

非病毒载体介导脑源性神经营养因子基因转染骨髓间充质干细胞： 脂质体及电穿孔转染法的比较☆

陈观贵¹, 刘谦虚², 谢鼎华³

Non-virus vector methods in hBDNF gene transfected bone marrow mesenchymal stem cells: Lipofectamine versus electroporation

Chen Guan-gui¹, Liu Qian-xu², Xie Ding-hua³

Abstract

BACKGROUND: Gene transfection of cells includes virus and non-virus vector. As virus vector has some issues, such as safety and immunological rejection, the present study explored lipofectamine and electroporation transfection methods.

OBJECTIVE: To establish genetic engineering cells using human brain-derived neurotrophic factor (hBDNF) gene transfected bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) by lipofectamine or electroporation, and explore its characteristics and expression *in vitro*.

METHODS: Lipofectamine method: The BMMSCs were obtained from the tibias and femurs of the guinea pigs. The third passage BMMSCs were cultured with plasmid-lipofectamine mixture for 6 hours, followed by fetal bovine medium for 48 hours. Immunohistochemistry was performed for transient expression. G418 was added after 48 hours. Electroporation method: BMMSCs were trypsinized and resuspended with serum-free medium. Cell suspension was added into electrotransformation pool, and plasmid was added. The electrotransformation pool was moved between electrodes. After transfection for 48 hours, gene transient expression was detected. G418 was added after 48 hours. Brain-derived neurotrophic factor expression was detected by immunohistochemistry and RT-PCR.

RESULTS AND CONCLUSION: Immunohistochemistry showed that BDNF transient expression was 5.80% by lipofectamine and 24.29% by electroporation. Cells almost died at 14 days following lipofectamine transfection. Stable expression cell lines of BDNF engineered BMMSC were successfully established by electroporation, with 90% expressive rate by immunohistochemistry and expression of BDNF mRNA by RT-PCR. Genetic engineering cells using BDNF transected BMMSC were established by electroporation whereas failed by lipofectamine, and the expressed BDNF was confirmed by immunohistochemistry and RT-PCR *in vitro*.

Chen GG, Liu QX, Xie DH. Non-virus vector methods in hBDNF gene transfected bone marrow mesenchymal stem cells: Lipofectamine versus electroporation. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(10):1847-1852. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 基因转染细胞有病毒及非病毒载体法, 因病毒载体面临安全性、免疫排斥等问题, 实验探讨脂质体及电穿孔转染法。

目的: 比较脂质体及电穿孔法介导人脑源性神经营养因子基因转染骨髓间充质干细胞的细胞转染特性和体外表达情况, 建立基因工程细胞。

方法: ①脂质体法: 取体外分离、培养的第3代豚鼠骨髓间充质干细胞, 将质粒-脂质体混合物加入含细胞的培养基中培养6 h, 再加入胎牛血清的培养基, 孵育48 h 后行免疫组织化学检测, 即为瞬时表达。48 h 后加入含 G418 培养基筛选。②电穿孔法: 取骨髓间充质干细胞, 胰酶消化, 用无血清培养基重悬细胞, 将细胞悬液加入电转化池中, 加入质粒, 将电转化池移至电极间放电转导。转染48 h 后, 检测目的基因瞬时表达。48 h 后加入含 G418 培养基筛选。用免疫组织化学及 RT-PCR 检测两种方法脑源性神经营养因子基因表达情况。

结果与结论: 免疫组织化学显示脂质体介导转染的脑源性神经营养因子瞬时表达率约为 5.80%, 电穿孔法约为 24.29%。脂质体法转染筛选 14 d 后细胞几乎全部死亡; 电穿孔法转染后筛选并扩大培养建立工程细胞, 免疫组织化学显示工程细胞脑源性神经营养因子阳性表达率达 90% 以上, RT-PCR 扩增产物电泳证实目的基因阳性条带。结果表明, 用电穿孔法可成功建立脑源性神经营养因子基因修饰骨髓间充质干细胞的工程细胞, 并用免疫组织化学和 RT-PCR 方法证实细胞体外表达目的基因。

关键词: 脂质体法; 电穿孔法; 骨髓间充质干细胞; 基因转染; 非病毒载体

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.10.029

陈观贵, 刘谦虚, 谢鼎华. 非病毒载体介导脑源性神经营养因子基因转染骨髓间充质干细胞: 脂质体及电穿孔转染法的比较 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(10):1847-1852. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

¹Department of Otorhinolaryngology, Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510260, Guangdong Province, China;
²Department of Otorhinolaryngology, Zhuhai People's Hospital, Zhuhai 519000, Guangdong Province, China;
³Department of Otorhinolaryngology, Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China

Chen Guan-gui ☆, Doctor, Attending physician, Department of Otorhinolaryngology, Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510260, Guangdong Province, China
entcgg@yahoo.com.cn

Received: 2009-10-29
Accepted: 2010-01-29

¹ 广州医学院第二附属医院耳鼻咽喉科, 广东省广州市 510260; ² 珠海市人民医院耳鼻咽喉科, 广东省珠海市 519000; ³ 中南大学湘雅二医院耳鼻咽喉科, 湖南省长沙市 410011

陈观贵☆, 男, 1975年生, 广东省吴川市人, 汉族, 2009年中南大学毕业, 博士, 主治医师, 主要从事耳科学基础与临床的研究。
entcgg@yahoo.com.cn

中图分类号: R394.2
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2010)10-01847-06

收稿日期: 2009-09-29
修回日期: 2010-01-29
(20100106017/W.A)

0 引言

干细胞因其具有高度自我更新能力和多向分化潜能, 是细胞治疗和基因治疗中理想的靶细胞, 其中骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSC) 受到学者的广泛关注, 该细胞易于分离、扩增, 在适宜的条件刺激下可向多方向分化, 可自体移植, 消除了异体移植的复杂性和免疫源性, 并且能广泛迁移, 易与周围组织整合而发挥功能^[1]。这些都暗示其在基因治疗中可能成为非常有价值的运载细胞。鉴于病毒载体的安全性和免疫源等的考虑, 作者在该部分中研究了非病毒载体方式介导人脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 基因转染 BMMSC, 构建基因工程细胞, 并检测 BDNF 表达情况, 为基因治疗研究提供细胞来源。

1 材料和方法

设计: 对比观察。

时间及地点: 实验于 2008-06/12 年在中南大学湘雅二医院中心实验室完成 (BSL-2)。

材料: 清洁级 60~90 d 健康纯白短毛红目豚鼠, 体质量 250~350 g, 雌雄不限。

实验过程中对动物处置符合 2006 年科学技术部发布的关于善待实验动物的指导性意见^[2]。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
pcDNA3.1(-)-hBDNF 质粒	中南大学耳科研究所保存
Lipofectamine™ 2000 引物	美国 Invitrogen 公司 由上海生工生物工程技术有限公司合成
兔抗人 BDNF 多克隆抗体、SABC 染色试剂盒、DAB 显色试剂盒;	武汉博士德公司
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit、PCR Master Mix (2X)、DNase I	立陶宛 Fermentas 公司
CD44、CD34、CD45 电穿孔仪 (Gene Pulser II) PCR 仪 (ABI 7500 型)	美国 Santa Cruz 公司 美国 Bio-Rad 公司 美国 ABI 公司

实验方法:

BMMSC 的分离、培养及鉴定: 取豚鼠四肢骨干, 用注射器抽 DMEM 培养基反复轻柔冲洗骨髓腔, 收集骨髓悬液。4 °C 离心 900 g×10 min, 去

除上清液, 重新加入 4 mL DMEM 制成细胞悬液。将细胞悬液沿管壁加入预先放有 4 mL 1.073 g/mL 淋巴细胞分离液的离心管, 注意使细胞悬液位于分离液的表面。离心 900 g×20 min, 取中间的有核细胞层到另一离心管, 加入 5 mL DMEM 培养基, 离心 900 g×10 min, 去除上清液。重新加入 5 mL DMEM 培养基 (含体积分数为 10% 胎牛血清), 将细胞悬液细胞计数至 $1.5 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 后接种于 25 mL 培养瓶中。在体积分数为 5% CO₂、37 °C 及饱和湿度孵箱内培养, 待细胞长满瓶底的 80%~90% 后予以传代。取第 3 代培养细胞进行流式细胞学检测, 检测抗原为 CD44、CD34 和 CD45。

两种非病毒载体方法介导人 BDNF 基因转染 BMMSC: 分别用脂质体法 (lipofectamine™ 2000) 和电穿孔法介导 BDNF 基因转染 BMMSC, 48 h 后用免疫组织化学方法检测目的基因的瞬时表达, 然后加入含 G418 的条件培养基进行筛选, 观察细胞生长情况及免疫组织化学方法检测目的基因稳定情况。通过两种方法的比较, 选择较好的转染方法用于建立基因工程细胞。

脂质体法: 6 孔培养板中接种取第 3 代以后的 BMMSC, 当细胞汇合率达到 90%~95% 时, 于转染前用无血清和抗生素的 DMEM 洗 2 遍, 每孔加入 2 mL DMEM。配制质粒-脂质体的混合物。即先将纯化的重组质粒 4 μg 加入到 250 μL 无血清和抗生素的培养基中, 然后将 lipofectamine 10 μL 加入到 250 μL 无血清和抗生素的培养基中室温放置 5 min。将两组分混匀, 室温作用 20~30 min。将质粒-脂质体混合物加入每孔含细胞的培养基中, 前后摇动混匀。细胞于 37 °C 孵育培养 6 h, 吸弃转染液, 加入含有体积分数为 10% 胎牛血清的培养基 2 mL, 继续孵育 48 h 后行免疫组织化学检测, 即为瞬时表达。48 h 后加入含 G418 培养基筛选。**电穿孔法:** 细胞融合度 70%~80% 时, 胰酶消化, 离心 (500 g×5 min)。室温下用无血清培养基重悬细胞至 $5 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$, 将 500 μL 细胞悬液加入 4 mm 电转化池中。

设置电转化参数: 电容量 1 050 Uf, 电压 260 V, 内部阻抗无穷大。每一池中加入 20 μg 的质粒 DNA, 用吸管轻轻混匀。立即将电转化池移至电极间放电转导。将细胞转移至 6 孔板, 放培养箱中孵育。转染 48 h 后, 检测目的基因瞬时表达。48 h 后加入含 G418 培养基筛选。

转染后细胞的筛选: 分别用G418质量浓度为50, 100, 150, 200 mg/L体积分数为10%胎牛血清培养基培养BMMSC, 三四天更换一次培养基, 连续培养10 d, 观察每种培养基中BMMSC成活情况, 选择在培养10 d后能够杀死所有细胞的最小G418浓度为最佳筛选浓度。本实验选择的最佳质量浓度为100 mg/L。转染细胞培养48 h后吸弃旧培养基, 换用100 mg/L G418的体积分数15%胎牛血清培养基进行筛选, 同时, 用未经转染的BMMSC为对照组, 待对照组细胞全部死亡后(一般培养10~14d), 换用正常培养基培养扩大克隆, 后待细胞克隆汇合度70%以上时收集标本。

基因转染方法的选择: 转染48 h后免疫组织化学检测BDNF的瞬时表达, 并在显微镜下计数转染前后细胞数量, 计算细胞死亡率, 然后进一步加G418进行筛选, 逐日观察细胞生长情况。通过脂质体法和电穿孔法的实验观察, 择优选择转染方法进一步建立基因工程细胞。选择指标: 瞬时表达率、细胞死亡率、稳定表达情况。

免疫组织化学检测转染细胞BDNF的表达: 基因转染48 h后(瞬时表达)和G418培养基筛选后(稳定表达)的细胞均每组收集3孔标本, 同时设置空白质粒转染组、未转染组作为对比。免疫组织化学使用SABC法, 阴性对照以PBS 分别代替一抗及二抗。

RT-PCR检测转染细胞的BDNF mRNA: 用经择优选择的转染方法进行细胞转染并筛选后, 取细胞进行RT-PCR检测, 同时用未转染组和转染空白质粒组作为对照组。根据在线网络软件Primer5设计引物: 人BDNF (genebank序列号NM001709), 豚鼠BDNF (genebank序列号AB012097), 根据人、豚鼠共源系列设计引物, 内参使用b-actin (genebank序列号NM_007393)。

引物:

β -Actin:

上游引物5-AGC GAG CAT CCC CCAAG TT-3,

下游引物5-GGG CAC GAA GGC TCA TCA TT-3, 产物285 bp;

BDNF:

上游引物5-ATG ACC ATC CTT TTC CTT AC-3,

下游引物5-GGT AAT TTT CCC CTT CTA TC-3, 产物744 bp。

培养细胞总RNA抽提(TRIZOL法)后, 1%的琼脂糖凝胶电泳判断RNA 的完整性, 用紫外分光光度仪测量RNA样本的 A_{260} 、 A_{280} 吸光度值。提取的RNA 保存于 -70°C 超低温冰箱中。

第一链cDNA的合成: 在PCR反应管中依次加入总RNA 2 μL 、Oligo(dT)18(0.5 mol/L)1 μL 、DEPC-treated Water 8 μL 、 65°C 反应5 min后置冰上, 再依次加入5 \times reaction buffer 4 μL 、NTP mix (10 mmol/L) 2 μL 、Ribonuclease Inhibitor (20 u/ μL) 1 μL 、DEPC-treated Water 1 μL 、 37°C 反应5 min, 加入RevertAidTM H Minus

M-MuLV Reverse Transcriptase (200 u/ μL) 1 μL 、 42°C 反应60 min, 70°C 10 min停止反应后, -20°C 保存。

PCR反应: 用 nuclease-free Water 稀释第一条链cDNA的合成产物稀释到100 μL 。进行PCR扩增, 反应体系: PCR Master Mix (2X) 12.5 μL 、Forward Primer (25 $\mu\text{mol/L}$)0.5 μL 、Reverse Primer (25 $\mu\text{mol/L}$)0.5 μL 、cDNA Template 2 μL 、nuclease-free Water 9.5 μL 、反应程序: 95°C 变性5 min, 95°C 变性30 s, 54°C 退火30 s, 72°C 延伸30 s, 循环38次, 72°C 再延伸5 min后, 扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳。

主要观察指标: 基因转染48 h后细胞的阳性表达率、细胞死亡率; 条件培养基筛选后细胞的基因表达情况。

设计、实施、评估者: 为第一、第二作者, 均接受过生物技术实验培训。

2 结果

2.1 BMMSC的分离、培养及鉴定 骨髓分离细胞在分离后48 h贴壁生长, 长梭形, 可见细胞核, 分散排列, 悬浮的球形细胞经换液后逐渐减少。培养7~10 d, 可观察到成片细胞克隆, 约在2周后可以出现致密的贴壁层。第3代培养细胞流式细胞鉴定, 结果显示第3代细胞各表面抗原表达阳性率分别为CD44 : 94.65%、CD34: 4.37%、CD45: 7.81%, 见图1。证明通过分离培养后可以获得纯度较高的BMMSC。

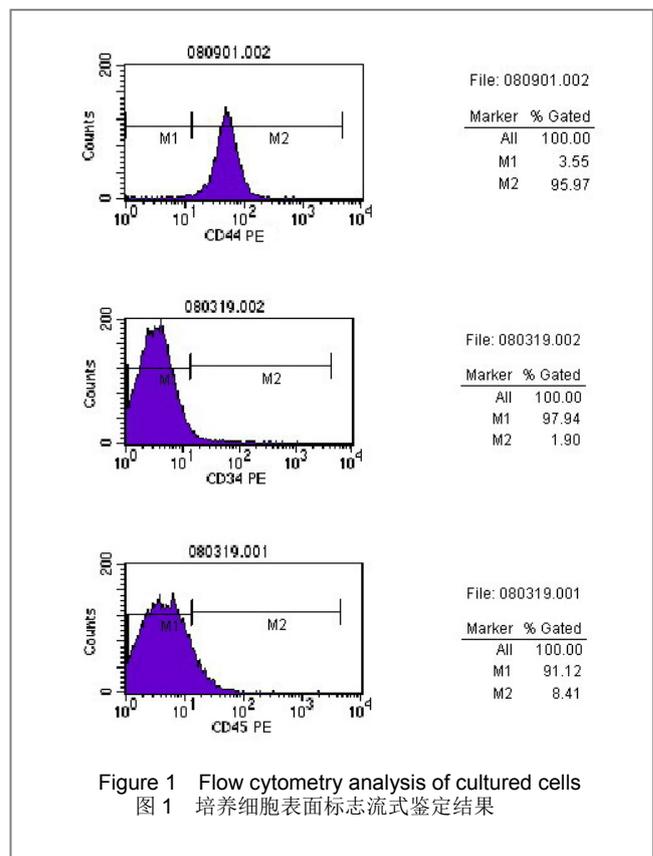
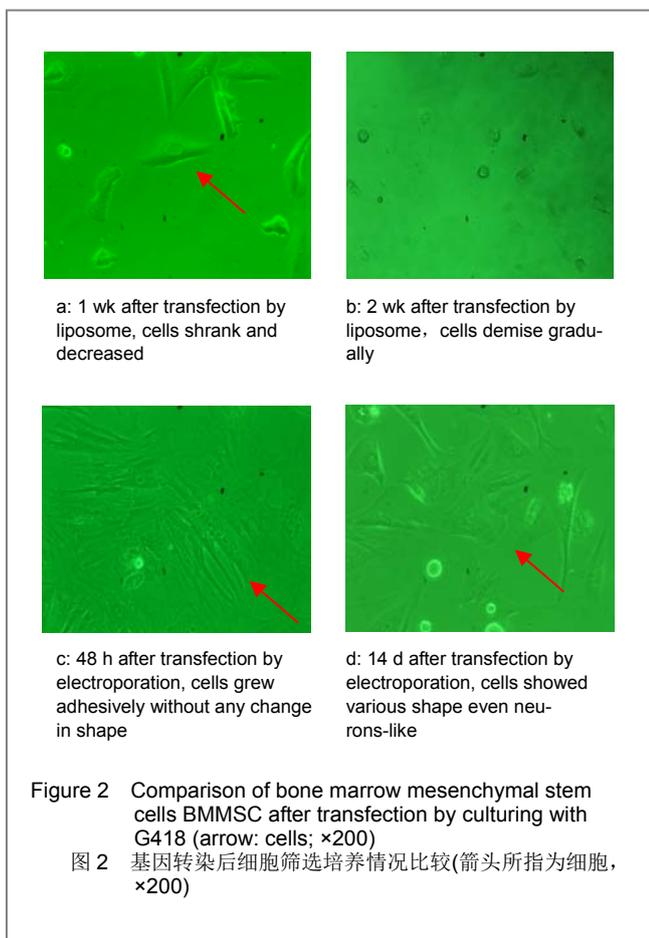


Figure 1 Flow cytometry analysis of cultured cells
图1 培养细胞表面标志流式鉴定结果

2.2 脂质体法和电穿孔法介导基因转染的比较 两种转染方法转染48 h后分别检测用免疫组织化学检测BDNF的瞬时表达率和显微镜下细胞计数计算转染后的细胞死亡率, 脂质体法瞬时转染率为 (5.80±2.80)%, 细胞死亡率为 (15.20±3.77)%; 电穿孔法瞬时转染率为 (24.30±5.19)%, 细胞死亡率为 (26.90±6.26)%。经卡方检验显示, 电穿孔法的瞬时表达率显著性高于脂质体法 ($P < 0.01$), 但细胞死亡率也显著性高于后者 ($P < 0.05$)。

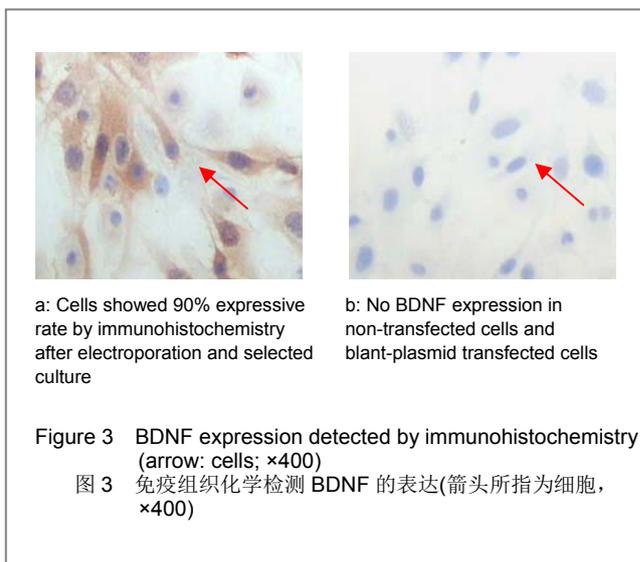
脂质体法转染后细胞部分死亡, 加G418筛选在2周后绝大部分细胞胞体收缩并逐步死亡, 重复多次实验均未能成功构建工程细胞。用电穿孔法转染48 h后细胞可贴壁生长, 除部分细胞死亡外, 细胞形态与转染前无明显变化。加入含G418培养基筛选, 持续培养10~14 d后, 细胞克隆扩大, 形态多变, 部分细胞呈现神经细胞的形态, 见图2。



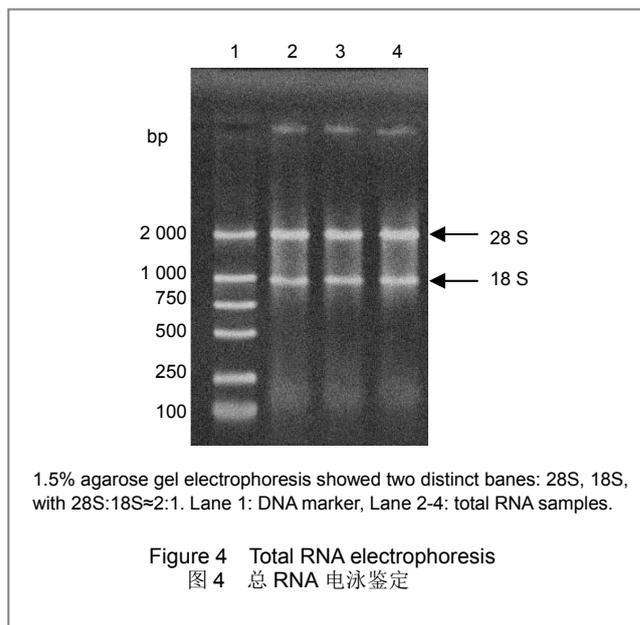
脂质体法虽然转染后细胞死亡率较低, 但目的基因瞬时表达率很低, 而且筛选后细胞多次扩增失败。因此本实验选用电穿孔法作为BMMSC基因工程细胞的建立方法。建立的工程细胞进一步经过免疫组织化学及RT-PCR方法证实目的基因表达。

2.3 免疫组织化学检测BDNF的表达 电穿孔法介导

基因转染细胞, 经G418筛选14 d后的BDNF阳性表达率约90%。未转染细胞或者转染空白质粒细胞几乎不表达BDNF蛋白, 图3。



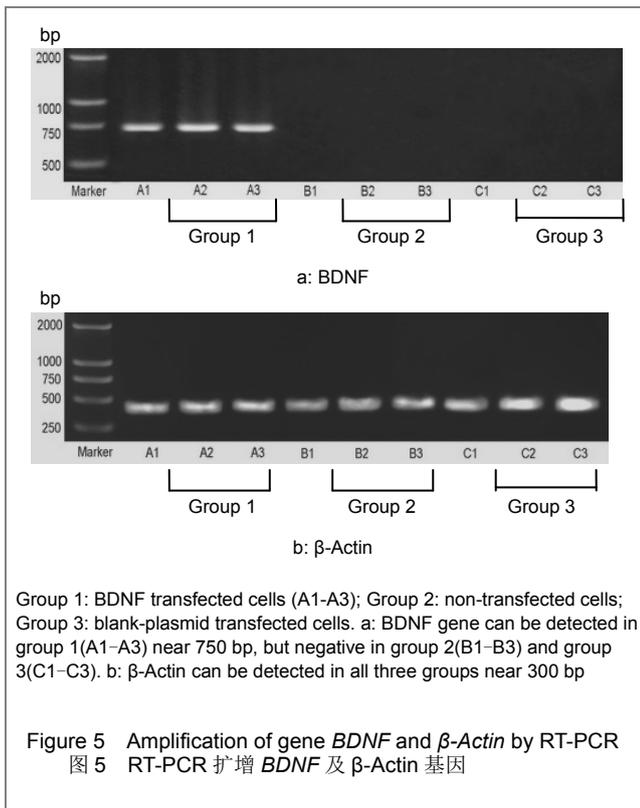
2.4 RT-PCR检测BDNF mRNA 电穿孔法介导基因转染细胞, 经G418筛选后, 细胞提取总RNA后, 行1.5%的琼脂糖凝胶电泳, 如果出现2条清晰条带: 28S、18S, 且 28S : 18S ≈ 2 : 1, 说明RNA质量好, 见图4。



紫外分光光度仪测量RNA样本的 A_{260} 、 A_{280} 吸光度值, 显示 $A_{260}/A_{280}=1.8\sim 2.0$, 说明总RNA的纯度高。

RT-PCR方法检测细胞BDNF mRNA, BDNF转染组在约750 bp处可以看到特异性条带, 而未转染组和转染空白质粒组没有特异性条带, 3组条带均没有明显杂带。而作为内参照的 β -Actin在3组均检测到约300 bp处的特异性条带, 见图5。说明了基因工程细胞能在体外转录

BDNF mRNA, 而未转染组和转染空白质粒组不转录 *BDNF* mRNA。



3 讨论

MSCs不但可以作为种子细胞移植进目标组织内, 分化替代为想对应的组织功能细胞, 而且还可以作为治疗基因的载体细胞, 达到基因治疗的目的^[3-5]。基因转染细胞的方法有病毒载体介导和非病毒载体介导两种。病毒载体虽然转染率高, 如慢病毒载体转染 MSCs 可以有高达95%的转染率^[6-7], 反转录病毒介导的MSCs转染效率达到 80%~90%^[8-9], 但是面临安全性、免疫排斥等问题^[10-11], 因此在本实验中探讨了非病毒载体转染的方法, 非病毒转染方法常用的有DEAE-葡聚糖法、磷酸钙法、脂质体法和电穿孔法, 尤其以后两者常用。

本实验以新型阳离子脂制剂 Lipofectamine™ 2000, 研究阳离子脂介导的转染方法应用于转基因细胞移植领域的前景。文献报道Lipofectamine介导基因转染MSCs的转染效率为1%~24%^[6, 12-13], 从实验结果看, 脂质体介导的基因转染MSCs效率很低, 为5.8%, 并且抗生素筛选2周后细胞几乎全部死亡, 实验重复多次均未得到阳性细胞克隆, 这与鲁玲玲等^[14]的实验结果相符合, 但也有学者用此方法成功构建稳定表达的基因修饰骨髓间充质干细胞^[15-16]。脂质体法介导包括MSCs在内的原代细胞转染效果欠佳的可能原因有: ①脂质体介导基因进入细胞的原理, 是通过包绕DNA, 合成脂囊, 与

细胞表面的唾液酸结合, 经细胞的胞饮或受体介导的胞饮作用进入细胞内。所以, 在用于MSCs时脂质体介导的基因转染效率低可能与该细胞表面缺乏其特异性受体有关, 也与细胞的物种来源有关^[17-18]。②虽然新一代的脂质体作了改良, 但仍避免不了对细胞有明显毒性^[19]。实验中在细胞转染后大部分细胞逐步死亡, 导致细胞克隆难以形成可能与这一点有关。③有研究表明脂质体转染法对于悬浮细胞和贴壁细胞的转染效率相差很大, MSCs是贴壁细胞, 这可能是影响其转染效率的另外一个原因^[20]。

电穿孔介导基因转染MSCs也是常用方法, 其特点是操作相对简单, 单次可以大批量转染。Peister等^[21]对经改良的电穿孔法转染人和大鼠的MSCs, 通过荧光蛋白观察转染细胞瞬时表达率为12.5%, 经过14 d的G418培养基筛选后细胞阳性表达率可达98%, 经过14 d的培养后细胞总数可以扩增达300倍, 可以建立稳定表达目的基因的工程细胞。Ferreira等^[22]对电穿孔法进行改良, 发现转染48 h后报告基因lacZ在MSCs的表达率为29%, 表达至少维持10 d。并且, 电转化法进行MSCs的基因转染对细胞的活力和生物学特性包括多向分化能力影响不大。实验用电穿孔法转染基因, 发现目的基因瞬时表达率约为24.3%, 高于脂质体转染方法, 经过条件培养基筛选2周后目的基因阳性表达率可达90%。虽然电穿孔转染细胞死亡率也相对较高, 本实验是26.9%, 甚至可达50%^[6], 但电穿孔法不失为一个简单可行的方法。怎样进一步提高非病毒载体转染原代细胞的转染率是仍是一个值得深入研究的问题。为了选择稳定表达细胞系, 线性质粒比环形质粒更容易整合到细胞基因组, 或者可以选择缺少细菌序列的微环DNA载体 (Minicircle DNA vectors)^[23], 研究证明新型纳米材料也对转染率的提高有帮助^[24]。近年来amaza公司对电穿孔法进行了改良, 发明了专利技术核转染(Nucleofection), 能够让质粒直接进去细胞核内, 提高转染率的同时显著降低了细胞死亡率, 使对包括MSCs内的多种类型原代细胞基因转染率提高到50%~90%^[25-26], 但不同细胞转染的参数包括电压、温度、转导液等需要经过不同的转染条件优化^[27]。

实验证实, MSCs导入外源性基因后可在体内高效长期表达, 并可以长时间保持自身的生物学特性不变^[8, 28-30]。Chan等^[29]用反转录病毒将 β -半乳糖苷酶和绿色荧光蛋白基因转染人胚胎MSCs, MSCs在转染成功后14周以上仍保持自我更新、多向分化的潜能, 体外稳定传代20代以上。Lee等^[8]利用反转录病毒将人白细胞介素3(human interleukin 3, hIL-3)和绿色荧光蛋白基因(green fluorescent protein, GFP)转染小鼠MSCs, 并随后进行了长时间的体外、小鼠外体内实验观察, 结果发现转入人白细胞介素 3 和绿色荧光蛋白基因的

MSCs仍具有旺盛的增殖能力, 体外实验证明转基因细胞保持着稳定的外源基因表达长达6个月以上, 细胞分化后亦保持表达外源基因的能力, 在体内(皮下、静脉注射、腹腔内注射)也可以维持高水平表达外源基因时间长达3个月。同样, 实验也证明了应用电穿孔法转染MSCs对细胞多向分化能力没有明显影响^[25-26]。因此利用电穿孔法介导基因转染MSCs构建工程细胞是安全可行的, 但是启动子失活、基因沉默、转染细胞丢失及转染细胞自我维持能力的长时间评价、安全性评价等问题仍进一步研究解决。

4 参考文献

- [1] Nasef A, Ashammakhi N, Fouillard L. Immunomodulatory effect of mesenchymal stromal cells: possible mechanisms. 2008;3(4): 531-546.
- [2] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30. 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [3] Kumar S, Chanda D, Ponnazhagan S. Therapeutic potential of genetically modified mesenchymal stem cells. 2008;15(10): 711-775.
- [4] Dazzi F, Horwood NJ. Potential of mesenchymal stem cell therapy. 2007;19(6):650-655.
- [5] Reinders ME, Fibbe WE, Rabelink TJ. Multipotent mesenchymal stromal cell therapy in renal disease and kidney transplantation. Nephrol Dial Transplant 2010;25(1):17-24.
- [6] McMahon JM, Conroy S, Lyons M, et al. Gene transfer into rat mesenchymal stem cells: a comparative study of viral and nonviral vectors. 2006;15(1):87-96.
- [7] Ricks DM, Kutner R, Zhang XY, et al. Optimized lentiviral transduction of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Stem Cells Dev 2008;17(3):441-450.
- [8] Lee K, Majumdar MK, Buyaner D, et al. Human mesenchymal stem cells maintain transgene expression during expansion and differentiation. 2001;3(6):857-866.
- [9] Zheng ZF, Yi ZW, He QM, et al. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi. 2008; (09):1008-1011. 曾智凤, 易著文, 何庆南, 等. 逆转录病毒介导增强型绿色荧光蛋白基因在大鼠骨髓间充质干细胞中的表达[J]. 世界华人消化杂志, 2008;(09):1008-1011.
- [10] Xu S, Ma YY, Lv MM, et al. Shengwu Jishu Tongxun. 2007;(6): 1013-1015. 徐述, 马玉媛, 吕茂民, 等. 反转录病毒基因治疗载体及其安全性评价[J]. 生物技术通讯, 2007,(6):1013-1015.
- [11] Nayak S, Herzog RW. Progress and prospects: immune responses to viral vectors. Gene Ther. 2010;17(2):294.
- [12] Clements BA, Incani V, Kucharski C, et al. A comparative evaluation of poly-L-lysine-palmitic acid and Lipofectamine 2000 for plasmid delivery to bone marrow stromal cells. Biomaterials 2007;28(31):4693-4704.
- [13] Gheisari Y, Soleimani M, Azadmanesh K, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells: optimization and comparison of five cationic polymer-based gene delivery methods. Cytotherapy 2008;10(8):815-823.
- [14] Ru LL, Zhao HY, Zhao CL, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchao Kangfu. 2007;11(3):471-474. 鲁玲玲, 赵焕英, 赵春礼, 等. 骨髓间充质干细胞基因工程改造方法的比较[J]. 中国组织工程研究与临床康复[J]. 2007;11(3):471-474.
- [15] Shi DG, Li GL, Zhang JR, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchao Kangfu. 2009;(33):6411-6417. 史德刚, 栗国梁, 张积仁, 等. 重组碱性成纤维细胞生长因子基因转染对于骨髓源性成骨细胞的生物学特性及对血管生成的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复. 2009;(33):6411-6417.
- [16] Zan YL, Kurexi YNS, Huang GH, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchao Kangfu. 2008; 12(47):9226-9230. 詹玉林, 库热西·玉努斯, 黄国虹, 等. pIRES2-EGFP-BMP-2真核表达质粒转染兔骨髓间充质干细胞[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(47):9226-9230.
- [17] Hoare M, Greiser U, Schu S, et al. Enhanced lipoplex-mediated gene expression in mesenchymal stem cells using reiterated nuclear localization sequence peptides. J Gene Med. 2010; 12(2):207-218.
- [18] Zuhorn IS, Engberts JB, Hoekstra D. Gene delivery by cationic lipid vectors: overcoming cellular barriers. Eur Biophys J 2007; 36(4-5):349-362.
- [19] Srinivasan C, Burgess DJ. Optimization and characterization of anionic lipoplexes for gene delivery. J Control Release. 2009; 136(1):62-70.
- [20] Smith CC, Lynch AM, Gooderham NJ. Evaluating the genetic toxicology of DNA-based products using existing genetic toxicology assays. 2003;18(3):259-264.
- [21] Peister A, Mellad JA, Wang M, et al. Stable transfection of MSCs by electroporation. 2004;11(2):224-228.
- [22] Ferreira E, Potier E, Logeart-Avramoglou D, et al. Optimization of a gene electrotransfer method for mesenchymal stem cell transfection. 2008;15(7):537-544.
- [23] Mayrhofer P, Blaesen M, Schlee M, et al. Minicircle-DNA production by site specific recombination and protein-DNA interaction chromatography. J Gene Med. 2008;10(11):1253-1269.
- [24] Pathak A, Patnaik S, Gupta KC. Recent trends in non-viral vector-mediated gene delivery. Biotechnol J. 2009;4(11): 1559-1572.
- [25] Zeitelhofer M, Vessey JP, Thomas S, et al. Transfection of cultured primary neurons via nucleofection. Curr Protoc Neurosci 2009; Chapter 4: Unit 4.32
- [26] Haleem-Smith H, Derfoul A, Okafor C, et al. Optimization of high-efficiency transfection of adult human mesenchymal stem cells in vitro. 2005;30(1):9-20.
- [27] Wang HL, Pan MX, Zhang HY, et al. Zhonghua Shiyan Waikexue Zazhi. 2007, (08):993-995. 王海澜, 潘明新, 张会迎, 等. Nucleofector~(TM)电转仪转染外源基因至骨髓基质细胞优化方案[J]. 中华实验外科杂志, 2007, 24(8):993-995.
- [28] Sasportas LS, Kasmieh R, Wakimoto H, et al. Assessment of therapeutic efficacy and fate of engineered human mesenchymal stem cells for cancer therapy. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009; 106(12):4822-4827.
- [29] Chan J, O'Donoghue K, de la Fuente J, et al. Human fetal mesenchymal stem cells as vehicles for gene delivery. 2005; 23(1):93-102.
- [30] Roelants V, Labar D, de Meester C, et al. Comparison between adenoviral and retroviral vectors for the transduction of the thymidine kinase PET reporter gene in rat mesenchymal stem cells. J Nucl Med. 2008;49(11):1836-1844.

来自本文课题的更多信息--

利益冲突: 无利益冲突。

课题的意义: 课题比较了两种非病毒载体转染基因方法, 对细胞的基因转染技术的选择有参考价值。

课题评估的“金标准”: 比较细胞转染率时, 如果采用绿色荧光蛋白基因作为示踪蛋白会更好, 实验未应用该方法, 原因是构建的质粒蛋白是为应用于动物体内实验而设计, 未考虑到计算细胞转染率的用途。

设计或课题的偏倚与不足: 文中的细胞阳性表达率只是代表目的基因的表达情况, 和细胞转染率是不同的两个概念, 比较好的方法是采用绿色荧光蛋白作为计算细胞转染率的依据。

提供临床借鉴的价值: 由于病毒载体的安全性问题影响其临床上的应用, 而电穿孔法介导基因转染安全性良好, 可以大批量操作, 是值得推广的构建基因工程细胞的方法。