

永生化人前软骨干细胞株的构建*☆

尹德龙, 陈安民, 郭风劲, 王俊芳, 程浩

Construction of immortalized human precartilaginous stem cell lines

Yin De-long, Chen An-min, Guo Feng-jin, Wang Jun-fang, Cheng Hao

Abstract

BACKGROUND: The precartilaginous stem cells are limited regarding *in vitro* proliferative capacity, but the immortalized cell lines can provide a large number of stable immortalized cells, and simian virus 40 large T antigen gene (SV40Tag) is one of gene fragments which are commonly used and effective *in vitro* immortalized cells.

OBJECTIVE: To construct human immortalized precartilaginous stem cells (IPSCs) using human precartilaginous stem cells induced by SV40LTag gene.

METHODS: The human immortalized precartilaginous stem cells were isolated from aborted fetus and purified with enzyme digestion and immunomagnetic beads screening method. By using liposome-mediated gene transfection technology, plasmid pCMVSV40T/PUR containing SV40Tag was transfected in primary embryonic precartilaginous stem cells, while non-transfected cells served as negative controls. Positive clones were cultured to observe the cell morphology and the passage recovery, to calculate cell survival rate and population doubling time, to draw cell growth curve. Immunofluorescence cytochemistry was used to detect the expression of IPSCs fibroblast growth factor receptor 3, the expressions of SV40Tag and fibroblast growth factor receptor 3 in the human precartilaginous stem cells were determined by RT-PCR.

RESULTS AND CONCLUSION: Morphology of human IPSCs seemed coincidence with primary human precartilaginous stem cells. The survival rate of human IPSCs was not influenced by subculture, freezing and recovery, but the survival rate was descended in the human precartilaginous stem cells at the 6th and 10th passages ($P < 0.01$). Compared with cells at the 6th and 10th passages, the proliferation of human IPSCs was greater, with short population doubling time and high growth rate ($P < 0.01$). The immunofluorescence showed that fibroblast growth factor receptor 3 was positive in human IPSCs at the second passage, and the RT-PCR results of fibroblast growth factor receptor 3 revealed a specific amplification band at 400 bp, while that of SV40Tag revealed at 560 bp. No band was seen in the primary cells. It is indicated that SV40Tag human IPSCs can be constructed successfully using immunomagnetic bead screening technology and liposome transfection technique.

Yin DL, Chen AM, Guo FJ, Wang JF, Cheng H. Construction of immortalized human precartilaginous stem cell lines. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(2):223-226. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 前软骨干细胞体外培养增殖能力有限, 但永生化细胞株可以提供大量性状稳定的永生化细胞, 并且猿病毒 40 大 T 抗原基因(simian virus 40 large tumor antigen, SV40Tag)是较为常用且有效的体外永生化细胞的基因片段之一。

目的: 以 SV40Tag 转染的人前软骨干细胞构建永生化人前软骨干细胞株。

方法: 采用酶消化法及免疫磁珠筛选技术分离纯化人胚胎前软骨干细胞。利用脂质体介导基因转染技术将含有 SV40Tag 的质粒 pCMVSV40T/PUR 转染原代胚胎前软骨干细胞, 以未转染细胞作阴性对照。阳性克隆扩大培养, 观察细胞形态学以及传代复苏情况, 计算细胞存活率和群体倍增时间, 绘制细胞生长曲线。以免疫荧光细胞化学技术检测永生化人前软骨干细胞成纤维生长因子受体 3, 以 RT-PCR 检测永生化人前软骨干细胞及人前软骨干细胞中 SV40Tag 和成纤维生长因子受体 3 表达。

结果与结论: 贴壁培养的永生化人前软骨干细胞形态与原代人前软骨干细胞形态无明显差别。传代、冻存、复苏对人永生化前软骨干细胞的存活率无影响, 第 6、10 代人前软骨干细胞的存活率降低($P < 0.01$)。与第 6、10 代人前软骨干细胞相比, 永生化人前软骨干细胞增殖较旺盛, 群体倍增时间短、增殖率高($P < 0.01$)。第 2 代永生化人前软骨干细胞成纤维生长因子受体 3 染色阳性, 成纤维生长因子受体 3 的 RT-PCR 结果显示在约 400 bp 处有一特异形扩增条带, SV40Tag 的 RT-PCR 结果显示在约 560 bp 处有一特异形扩增条带, 未转染的原代细胞未见条带。提示以免疫磁珠筛选技术及脂质体转染技术成功构建了 SV40Tag 永生化人前软骨干细胞株。

关键词: 人前软骨干细胞; 永生化; SV40Tag; 软骨组织工程

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.02.008

尹德龙, 陈安民, 郭风劲, 王俊芳, 程浩. 永生化人前软骨干细胞株的构建[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(2):223-226. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

前软骨干细胞也称骨髓干细胞是一种成体干细胞^[1]。它是否为骨软骨瘤干细胞的前体细胞? 在特定的条件下, 能否诱变成为骨软骨瘤干细胞? 从而导致骨软骨瘤的发生、增殖、恶

变和转移? 这些问题都亟待去研究。作者旨在研究骨骺周围软骨膜中前软骨干细胞和骨骺来源的骨软骨瘤细胞在生物学上的异同, 探讨在特定条件下前软骨干细胞是否会转化为肿瘤干细胞, 导致骨软骨瘤的发生, 从而试图进一步阐明遗传性多发性骨软骨瘤发生的原理。但前软骨干细胞体外培养增殖能力有限。近年来,

Department of Orthopedics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Yin De-long[☆], Studying for doctorate, Department of Orthopedics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China yindelong607@sina.com

Correspondence to: Cheng Hao, Doctor, Attending physician, Department of Orthopedics, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China chenghao@tjh.tjmu.edu.cn

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30650007*

Received: 2009-07-03 Accepted: 2009-08-11

华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科, 湖北省武汉市 430030

尹德龙[☆], 男, 1982年生, 天津市宁河县人, 汉族, 华中科技大学同济医学院在读博士, 主要从事骨肿瘤研究。
yindelong607@sina.com

通讯作者: 程浩, 博士, 主治医师, 华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科, 湖北省武汉市 430030
chenghao@tjh.tjmu.edu.cn

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2010)02-00223-04

收稿日期: 2009-07-03
修回日期: 2009-08-11
(20090616016/GW-Y)

随着永生化技术的成熟, 永生化的细胞株可以提供大量性状稳定的永生化细胞^[2], 猿肾病毒40大T抗原(simian virus 40 large tumor antigen, SV40Tag)基因是较为常用且有效的体外永生细胞的基因片段之一^[3]。作者用SV40Tag转染人前软骨干细胞, 诱导其永生, 构建可连续传代的、性状稳定的人永生化前软骨干细胞, 为后续运用基因打靶技术构建骨软骨瘤的细胞模型提供了一个稳定的细胞来源^[4-6]。

1 材料和方法

设计: 脂质体介导的基因转染及验证实验。

时间及地点: 于2007-01/12在华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科实验室完成。

材料: 3个月流产胚胎由华中科技大学同济医学院附属同济医院妇产科门诊提供。已获医院伦理委员会批准及家属和孕妇知情同意。含有SV40Tag的质粒pCMVSV40T/PUR获赠于瑞典Jan Holgersson教授^[7]。

设计针对人前软骨干细胞特异性受体成纤维生长因子受体3的2条引物: 上游sequence(5' to 3'): GGG CTT CTT CCT GTT CAT CC, 下游sequence(5' to 3'): GTG GCA TCG TCT TTC AGC ATC T, 产物长度为402 bp。sequence(5' to 3'): TGG AAT AGT CAC CAT GAA TG, 产物长度为558 bp。引物由上海生工公司合成。

实验方法:

人前软骨干细胞的分离与纯化: 取人胚胎四肢长骨干骺端La Croix环处软骨膜组织取下^[8], 剪成1 mm³小块, 用2.5 g/L胰蛋白酶消化5 min, 离心8 min (1 000 g), 弃上清; 用0.1% I型胶原酶消化过夜, 100目滤网过滤以获得单细胞悬液, 调整细胞浓度1×10⁹ L⁻¹, 接种于250 mL培养瓶中培养48 h。待细胞长满瓶底后, 常规消化离心细胞, 用1 000 μL Buffer悬浮, 按每10⁷细胞加入20 μL小鼠抗人单克隆抗体FGFR-3, 37 °C反应15 min, 加50 μL山羊抗小鼠IgG二抗, 37 °C反应15 min, 离心8 min (1 000 g), 弃上清, buffer洗细胞2次, buffer重悬细胞, 用免疫磁珠分离柱将阳性细胞分离出来(即人前软骨干细胞), 用培养基悬浮细胞, 将其接种到50 mL培养瓶中培养。

质粒扩增、提取及鉴定: 将质粒pCMVSV40T/PUR转化到DH5α感受态细胞中扩增, 按小提质粒盒的步骤及试剂提取质粒, 用Xho I和Not

I分别进行单酶切和双酶切, 1.0%琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。测质粒浓度, 纯度, 低温冰箱中保存备用。

人前软骨干细胞的转染、筛选及扩大培养: 取处于指数生长期的第2~3代的人前软骨干细胞接种于24孔板, 按lipofectAMINE2000说明书步骤用SV40Tag基因转染人前软骨干细胞。48 h后用分别依次用含嘌呤霉素0.8, 0.5, 0.2 mg/L的培养基进行筛选, 未转染SV40Tag基因的细胞作阴性对照。经四五周后出现抗性克隆后, 采用有限稀释法挑选单克隆并扩大培养。

转染细胞的鉴定: 以转染后的第2代永生化人前软骨干细胞制作细胞爬片, 应用SABC(荧光FITC)试剂盒的步骤和试剂进行FGFR-3免疫荧光染色, 用Trizol试剂盒提取第2代人前软骨干细胞和第2, 30代永生化人前软骨干细胞的总RNA, 进行反转录。应用PCR技术检测上述3种细胞中SV40Tag基因及FGFR-3存在与否。PCR产物以1.0%琼脂糖凝胶电泳分析。

传代、冻存和复苏^[9-11]: 按常规方法传代, 采用“慢冻、快融”的方法定期冻存、复苏细胞, 复苏后行0.5%Trypan Blue染色, 计算细胞存活率, 细胞存活率=[活细胞总数/(活细胞总数+死细胞总数)]×100%。

绘制细胞生长曲线和计算群体倍增时间: 将第2, 6, 10代人前软骨干细胞和第30代永生化人前软骨干细胞按1×10⁴/孔接种于24孔板, 每隔24 h常规消化3孔细胞并计数, 取平均值绘制生长曲线, 按下列公式计算细胞群体倍增时间: 群体倍增时间=[Lg2/(LgN₁-LgN₀)]×t, 其中N₀和N₁分别代表接种后和培养t时间后的细胞数。

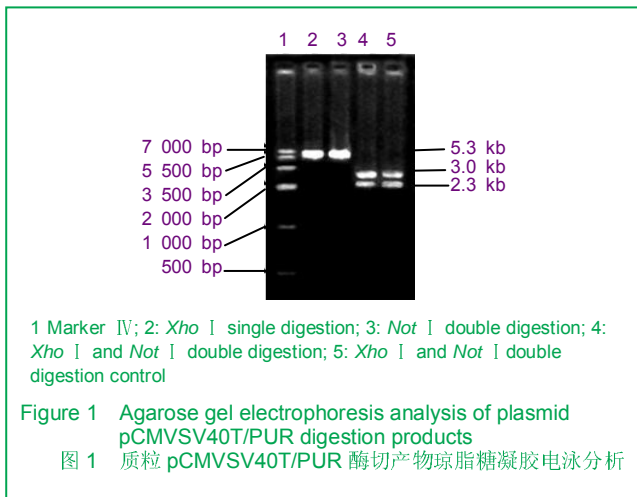
统计学分析: 由第一作者采用SPSS13.0统计软件包进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。不同细胞间比较采用单因素方差分析, P<0.05为差异有显著性意义。

2 结果

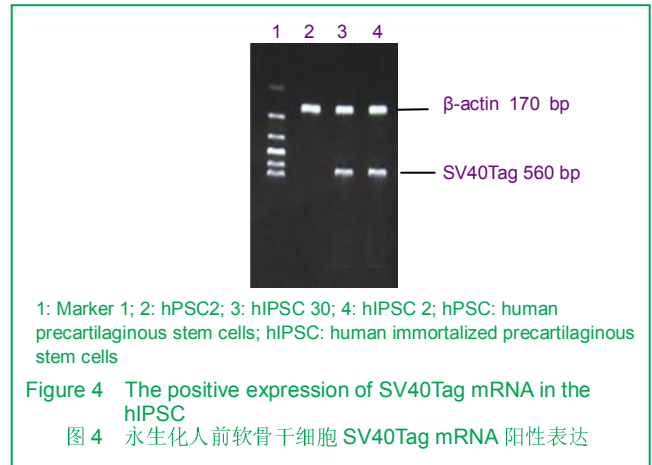
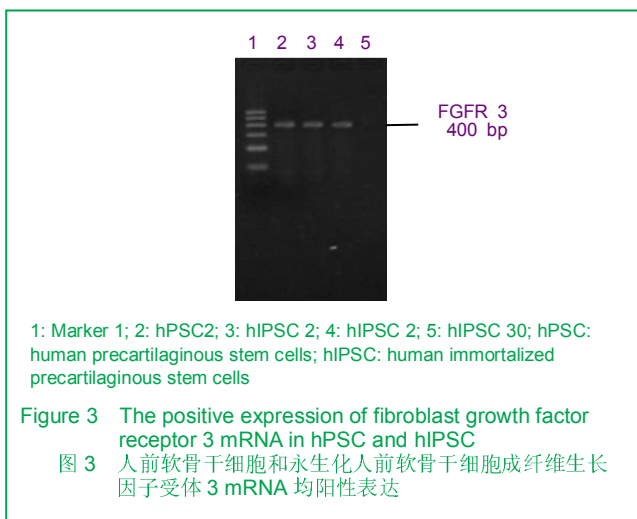
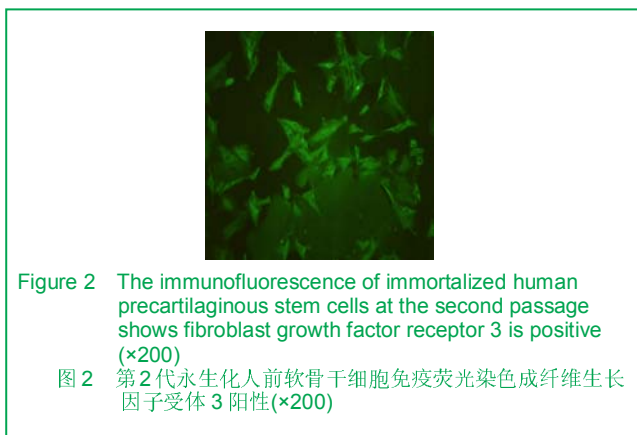
2.1 人前软骨干细胞的分离与纯化 人前软骨干细胞用酶消化法获得后, 用免疫磁珠分选技术获得的阳性细胞贴壁生长, 折光性好, 以梭形或三角形为主。

2.2 质粒扩增、提取及鉴定 质粒pCMVSV40T/PUR酶切产物电泳分析显示, 质粒载体经Not I或Xho I单酶切各得到一条约5.3 kb的条带; 经Not I和Xho I双酶切得到约2.3 kb和3.0 kb的2条带, 目的基因约2.3 kb

与Genbank中发布的SV40Tag cDNA长度一致, 见图1。

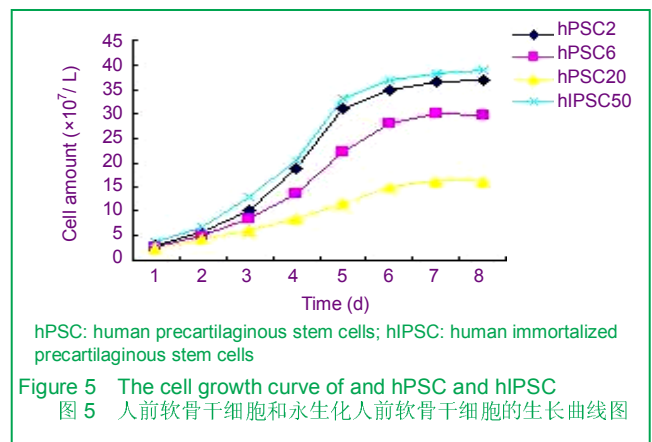


2.3 转染细胞的鉴定 转染细胞经嘌呤霉素筛选后单克隆扩大培养, 贴壁培养的二代细胞形态与原代培养的人前软骨干细胞形态无明显差别。用免疫荧光染色法检测显示, 第2代永生化人前软骨干细胞的成纤维生长因子受体3染色阳性, 见图2。成纤维生长因子受体3的RT-PCR结果显示在约400 bp处有一特异形扩增条带, SV40Tag的RT-PCR结果显示在约560 bp处有一特异形扩增条带, 而未转染的原代细胞均未见条带, 见图3, 4。



2.4 细胞传代、复苏、冻存结果 传代、复苏和冻存不改变细胞的形态及增殖能力, 复苏的30代永生化人前软骨干细胞存活率为(94±5)%, 而6, 10代人前软骨干细胞分别为(80±6)%和(45±4)%, 均低于30代永生化人前软骨干细胞($P < 0.01$), 人前软骨干细胞体外传至10代左右即出现复制衰老现象, 而永生化人前软骨干细胞可连续传代, 目前已传至30代, 未观察到衰老迹象。

2.5 细胞生长曲线和群体倍增时间 第2, 6, 10代的人前软骨干细胞以及转染后的第30代永生化人前软骨干细胞生长曲线均呈“S”形, 见图5。



3 讨论

遗传性多发性骨软骨瘤发病时可压迫血管, 压迫或刺激神经^[12], 妨碍关节或肌腱活动, 最严重的并发症是恶变, 绝大多数恶变为软骨肉瘤^[13], 但也有恶变为骨肉瘤和纤维肉瘤的报道。恶变率各家报道不一, 国外统计资料一般为5%~28%^[14], 亦有指出在多发性骨软骨瘤的患者中恶变的比例高达10%~20%^[15]。研究遗传性多发性骨软骨瘤的发病机制, 从而在病因环节达到预防和治疗疾病的目的, 是目前亟待解决的问题。从前软骨干细胞的提出^[1], 到近年来游洪波等对前软骨干细胞进行的纯化^[16], 都为研究正常骨骺发育及骨骺发育异常引起的疾病提供了新思路。但前软骨干细胞体外

培养是不能无限分裂、增殖的, 经过有限次的传代后就会停止增殖, 进而衰老、死亡^[7], 限制了对正常骨骺发育及骨骺发育异常引起疾病的可能机制的研究。实验发现第6代人前软骨干细胞(hPSC6)的传代时间延长至七八天, 到第10代的人前软骨干细胞(hPSC10)即基本失去增殖能力, 传代后3周, 细胞仍不能铺满瓶底, 细胞内出现小空泡及颗粒, 出现典型的复制衰老现象, 被看作是凋亡的一种方式^[17], 也是细胞周期的G₁期不可逆性停滞^[18], 只有当细胞发生遗传特性的改变, 如获得永生转化时, 越过M₂期, 细胞才能连续传代并持久增殖^[19]。SV40Tag基因是较为常用且有效的体外永生细胞的基因片段之一^[20-21], 可通过与生长抑制因子pRB、p53和SEN6相互作用^[22], 避免细胞进入凋亡, 延长细胞寿命, 并使细胞最终渡过危机期, 实现永生^[23]。实验利用脂质体介导的基因转染技术将含有SV40Tag基因的质粒转染体外培养的人前软骨干细胞^[24-26]。经嘌呤霉素筛选, 成功构建了永生化人前软骨干细胞。

人前软骨干细胞株目前为止还没有文献报道建立的, 实验通过免疫磁珠筛选技术及脂质体转染技术成功构建了SV40Tag永生化人前软骨干细胞株, 为研究正常骨骺发育及骨骺发育异常引起疾病的可能机制提供了相对稳定的细胞来源, 而且人流产胎儿前软骨干细胞从物种意义上来说更是无限接近人骨软骨瘤细胞的物种起源, 比起其他物种的前软骨干细胞研究都更具有研究意义。但是永生化人前软骨干细胞株的生物学稳定性还有待进一步研究观察, 而且本实验还有待进一步完成。即通过基因打靶技术诱使人前软骨干细胞的EXT1基因的ex-on6发生移码突变(系cDNA第2120位T丢失)^[5-7], 研究突变的人前软骨干细胞在体内外增殖、分化、矿化、凋亡过程中的变化, 进一步阐明EXT1基因ex-on6突变导致遗传性多发性外生骨疣的详细机制, 进一步加深对遗传性多发性外生骨疣及其他骨骺发育疾病的认识。

4 参考文献

[1] Robinson D, Hasharoni A, Cohen N, et al. Fibroblast growth factor receptor-3 as a marker for precartilaginous stem cells. Clin Orthop Relat Res. 1999;(367 Suppl): S163-175.

[2] Chapman EJ, Kelly G, Knowles MA. Genes involved in differentiation, stem cell renewal, and tumorigenesis are modulated in telomerase-immortalized human urothelial cells. Mol Cancer Res. 2008; 6(7):1154-1168.

[3] Jha KK, Banga S, Palejwala V, et al. SV40-mediated immortalization. Exp Cell Res. 1998;25: 1-7.

[4] Meinicke H, Darcan Y, Hamelmann E. Targeting Allergic Airway Diseases by siRNA: An Option for the Future? Curr Mol Med. 2009;9(4):483-494.

[5] Tolmachov O. Designing plasmid vectors. Methods Mol Biol. 2009; 542:117-129.

[6] Tian F, Stevens NM, Buckler ES 4th. Tracking footprints of maize domestication and evidence for a massive selective sweep on chromosome 10. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106 Suppl 1: 9979-9986.

[7] Holgersson J, Gustafsson A, Breimer ME. Characteristics of protein-carbohydrate interactions as a basis for developing novel carbohydrate-based antirejection therapies. Immunol Cell Biol. 2005;83(6):694-708.

[8] Zhang S, Chen A, Guo F, et al. Immunological purification of rat precartilaginous stem cells and construction of the immortalized cell strain. Arch Orthop Trauma Surg. 2008; 128(11): 1339-1344.

[9] Liu L, Nutter LM, Law N, et al. Sperm freezing and in vitro fertilization in three substrains of C57BL/6 mice. J Am Assoc Lab Anim Sci. 2009;48(1):39-43.

[10] Li Y, Tan JC, Li LS. Comparison of three methods for cryopreservation of human embryonic stem cells. Fertil Steril. 2008. [Epub ahead of print]

[11] Dash SN, Routray P, Dash C, et al. Use of the non-toxic cryoprotectant trehalose enhances recovery and function of fish embryonic stem cells following cryogenic storage. Curr Stem Cell Res Ther. 2008;3(4):277-287.

[12] Han IH, Kuh SU. Cervical Osteochondroma Presenting as Brown-Sequard Syndrome in a Child with Hereditary Multiple Exostosis. J Korean Neurosurg Soc. 2009;45(5):309-311.

[13] Heffernan EJ, Alkubaidan FO, Munk PL. Radiology for the surgeon Musculoskeletal case 42. Can J Surg. 2008;51(5):397-398.

[14] Kivioja A, Ervasti H, Kinnunen J, et al. Chondrosarcoma in a family with multiple hereditary exostoses. J Bone Joint Surg Br. 2000;82(2):261-266.

[15] Cimino R, Steenks MH, Michelotti A, et al. Mandibular condyle osteochondroma. Review of the literature and report of a misdiagnosed case. J Orofac Pain. 2003;17(3):254-261.

[16] You HB, Chen AM, Cheng H. Zhonghua Chuangshang Zazhi. 2004; 20(10):606-608. 游洪波, 陈安民, 程浩. 免疫磁性细胞分选技术分离纯化新生大鼠骨骺前软骨干细胞[J]. 中华创伤杂志. 2004;20(10):606-608.

[17] Bollmann FM. The many faces of telomerase: emerging extratelomeric effects. Bioessays. 2008;30(8):728-732.

[18] Tolstogonov GV, Belichenko-Weitzmann IV, Lu JP, et al. Spontaneously immortalized mouse embryo fibroblasts: growth behavior of wild-type and vimentin-deficient cells in relation to mitochondrial structure and activity. DNA Cell Biol. 2005;24(11):680-709.

[19] Cukusić A, Skrobot Vidacek N, Sopta M, et al. Telomerase regulation at the crossroads of cell fate. Cytogenet Genome Res. 2008;122(3-4):263-272.

[20] Robinson C, van Bruggen I, Segal A, et al. A novel SV40 Tag transgenic model of asbestos-induced mesothelioma: malignant transformation is dose dependent. Cancer Res. 2006;66(22): 10786-10794.

[21] Takenouchi T, Iwamaru Y, Sato M, et al. Establishment and characterization of SV40 large T antigen-immortalized cell lines derived from fetal bovine brain tissues after prolonged cryopreservation. Cell Biol Int. 2007;31(1):57-64.

[22] Beitzinger M, Oswald C, Beinoraviciute-Kellner R, et al. Regulation of telomerase activity by the p53 family member p73. Oncogene. 2006;25(6):813-826.

[23] Mahon C, Liang B, Tikhanovich I, et al. Restriction of human polyomavirus BK virus DNA replication in murine cells and extracts. J Virol. 2009;83(11):5708-5717.

[24] Shaw ML, Williams EJ, Hawes S, et al. Characterisation of histone variant distribution in human embryonic stem cells by transfection of in vitro transcribed mRNA. Mol Reprod Dev. 2009. [Epub ahead of print]

[25] Huichalaf C, Schoser B, Schneider-Gold C, et al. Reduction of the rate of protein translation in patients with myotonic dystrophy 2. J Neurosci. 2009;29(28):9042-9049.

[26] Sibbe M, Förster E, Basak O, et al. Reelin and Notch1 cooperate in the development of the dentate gyrus. J Neurosci. 2009;29(26): 8578-8585.

来自本文课题的更多信息--

基金资助: 课题为国家自然科学基金项目(30650007)。

实验设计与文章构思: 实验永生化前软骨干细胞是从流产胎儿中提取, 而以前大部分研究者提取前软骨干细胞时, 多取自大鼠乳鼠。从物种起源上考虑, 实验提取的前软骨干细胞更接近所要进一步研究的人遗传性多发性骨软骨瘤, 为进一步的肿瘤机制研究提供了细胞学基础, 而且目前国内国外尚未有其他研究机构采用此种取材方法提取前软骨干细胞。实验以猿肾病毒 40 大 T 抗原基因转染胎儿前软骨干细胞, 诱导胎儿前软骨干细胞永生, 成功构建了可连续传代的、性状稳定的永生化人前软骨干细胞, 为后续运用基因打靶技术构建骨软骨瘤的细胞模型提供了一个稳定的细胞来源, 具有一定的实用价值。

实验中永生化细胞的致瘤性方面还有待在动物实验中的检测, 需进一步的研究。