

重组人白细胞介素1受体拮抗蛋白荧光质粒在软骨细胞的表达**☆

张平¹, 刘斌², 蔡道章², 钟志宏¹, 潘永谦¹, 张振山¹

Expression of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist protein fluorescent plasmid in chondrocytes

Zhang Ping¹, Liu Bin², Cai Dao-zhang², Zhong Zhi-hong¹, Pan Yong-qian¹, Zhang Zhen-shan¹

Abstract

BACKGROUND: Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) can delay osteoarthritis progress. The expression of IL-1Ra can be increased by gene transfection.

OBJECTIVE: To construct recombinant human IL-1Ra protein fluorescent plasmid and to observe its expression in chondrocytes by liposome gene transfection.

METHODS: pGEM-T-IL-1Ra was digested with double enzymes restriction, and then it was linked with T4 DNA ligase and cloned into the pEGFP-C1 vector. Rabbit articular chondrocytes were isolated and cultured *in vitro*. The plasmids carrying the IL-1Ra gene were transfected into chondrocytes. Then the expression of the transgene was observed under a fluorescence microscope and detected by using real-time PCR assay.

RESULTS AND CONCLUSION: The sequence of obtained pEGFP-C1-IL-1Ra was identical to IL-1Ra and sequence in the Genbank. The expression of enhanced green fluorescent protein was observed. Real-time PCR analysis showed that the genes were expressed in chondrocytes.

Zhang P, Liu B, Cai DZ, Zhong ZH, Pan YQ, Zhang ZS. Expression of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist protein fluorescent plasmid in chondrocytes. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(7): 1169-1173. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 白细胞介素1受体拮抗蛋白能延缓骨性关节炎进程, 通过转基因方法可以使白细胞介素1受体拮抗蛋白表达的增加。
目的: 观察重组人白细胞介素1受体拮抗蛋白荧光质粒的构建及经脂质体转染软骨细胞的表达情况。

方法: 双酶切法切取重组人白细胞介素1受体拮抗蛋白的 c-DNA 片段, 通过 T4DNA 连接酶连接到 pEGFP-C1 载体上。体外分离培养兔关节软骨细胞, 然后用构建的重组人白细胞介素1受体拮抗蛋白质粒经脂质体转染软骨细胞, 通过荧光显微镜观察转基因的表达和荧光定量 PCR 检测其表达。

结果与结论: 获得重组人 pEGFP-C1-IL-1Ra 真核表达载体质粒, 酶切及测序结果证明表达质粒的 DNA 序列完全正确。荧光显微镜观察有绿色荧光蛋白表达, 荧光定量 PCR 鉴定证实转染的软骨细胞基因得到表达。

关键词: 白细胞介素1受体拮抗蛋白; 基因转染; 荧光; 质粒; 软骨细胞; 表达

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.07.007

张平, 刘斌, 蔡道章, 钟志宏, 潘永谦, 张振山. 重组人白细胞介素1受体拮抗蛋白荧光质粒在软骨细胞的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(7):1169-1173. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

随着世界老龄化人口的增加, 骨性关节炎 (osteoarthritis, OA) 的发病率也呈逐年上升趋势, 已成为影响老年人、运动员生活质量的首要原因^[1-2]。关节软骨属于透明软骨, 自身没有血供, 无淋巴引流, 无神经分布, 对抗外伤和各种疾病的能力脆弱, 自我修复能力有限, 故有些学者称OA是不可治愈的疾患, 到目前为止还没有满意的解决方法^[3-4]。随着分子生物学和基因工程技术的发展, 将特定基因导入有特定治疗意义的功能细胞, 可达到治疗关节内疾病的目的^[5-7]。实验表明, 白细胞介素1受体 (Interleukin-1 receptor antagonist, IL-1Ra) 能延缓OA疾病的进程, 对抑制IL-1的活性有其特殊的应用价值^[8-9]。因此,

通过提高IL-1Ra在细胞外基质中的水平来保护并修复损伤的关节软骨, 具有可行性。本试验旨在构建重组人白细胞介素1受体拮抗蛋白荧光质粒及转染软骨细胞以观察其表达情况, 为基因治疗骨性关节炎提供研究基础。

1 材料和方法

设计: 细胞学体外观察。

时间及地点: 实验于2009-12/2010-05在中山大学第三附属医院中心实验室完成。

材料: 正常人体肝脏组织标本取自因健康原因需终止妊娠5月龄水囊引产的胚胎, 0.5 h 内将获取的组织液急速冻后, 转-80℃冰箱保存, 由广州医学院第三附属医院提供。

清洁级的成年健康新西兰大白兔1只, 雌

¹Department of Orthopaedics, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510150, Guangdong Province, China; ²Department of Orthopaedics, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, Guangdong Province, China

Zhang Ping ☆, Doctor, Associate chief physician, Department of Orthopaedics, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510150, Guangdong Province, China 644459349@qq.com

Supported by: the Scientific and Technological Project of Guangdong Province, No. (2009)198*, the Doctor Fund of Guangzhou Medical University, No.2008C20*

Received: 2010-09-20
Accepted: 2010-11-05

¹ 广州医学院第三附属医院骨外科, 广东省广州市 510150; ² 中山大学附属第三医院骨外科, 广东省广州市 510630

张平 ☆, 男, 1970年生, 广东省广州市人, 汉族, 2008年中山大学毕业, 博士, 副主任医师, 主要从事关节外科的研究。644459349@qq.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2011)07-01169-05

收稿日期: 2010-09-20
修回日期: 2010-11-05
(20100920003/YJ·Z)

性, 4月龄, 2 kg, 由中山大学北校区动物实验中心提供, 实验动物生产许可证号: SCXK(粤)2004-0011, 实验动物使用许可证号: SYXK(粤)2007-0081。

pEGFP-C1 Vector购自美国Clontech公司, 是一种增强型绿色荧光蛋白载体, 绿色荧光蛋白作为细胞示踪标记已得到广泛应用, 能保证重组其上基因的有效表达^[10]。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
总 RNA 提取纯化系统 SV Total RNA Isolation System, pGEM-T Easy Vector	美国 Promega 公司
PCR 引物及序列测定, Lipofectamine™ 2000 Reagent	美国 Invitrogen 公司
IL-1Ra 引物、探针	北京三博远志生物技术有限责任公司
Xho I、Bgl III 酶	美国 NEB 公司
E.Z.N.A® Plasmid Extraction Kit	美国 OMEGA 公司
T4 DNA Ligase Kit	美国 MBI 公司
TaKaRa Ex-Taq Polymerase Kit	日本 TaRaKa 公司
Trizol 液	上海申能博彩生物科技有限公司
荧光显微镜及摄影系统	日本 Nikon 公司
ABI7000 荧光定量 PCR 仪	美国 ABI 公司

方法:

重组人IL-1Ra表达载体的构建: 从正常人体肝脏组织标本中提取总RNA, PCR扩增IL-1Ra基因, 克隆进pGEM-T Easy Vector载体中, 见图1, 进行测序。通过Bgl II和Xho I进行双酶切, 酶切片断通过T₄ DNA连接酶连接到pEGFP-C1载体上, 构建pEGFP-IL-1Ra表达质粒, 见图2。

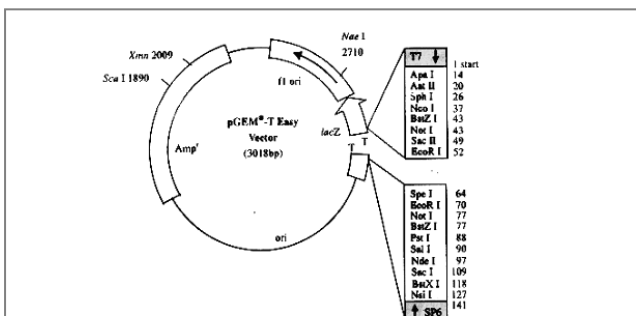


Figure 1 Physical map of pGEM-T Easy Vector
图 1 pGEM-T Easy Vector 物理图谱

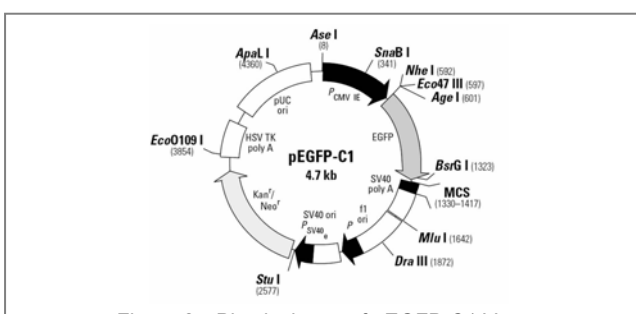


Figure 2 Physical map of pEGFP-C1 Vector
图 2 pEGFP-C1 Vector 物理图谱

制备DH5a感受态, 进行质粒转化, 铺板筛选并提取阳性克隆, 经酶切鉴定证实重组成功。重组质粒摇菌扩增后进行质粒抽提^[11]。

软骨细胞的培养: 空气栓塞法处死大白兔, 无菌操作下取肩、膝关节软骨, D-Hanks液漂洗后剪碎成糊状, 加入含0.02%EDTA的0.25%胰蛋白酶在37℃温箱孵化30 min, 1 000 r/min离心6 min, 弃上清, 加入0.2% II型胶原酶在37℃温箱消化4 h, 每2 h收集一次细胞, 200目不锈钢滤网过滤, 离心弃上清, D-Hanks液漂洗2次, 收集细胞, 加入含体积分数15%胎牛血清的高糖DMEM培养基。残渣继续置入0.2%的II型胶原酶中消化。待全部细胞收集后, 将细胞均匀接种于培养瓶中, 置于37℃、体积分数5% CO₂培养箱内进行培养。

软骨细胞的脂质体转染: 将软骨细胞以细胞浓度 $1.5 \times 10^5 \text{ L}^{-1}$ 接种于6孔培养板, 设转染组与未转染组, 每组各5孔。用含体积分数15%胎牛血清的DMEM培养基于37℃、体积分数5%CO₂条件下培养至细胞生长到80%~90%融合率。用250 μL OPEI-MEM培养基稀释10 μL Lipofectamine™ 2000 Reagent 10份, 室温下静置5 min。用250 μL OPEI-MEM培养基稀释4 μg (16 μL) IL-1Ra质粒5份。将上述2种液体混合, 轻柔混匀后室温静置20 min以形成DNA-Lipofectamine™ 2000 Reagent复合物。将待转染的软骨细胞用无血清无抗生素的DMEM培养基漂洗2次, 加入上述转染液轻柔混匀, 于37℃、体积分数5%CO₂条件下培养5 h。更换新鲜的含体积分数10%胎牛血清的高糖DMEM培养基继续培养。

转染细胞的荧光显微镜观察: 在转染后12, 24 h, 2, 4, 6 d, 将培养板放于倒置荧光显微镜下进行观察, 并拍照保存, 计算转染率。通过观察10个高倍视野, 采用双盲法计数每100个细胞中的阳性细胞数, 取平均值即为其细胞转染率。

总RNA提取及实时荧光定量PCR: 脂质体转染后第6天收集细胞, 加入Trizol液1mL, 按说明书操作, 提取总RNA, 然后用反转录试剂盒获得cDNA, 进行荧光定量PCR。引物探针序列根据Oligo6软件设计。IL-1Ra上游引物5'-GAA GTG CCA AAG GCG AAG TT-3', 下游引物5'-ACC ACA AGC CAG TTC CAC TGT-3', 探针序列fam-AGG TGA AGC AGA AAG TGC CAG CTC CA-tamra。实验步骤按试剂盒说明书进行, PCR反应液配制, 循环条件为: 93℃热变性2 min, 然后按93℃ 45 s → 55℃ 45 s, 先做10个循环, 最后按93℃ 45 s → 55℃ 45 s, 做30个循环。

利用已知起始拷贝数的质粒标准品作标准曲线, 标准曲线在 $10^6 \sim 10^2$ 拷贝/反应范围内有好的线性关系, 最小可以检测到 10^2 个DNA拷贝。

在确定标准检测曲线后, 以同样条件对样品利用实

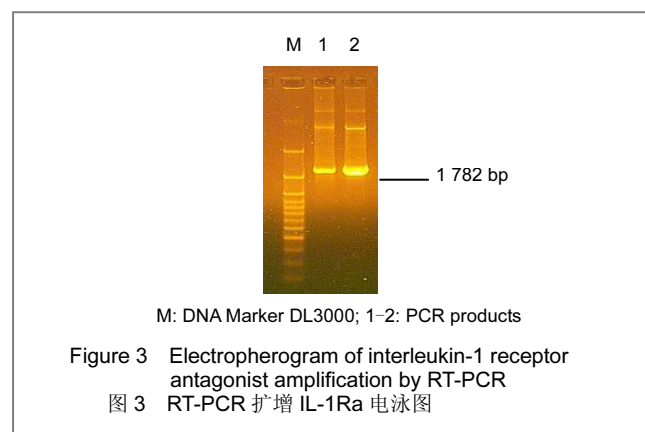
时定量PCR技术测定样品中的DNA拷贝数。样品为细胞数相同的转染的软骨细胞和未转染软骨细胞抽提的总RNA。

主要观察指标: 转染软骨细胞基因表达。

统计学分析: 由第四作者采用SPSS 10.0软件包进行统计学处理。采用 t 检验各组数据的差异, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

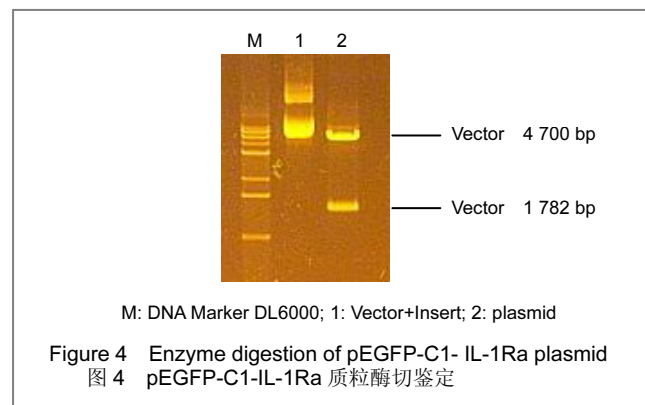
2 结果

2.1 rhIL-1Ra的PCR扩增 以原始cDNA为模板, 用特异性引物进行PCR扩增, 得到大小1 782 bp的DNA片段, 经1.2%琼脂糖电泳, 扩增带清晰, 大小与预期符合, 见图3。



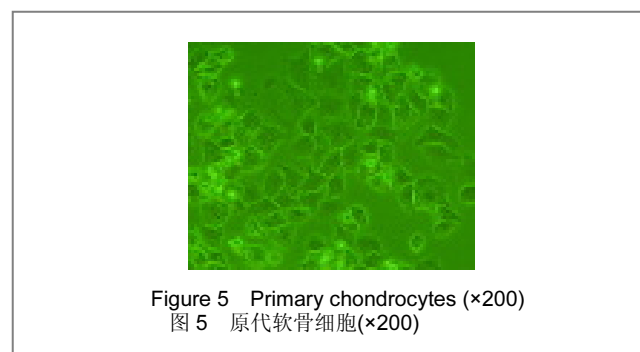
2.2 rhIL-1Ra真核表达质粒的构建及酶切鉴定、测序鉴定 挑选PCR鉴定为阳性的质粒DNA用于测序。序列由Invitrogen测定, 并于NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)上, 通过Blast软件进行比对分析, 获得pGEM-T-IL-1Ra克隆。

rhIL-1Ra的PCR扩增产物经酶切后, 插入载体pEGFP-C1, 制备DH5 α 感受态, 进行质粒转化, 铺板筛选并提取阳性克隆, 经酶切鉴定, 与预期大小一致, 见图4。

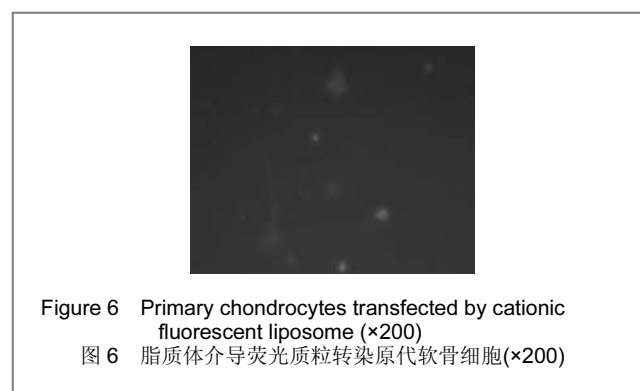


2.3 体外培养软骨细胞特点 培养24 h后软骨细胞开

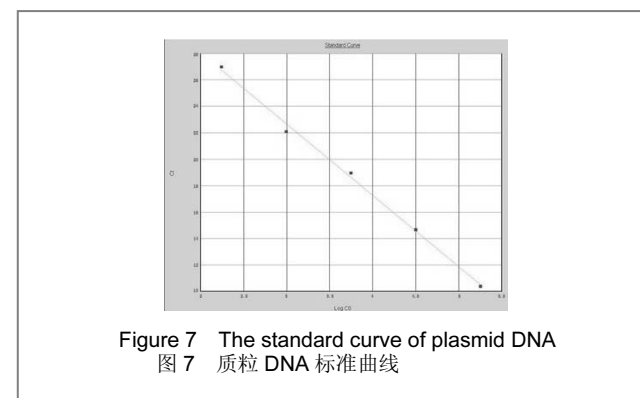
始贴壁, 外观扁平透亮, 并逐渐伸出突起, 变为多角形细胞, 少数呈长梭形, 胞核大而圆, 胞浆丰富, 内含分泌颗粒, 见图5。约10 d长满培养瓶, 传代后增殖速度加快, 4 d时即铺满培养瓶。



2.4 体外转染软骨细胞的荧光表达 转染后12 h观察到少许表达荧光质粒的阳性细胞, 细胞的表达率(8.12 ± 1.64)%, 转染后24 h细胞的表达率最高(16.16 ± 2.71)%, 见图4, 第6天后随着时间的延长而表达量和转染率逐渐降低, 细胞的表达率(12.18 ± 2.14)%。



2.5 IL-1Ra 转染软骨细胞后的基因表达 以10倍梯度稀释已知浓度的质粒DNA做出标准曲线, 见图7。



采用不同浓度的标准样品(质粒DNA)进行实时荧光定量PCR后得到数据与预计数值间经 t 检验, 两者差异无显著性意义($P > 0.05$)。

将转染IL-1Ra组与未转染组样品各做5孔检测, 基

因拷贝数分别为 $47\ 939 \pm 5\ 881$ 和 $4\ 291 \pm 518$, 两组结果差异有显著性意义($P < 0.05$), 证明IL-1Ra基因转染软骨细胞后其表达水平有明显变化。

3 讨论

IL-1是OA发病过程中重要的炎性细胞因子^[12-13]。IL-1对关节软骨细胞的作用主要表现为抑制透明软骨特征性II型胶原的合成, 促进I, III型胶原的合成, 促使软骨细胞变性。IL对关节软骨的破坏作用主要表现在它可以促进胶原酶的合成和分泌, 提高软骨基质中溶蛋白酶的活性。研究证实IL-1能刺激成纤维细胞、软骨细胞和滑膜细胞分泌前列腺素E2、胶原酶, 加速软骨基质中蛋白多糖和II型胶原的降解并抑制其合成, 抑制II型前胶原mRNA的表达, 参与病变软骨的破坏^[14-15]。IL-1Ra为滑膜细胞分泌的IL-1受体的天然拮抗剂, IL-1Ra不能抑制IL-1的合成^[16], 但可以抑制IL-1的活性。

绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)是目前最常用的报告基因之一, 是一种生物发光蛋白, 激发波长490 nm, 检测波长530 nm; 其产生的荧光无种属特异性, 不干扰细胞的特性, 可耐受光漂白, 表达时不需要其他刺激因子、底物或其他基因的产物协作。因此GFP的检测极其方便, 广泛应用于荧光显微镜、流式细胞仪等对活细胞的高效特异的检测。荧光的强度与GFP的表达量和细胞的生长状态有关。本实验采用的pEGFP-C1是含绿色荧光蛋白报道基因的真核细胞表达载体, 具有很强的复制能力, 其多克隆位点位于EGFP基因编码区和SV40多聚腺苷酸尾之间, 外源基因插入到pEGFP的C端, 同时以GFP为报告基因, 与pEGFP形成融合蛋白一同表达, 提高外源基因在真核细胞的表达; 同时也不影响目的基因的结构和功能^[17-20]。因此, 作为真核细胞的表达载体, pEGFP-C1能保证重组其上基因的有效表达。

根据NCBI上已报道的人类IL-1Ra的开放读码框序列设计基因克隆的特异性引物, 以肝组织反转录产物为模板, 获取IL-1Ra片段。由于PCR产物不稳定, 很容易降解, pGEM-T载体可以方便地把PCR产物连进载体, 并且很稳定, 可以长时间保留和利于基因测序。将获取片段连接到pGEM-T载体, 转化到DH5 α 菌株, 挑2个左右的单克隆(蓝白斑筛选)扩大培养。收菌后, 提取其中两管菌的质粒, 经Bgl II和Xho I酶切验证后, 送Invitrogen测序, 测序结果分析表明, 通过PCR成功的从肝组织中克隆到人类IL-1Ra的开放读码框, 获得pGEM-T-IL-1Ra克隆, 说明克隆质粒完全符合预先的设计要求。由于pGEM-T-IL-1Ra质粒用Bgl II和Xho I进行双酶切, 而pEGFP-C1用Bgl II和Sal I(是Xho I的同尾酶)进行酶切; 因此将构建的pGEM-T-IL-1Ra和

经过Bgl II和Xho I双酶切后的片断连接到pEGFP-C1(已用Bgl II和Xho I双酶切)载体上, 而不会发生移码。本组构建pEGFP-C1-IL-1Ra表达质粒, pEGFP-C1 4.7 kb, IL-1Ra cDNA 1 782 bp。凝胶上的电泳条带位置符合设计要求, 故所提取的重组人pEGFP-C1-IL-1Ra是正确的, 为下一步基因转染软骨细胞提供了良好的基础。

在基因治疗中, 载体的选择至关重要。从目前OA基因治疗的情况看, 载体的选择是OA基因治疗的瓶颈也是研究的热点。载体是指能将外源性遗传物质转入靶细胞, 并使之能在靶细胞内表达的无致病能力的病毒或DNA结构, 分为病毒类载体和非病毒类载体。转基因载体的病毒种类繁多, 包括: 乳头瘤病毒、腺病毒、牛痘病毒、腺相关病毒、疱疹病毒、反转录病毒等^[21-24]。病毒载体具有转染率高, 表达稳定等特点, 但易于整合到靶细胞染色体内, 故安全性差, 尚需慎用。非病毒载体包括裸DNA、脂质体-DNA复合体、聚合物-DNA复合体等, 该类载体不仅可直接用于运载目的基因进行基因治疗, 也可包裹反义寡核苷酸或反义表达质粒进行反义治疗。这种技术依赖于DNA的阴离子性能。为了进行脂质转移, 脂质体首先与DNA混合, 使之形成一个非共价键连接的脂质体-DNA复合物, 这种复合物加入到靶细胞中, 吸附到细胞膜上, 然后将DNA传送到胞浆中。非病毒载体易合成、稳定实用、生物安全性高、转运容量大、可同时传输多种治疗基因, 但转染率低, 表达时间短^[25-28]。

本实验在Lipofectamine™2000脂质体介导下将IL-1Ra基因转染兔关节软骨细胞, 通过荧光显微镜观察有绿色荧光蛋白表达, 荧光定量PCR鉴定证实在转染后的软骨细胞中转基因得到表达, 转染组与未转染组的IL-1Ra表达水平有显著性的差异。虽然IL-1Ra基因转染软骨细胞可获得表达, 但荧光显微镜观察显示转基因的表达率仍较低, 说明脂质体的转染效率不高, 明显低于病毒载体的转染, 其转染效率和DNA与脂质体的比例以及DNA的用量、转染时与细胞的生长周期密切相关^[29-30]。所以实验中掌握好这些因素对转染率至关重要。本实验在基因转染前细胞达80%~90%的融合, 这时的细胞大部分处于S期或G2期, 目的是尽可能提高转染率。从荧光显微镜观察, 转染后24h细胞的表达率最高, 转染第6天后随着时间的延长, 基因表达量和转染率逐渐降低, 说明目的基因随着细胞的分裂而逐渐丢失并不能长期表达。

通过本实验所用的脂质体介导转染法可以将重组人IL-1Ra基因转染入软骨细胞内, 软骨细胞可以有有效的表达外源基因, 能够作为基因治疗OA过程中的受体细胞, 为下一步在体外、体内OA模型防止软骨退变的实验研究提供基础。

4 参考文献

- [1] Seed SM, Dunican KC, Lynch AM. Osteoarthritis: a review of treatment options. *Geriatrics*. 2009;64(10):20-29.
- [2] Guccione AA, Felson DT, Anderson JJ, et al. The effects of specific medical conditions on the functional limitations of elders in the Framingham Study. *Am J Public Health*. 1994;84(3):351-358.
- [3] Hunter W. Of the structure and disease of articulating cartilages. 1743. *Clin Orthop Relat Res*. 1995;(317):3-6.
- [4] Alcaraz MJ, Megías J, García-Aranda I, et al. New molecular targets for the treatment of osteoarthritis. *Biochem Pharmacol*. 2010;80(1):13-21.
- [5] Im HJ, Pacione C, Chubinskaya S, et al. Inhibitory effects of insulin-like growth factor-1 and osteogenic protein-1 on fibronectin fragment- and interleukin-1 β -stimulated matrix metalloproteinase-13 expression in human chondrocytes. *J Biol Chem*. 2003;278(28):25386-25394.
- [6] Hsieh JL, Shen PC, Shiau AL, et al. Intraarticular gene transfer of thrombospondin-1 suppresses the disease progression of experimental osteoarthritis. *J Orthop Res*. 2010;28(10):1300-1306.
- [7] Clanchy FI, Williams RO. Plasmid DNA as a safe gene delivery vehicle for treatment of chronic inflammatory disease. *Expert Opin Biol Ther*. 2008;8(10):1507-1519.
- [8] Calich AL, Domiciano DS, Fuller R. Osteoarthritis: can anti-cytokine therapy play a role in treatment? *Clin Rheumatol*. 2010;29(5):451-455.
- [9] Swellam M, Mahmoud MS, Samy N, et al. Potential influence of interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism on knee osteoarthritis risk. *Dis Markers*. 2010;28(5):299-305.
- [10] Zhang P, Cai DZ, Liu B, et al. Zhongguo Linchuang Jiepouxue Zazhi. 2008;26(2):179-182.
张平,蔡道章,刘斌,等.重组人IL-1Ra与TGF- β 1共转染软骨细胞的基因表达[J].中国临床解剖学杂志, 2008,26(2):179-182.
- [11] Fu X, Yu SB, Zhang XL, et al. Zhongguo Yundong Yixue Zazhi. 2006;25(1):54-56.
傅欣,郁时兵,张晓玲,等. IL-1Ra和IL-10真核表达质粒载体的构建及其表达检测[J].中国运动医学杂志, 2006,25(1):54-56.
- [12] Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology*. 2002;39(1-2):237-246.
- [13] Moxley G, Meulenbelt I, Chapman K, et al. Interleukin-1 region meta-analysis with osteoarthritis phenotypes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18(2):200-207.
- [14] Lyons-Giordano B, Pratta MA, Galbraith W, et al. Interleukin-1 differentially modulates chondrocyte expression of cyclooxygenase-2 and phospholipase A2. *Exp Cell Res*. 1993;206(1):58-62.
- [15] Pujol JP, Chadjichristos C, Legendre F, et al. Interleukin-1 and transforming growth factor-beta 1 as crucial factors in osteoarthritic cartilage metabolism. *Connect Tissue Res*. 2008;49(3):293-297.
- [16] Pelletier JP, McCollum R, Cloutier JM, et al. Synthesis of metalloproteinases and interleukin 6 (IL-6) in human osteoarthritic synovial membrane is an IL-1 mediated process. *J Rheumatol Suppl*. 1995;43:109-114.
- [17] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 1994;263(5148):802-805.
- [18] Oberholzer A, John T, Kohl B, et al. Adenoviral transduction is more efficient in alginate-derived chondrocytes than in monolayer chondrocytes. *Cell Tissue Res*. 2007;328(2):383-390.
- [19] Campbell JJ, Blain EJ, Chowdhury TT, et al. Loading alters actin dynamics and up-regulates cofilin gene expression in chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;361(2):329-334.
- [20] Vogt S, Ueblacker P, Geis C, et al. Efficient and stable gene transfer of growth factors into chondrogenic cells and primary articular chondrocytes using a VSV.G pseudotyped retroviral vector. *Biomaterials*. 2008;29(9):1242-1249.
- [21] Perales JC, Ferkol T, Beegen H, et al. Gene transfer in vivo: sustained expression and regulation of genes introduced into the liver by receptor-targeted uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(9):4086-4090.
- [22] Robbins PD, Tahara H, Mueller G, et al. Retroviral vectors for use in human gene therapy for cancer, Gaucher disease, and arthritis. *Ann N Y Acad Sci*. 1994;716:72-89.
- [23] Nixon AJ, Goodrich LR, Scimeca MS, et al. Gene therapy in musculoskeletal repair. *Ann N Y Acad Sci*. 2007;1117:310-327.
- [24] Hsieh JL, Shen PC, Shiau AL, et al. Adenovirus-mediated kallistatin gene transfer ameliorates disease progression in a rat model of osteoarthritis induced by anterior cruciate ligament transection. *Hum Gene Ther*. 2009;20(2):147-158.
- [25] Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. Gene therapy for osteoarthritis: new perspectives for the twenty-first century. *Clin Orthop Relat Res*. 2000;(379 Suppl):S262-272.
- [26] Capito RM, Spector M. Collagen scaffolds for nonviral IGF-1 gene delivery in articular cartilage tissue engineering. *Gene Ther*. 2007;14(9):721-732.
- [27] Madry H, Weimer A, Kohn D, et al. Tissue engineering for articular cartilage repair improved by gene transfer. *Current concepts*. *Orthopade*. 2007;36(3):236-247.
- [28] Morrey ME, Anderson PA, Chambers G, et al. Optimizing nonviral-mediated transfection of human intervertebral disc chondrocytes. *Spine J*. 2008;18(5):796-803.
- [29] Brunner S, Sauer T, Carotta S, et al. Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus. *Gene Ther*. 2000;7(5):401-407.
- [30] Stuart DD, Kao GY, Allen TM. A novel, long-circulating, and functional liposomal formulation of antisense oligodeoxynucleotides targeted against MDR1. *Cancer Gene Ther*. 2000;7(3):466-475.

来自本文课题的更多信息——

基金资助: 广东省科技计划项目(粤科规划字(2009)198号), 广州医学院博士启动项目(2008C20)。

作者贡献: 张平进行实验设计, 实验实施为刘斌, 实验评估为刘斌, 资料收集为钟志宏, 张平成文, 蔡道章审核, 张平对文章负责。

利益冲突: 说明课题无涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 研究样本取得产妇知情同意, 实验经中山大学第三附属医院伦理学委员会批准。实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》要求。

本文创新性:

提供证据: 2010-10 检索检索万方、维普和中国知网等, 检索关键词: 白细胞介素1受体拮抗蛋白; 软骨细胞, 检索到6篇相关文献。

创新点说明: 由于骨性关节炎患者软骨细胞自身分泌的生长因子有限, 而外源性细胞因子代谢半衰期短, 直接关节腔内注射需要费用高, 剂量不容易调控, 常需反复应用。基因疗法可以解决这个难题。应用病毒载体能够成功地把基因转染到细胞中, 但有其局限性。课题组采用实验利用绿色荧光蛋白标记构建的人白细胞介素1受体拮抗蛋白质粒, 经脂质体介导转基因到软骨细胞, 证实转染的软骨细胞基因得到表达, 为基因治疗骨性关节炎打下了基础。