

慢病毒载体介导 HCV 受体基因 *OCN/CD81* 转染 对树鼩骨髓间充质干细胞的影响

陆彩霞^{1,2}, 孙晓梅^{1,2}, 王文广^{1,2}, 匡德宣^{1,2}, 李娜^{1,2}, 仝品芬^{1,2},
李明学^{1,2}, 代解杰^{1,2*}

(1. 中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心; 2. 中国医学科学院医学生物学研究所
实验树鼩标准化与应用研究省创新团队, 昆明 650118)

【摘要】 目的 观察在体外培养条件下,慢病毒载体介导的 HCV 受体基因 *OCN/CD81* 转染对树鼩骨髓间充质干细胞生物学特性的影响及基因的表达情况。**方法** 利用本室分离鉴定保存的树鼩 BM-MSCs,构建含人 *OCN/CD81* 基因的慢病毒载体,并分别将 *CD81* 和 *OCN* 基因转染到 BM-MSCs 中,荧光倒置显微镜和流式细胞仪检测转染效率,CCK8 法检测转染后 BM-MSCs 的细胞增殖情况,成骨成脂细胞诱导分化检测其多向分化潜能。采用实时荧光定量及 WB 方法检测 HCV 受体(*OCN/CD81*) 基因 mRNA 和蛋白表达情况和转染后 BM-MSCs 干性基因的表达。**结果** 以 MOI 为 100 转染含人 *OCN/CD81* 基因的慢病毒载体后,LV-*CD81* 转染效率达 99.4%,LV-*OCN* 转染效率 22.6%。细胞增殖趋势与未转染基因的 BM-MSCs 相似,转染后的 BM-MSCs 仍可以向成骨成脂细胞分化,但能力有所下降。干性基因 *NANOG* mRNA 表达增高,差异有显著性($P < 0.05$),*LIN28A* mRNA 表达下降,差异有显著性($P < 0.05$)。转染后树鼩 BM-MSCs 能高效表达所转入的外源基因。**结论** 构建的含人 *OCN/CD81* 基因的慢病毒载体可以成功转染树鼩 BM-MSCs,并高效表达所转入的基因,转染后对树鼩 BM-MSCs 的多向分化潜能有一定的影响。

【关键词】 *OCN/CD81*;树鼩;骨髓间充质干细胞

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 06-0700-08

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2018.06.005

Effect of lentiviral vector-mediated HCV receptor *OCN/CD81* gene transfection on the tree shrew bone marrow mesenchymal stem cells

LU Caixia^{1,2}, SUN Xiaomei^{1,2}, WANG Wenguang^{1,2}, KUANG Dexuan^{1,2},
LI Na^{1,2}, TONG Pinfen^{1,2}, Li Mingxue^{1,2}, DAI Jiejie^{1,2*}

(1. the Center of Tree Shrew Germplasm Resources, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College; 2. Yunnan Science and Technology Talent and Platform Program, Kunming 650118, China)

Corresponding author: Jiejie Dai. E-mail: dj@imbcams.com.cn

【Abstract】 Objective To observe the effect of lentiviral vector-mediated HCV receptor *OCN/CD81* gene transfection on the biological characteristics and gene expression of tree shrew bone marrow mesenchymal stem cells (BM-

【基金项目】 国家自然科学基金(31601907);云南省科技人才和平台计划项目(2017HC019,2018HB071)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (31601907), Yunnan Science and Technology Talent and Platform program(2017HC019, 2018HB071)。

【作者简介】 陆彩霞(1979—)女,硕士研究生,研究方向:干细胞及人类疾病动物模型研究。Email:lex@imbcams.com.cn

【通信作者】 代解杰(1961—)男,研究员,博士生导师。Email:dj@imbcams.com.cn

MSCs) under in vitro culture conditions. **Methods** BM-MSCs were obtained by our previously described isolation method. We constructed a lentivirus vector containing the human *OCN/CD81* gene and transfected it into BM-MSCs. The transfection efficiency was determined by fluorescence inverted microscopy and flow cytometry, and the proliferation of BM-MSCs was determined using CCK8. Multipotent differentiation was induced by osteoblasts and adipocytes. The gene and protein expression of *OCN/CD81* was detected by RT-PCR and WB, respectively. **Results** The transfection efficiency levels of LV-CD81 and LV-OCN were 99.4% and 22.6%, respectively, on MOI 100. The cell proliferation trends were similar to those of the untransfected BM-MSCs. The BM-MSCs were still undergoing osteogenic and adipogenic differentiation, but this declined. The pluripotency marker of *NANOG* mRNA was increased ($P < 0.05$), while the level of *LIN28A* mRNA was decreased ($P < 0.05$). BM-MSCs could express the transferred gene efficiently after transfection. **Conclusions** The constructed lentivirus vector containing the human *OCN/CD81* gene can be successfully transfected into tree shrew BM-MSCs and the target gene is highly expressed. The multipotent differentiation potential of tree shrew BM-MSCs is clearly affected after transfection.

【Keywords】 *OCN*; *CD81*; tree shrew; bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs) 是一群来源于骨髓组织中的非造血细胞, 具有自我更新和多向分化潜能的细胞^[1]。BM-MSCs 特性稳定, 易于获得及扩增, 连续传代培养和冷冻保存后仍具有多向分化潜能; 能够与各种病毒载体结合, 进行各种基因的转染, 既能保持本身基因的稳定, 还能高效表达所转染的基因^[2]。

Cluster designation 81 (CD81) 是四次跨膜蛋白超家族成员之一^[3], 研究发现, CD81 是 HCV 入胞的受体, 通过与 HCV E2 结合, 使 HCV 吸附在细胞表面, 在 HCV 入胞的早期阶段发挥作用。Occludin (OCN) 是构成紧密连接的组成成分之一, 在进化上保守, 小鼠、人类和犬的 *OCN* 基因有 90% 的同源性^[4-5]。Dorner 等^[6]将表达人 HCV 受体 CD81、SR-BI、Claudin-1 和 OCN 的重组腺病毒载体静脉注射小鼠后, 使小鼠获得了对 HCV-CRE 的感染, 并证实能表达 CD81 和 OCN 的动物都能成功感染 HCV-CRE。国内外很多学者将这些受体转染非肝源性细胞, 发现这些原本无法被 HCV 感染的细胞获得了 HCV 易感性^[6-8], 从而认为 CD81 和 OCN 是 HCV 入胞的两个最为关键的受体^[6]。

树鼩 (tree shrew, *Tupaia Belangeri*) 是比大小鼠等啮齿类动物更接近非人灵长类的动物^[9], 树鼩的 *CD81* 和 *OCN* 与人类 *CD81* 和 *OCN* 同源性分别达 93% 和 88%^[10]。树鼩作为一种新型实验动物, 在生物医学研究中的应用范围越来越广, 可用于肝炎病毒、柯萨奇病毒、单纯疱疹病毒等病毒类疾病的研究和阿尔茨海默、抑郁症等神经系统疾病的研究^[11-15]。利用树鼩 BM-MSCs 开展慢病毒载体介导

HCV 受体 (*OCN/CD81*) 基因转染实验, 研究转染后对树鼩 BM-MSCs 生物学特性的影响和受体的表达情况, 为下一步利用树鼩 BM-MSCs 开展 HCV 研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

F1 代成年普通级树鼩, 雌雄不限, 体重 110 ~ 130 g, 来自中国医学科学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心【SCXK (滇) K2013-0001】, 实验在中国医学科学院医学生物学研究所进行【SYXK (滇) K2013-0001】。所有操作均符合中国医学科学院医学生物学研究所动物伦理审查的要求 (伦理审批号: 医科生伦字 [2016] 7 号)。

1.1.2 实验试剂

人淋巴细胞分离液 (天津灏洋生物制品有限公司)、DMEM/F12 (Thermo, 美国)、高糖 DMEM (HyClone, 美国)、胎牛血清 (Thermo)、地塞米松 (Enzo)、3-异丁基-甲基黄嘌呤 (IBMX)、胰岛素、吡啶美辛 (Sigma)、噻唑蓝 (MTT)、DMSO (Sigma)、茜素红 (Solarbio)、BMP-2 (PeproTech, 美国)、油红 O (Sigma)、RNAzol (MRC, cat. no: RN 190)、All-in-One™ First-Strand cDNA Synthesis Kit (GeneCopoeia, cat. no: AORT-0020)、All-in-One™ qPCR Mix (GeneCopoeia, cat. no: AORT-0020)、胰酶、肝素钠、青霉素、链霉素、4% 多聚甲醛、CCK-8 试剂盒 (碧云天生物技术)。

1.1.3 实验仪器

倒置荧光显微镜 (Nikon Ti, 日本)、二氧化碳孵

箱(Thermo,美国)、酶标仪(BioTek,美国)、细胞自动计数仪(Bio-Rad,美国)、流式细胞仪(BD Accuri C6,美国)、实时荧光定量仪(Bio-Rad,美国)、小型离心机(CT15RE,日本)、垂直电泳槽(Bio-Rad,美国)、半干转膜仪(Bio-Rad,美国)、水平脱色摇床、凝胶成像系统(Bio-Rad,美国)。

1.1.4 BM-MSCs 细胞

由本实验室分离鉴定保存,具体方法见我们之前的报道^[11]。

1.2 方法

1.2.1 CD81 和 OCLN 慢病毒载体的构建

构建过表达人 CD81(NM_004356.3)和 OCLN(U53823.1)慢病毒载体,分别含有 GFP 和 RFP 荧光,标记为 LV-CD81 和 LV-OCLN。病毒滴度测定采用稀释计数法,制备好的慢病毒载体置于 -80℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 慢病毒载体转染树鼩 BM-MSCs

采用 1/2 小体积感染法,即取 P3 代树鼩 BM-MSCs 以 5×10^4 个/mL 接种 6 孔板,待第二天细胞长至约 60% 汇合时,吸去旧培养基,加入 1/2 体积新鲜培养基。按 $MOI = 100$,换算为对应的病毒原液体积,并按体积将病毒原液加入细胞中,摇匀,置于 37℃、5% CO_2 孵箱中感染 4 h 后取出细胞,直接往含病毒的培养基中加入另外 1/2 体积的新鲜培养基。感染后第 2 天,吸去含病毒的培养基,换上新鲜的培养液,继续 37℃、5% CO_2 孵箱中培养。感染 72 h 后,进行荧光显微镜拍照和流式细胞仪分析感染效率。

1.2.3 流式细胞仪(FACS)分析慢病毒感染效率

将慢病毒感染 72 h 后的 BM-MSCs 细胞用 0.25% 的胰蛋白酶溶液消化,用基础培养基混悬细胞,收集于 1.5 mL 的 EP 管中,3500 r/min 离心 3 min,弃上清。添加 0.1% BSA-PBS 1 mL 混悬细胞,3500 r/min 离心 3 min,弃上清。添加 4% formaldehyde 100 μ L,再添加 PBS 400 μ L。混悬细胞后,将细胞转移至上样管中,上机分析样品。

1.2.4 慢病毒转染后树鼩 BM-MSCs 生长曲线测定

将慢病毒感染后的树鼩 BM-MSCs 及未感染慢病毒的对照组第 3 代树鼩 BM-MSCs 用 0.25% 胰蛋白酶溶液消化后制成单细胞悬液。取 10 μ L 细胞与台盼蓝染液按 1:1 混匀后,再取 10 μ L 加入到细胞计数板,将细胞计数板插入到伯乐细胞计数仪上计数,按细胞密度为 4×10^4 个/mL 接种 96 孔细胞板,

每孔取 200 μ L,每组每个时间点设 3 个复孔,放入 37℃、5% CO_2 孵箱中培养。分别于培养的 1d、2d、3d、4d、5d、6d、7d 检测各组细胞光密度值。检测前,吸走原有培养基,每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液与 100 μ L 培养基混合液,在培养箱孵育 4 h。酶标仪(450 nm)读取各孔光密度(OD)值,并绘制细胞生长曲线。

1.2.5 慢病毒转染后树鼩 BM-MSCs 向脂肪细胞诱导

将感染慢病毒的 BM-MSCs 用 0.25% 胰蛋白酶溶液消化后制成单细胞悬液,细胞计数后按照 2×10^4 个/mL 接种于 12 孔板中,每孔 1 mL,常规培养基培养至细胞生长汇合至 80% 左右时,更换培养基为成脂诱导液(DMEM/F12 + 100 U/mL 青霉素 + 100 μ g/mL 链霉素溶液 + 10% FBS + 1 μ mol/L 地塞米松 + 0.2 mmol/L 吡啶美辛 + 0.01 mg/mL 胰岛素 + 0.5 mmol/L IBMX)。放入 37℃、5% CO_2 孵箱中继续培养,每隔 48 h 换液。诱导 2 周后进行油红 O 染色。

1.2.6 慢病毒转染后树鼩 BM-MSCs 向成骨细胞诱导

将感染慢病毒的 BM-MSCs 用 0.25% 胰蛋白酶溶液消化后制成单细胞悬液,细胞计数后按照 2×10^4 个/mL 接种于 12 孔板中,每孔 1 mL,常规培养基培养至细胞生长汇合至 80% 左右时,更换培养基为成骨诱导液(高糖 DMEM + 50 ng/mL BMP-2 + 10% FBS + 100 U/mL 青霉素 + 100 μ g/mL 链霉素溶液)。放入 37℃、5% CO_2 孵箱中继续培养,每隔 48 h 换液。诱导 18 d 后进行茜素红染色。

1.2.7 慢病毒转染后树鼩 BM-MSCs 干性基因检测

提取慢病毒转染前后的树鼩 BM-MSCs 总 RNA,提取方法按 MRC 的“Trizol 法提取总 RNA”试剂盒说明书进行。用设计的 LIN28A、NANOG、OCT4 和 SOX2 引物(见表 1)进行 qRT-PCR 定量检测。干性基因相对表达量采用基因相对定量分析法($2^{-\Delta\Delta CT}$ 法),以 GAPDH 为内参基因。

1.2.8 慢病毒感染后 CD81 和 OCLN mRNA 表达检测

细胞总 RNA 提取方法按 MRC 的“Trizol 法提取总 RNA”试剂盒说明书进行。用设计的 CD81 和 OCLN 引物(见表 2)进行 qRT-PCR 定量检测。CD81 和 OCLN mRNA 表达量采用基因相对定量分析法($2^{-\Delta\Delta CT}$ 法),以 GAPDH 为内参基因。

表 1 干性基因引物列表

Table 1 Primer sequences

基因 Gene	引物序列 Primer sequences
LIN28A R	5'-TCAGGTGTGGCTCTATGGGCA-3'
LIN28A F	5'-CAGTGTGGTTTGAAGTTGGC-3'
NANOG R	5'-GTCTCATCCCTCCCTTCCTCA-3'
NANOG F	5'-TGCCACCGCTTACACTTCATT-3'
OCT4 R	5'-AAGCCGACAACAACGAAAATC-3'
OCT4 F	5'-GTACTGGTCCCCCTGAGAAAG-3'
SOX2 R	5'-TTTGTCGAGACGGAGAAGC-3'
SOX2 F	5'-GGAAGAGTAACACAGGGG-3'
GAPDH R	5'-AGTGATGGCGTGGACTGTGGT-3'
GAPDH F	5'-GCTGCTGCCGACTATGTTGTG-3'

表 2 CD81 和 OCLN 引物列表

Table 2 Primer sequences of CD81 and OCLN

基因 Gene	引物序列 Primer sequences
CD81 F	5'-TGTCTTGAGCACTGAGGTGGTC-3'
CD81 R	5'-TGGTGATGATGACGCCAAC-3'
OCLN F	5'-CGGCAATGAAACAAAAGGCAG-3'
OCLN R	5'-GGCTATGTTATGGCTATGGCTAC-3'
GAPDH F	5'-GCTGCTGCCGACTATGTTGTG-3'
GAPDH R	5'-AGTGATGGCGTGGACTGTGGT-3'

1.2.9 慢病毒感染后 CD81 和 OCLN 蛋白表达检测

采用 Western blot 检测 CD81 和 OCLN 蛋白表达水平。分别配置 10% 和 12% 的分离胶,取等量蛋白量(含细胞蛋白 25 mg)上样行电泳。电泳条件:浓缩胶恒压 80 V,20 min,分离胶恒压 100 V,约 60 min。转膜后,置于 5% 的脱脂奶粉中,室温封闭 30 min。加入 CD81 和 OCLN 一抗,室温孵育 60 min。洗膜后加入二抗,室温摇床上孵育 1.5 h,用 1X TBST 在室温摇床上充分脱色后,用 TBST 洗膜,最后采用 ECL 底物化学发光法在凝胶成像系统显色成像。

1.3 统计学方法

所得数据采用 GraphPad Prism 6 软件处理,实验结果采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CD81 和 OCLN 过表达慢病毒载体的构建

CD81 和 OCLN 慢病毒阳性重组克隆均通过测

序,证明载体构建成功。LV-CD81 病毒滴度为 1×10^8 TU/mL, LV-OCLN 病毒滴度为 3×10^8 TU/mL。

2.2 含人 CD81 和 OCLN 的慢病毒转染效率

转染 72 h 后,荧光倒置显微镜下观察,在 MOI = 100 时,可见荧光细胞几乎满视野,细胞呈条索状(图 1)。流式细胞仪检测 LV-CD81 转染效率达 99.4%, LV-OCLN 转染效率 22.6% (图 2)。

2.3 含人 CD81 和 OCLN 的慢病毒转染对树鼩 BM-MSCs 增殖能力的影响

P₃ 代树鼩 BM-MSCs 转染含人 CD81 和 OCLN 分子的慢病毒后,均在 3 d 进入对数生长期,之后呈现下降趋势,7 d 又开始回升。转染基因后细胞增殖的总体趋势与未转染基因的 BM-MSCs 相似(图 3),但 LV-OCLN 组细胞增殖活力相对于未转染组和 LV-CD81 组低。

2.4 慢病毒转染树鼩 BM-MSCs 后成脂诱导鉴定

BM-MSCs 成脂诱导 6 d 后,镜下可见细胞变圆变大,细胞内有小的脂滴形成,成“葡萄样”改变,随着培养时间的增加细胞内脂滴逐渐变大,诱导 14 d 后油红 O 染色可见脂滴被染成红色。正常对照组 BM-MSCs 红色脂滴较转染了慢病毒的 BM-MSCs 产生的脂滴多(图 4)。

2.5 慢病毒转染树鼩 BM-MSCs 后成骨诱导鉴定

慢病毒转染 BM-MSCs 后成骨诱导 18 d 后进行茜素红染色,镜下可观察到红色结节,但成骨对照组红色结节较转染了慢病毒的 BM-MSCs 产生的红色结节多(图 5)。

2.6 慢病毒转染树鼩 BM-MSCs 后干性基因检测

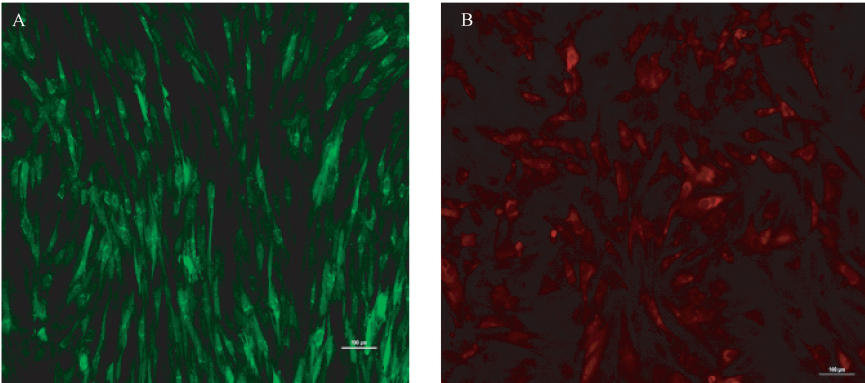
未转染组均表达干性相关基因 LIN28A、NANOG、OCT4,不表达 SOX2。LV-OCLN 和 LV-CD81 转染树鼩 BM-MSCs 后,NANOG 基因 mRNA 表达增高,差异有显著性(*P* < 0.05),LIN28A 基因 mRNA 表达下降,差异有显著性(*P* < 0.05) (图 6)。

2.7 慢病毒感染后 CD81 和 OCLN mRNA 表达

构建的含人 CD81/OCLN 慢病毒载体在转染树鼩 BM-MSCs 后,CD81 和 OCLN 的 mRNA 表达均较未转染组高表达,差异有显著性(*P* < 0.05) (图 7)。

2.8 慢病毒感染后 CD81 和 OCLN 蛋白表达

Western blot 结果显示转染组 OCLN 蛋白和 CD81 蛋白水平均高于未转染组,差异有显著性(*P* < 0.05) (图 8)。

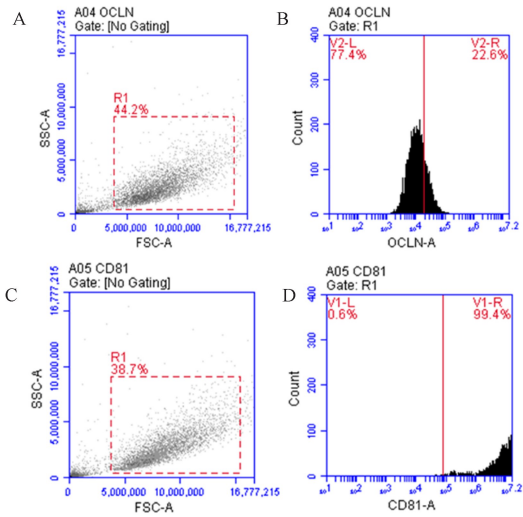


注:A. 含人 *CD81* 慢病毒转染 BM-MSCs; B. 含人 *OCN* 慢病毒转染 BM-MSCs。

图 1 慢病毒转染后荧光倒置显微镜观察 (×100)

Note. A. LV-*CD81*-BM-MSCs. B. LV-*OCN*-BM-MSCs.

re 1 Detection of transfection efficiency of LV-*OCN* and LV-*CD81* by FACS using a fluorescence inverted microscope (×100)



注:A-B. 流式细胞仪检测 LV-*OCN* 转染效率;C-D. 流式细胞仪检测 LV-*CD81* 转染效率。

图 2 流式细胞仪检测转染效率

Note: A – B. Detection of transfection efficiency of LV-*OCN* by FACS.
C – D. Detection of transfection efficiency of LV-*CD81* by FACS.

Figure 2 Detection of transfection efficiency of
LV-*OCN* and LV-*CD81* by FACS

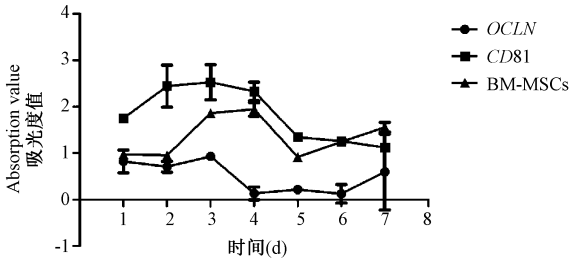
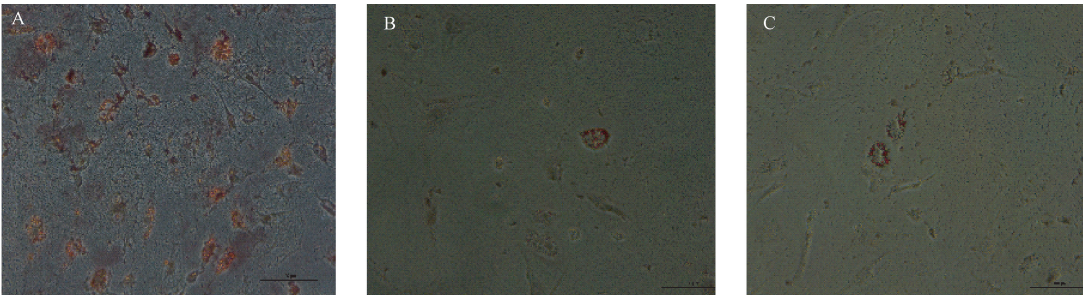


图 3 含人 *CD81* 和 *OCN* 分子的慢病毒转染后
树鼯 BM-MSCs 的生长曲线

Figure 3 Growth curve of tree shrew BM-MSCs
transfected with *CD81*/*OCN* lentiviral vector

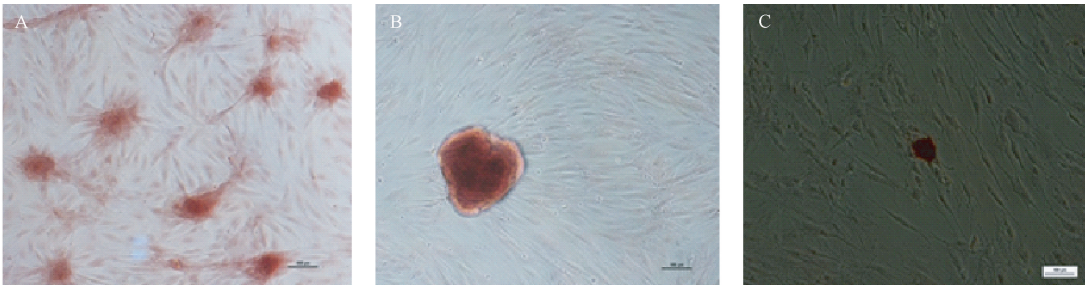


注:A. 成脂对照组;B. LV-*CD81*-BM-MSCs;C. LV-*OCN* -BM-MSCs。

图 4 慢病毒转染树鼯 BM-MSCs 后成脂诱导第 14 天后油红 O 染色 (×100)

Note. A. Control group of adipogenic induction. B. LV-*CD81* group of adipogenic induction. C. LV-*OCN* group of adipogenic induction.

Figure 4 Adipogenic induction of BM-MSCs after transfection with
lentivirus at day 14 by oil red O staining (×100)



注：A. 成骨对照组；B. LV-OCN -BM-MSCs；C. LV-CD81-BM-MSCs。

图 5 慢病毒转染树鼩 BM-MSCs 后成骨诱导第 18 天后茜素红染色 (×100)

Note. A. Control group of osteogenic induction. B. LV-OCN group of osteogenic induction. C. LV-CD81 group of osteogenic induction.

Figure 5 Osteogenic induction of BM-MSCs after transfection with lentivirus at day 18 by alizarin red staining (×100)

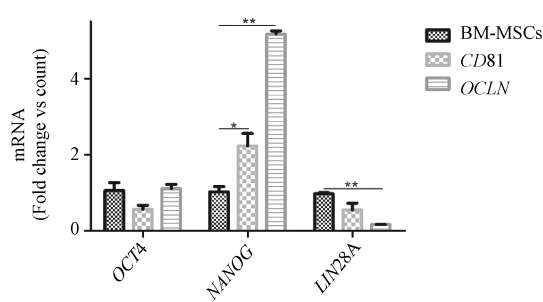


图 6 慢病毒转染树鼩 BM-MSCs 后干性基因检测

Figure 6 Pluripotency marker detection of BM-MSCs after transfection with lentivirus

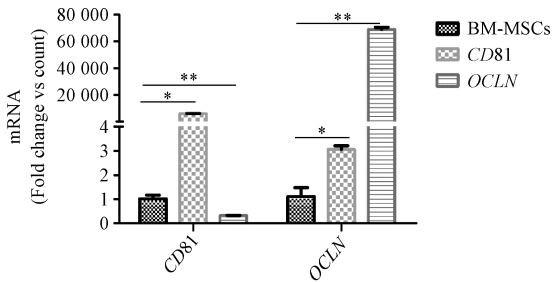
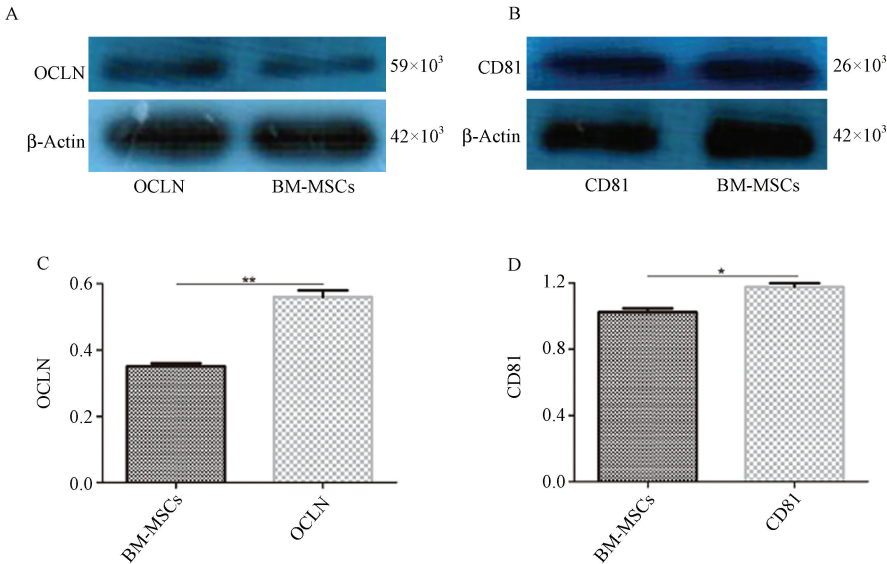


图 7 慢病毒转染后 CD81 和 OCLN mRNA 表达

Figure 7 mRNA expression of CD81 and OCLN after lentivirus infection



注：A-C. 慢病毒转染后 OCLN 蛋白表达；B-D. 慢病毒转染后 CD81 蛋白表达。

图 8 慢病毒转染树鼩 BM-MSCs 后 CD81/OCLN 基因的蛋白表达

Note. A, C. The OCLN protein expression of BM-MSCs after transfection with lentivirus. B, D. The CD81 protein expression of BM-MSCs after transfection with lentivirus.

Figure 8 CD81 and OCLN protein expression of BM-MSCs after transfection with lentivirus

3 讨论

BM-MSCs 起源于中胚层,除了可以向成骨细胞、脂肪细胞、心肌细胞、肝和胆道上皮细胞等中胚层细胞分化,同时又有向外胚层的神经元细胞和内胚层的肝卵圆细胞分化的潜力。BM-MSCs 不涉及道德及伦理学方面的问题,且容易在体外培养,具有高度的扩增能力,能够与各种病毒载体结合,进行各种基因的转染,既能保持本身基因的稳定性,还能高效表达所转染的基因^[2]。

基因转染的方法有非病毒载体和病毒载体转染两种。病毒载体主要有逆转录病毒介导、慢病毒介导法、腺病毒介导以及腺相关病毒介导等,各有利弊。慢病毒可以感染分裂和不分裂的细胞,感染细胞时病毒基因组整合于宿主染色体上,能稳定长期表达,免疫原性低,安全性较好,已成功感染了造血干细胞、神经细胞、胰岛细胞、肝细胞、视网膜色素上皮细胞、肌肉细胞和气道上皮细胞等^[16-18]。腺病毒载体感染细胞时病毒基因组并不整合到染色体上,只瞬时表达外源基因,免疫原性高,反复应用易引起免疫反应^[19]。苏玉金等^[20]报道慢病毒载体转染 SD 大鼠 BM-MSCs 效率高于腺相关病毒转染 BM-MSCs (AAV 转染率为 49.1%, LV 转染率为 91.4%)。我们在实验前期曾尝试用腺病毒载体和 Lipofectamine 2000 脂质体介导转染树鼯 BM-MSCs,但发现两者的转染效率都很低。而在用慢病毒转染树鼯 BM-MSCs 时,发现在感染复数 (MOI) 为 100 时, LV-CD81 转染效率达 99.4%, LV-*OCLN* 转染效率 22.6%, 转染效率的高低可能与所携带的外源基因的大小有关 (CD81, 711 bp, *OCLN*, 1569 bp)。

武成聪等^[21]在研究重组腺病毒在不同感染复数下转染兔 BM-MSCs,发现随感染复数值的增加, BM-MSCs 贴壁能力减弱,部分细胞老化、死亡,转染效率在 5% ~ 12% 之间。感染复数达 250 时,成骨分化潜能受到影响,最适感染复数为 100。在我们的研究中发现,在不加入助转剂 (polybrene) 时,含人 *OCLN/CD81* 慢病毒载体转染树鼯 BM-MSCs 的最适感染复数为 100,细胞状态良好,未出现死亡现象,转染效率较高。助转剂的加入可以降低病毒用量,同时提高转染效率,我们发现在加入终浓度为 4 $\mu\text{g/mL}$ 的助转剂时,在 MOI 为 30 时,即可达到理想的转染效率 (数据未给出)。MOI 为 100 时,转染含人 *OCLN/CD81* 慢病毒载体后,树鼯 BM-MSCs 生

长曲线总体趋势一致,但 LV-*OCLN* 组在生长后期出现增殖缓慢,推测可能与转入的外源基因片段大有关。

在多向分化潜能上,转染了含人 *OCLN/CD81* 慢病毒载体后,树鼯 BM-MSCs 虽然依然能向成脂成骨诱导分化,但诱导的脂肪细胞和成骨细胞比未转染组少。说明在 MOI 为 100 时,其多向分化潜能受到一定的影响。多向分化潜能性基因或干性维持基因 (如 *LIN28A*、*NANOG*、*OCT4*、*SOX2*) 特定表达于具有多向分化潜力的细胞,对干细胞的多向分化具有调节作用,其表达量随着干细胞的分化而逐渐下降^[22-24]。对成体干细胞的研究发现,随着年龄的增长干细胞自身增殖及分化功能减退^[25-26],推测可能与干细胞的干性维持相关的基因表达下降有关^[27-28]。Tsai 等^[23]发现 *OCT4* 及 *NANOG* 基因在成体 MSCs 同样高表达,而敲除 *OCT4* 及 *NANOG* 基因后, MSCs 的增殖及分化均明显下降,而自发性分化现象明显增加。我们应用 PCR 技术评估了慢病毒载体介导的 HCV 受体基因 *OCLN/CD81* 转染对树鼯 BM-MSCs 内 *LIN28A*、*NANOG*、*OCT4*、*SOX2* 基因的表达情况,结果显示 *SOX2* 在转染和未转染细胞中基本检测不出来,可能是树鼯 BM-MSCs 不表达该基因。*OCT4* 表达量在转染和未转染细胞中表达量无显著性差别,而 *NANOG* 表达量转染组比未转染组高,表达量有显著性差异。*LIN28A* 基因表达量转染组比未转染组低,差异有显著性。这些差异的出现说明外源基因的导入,对树鼯 BM-MSCs 干性相关基因的表达有一定的影响,这些变化也间接影响了其多向分化潜能。

构建的含人 *OCLN/CD81* 慢病毒载体在转染树鼯 BM-MSCs 后, *CD81* 和 *OCLN* 的 mRNA 表达和蛋白表达均较未转染组高表达,有显著差异,说明我们构建的慢病毒载体能成功地转染树鼯 BM-MSCs 并表达转入的外源基因,这为下一步在转染 HCV 受体 (*OCLN/CD81*) 的树鼯 BM-MSCs 上进行 HCVcc 相关感染实验提供了基础。

参 考 文 献 (References)

- [1] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. Nature, 2002, 418(6893): 41-49.
- [2] 王彤. 骨髓间充质干细胞临床研究进展[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
Wang T. Progress in clinical study of bone marrow mesenchymal stem cells[M]. Beijing: People's Health Press, 2010.

- [3] 史振丹, 乌丽雅苏, 乌亚罕, 等. 四次跨膜蛋白 CD81 的研究现状[J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(05):1277-1284.
Shi ZD, Wuliyasu, Wuyahan, et al. Current research status of tetraspanins CD81[J]. Chin Anim Husbandry Vet Med, 2016, 43(05):1277-1284.
- [4] 何柳, 陈正礼, 罗启慧, 等. 丙肝感染宿主亲嗜性基因 OCLN 和 CD81 在猕猴川西亚种组织中的分布[J]. 浙江农业学报, 2016, 28(01): 44-50.
He L, Chen ZL, Luo QH, et al. Distribution of HCV infection related OCLN and CD81 in different tissues of Macaca mulatta lasiotis[J]. Acta Agr Zhejiang, 2016, 28(01): 44-50.
- [5] Ando-Akatsuka Y, Saitou M, Hirase T, et al. Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues[J]. J Cell Biol, 1996, 133(1): 43-47.
- [6] Dörner M, Horwitz JA, Robbins JB, et al. A genetically humanized mouse model for hepatitis C virus infection[J]. Nature, 2011, 474(7350): 208-211.
- [7] Tong YM, Zhu YZ, Xia XS, et al. Tupaia CD81, SR-BI, Claudin-1, and Occludin support hepatitis C virus infection[J]. J Virol, 2011, 85(6): 2793-2802.
- [8] Ploss A, Evans MJ, Gaysinskaya VA, et al. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells[J]. Nature, 2009, 457(7231): 882-886.
- [9] Fan Y, Huang ZY, Cao CC, et al. Genome of the Chinese tree shrew[J]. Nat Commun, 2013, 4:1426.
- [10] 李尧, 代解杰, 孙晓梅, 等. 树鼩作为丙型肝炎动物模型的 HCV 受体研究进展[J]. 动物学研究, 2011, 32(01):97-103.
Li Y, Dai JJ, Sun XM, et al. Progress in studies on HCV receptor of Tupaia as a potential hepatitis C animal model[J]. Zool Res, 2011, 32(01):97-103.
- [11] 陆彩霞, 李晓飞, 王文广, 等. 树鼩骨髓间充质干细胞体外分离培养及成脂成骨诱导[J]. 中国比较医学杂志, 2014, 32(01):97-103.
Lu CX, Li XF, Wang WG, et al. Isolation, culture, adipogenic and osteogenic induction of Tupaia bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Chin J Comp Med, 2014, 32(01):97-103.
- [12] Li L, Li Z, Wang E, et al. Herpes simplex virus 1 infection of tree shrews differs from that of mice in the severity of acute infection and viral transcription in the peripheral nervous system[J]. J Virol, 2015, 90(2):790-804.
- [13] Feng Y, Feng YM, Lu C, et al. Tree shrew, a potential animal model for hepatitis C, supports the infection and replication of HCV in vitro and in vivo[J]. J Gen Virol, 2017, 98(8):2069-2078.
- [14] Li JP, Liao Y, Zhang Y, et al. Experimental infection of tree shrews (Tupaia belangeri) with Cocksackie virus A16[J]. Dongwuxue Yanjiu, 2014; 35(6): 485-491.
- [15] Fan Y, Luo R, Su LY, et al. Does the genetic feature of the Chinese tree shrew (Tupaia belangeri chinensis) support its potential as a viable model for Alzheimer's disease research?[J]. J Alzheimers Dis, 2018, 61(3): 1015-1028.
- [16] Dreyer JL. Lentiviral vector-mediated gene transfer and RNA silencing technology in neuronal dysfunctions[J]. Methods Mol Biol, 2010, 614: 3-35.
- [17] Escors D, Breckpot K. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2010, 58(2): 107-119.
- [18] Matrai J, Chuah MK, VandenDriessche T. Recent advances in lentiviral vector development and applications[J]. Mol Ther, 2010, 18(3): 477-490.
- [19] Cao H, Molday RS, Hu J. Gene therapy: light is finally in the tunnel[J]. Protein Cell, 2011, 2(12): 973-989.
- [20] 苏玉金, 赵育梅, 顾漪. 腺相关病毒及慢病毒载体对骨髓间充质干细胞基因转染效率的比较[J]. 中国康复理论与实践, 2014, 20(12):1117-1121.
Su YJ, Zhao YM, Gu Y. Efficiency of gene transfection with adeno-associated viral vector or lentiviral vector in bone marrow derived mesenchymal stem cells[J]. Chin J Rehabil Theory Pract, 2014, 20(12):1117-1121.
- [21] 武成聪, 荣树, 任静, 等. 腺病毒介导增强型绿色荧光蛋白基因转染兔骨髓间充质干细胞的效率及毒性[J]. 中国组织工程研究, 2018, 22(17):1-6.
Wu CC, Rong S, Ren J, et al. Transferring adenovirus vector-mediated enhanced green fluorescent protein gene into rabbit bone marrow mesenchymal stem cells; effectiveness and toxicity[J]. J Clin Rehabil Tis Eng Res, 2018, 22(17):1-6.
- [22] Boyer LA, Lee TI, Cole MF, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells[J]. Cell, 2005, 122(6): 947-956.
- [23] Darr H, Mayshar Y, Benvenisty N. Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features[J]. Development, 2006, 133(6): 1193-1201.
- [24] Barrand S, Collas P. Chromatin states of core pluripotency-associated genes in pluripotent, multipotent and differentiated cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 391(1): 762-767.
- [25] Sharpless NE, Depinho RA. How stem cells age and why this makes us grow old[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8(9): 703-713.
- [26] Chang HX, Yang L, Li Z, et al. Age-related biological characterization of mesenchymal progenitor cells in human articular cartilage[J]. Orthopedics, 2011, 34(8): e382-e388.
- [27] Alt EU, Senst C, Murthy SN, et al. Aging alters tissue resident mesenchymal stem cell properties[J]. Stem Cell Res, 2012, 8(2): 215-225.
- [28] Collins-Hooper H, Woolley TE, Dyson L, et al. Age-related changes in speed and mechanism of adult skeletal muscle stem cell migration[J]. Stem Cells, 2012, 30(6): 1182-1195.