达呈递减趋势,至转染后的第 150 天,未能检测到 hTERT 基因在髓核细胞内的表达。rAAV-EGFP 作为标记基因也显示了同样的表达效率衰减过程,转染初期,EGFP 表达比率高达 73.9%,然而,当细胞培养至 150 天左右时,表达比率仅为 8.07%,这可能和 AAV 自身的缺陷有关^[13]:(1)以 AAV 为载体的基因治疗会在分裂的宿主细胞细胞核上形成一个附加的串联体结构,

由于这段附加的 DNA 片段是不能随着宿主细胞的分裂而复制的,因而,随着细胞的分裂增殖,AAV 的 DNA 结构会逐渐丢失;(2)AAV 病毒的自我复制还存在一定缺陷,因而在未感染 AAV 病毒的细胞中不能扩大感染率。有学者发现 AAV 转染体外培养关节软骨细胞 150d 后,仍可检测到目的基因的表达^[14],我们认为这种表达时间上的差异可能是由于髓核细胞和软骨细胞之间的生物活性差异造成的。

端粒酶能通过维持端粒长度而帮助细胞逃过衰老过程,然而,正常体细胞自身并不能表达足够的端粒酶而维持端粒长度^[15]。因而,通过转入外源性的 hTERT 基因有可能实现这一目的,迄今为止,学者们利用 hTERT 基因已经在 19 种不同的组织 35 种细胞上进行了验证,证实 hTERT 基因能够延长细胞的生命,维持细胞的功能^[16]。通过对髓核细胞分泌细胞外基质功能的对比研究,我们发现相对于 AAV 空病毒转染组及髓核细胞空白对照组而言,无论在基质合成的基因水平还是蛋白水平,rAAV-hTERT 转染髓核细胞分泌 II 型胶原及蛋白多糖能力均较两对照组明显延长。在转染后第 21 天,rAAV-hTERT 转染髓核细胞分泌细胞外基质出现相对的高值 ($P<0.05$),这可能和 AAV 进入细胞内的限速步骤有关。有研究显示,AAV 在不同的细胞组织中的最高表达可从几天到几周不等^[17]。而两对照组髓核细胞自培养传代开始,即出现了 II 型胶原及蛋白多糖合成分泌随时间延长而下降,在培养 21d 后,两对照组出现了细胞外基质含量的急剧下降,我们分析可能是对照组细胞在 21 天左右发生了细胞去分化,进而导致细胞分泌功能急剧降低。在转染 150d 时,3 组细胞的细胞外基质合成能力无明显差别 ($P>0.05$),我们认为可能是失去了 hTERT 基因作用的髓核细胞在 150d 左右也发生了细胞的去分化,因而,在 150d 左右时,3 组细胞在细胞合成能力上无明显差别,其具体的作用机制还有待于进一步的研究。

研究中发现,选用 AAV 作为基因治疗载体也暴露出了一些缺陷:如包装长度有限,要求包装的基因片段 $<5\text{kb}$,因而限制了将 hTERT 基因和 EGFP 基因片段同时包装在 AAV 病毒载体上,影响了对基因表达的直观观察,因而寻找更高效、便捷、安全的基因治疗载体是进一步研究的方向。课

题选用 hTERT 基因转染人髓核细胞,区别于其他的髓核细胞基因治疗方法,是着眼于通过 hTERT 基因的表达,改变细胞的衰老进程,从而保持细胞的活力,从实验结果来看,hTERT 基因的转入及表达,能延长体外培养髓核细胞的基质表达,为进一步的体内实验提供了参考。

4 参考文献

1. Cheung KM, Karppinen J, Chan D, et al. Prevalence and pattern of lumbar magnetic resonance imaging changes in a population study of one thousand forty-three individual [J]. Spine, 2009, 34(9): 934-940.
2. Roughley PJ. Biology of intervertebral disc aging and degeneration: involvement of the extracellular matrix[J]. Spine, 2004, 29(23): 2691-2699.
3. Wang JC, Kim JS. Biological or genetic modulation of intervertebral disk degeneration [J]. Current orthopaedic practice, 2008, 19(4): 366-371.
4. Roberts S, Evans H, Trivedi J, et al. Histology and pathology of the human intervertebral disc [J]. J Bone Joint Surg Am, 2006, 88(Suppl 2): 10-14.
5. Gruber HE, Hanley EN Jr. Human disc cells in monolayer vs 3D culture: cell shape, division and matrix formation[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2000, 1: 1.
6. Robertson DM, Li L, Fisher S, et al. Characterization of growth and differentiation in a telomerase immortalized human corneal epithelial cell line [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(2): 470-478.
7. Daya S, Berns KI. Gene therapy using adeno-associated virus vectors[J]. Clin Microbiol Rev, 2008, 21(4): 583-593.
8. Wu Z, Asokan A, Grieger JC, et al. Single amino acid changes can influence titer, heparin binding, and tissue tropism in different adeno-associated virus (AAV) serotypes[J]. J Virol, 2006, 80(22): 11393-11397.
9. Wu Z, Asokan A, Samulski RJ. Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy [J]. Mol Ther, 2006, 14(3): 316-327.
10. Lattermann C, Oxner WM, Xiao X, et al. The adeno associated viral vector as a strategy for intradiscal gene transfer in immune competent and pre-exposed rabbits[J]. Spine, 2005, 30(5): 497-504.
11. Chung SA, Wei AQ, Connor DE, et al. Nucleus pulposus cellular longevity by telomerase gene therapy[J]. Spine, 2007, 32(11): 1188-1196.
12. Dinculescu A, Glushakova L, Min SH, et al. Adeno-associated virus-vectored gene therapy for retinal disease[J]. Hum Gene Ther, 2005, 16(6): 649-663.
13. Gonçalves MA. Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector[J]. Virol J, 2005, 2: 43.
14. Madry H, Cucchiaroni M, Terwilliger EF, et al. Recombinant adeno-associated virus vectors efficiently and persistently transduce chondrocytes in normal and osteoarthritic human articular cartilage[J]. Hum Gene Ther, 2003, 14(4): 393-402.
15. Masutomi K, Yu EY, Khurts S, et al. Telomerase maintains telomere structure in normal human cells [J]. Cell, 2003, 114(2): 241-253.
16. Harley CB. Telomerase therapeutics for degenerative diseases [J]. Curr Mol Med, 2005, 5(2): 205-211.
17. Gilson A, Dreger M, Urban JP. Differential expression level of cytokeratin 8 in cells of the bovine nucleus pulposus complicates the search for specific intervertebral disc cell markers[J]. Arthritis Res Ther, 2010, 12(1): R24.

(收稿日期:2011-09-15 修回日期:2012-03-01)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 彭向峰)