

慢病毒载体介导绿色荧光蛋白转染大鼠牙髓干细胞

张瑞涵, 刘佳, 聂姗姗, 王璇, 李伯琦, 孙大磊, 热甫卡提·地力毛拉提, 刘奕杉(新疆医科大学第一附属医院儿童口腔科-口腔预防科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054)

文章亮点:

- 1 应用慢病毒载体介导绿色荧光蛋白转染体外培养的大鼠牙髓干细胞, 观察绿色荧光蛋白在大鼠牙髓干细胞中的表达, 获得其最佳感染复数值和感染时间。
- 2 通过检测转染后大鼠牙髓干细胞的细胞动力学、细胞周期及牙向分化能力, 评价慢病毒载体介导的绿色荧光蛋白对大鼠牙髓干细胞生物学特性的影响, 为后期大鼠牙髓干细胞在动物模型体内的示踪研究提供实验依据。

关键词:

干细胞; 分化; 牙髓干细胞; 慢病毒载体; 绿色荧光蛋白; 大鼠; 转染; 组织工程; 新疆维吾尔自治区自然科学基金

主题词:

干细胞; 牙髓; 慢病毒感染; 绿色荧光蛋白质类

基金资助:

新疆维吾尔自治区自然科学基金面上项目(2011211A067)

摘要

背景: 对牙髓干细胞进行稳定高效安全的体外标记是示踪技术中首先需要解决的问题, 也是牙齿再生体内研究的基础。

目的: 探讨慢病毒载体介导绿色荧光蛋白转染大鼠牙髓干细胞的理想条件及方法, 并确定其转染后是否保持干细胞特性。

方法: 通过改良酶消化法获得大鼠牙髓干细胞, 对其免疫表型及分化潜能进行鉴定, 以感染复数为 5, 10, 25, 50 和 100 的慢病毒载体介导绿色荧光蛋白作用 24 h 和 48 h, 倒置显微镜下检测转染率和荧光强度, 并对大鼠牙髓干细胞感染前后的克隆增殖能力、细胞周期及牙向分化能力进行比较, 评价感染对其生物学特性的影响。

结果与结论: 流式细胞仪检测结果显示大鼠牙髓干细胞 STRO-1 和 CD146 表达阳性, CD34 和 CD45 表达阴性, 经相应诱导培养后可向成骨和成脂分化。当感染复数为 50, 作用时间为 48 h 时, 转染效率最高, 荧光表达最强; 感染前后细胞增殖、克隆形成率及细胞周期等方面差异无显著性意义($P > 0.05$), 碱性磷酸酶阳性表达。说明感染复数为 50 作用 48 h 是慢病毒载体介导绿色荧光蛋白转染大鼠牙髓干细胞的理想条件, 且不影响牙髓干细胞生物学特性, 为大鼠牙髓干细胞的体内研究提供了可靠的示踪方法。

张瑞涵, 刘佳, 聂姗姗, 王璇, 李伯琦, 孙大磊, 热甫卡提·地力毛拉提, 刘奕杉. 慢病毒载体介导绿色荧光蛋白转染大鼠牙髓干细胞[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(45):7299-7305.

Transfection of stem cells derived from rat dental pulp with green fluorescent protein infection by lentiviral vector

Zhang Rui-han, Liu Jia, Nie Shan-shan, Wang Xuan, Li Bo-qi, Sun Da-lei, Refukati Dilimaolati, Liu Yi-shan (Department of Prevention and Health Care of Children's Teeth, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China)

Abstract

BACKGROUND: Stable and efficient labeling of dental pulp stem cells *in vitro* is most important in tracer technique, which is also the basis of tooth regeneration *in vivo*.

OBJECTIVE: To determine the optimal condition and method for transfection of stem cells derived from rat dental pulp with green fluorescent protein infection by lentiviral vector and to determine whether green fluorescent protein-labeled dental pulp stem cells maintain their stem cell properties.

METHODS: Rat dental pulp stem cells were obtained by modified enzyme digestion method, to identify the immune phenotype and differentiation potential. Dental pulp stem cells were infected with green fluorescent protein by lentiviral vector for 24 and 48 hours at different multiplicity of infection (MOI) (5, 10, 25, 50 and 100). The infection efficiency and fluorescence intensity were analyzed by inverted fluorescent microscopy. The clonal and proliferation ability, cell cycle and the mineralization potential were compared before and after transfection. Based on those mentioned above, we could evaluate the influence of infection on their biological characteristics.

RESULTS AND CONCLUSION: Flow cytometry results showed that rat dental pulp stem cells expressed STRO-1 and CD146 but not CD34 or CD45. The dental pulp stem cells could differentiate into osteoblasts and

张瑞涵, 女, 1988 年生, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市人, 汉族, 新疆医科大学第一附属医院在读硕士, 主要从事儿童口腔医学方面的研究。

通讯作者: 刘奕杉, 硕士, 副教授, 副主任医师, 新疆医科大学第一附属医院儿童口腔科-口腔预防科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.

2014.45.016

[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2014)45-07299-07

稿件接受: 2014-10-20

Zhang Rui-han, Studying for master's degree, Department of Prevention and Health Care of Children's Teeth, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Corresponding author: Liu Yi-shan, Master, Associate professor, Associate chief physician, Department of Prevention and Health Care of Children's Teeth, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Accepted: 2014-10-20

adipocytes when cultured in specific medium for each lineage differentiation. The highest efficiency of infection and strongest fluorescence expression appeared at 48 hours of infection and MOI 50. There were no significant differences in growth ability, cell colony formation rate and cell cycle before and after transfection ($P > 0.05$). And the alkaline phosphatase expressed positively. Infection for 48 hours at MOI 50 is optimal for transfecting dental pulp stem cells with green fluorescent protein by a lentiviral vector, thereby providing reliable tracer method for the study of rat dental pulp stem cells *in vivo*.

Subject headings: stem cells; dental pulp; lentivirus infections; green fluorescent proteins

Funding: the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region, No. 2011211A067

Zhang RH, Liu J, Nie SS, Wang X, Li BQ, Sun DL, Refukati Dilimaolati, Liu YS. Transfection of stem cells derived from rat dental pulp with green fluorescent protein infection by lentiviral vector. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(45):7299-7305.

0 引言 Introduction

自2000年Gronthos等^[1]首次从人第三磨牙牙髓组织中分离出一种具有较强自我更新能力和多向分化潜能的成体干细胞,并将其命名为牙髓干细胞(dental pulp stem cells, DPSCs)以来,已有研究证实牙髓干细胞在一定的诱导条件下可分化为成牙本质细胞^[2-3],表明了牙髓干细胞具有形成牙本质样结构的能力^[4]。目前,将牙髓干细胞移植入动物模型体内后深入探究其定位、分化与转归以及在组织工程牙本质形成过程中所发挥的作用是许多研究者所关注的问题。因而,需要建立一种能够稳定高效且不影响牙髓干细胞功能的标记方法以进行体内示踪研究。

绿色荧光蛋白基因是一种广泛应用的示踪基因^[5],整合绿色荧光蛋白基因与目的基因后,通过载体转入宿主细胞内进行表达,用蓝色波长范围的光线激发后所呈现出的绿色荧光借助荧光显微镜即可观察,是一种简便直观的细胞示踪方法^[6]。目前,尤以慢病毒为载体的转染效率较高、表达稳定和安全性好^[7]。然而,慢病毒载体介导绿色荧光蛋白转染牙髓干细胞的最佳感染复数(multiplicity of infection, MOI)值以及是否影响其干细胞特性尚未见报道。因此,本实验从大鼠牙髓组织中分离培养出牙髓干细胞对其鉴定后,体外扩增用于慢病毒介导的绿色荧光蛋白基因转染,明确大鼠牙髓干细胞标记的理想条件,从不同角度探讨绿色荧光蛋白慢病毒对大鼠牙髓干细胞生物学特性的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 细胞学水平, 体外观察性实验。

时间及地点: 实验于2013年4月至2014年4月在新疆医科大学第一附属医院临床研究院完成。

材料:

实验动物: 健康雄性SD大鼠10只, SPF级, 4-6周龄, 体质量(150±20) g, 由新疆医科大学动物实验中心提供, 生产许可证号: SCXK(新)2003-001。实验过程中对动物的处置遵守《关于善待实验动物的指导性意见》相关要求。

主要仪器和试剂: SW-CJ-IF超净工作台(苏州智净净化设备有限公司); HF90/HF240 CO₂培养箱(上海寰熙医疗器械有限公司); DMI4000B荧光倒置相差显微镜(Leica公

司); 流式细胞仪(BECKMAN COULTER 公司)。携带绿色荧光蛋白的慢病毒载体(上海斯丹赛公司); I型胶原酶、中性蛋白酶(Gibco公司); 0.01 mmol/L PBS、LG-DMEM培养液、胎牛血清、双抗和2.5 g/L胰蛋白酶(Hyclone公司); 二甲基亚砜、L-谷氨酰胺(Invitrogen公司); 5 g/L油红O染液、20 g/L茜素红染液及碱性磷酸酶检测试剂盒(南京建成公司); FITC标记的小鼠抗大鼠STRO-1抗体、FITC标记二抗(eBioscience公司); PE标记的抗大鼠抗体CD146、CD34和CD45(R&D公司)。

实验方法:

大鼠牙髓干细胞的分离、培养: 应用课题组在前期实验中探索得到的改良酶消化法分离培养大鼠牙髓干细胞^[8]。将大鼠牙髓组织浸入以3 g/L I型胶原酶与4 g/L中性蛋白酶按1:1比例混合的消化液中,于37 °C水浴下消化15 min后以300×g离心5 min。弃上清, PBS重复清洗2遍, 将组织块均匀铺入6 cm培养皿内, 每个组织块滴加200 μL的完全生长液, 置入体积分数为5% CO₂的37 °C恒温培养箱中孵育。隔日待组织块贴于皿底后补足培养基, 之后每3 d换液1次, 倒置显微镜下观察细胞生长情况, 待细胞汇合至80%~90%时, 以2.5 g/L胰蛋白酶消化传代, 进行扩增培养。

大鼠牙髓干细胞的鉴定:

免疫表型鉴定: 常规消化、收集第3代对数生长期大鼠牙髓干细胞, 预冷PBS清洗2遍, 调整细胞浓度至 $1 \times 10^9 L^{-1}$ 。以1 mL/管分装于EP管中, 编号后分别加入荧光标记的STRO-1, CD146, CD34和CD45抗体, 4 °C避光孵育30 min, 经流式细胞仪进行检测。

分化潜能鉴定: 成骨成脂诱导分化实验均以第3代大鼠牙髓干细胞为研究对象, 成骨诱导液: 10 mmol/L β-甘油磷酸钠、 1×10^{-7} mol/L地塞米松、50 mg/L维生素C和体积分数为10%胎牛血清的LG-DMEM培养液; 成脂诱导液: 0.5 mol/L IBMX、 1×10^{-7} mol/L地塞米松、10 μmol/L胰岛素、100 μmol/L 吡哆美辛和体积分数为10%胎牛血清的LG-DMEM培养液。将细胞密度调整至 $8 \times 10^3/cm^2$ 分别接种于3.5 cm的培养皿中, 待细胞汇合至40%~50%时, 弃原培养基, 更换为成骨诱导培养液开始成骨诱导, 汇合至70%~80%时更换为成脂诱导培养液开始进行成脂诱导。每3 d换诱导液1次, 直至镜

下可见矿化结节和脂滴形成, 即终止培养, 分别用茜素红和油红O进行染色, 倒置相差显微镜观察拍照。

绿色荧光蛋白-慢病毒转染大鼠牙髓干细胞: 取对数生长期状态良好的第3代大鼠牙髓干细胞, 用2.5 g/L胰蛋白酶消化, 制成单细胞悬液并计数。调整细胞密度至 1×10^4 /孔, 接种至24孔培养板内。根据慢病毒不同的MOI值将细胞随机分为6组: MOI=0, MOI=5, MOI=10, MOI=25, MOI=50和MOI=100, 每组设3个平行样本, 共18孔。按照以上MOI值分别加入病毒滴度为 9×10^9 TU/L的绿色荧光蛋白-慢病毒与大鼠牙髓干细胞共培养。每孔用完全培养液补足至500 μ L, 充分混匀后, 放入37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中培养。

绿色荧光蛋白的表达及转染率的计算: 绿色荧光蛋白-慢病毒转染细胞后24 h和48 h, 于倒置荧光相差显微镜下观察细胞生长状态以及绿色荧光蛋白荧光表达情况, 并拍照。于48 h时, 每组细胞通过计数3个显微镜高倍视野下绿色荧光蛋白阳性表达细胞所占的百分比, 求其平均值即为转染率。

评价转染对生物学特性的影响: 以下检测均设对照组(MOI=0)和实验组(MOI=50)。

MTT法检测细胞增殖能力: 将两组细胞以 3×10^3 /孔的密度接种至96孔板, 每孔200 μ L完全培养液, 37 $^{\circ}$ C恒温培养, 分别于24, 48, 72, 96 h时(每个时间点设3个平行样本)进行MTT检测。方法为: 每孔加入20 μ L MTT溶液, 孵育4 h后吸弃孔内培养液, 加入150 μ L二甲基亚砷, 置酶联免疫检测仪内振荡10 min, 测定490 nm波长处各孔的吸光度。

克隆形成能力比较: 将两组细胞分别以 1×10^3 个接种于10 cm培养皿中, 常规条件下, 14 d终止培养, 吸弃培养液, 用体积分数95%甲醇固定15 min, Giemsa染色20 min, 去离子水洗净染液后干燥。镜下观察并计数, 以 ≥ 50 个细胞的细胞群为1个克隆。以下述公式计算克隆形成率: 克隆形成率(%)=形成细胞集落数/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

测定细胞周期: 取生长状态良好的两组细胞, 各调整细胞浓度至 1×10^9 L $^{-1}$, 预冷PBS清洗2遍, 300 \times g离心力离心5 min, 弃上清, 加入1 mL PBS重悬细胞, 再加入2 mL预冷的无水乙醇, 吹打混匀, 4 $^{\circ}$ C过夜。上机前离心弃乙醇固定液, PBS清洗2遍, 0.01% Rnase处理细胞30 min, 0.5%碘化丙啶4 $^{\circ}$ C避光染色30 min, 过300目尼龙筛网, 上机检测并进行细胞周期分析。

牙向分化能力检测: 两组细胞以 8×10^3 /cm 2 的密度接种于3.5 cm培养皿中, 待细胞汇合达40%–50%, 更换为矿化诱导液(同前成骨诱导液)连续培养14 d, 吸弃诱导液, PBS清洗2遍, 按照碱性磷酸酶染色试剂盒说明书进行细胞染色。

主要观察指标: ①慢病毒载体介导绿色荧光蛋白转染大鼠牙髓干细胞最佳感染复数及感染时间。②转染后大鼠牙髓干细胞的生物学特性。

统计学分析: 应用SPSS 13.0软件进行统计学处理。

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 定量资料组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 鉴定大鼠牙髓干细胞

细胞生长特性: 接种72 h后, 可见部分细胞从组织块周围游离出来, 原代细胞体积较小, 呈集落性生长, 密集区细胞排列紧密为圆形或多角形, 集落边缘细胞呈长梭形, 细胞折光性强(图1A); 随着传代次数增加, 细胞大小形态逐渐趋于一致, 出现成纤维细胞样形态(图1B)。

免疫表型检测结果: 通过流式细胞仪检测第3代大鼠牙髓干细胞的STRO-1, CD146, CD34和CD45各免疫表型的表达情况。结果显示, 大鼠牙髓干细胞高表达STRO-1和CD146(图2A, B), 分别为63.6%和43.8%; 低表达CD34和CD45, 分别为2.7%和0.1%(图2C, D)。

分化潜能鉴定结果: 成骨诱导培养第9, 10天, 大鼠牙髓干细胞形态开始发生变化, 由长梭形变为立方形, 并呈复层生长, 20 d时镜下可见不透光的矿化结节, 继续诱导培养钙结节逐渐增多增大, 至28 d时, 终止培养行茜素红染色, 结果显示染色阳性(图3A)。经成脂诱导后, 镜下观察部分大鼠牙髓干细胞胞体逐渐增大, 折光度增加, 约14 d可观察到细胞胞浆内出现串珠样脂滴, 随着培养天数的增加脂滴逐渐相互融合形成大脂滴, 21 d时行油红O染色, 结果呈阳性反应(图3C)。对照组染色均为阴性(图3B, D)。

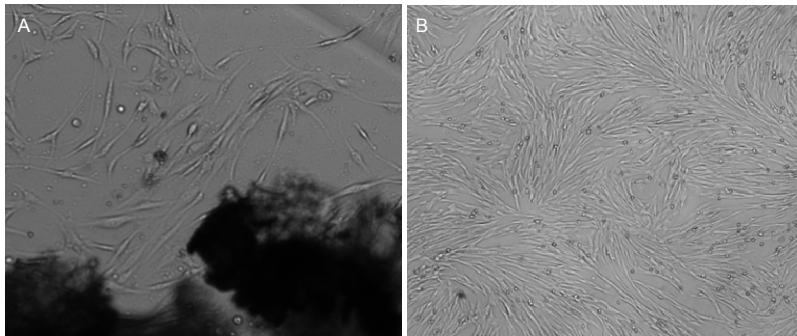
2.2 绿色荧光蛋白的表达 经MOI值为5, 10, 25, 50和100的绿色荧光蛋白-慢病毒转染大鼠牙髓干细胞24 h后, 均可见绿色荧光蛋白阳性细胞但数量较少, 且胞浆内绿色荧光较弱。作用48 h, 绿色荧光蛋白阳性表达细胞增多, 荧光强度明显高于24 h。镜下观察MOI为5, 10, 25, 50组细胞生长状态良好, 细胞形态未见明显改变, 多数细胞呈长梭形, 部分细胞呈多角形或卵圆形(图4A–D)。MOI=100组细胞边界不清, 部分细胞胞体皱缩, 表面粗糙有颗粒状物质, 呈中毒样改变, 偶见死亡细胞(图4E)。MOI为0的对照组未见阳性细胞(图4F)。

2.3 不同MOI值慢病毒的转染效率 以不同MOI值的绿色荧光蛋白-慢病毒转染大鼠牙髓干细胞48 h, 镜下计数绿色荧光蛋白阳性细胞, 计算MOI为5, 10, 25, 50和100时细胞感染率分别为(16.35 \pm 1.30)%, (29.81 \pm 1.60)%, (48.74 \pm 1.10)%, (86.14 \pm 2.30)%和(70.65 \pm 2.10)%, 见图5。

2.4 转染对生物学特性的影响

细胞增殖能力: 在各时间点, MOI=50组相对于MOI=0组细胞增殖差异无显著性意义($P > 0.05$, 图6)。

细胞克隆形成率: 绿色荧光蛋白-慢病毒转染大鼠牙髓干细胞后Giemsa染色, 可见明显的细胞克隆集落形成(图7A)。镜下计数, 计算对照组和实验组克隆形成率分别为(0.90 \pm 0.02)%和(0.85 \pm 0.02)%, 两者比较差异无显著性意义($P > 0.05$, 图7B)。

图 1 大鼠牙髓干细胞的形态特征($\times 50$)Figure 1 Morphological characteristics of rat dental pulp stem cells ($\times 50$)

图注: 图中 A 为原代细胞培养 3 d, 细胞增殖明显且呈长梭形; B 为第 3 代细胞培养 3 d, 细胞形态趋于一致, 呈成纤维细胞样。

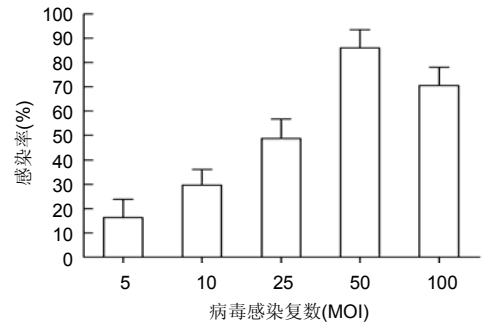


图 5 不同 MOI 值慢病毒的转染率

Figure 5 Transfection efficiency at different multiplicity of infection

图注: MOI 为 5, 10, 25 和 100 各组分别与 MOI=50 组比较感染率差异有显著性意义($P < 0.05$)。

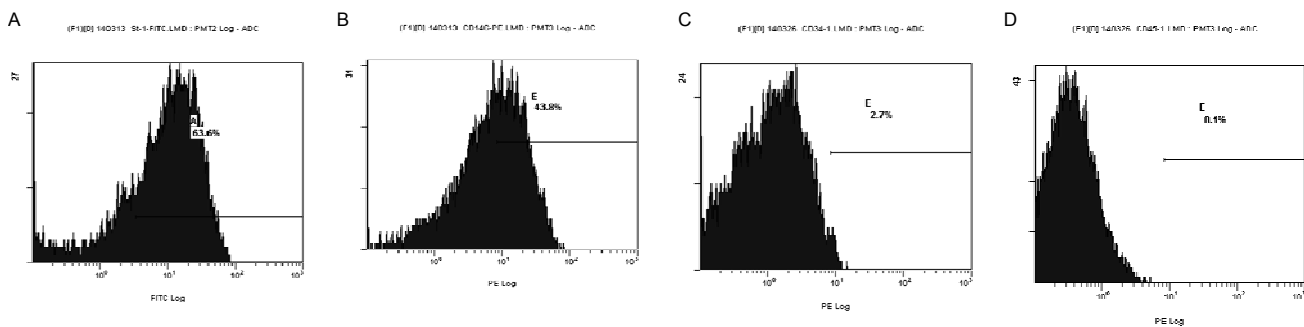


图 2 大鼠牙髓干细胞的免疫表型检测

Figure 2 Detection of immunophenotype of rat dental pulp stem cells

图注: 图中 A, B 显示细胞高表达 STRO-1 和 CD146; C, D 显示 CD34 和 CD45 阳性表达比例很低。

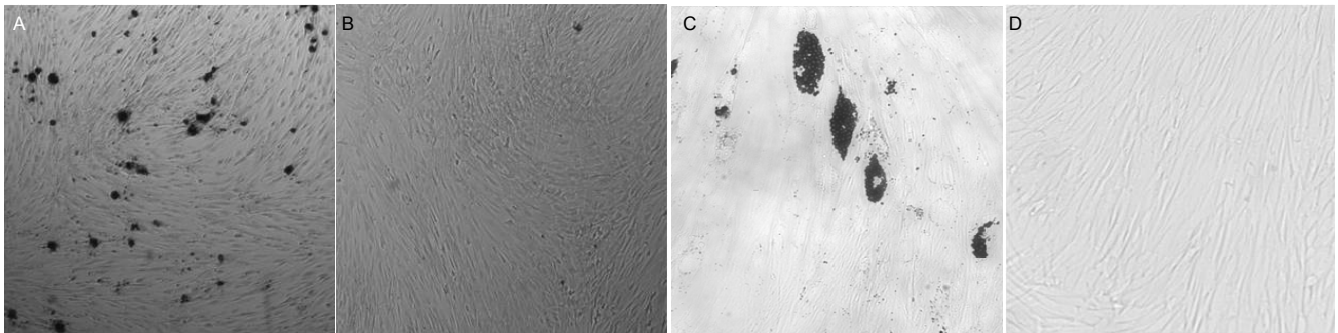


图 3 大鼠牙髓干细胞定向诱导分化结果

Figure 3 Directional differentiation results of rat dental pulp stem cells

图注: 图中 A 为细胞成骨诱导 28 d, 茜素红染色结果阳性($\times 50$); B 为对照组未见阳性细胞($\times 50$); C 为成脂诱导 21 d, 油红 O 染色可见阳性细胞($\times 100$); D 为对照组表达阴性($\times 100$)。

细胞周期: 经流式细胞仪检测, 对照组细胞在 G_0/G_1 期占81.6%, G_2/M 期占7.5%, S期占10.9%(图8A), 实验组细胞在 G_0/G_1 期占81.1%, G_2/M 期占6.8%, S期占12%(图8B)。

牙向分化能力: 矿化诱导14 d后, 行碱性磷酸酶染色, 镜下可见实验组细胞胞浆内出现棕色或棕褐色颗粒(图9A), 即碱性磷酸酶表达强阳性; 对照组未见阳性表达(图9B)。

3 讨论 Discussion

牙髓干细胞是一类来源于成年机体牙髓组织, 具有自

我更新和多向分化潜能的未分化细胞^[9]。自2000年首次发现以来, 国内外许多学者已开展了多项牙髓干细胞的研究工作, 获得重要的发现并取得突破性的进展^[10]。与其他来源于干细胞相比, 牙髓干细胞具有取材广泛、操作简便、不涉及伦理问题且有自体移植潜能等优势, 但仍有很多问题有待解决和阐明, 例如牙髓干细胞移植后在体内的精确定位及明确分化与转归等生理过程^[11-12]。因此, 对牙髓干细胞进行稳定高效安全的体外标记是示踪技术中首先需要解决的问题, 也是牙齿再生体内研究的基础。

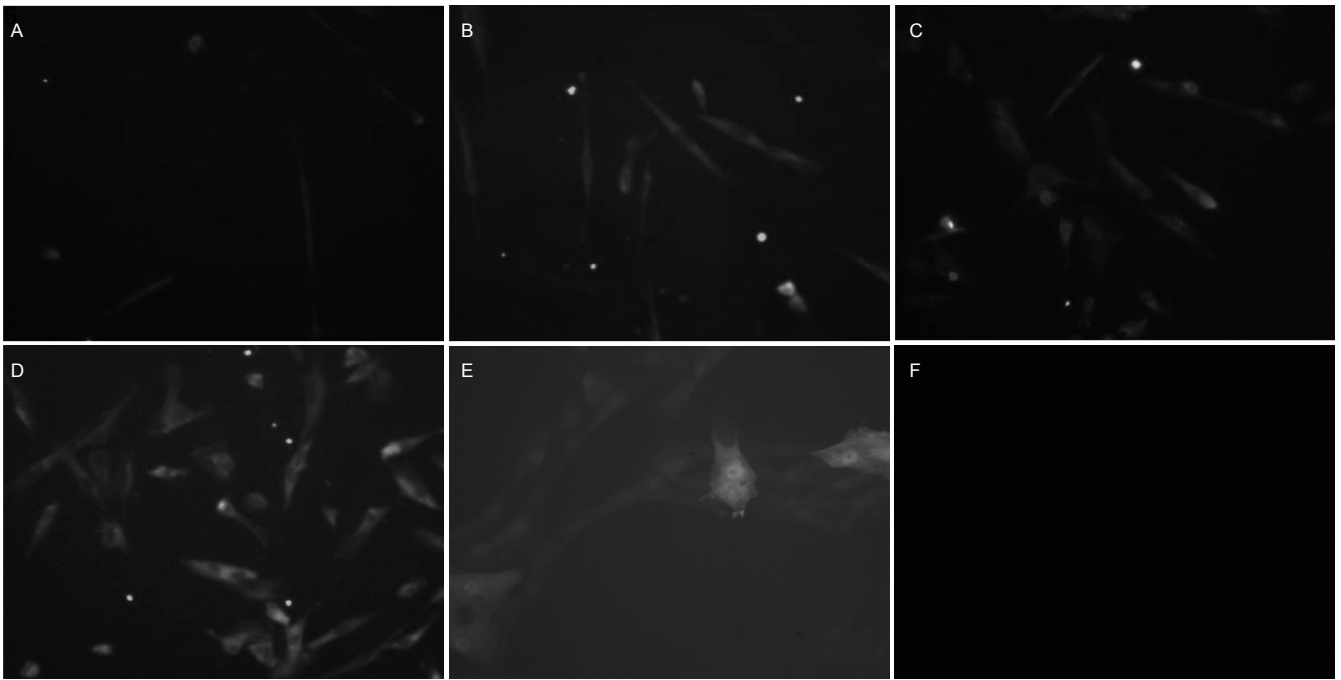


图4 绿色荧光蛋白-慢病毒转染大鼠牙髓干细胞 48 h 后荧光显微镜下观察($\times 100$)

Figure 4 Observation of rat dental pulp stem cells under fluorescence microscope after transfection with green fluorescent protein-lentiviral vector for 48 hours ($\times 100$)

图注: 图中 A 为 MOI=5; B 为 MOI=10; C 为 MOI=25; D 为 MOI=50; E 为 MOI=100; F 为 MOI=0(对照组)。A-D 可见细胞生长状态良好, 荧光表达较强, 阳性细胞数量依次增多; E 可见细胞形态发生明显改变; F 显示无荧光表达。

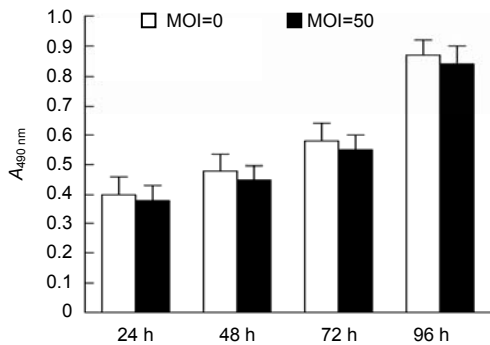


图6 比较两组细胞增殖情况

Figure 6 Comparison of cell proliferation between two groups

图注: MTT 法测定实验组(MOI=50)与对照组(MOI=0)细胞增殖能力差异无显著性意义($P > 0.05$)。

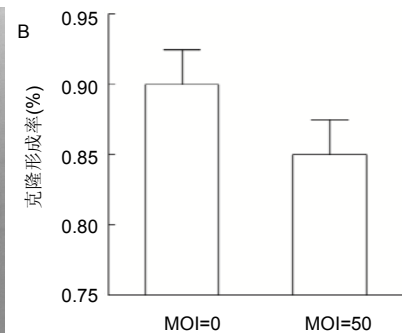
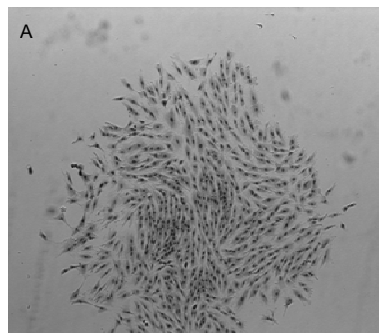


图7 绿色荧光蛋白-慢病毒转染后大鼠牙髓干细胞的细胞克隆形成

Figure 7 The clone formation after transfection of rat dental pulp stem cells with green fluorescent protein-lentiviral vector

图注: 图 A 为转染后细胞行 Giemsa 染色($\times 50$), 可见明显的细胞克隆集落形成; 图 B 为比较(MOI=50)与对照组(MOI=0)克隆形成率差异无显著性意义($P > 0.05$)。

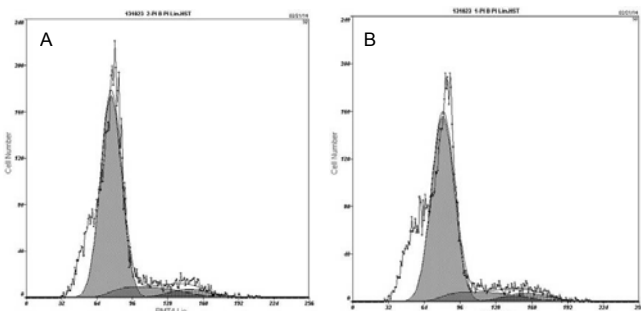


图8 绿色荧光蛋白-慢病毒转染后大鼠牙髓干细胞的细胞周期图谱

Figure 8 The cell cycle diagram after transfection of rat dental pulp stem cells with green fluorescent protein-lentiviral vector

图注: 图 A 为未感染病毒的对照组大鼠牙髓干细胞的细胞周期图; 图 B 为 MOI=50 绿色荧光蛋白-慢病毒感染后的细胞周期图, 两者未见明显变化。

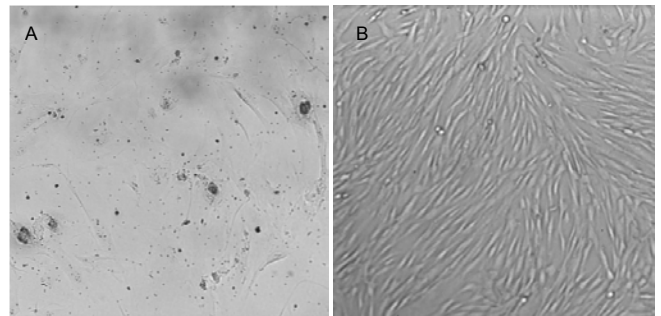


图9 绿色荧光蛋白-慢病毒转染后大鼠牙髓干细胞碱性磷酸酶染色($\times 50$)

Figure 9 Alkaline phosphatase staining after transfection of rat dental pulp stem cells with green fluorescent protein-lentiviral vector

图注: 图 A 为转染后的大鼠牙髓干细胞经矿化诱导 14 d 后, 行碱性磷酸酶染色, 出现棕色或棕褐色颗粒, 碱性磷酸酶表达阳性; 图 B 为对照组未见阳性表达。

目前有多种活细胞标记方法适用于实验研究^[13-16], 相较之下从水母体内分离获得的一种荧光蛋白—绿色荧光蛋白作为标记基因转染细胞具有标记效率高、稳定性好、表达时间长、易于检测且对细胞无毒害等优点^[17-18]。介导绿色荧光蛋白转入目的基因的载体有腺病毒、慢病毒和质粒^[19-20]。其中慢病毒载体是以人类免疫缺陷病毒(HIV-1)基因为基础, 使其自灭活后将外源基因有效整合到宿主基因中, 获得持久表达^[21-22], 因此, 慢病毒载体介导绿色荧光蛋白标记细胞的方法是当前标记技术中理想的选择^[23-24]。王巍巍等^[25]研究了携带增强绿色荧光蛋白的慢病毒载体感染人脂肪源性干细胞的有效性。本实验以大鼠作为研究对象, 采用不同MOI值的绿色荧光蛋白-慢病毒转染牙髓干细胞24 h和48 h后镜下观察细胞生长状态及绿色荧光蛋白的表达, 并通过检测转染率及转染后对细胞生物学特性的影响进行综合分析和评价, 明确慢病毒载体介导绿色荧光蛋白转染大鼠牙髓干细胞的理想条件与方法。

实验采用改良酶消化法所获得的大鼠牙髓干细胞镜下观察其大小形态和生长特性与郭红延等^[26]的研究结果一致。目前, 牙髓干细胞缺乏特异性标志物, 多采用STRO-1, CD146等间充质干细胞表面抗原的检测对其鉴定和分选^[27-28], 而对于造血系干细胞表面标记物CD34/CD45微弱表达或不表达^[29-30]。流式细胞仪检测结果表明: STRO-1和CD146高表达, 而CD34和CD45低表达。此外, 选择成骨和成脂两个较为经典的诱导分化方向进一步验证体外培养的大鼠牙髓干细胞的多向分化特性, 结果显示在相应的诱导培养条件下, 有矿化结节及脂滴的形成, 说明大鼠牙髓干细胞可定向分化为成骨细胞和脂肪细胞。上述实验结果证实从大鼠牙髓组织中分离培养的细胞符合间充质干细胞特性。

实验设置MOI为0, 5, 10, 25, 50, 100组绿色荧光蛋白慢病毒感染第3代大鼠牙髓干细胞, 转染24 h后大鼠牙髓干细胞开始表达绿色荧光, 但阳性细胞数量较少, 且荧光表达较弱, 继续培养达48 h, 每组表达绿色荧光蛋白阳性细胞数均增多, 且荧光表达明显增强。MOI≤50各组细胞形态未见明显改变, 而MOI=100组中出现明显细胞毒性反应。进一步检测每组转染率, 结果显示, MOI=50组转染效率最高, 并发现转染率与病毒MOI值之间存在密切联系, 即转染率在所设定MOI值范围内随其增加而升高, 但超过一定MOI值(MOI=100)时, 转染率反而有所下降。李宏松等^[31]研究提示, 在过高的MOI值下, 病毒的细胞毒性可使目的细胞生长受到抑制且出现毒性反应, 从而降低转染效率。实验结果证实, 在MOI=50转染48 h的条件下, 大鼠牙髓干细胞可达到最高转染效率及平均荧光强度, 故将该条件下转染的大鼠牙髓干细胞作为实验组与未感染(MOI=0)的大鼠牙髓干细胞进行比较。

自我更新能力是干细胞独有的生物学特性^[32-33], 体外细胞增殖与克隆形成是其重要体现。实验采用MTT法检测4个

时间点感染前后两组大鼠牙髓干细胞的增殖能力, 结果显示两组细胞中的吸光度值差异无显著性意义($P > 0.05$), 表明大鼠牙髓干细胞感染绿色荧光蛋白-慢病毒后能够稳定增殖。在同一条件下培养相同时间, 测得两组克隆形成率分别为 $(0.90 \pm 0.02)\%$ 和 $(0.85 \pm 0.02)\%$, 略低于郭红延等^[26]研究中的克隆形成率(0.94%), 原因可能与取材的大鼠种系和个体差异不同有关^[34]。但感染前后两组的克隆形成率差异无显著性意义($P > 0.05$), 验证了经绿色荧光蛋白-慢病毒转染后的大鼠牙髓干细胞能够保持原有的克隆形成能力。

细胞周期是反映细胞增殖动力学的重要参考指标^[35]。在正常生理状态下, 未分化的牙髓干细胞多处于静息状态或缓慢增殖状态^[36], 在周期上表现为 G_0/G_1 期比例较高, 反之增殖快的细胞 $S+G_2/M$ 期比例高^[37]。流式细胞周期检测结果显示: 两组细胞 G_0/G_1 期的比例均高于81%, 说明病毒感染前后的大鼠牙髓干细胞大多数仍处于静止期(G_0 期)或增殖前期(G_1 期), 符合干细胞生物学特性。在骨和牙齿等矿化组织形成、代谢和再生过程中, 碱性磷酸酶起着重要作用, 是常用的矿化鉴定指标^[38]。本实验检测碱性磷酸酶活性以明确绿色荧光蛋白-慢病毒标记后的大鼠牙髓干细胞的牙向分化能力, 结果显示实验组表达阳性, 而对照组阴性表达, 证明感染后的大鼠牙髓干细胞保留向成牙本质细胞分化的能力。

综上所述, MOI值为50的绿色荧光蛋白-慢病毒作用48 h时大鼠牙髓干细胞标记效率最高、荧光表达最强, 且不影响干细胞生物学特性, 故将其作为慢病毒介导绿色荧光蛋白转染大鼠牙髓干细胞的理想条件, 为长期观察大鼠牙髓干细胞定位、分化与转归的体内研究提供了可靠的示踪方法及理论依据。利用负载绿色荧光蛋白的慢病毒载体转染大鼠牙髓干细胞后进行体内定向诱导分化形成组织工程化牙本质是进一步实验的方向。

致谢: 衷心感谢新疆医科大学第一附属医院医学研究中心干细胞实验室马艳和毕晓娟老师的悉心指导和帮助, 为实验顺利实施奠定了基础。

作者贡献: 实验设计为通讯作者, 实验实施为第一作者, 实验评估为第二作者。第一作者成文, 通讯作者审校, 通讯作者对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。实验通过新疆医科大学第一附属医院伦理委员会审批, 并全程接受伦理委员会监督。

学术术语: MOI值—是Multiplicity of Infection的缩写, 中文译为感染复数, 指感染时病毒和细胞数量的比值。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, et al. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(25):13625-13630.
- [2] Gronthos S, Brahimi J, Li W, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*. 2002;81(8):531-535.
- [3] Zhang J, Jiang D, Zhang J, et al. Synthesis of dental enamel-like hydroxyapatite through solution mediated solid-state conversion. *Langmuir*. 2010;26(5):2989-2994.
- [4] Zheng Y, Wang XY, Wang YM, et al. Dentin regeneration using deciduous pulp stem/progenitor cells. *J Dent Res*. 2012;91(7):676-682.
- [5] Brazelton TR, Blau HM. Optimizing techniques for tracking transplanted stem cells in vivo. *Stem Cells*. 2005;23(9):1251-1265.
- [6] Chudakov DM, Matz MV, Lukyanov S, et al. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiol Rev*. 2010;90(3):1103-1163.
- [7] Bauer G, Dao MA, Case SS, et al. In vivo biosafety model to assess the risk of adverse events from retroviral and lentiviral vectors. *Mol Ther*. 2008;16(7):1308-1315.
- [8] 别利克孜·卡德尔, 刘奕杉, 王璇, 等. 改良酶消化法分离培养人乳牙牙髓干细胞[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(10):1793-1800.
- [9] Arthur A, Shi S, Zannettino AC, et al. Implanted adult human dental pulp stem cells induce endogenous axon guidance. *Stem Cells*. 2009 Sep;27(9):2229-2237.
- [10] 刘怡, 王松灵. 口腔特有的成体干细胞的研究进展[J]. *国外医学:口腔医学分册*, 2006, 33(2):110-113.
- [11] Ballini A, De Frenza G, Cantore S, et al. In vitro stem cell cultures from human dental pulp and periodontal ligament: new prospects in dentistry. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2007;20(1):9-16.
- [12] Karaöz E, Doğan BN, Aksoy A, et al. Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochem Cell Biol*. 2010;133(1):95-112.
- [13] Leiker M, Suzuki G, Iyer VS, et al. Assessment of a nuclear affinity labeling method for tracking implanted mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*. 2008;17(8):911-922.
- [14] Kato Y, Sawata SY, Inoue A. A lentiviral vector encoding two fluorescent proteins enables imaging of adenoviral infection via adenovirus-encoded miRNAs in single living cells. *J Biochem*. 2010;147(1):63-71.
- [15] Yang HN, Park JS, Na K, et al. The use of green fluorescence gene (GFP)-modified rabbit mesenchymal stem cells (rMSCs) co-cultured with chondrocytes in hydrogel constructs to reveal the chondrogenesis of MSCs. *Biomaterials*. 2009;30(31):6374-6385.
- [16] Cho SR, Kim YR, Kang HS, et al. Functional recovery after the transplantation of neurally differentiated mesenchymal stem cells derived from bone marrow in a rat model of spinal cord injury. *Cell Transplant*. 2009;18(12):1359-1368.
- [17] 武京国, 谢方南, 马慧雨, 等. EGFP和CM-Dil示踪骨髓间充质干细胞构建组织工程骨的体内研究[J]. *中国美容医学*, 2012, 21(3):406-409.
- [18] 吴沛桥, 巴晓革, 胡海, 等. 绿色荧光蛋白GFP的研究进展及应用[J]. *生物医学工程研究*, 2009, 28(1):83-86.
- [19] Lasek AW, Azouaou N. Virus-delivered RNA interference in mouse brain to study addiction-related behaviors. *Methods Mol Biol*. 2010;602:283-298.
- [20] Tannemaat MR, Verhaagen J, Malessy M. The application of viral vectors to enhance regeneration after peripheral nerve repair. *Neurol Res*. 2008;30(10):1039-1046.
- [21] Heilbronn R, Weger S. Viral vectors for gene transfer: current status of gene therapeutics. *Handb Exp Pharmacol*. 2010; (197): 143-170.
- [22] Burns TC, Ortiz-González XR, Gutiérrez-Pérez M, et al. Thymidine analogs are transferred from prelabeled donor to host cells in the central nervous system after transplantation: a word of caution. *Stem Cells*. 2006;24(4):1121-1127.
- [23] Nowakowski A, Andrzejewska A, Janowski M, et al. Genetic engineering of stem cells for enhanced therapy. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2013;73(1):1-18.
- [24] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 1994;263(5148):802-805.
- [25] 王巍巍, 张金元. 携带增强绿色荧光蛋白的慢病毒载体感染人脂肪源性干细胞的有效性[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(36):6695-6698.
- [26] 郭红延, 吴补领, 郭希民, 等. 大鼠牙髓干细胞的培养和鉴定[J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2004, 14(5):242-245.
- [27] Engelhardt M, Kumar R, Albanell J, et al. Telomerase regulation, cell cycle, and telomere stability in primitive hematopoietic cells. *Blood*. 1997;90(1):182-193.
- [28] Coppe C, Zhang Y, Den Besten PK. Characterization of primary dental pulp cells in vitro. *Pediatr Dent*. 2009;31(7):467-471.
- [29] Shimizu S, Kitada M, Ishikawa H, et al. Peripheral nerve regeneration by the in vitro differentiated-human bone marrow stromal cells with Schwann cell property. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;359(4):915-920.
- [30] Kaneko T, Arayatrakoolikit U, Yamanaka Y, et al. Immunohistochemical and gene expression analysis of stem-cell-associated markers in rat dental pulp. *Cell Tissue Res*. 2013;351(3):425-432.
- [31] 李宏松, 徐晨, 邹俊. 慢病毒负载GFP转染兔脂肪干细胞的效率及毒性评价[J]. *上海交通大学学报:医学版*, 2013, 33(4):439-444.
- [32] Cuenca-López MD, Zamora-Navas P, Garcia-Herrera JM, et al. Adult stem cells applied to tissue engineering and regenerative medicine. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2008; 54(1):40-51.
- [33] Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*. 2009;88(9):792-806.
- [34] Murray PE, Matthews JB, Sloan AJ, et al. Analysis of incisor pulp cell populations in Wistar rats of different ages. *Arch Oral Biol*. 2002;47(10):709-715.
- [35] Uchida N, He D, Frieri AM, et al. The unexpected G0/G1 cell cycle status of mobilized hematopoietic stem cells from peripheral blood. *Blood*. 1997;89(2):465-472.
- [36] 章静波, 宗书东, 马文丽. 干细胞[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2003:137-141.
- [37] 贺慧霞. 牙髓干细胞分离鉴定及其制备组织工程化牙本质牙髓复合体的实验研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2005.
- [38] 王志刚, 刘兴容. 牙髓干细胞及其表面特异标志物[J]. *国际口腔医学杂志*, 2010, 37(1):56-58.