

• 研究原著 •

慢病毒载体Pax6-EGFP构建及转染人骨髓间充质干细胞

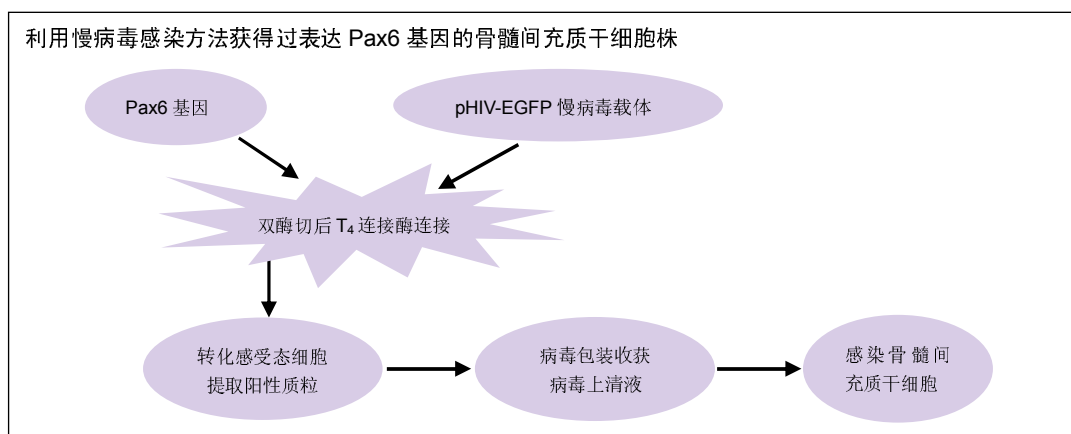
刘静雯^{1,2}, 任静^{1,2}, 陈胜¹, 李柏军¹, 刘身文¹, 秦波¹(¹深圳市眼科医院眼外伤科, 暨南大学附属深圳眼科医院, 深圳大学眼视光学院, 深圳眼科学重点实验室, 广东省深圳市 518000; ²暨南大学, 广东省广州市 510632)

引用本文: 刘静雯, 任静, 陈胜, 李柏军, 刘身文, 秦波. 慢病毒载体 Pax6-EGFP 构建及转染人骨髓间充质干细胞[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(36):5338-5344.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.36.003

ORCID: 0000-0003-2533-1378(刘静雯)

文章快速阅读:



刘静雯, 女, 1989 年生, 广东省清远市人, 汉族, 2016 年暨南大学毕业, 硕士, 医师, 主要从事眼外伤、眼底病研究。

通讯作者: 秦波, 博士, 教授, 主任医师, 深圳市眼科医院眼外伤科, 暨南大学附属深圳眼科医院, 深圳大学眼视光学院, 深圳眼科学重点实验室, 广东省深圳市 518000

文题释义:

慢病毒载体: 是以 HIV-1(人类免疫缺陷 1 型病毒)为基础发展起来的基因治疗载体, 它能将外源基因整合到宿主细胞染色体上并长期表达目的基因及蛋白。四质粒系统是目前最新、应用最广的慢病毒载体系统, 分别由 pRev、pGag/Pol、pVSV-G 和一个携带目的基因序列的载体构成, 由于其包装序列不能整合到基因组中, 病毒感染宿主后无法复制, 也不能产生新的病毒颗粒, 因此安全性得到保证。

感染复数: 指的是有感染力的病毒数量与待感染的细胞数量的比值, 通常以不同浓度梯度的病毒液感染靶细胞并观察转染效果, 以确定该病毒载体的最适感染复数。

摘要

背景: Pax6 基因是影响眼发育、分化的关键基因, 获得过表达 Pax6 基因的稳定细胞株是研究其对骨髓间充质干细胞分化作用的首要任务, 也是干细胞替代治疗的研究基础。

目的: 构建重组慢病毒载体 Pax6-EGFP, 体外转染人骨髓间充质干细胞, 检测 Pax6 基因在人骨髓间充质干细胞中的表达情况。

方法: 利用 PCR 法从人 Pax6 cDNA 基因克隆载体 pGEM-PAX6 上扩增 Pax6 目的片段, 将其与 Xba I 和 BamH I 双酶切的慢病毒载体 pHIV-EGFP 连接, 转化感受态细胞 DH5α, 挑取阳性克隆提取质粒, 测序鉴定。经 293T 细胞包装后, 收集含病毒颗粒的上清液, 体外转染人骨髓间充质干细胞, 同时设立阴性对照组(pHIV-EGFP 空载体)。荧光显微镜下观察转染是否成功, Real time PCR 检测转染细胞 Pax6 基因的表达。

结果与结论: ①酶切电泳及基因测序证实携带 Pax6 基因的慢病毒载体构建成功, 包装后获得滴度为 3×10^9 pfu/L 的 Pax6-EGFP 重组载体; ②转染人骨髓间充质干细胞后, 在荧光显微镜下可以发出绿色荧光, 且荧光强度不随培养时间延长而衰退; ③经 Real time PCR 检测, 被转染细胞内有 Pax6 基因表达, 表明慢病毒转染是一种安全高效的基因修饰手段, 能够使外源基因整合到宿主细胞基因组中。

关键词:

干细胞; 骨髓干细胞; 骨髓间充质干细胞; 过表达; Pax6 基因; 慢病毒; 基因转染; 绿色荧光蛋白

主题词:

骨髓; 间质干细胞; 成对盒转录因子类; 慢病毒属; 转染; 绿色荧光蛋白质类; 组织工程

基金资助:

深圳市知识创新计划基础研究计划项目(JCYJ20130401152829828)

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2016)36-05338-07

稿件接受: 2016-07-08

Liu Jing-wen, Master,
Physician, Ocular Trauma
Department of Shenzhen
Eye Hospital, Affiliated
Shenzhen Eye Hospital of
Jinan University, Joint
College of Optometry of
Shenzhen University,
Shenzhen Key Laboratory
of Ophthalmology,
Shenzhen 518000,
Guangdong Province,
China; Jinan University,
Guangzhou 510632,
Guangdong Province,
China

Corresponding author:
Qin Bo, M.D., Professor,
Chief physician, Ocular
Trauma Department of
Shenzhen Eye Hospital,
Affiliated Shenzhen Eye
Hospital of Jinan
University, Joint College of
Optometry of Shenzhen
University, Shenzhen Key
Laboratory of
Ophthalmology, Shenzhen
518000, Guangdong
Province, China

Construction of a lentivirus vector containing Pax6 and its transfection of human bone marrow mesenchymal stem cells

Liu Jing-wen^{1,2}, Ren Jing^{1,2}, Chen Sheng¹, Li Bai-jun¹, Liu Shen-wen¹, Qin Bo¹ (¹Ocular Trauma Department of Shenzhen Eye Hospital, Affiliated Shenzhen Eye Hospital of Jinan University, Joint College of Optometry of Shenzhen University, Shenzhen Key Laboratory of Ophthalmology, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China; ²Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Pax6 gene plays an important role in eye development and differentiation, and to study how it regulates the differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs), gaining the BMSCs stably over-expressing Pax6 is crucial, which is also the basis of stem cell replacement therapy.

OBJECTIVE: To construct a lentivirus vector containing Pax6 and detect the expression of Pax6 in transfected human BMSCs.

METHODS: Pax6 gene was extracted using PCR. After its connection with lentivirus vector pHIV-EGFP, it was then packaged by 293T cells. The human BMSCs were transfected with recombinant lentivirus Pax6-EGFP as well as lentivirus vector pHIV-EGFP, which was considered negative control group. The cellular morphology was observed by a fluorescence microscope, and the mRNA expression of Pax6 was detected by real-time PCR.

RESULTS AND CONCLUSION: The recombinant lentivirus Pax6-EGFP was constructed successfully with a titer of 3×10^9 pfu/L. After the transfection, both the green fluorescent protein and Pax6 gene were expressed detected using fluorescence microscope and real-time PCR, showing that the method of lentiviral transfection is a safe and effective way to modify BMSCs.

Subject headings: Bone Marrow; Mesenchymal Stem Cells; Paired Box Transcription Factors; Lentivirus; Transfection; Green Fluorescent Proteins; Tissue Engineering

Funding: Basic Research Project of Knowledge Innovation Program in Shenzhen, China, No. JCYJ20130401152829828

Cite this article: Liu JW, Ren J, Chen S, Li BJ, Liu SW, Qin B. Construction of a lentivirus vector containing Pax6 and its transfection of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(36):5338-5344.

0 引言 Introduction

外伤性视神经病变(trumatic optic neuropathy, TON)是外伤导致的一种眼部并发症,它的特点在于外伤后视力丧失,而缺乏外部或最初眼底镜下眼球或视神经损伤的表现。临床上对外伤性视神经病变的治疗主要有大剂量糖皮质激素、脱水剂、血管扩张剂、神经保护剂以及视神经减压术,虽然近几年在治疗方法上有了长足进展,但目前尚未建立治疗的金标准^[1]。对于一些严重的外伤性视神经病变患者,现有的临床干预效果往往不能阻止视网膜神经细胞损伤及功能丧失,所导致的不可逆性视力下降、视野缺损,严重影响着患者的生活质量。近年来迅速发展的干细胞研究使细胞替代治疗变成现实,为治疗外伤性视神经病变提供了一种新的思路。

骨髓间充质干细胞作为间充质干细胞中应用最多的一种,在适当条件下除了能分化为各种间充质组织以外,还具有向其他谱系细胞分化的可塑性^[2]。骨髓间充质干细胞的多向分化潜能特征使其成为治疗各类难治

性眼病的理想细胞,在这方面的研究也获得许多进展:经体内、外诱导骨髓间充质干细胞所得的角膜上皮细胞和角膜基质细胞能参与修复受损角膜;骨髓间充质干细胞作为种子细胞构建组织工程化骨,修复眶骨缺损;通过静脉输注骨髓间充质干细胞有效抑制小鼠模型的脉络膜血管新生^[3];Tzameret等^[4]和Jiang等^[5]分别利用网膜下移植和尾静脉输注的方法,将骨髓间充质干细胞注入视网膜退化性变和激光损伤视网膜的动物模型体内,成功使细胞退变和细胞凋亡得到延缓和抑制。此外有大量研究表明,骨髓间充质干细胞可分化为各种视网膜细胞。郑学栋等^[6]、Duan等^[7]成功将人骨髓间充质干细胞诱导分化为视网膜色素上皮样细胞;Kicic等^[8]则诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化出表达视紫红质、视蛋白等光感受器特异性标记的细胞;骨髓间充质干细胞向视网膜神经元样细胞的分化能力也已被孙旭芳等^[9]、刘东宁等^[10]证实。

Pax6基因作为眼域转录因子(eye-filed transcription factors, EFTFs)之一,在发育过程中广泛表达于眼球各

种组织, 包括视盘、视泡、晶状体、角膜上皮、虹膜、睫状体、神经视网膜各层以及视网膜色素上皮, 并对脊椎动物眼发育起重要作用^[11-12]。据文献报道, Pax6在视网膜神经细胞分化调控网络中处于上游位置, 能保证视网膜祖细胞的分化活力并决定其分化命运^[13]。

细胞分化在分子水平受多种基因的精确调节, 任何特定细胞的发育形成, 都是细胞内部因素和外部微环境共同作用的结果。基于现存的研究可以看出, 骨髓间充质干细胞作为合适的外源基因载体和种子细胞, 具有向各种视网膜细胞分化的可塑性; 而Pax6基因在眼球发育过程中扮演关键角色, 控制着视网膜祖细胞的分化方向。因此, 实验拟通过慢病毒转染, 获得过表达Pax6基因的稳态细胞株, 为进一步研究骨髓间充质干细胞定向分化及干细胞替代治疗提供实验依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外观察实验。

1.2 时间及地点 实验于2014年6月至2015年6月在深圳市眼科医院眼科学重点实验室完成。

1.3 材料 人骨髓间充质干细胞(深圳研顺生物科技有限公司); 人Pax6 cDNA基因克隆载体(Sino biological公司); 慢病毒质粒载体pHIV-EGFP(美国Addgene公司); 辅助载体、壳蛋白载体pMDLg/pRRE, pRSV-Rev, pMD2.G(美国Addgene公司); HEK-293T细胞(实验室自有); 限制性内切酶Xba I、BamH I及T₄ DNA连接酶(Invitrogen公司); 大肠杆菌 DH5 α (实验室自有); 去内毒素质粒提取试剂盒(Qiagen公司); Trizol试剂、Lipofectamine 2000(Invitrogen公司); 胶回收试剂盒(Takara公司); DMEM、胎牛血清(Giboco公司); 引物设计及合成(华大基因公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 Pax6-EGFP质粒的构建 以Pax6基因为模板, 设计含COZAK增强子序列及Xba I和BamH I酶切位点的上下游引物: Pax6 Forward: 5'-ATA TCT AGA GCC ACC ATG GTC ATG CAG AAC AGT CAC AGC-3'; Pax6 Reverse: 5'-CGC GGA TCC TTA CTG TAA TCT TGG CCA GTA TT-3', 从人Pax6 cDNA基因克隆载体pGEM-PAX6上扩增Pax6目的基因片段。以Xba I和BamH I双酶切扩增的Pax6序列, 胶回收Pax6基因片段。同样以Xba I和BamH I双酶切pHIV-EGFP慢病毒载体, 纯化后, 两者用T₄ DNA连接酶16℃连接过夜, 转化感受态细胞DH5 α , 挑取抗氨苄霉素的阳性

菌落在LB液体培养基中扩增, 参照去内毒素质粒提取试剂盒说明操作提取质粒, 用Xba I和BamH I对重组质粒进行双酶切, 测序鉴定, 以确定Pax6-EGFP质粒构建是否成功。

1.4.2 慢病毒包装 取对数生长期293T细胞, 细胞汇合度达到60%左右, 转染前2 h将细胞培养液更换为无血清培养液。向2个1.5 mL的灭菌EP离心管中各加入500 μ L的optiMEM, 并加入所制备的DNA混合溶液(对照组pHIV-EGFP、pMDLg/pRRE、pRSV-Rev和pMD2.G; 实验组Pax6-EGFP、pMDLg/pRRE、pRSV-Rev和pMD2.G)室温5 min。将60 μ L LipofectamineTM 2000加入另一管中, 室温5 min。把混匀后的DNA溶液以及转染试剂混合, 室温20 min, 形成转染复合物。将DNA与LipofectamineTM 2000混合液滴加入无血清培养基的293T细胞中, 轻轻摇晃培养基, 混匀DNA与转染试剂复合物, 培养6 h后更换含体积分数为20%胎牛血清的完全培养基, 转染48 h后10 000 $\times$ g离心5 min收集上清, 分装后-80℃冰箱保存。病毒滴度约为3 $\times$ 10⁹ pfu/L。

1.4.3 慢病毒颗粒感染骨髓间充质干细胞 取靶细胞接种到6孔细胞培养板(每孔1 $\times$ 10⁶个), 待细胞融合度达70%时, 用1 mL病毒上清混合1 mL完全培养基加入6孔板中, 同时加入终质量浓度为8 mg/L的聚凝胺(polybrene)促进病毒感染, 设立对照组(pHIV-EGFP)和实验组(Pax6-EGFP)。设置病毒感染复数(MOI)为=10, 20, 40。连续感染2次, 间隔1 d, 72 h后荧光显微镜下观察GFP的表达情况。

1.4.4 实时定量PCR检测Pax6 mRNA表达 慢病毒感染后收获细胞, 采用Trizol试剂提取总RNA, 使用紫外分光光度计进行RNA定量, 并根据RT-PCR试剂盒说明书反转录成cDNA。实时定量PCR检测Pax6的表达, 反应条件如下: 95℃预变性2 min, 以后每个循环条件为95℃ 1 min, 60℃ 1 min, 循环40次。引物: Pax6 Forward: 5'-GTG CCC GTC CAT CTT TGC T-3'; Pax6 Reverse: 5'-TGT TTA TTG ATG ACA CGC TTG GT-3'; GAPDH Forward: 5'-GTT GTC TCC TGC GAC TTC A-3'; GAPDH Reverse: 5'-GGT GGT CCA GGG TTT CTT A-3'。GAPDH作为内参, 通过2^{- $\Delta\Delta$ Ct}方法进行相对定量分析Pax6 mRNA水平。

1.5 主要观察指标 ①慢病毒转染间充质干细胞的效率; ②RT-PCR鉴定目的基因表达水平; ③转染后细胞生长状态。

2 结果 Results

2.1 目的基因片段 Pax6 的获取 设计扩增引物, 并在上下游引物分别加上 COZAK 增强子序列、Xba I 和 BamH I 酶切位点, 从人 Pax6 cDNA 基因克隆载体 pGEM-PAX6 上扩增 Pax6 基因片段, 用 Xba I 和 BamH I 双酶切, 电泳结果显示酶切后 1 269 bp 处有明亮特异的条带, 与预期相符, 同时 PHIV-EGFP 质粒也用 Xba I 和 BamH I 双酶切, 切胶纯化, 见图 1。

2.2 慢病毒载体 Pax6-EGFP 的鉴定及测序结果分析 重组质粒连接后转化到 DH5 α 感受态, 挑选 10 个克隆, 经菌液 PCR 筛选后可见 3 个阳性克隆(图 2A), 抽提 3 个阳性克隆的质粒, 继续做 PCR, 均可见长度为 1 269 bp 左右基因片段(图 2B), 与目的基因 Pax6 大小基本一致。

采用通用引物检测重组载体 PHIV-EGFP-Pax6 中的 Pax6 序列信息, 经测序分析与 GeneBank 中基因序列比对(图 3), 发现其相似性为 100%, 表明成功构建载体。

2.3 显微镜下观察细胞形态及绿色荧光表达 经 MOI=10, 20, 40 的 Pax6-EGFP 慢病毒转染骨髓间充质干细胞 24 h, 均可见绿色荧光蛋白阳性细胞但数量较少, 且胞浆内荧光较弱, 间隔 1 d 重复感染, 72 h 后见绿色荧光蛋白阳性细胞增多, 荧光增强, 其中 MOI=20 时阳性细胞数量及荧光强度最优。以相同 MOI 值及相同步骤对空白组进行 pHIV-EGFP 转染, 两组分别置于普通显微镜(图 4)、荧光显微镜(图 5)下观察。普通显微镜下两组细胞生长状态良好, 细胞形态均未见明显改变, 多数细胞呈长梭形。荧光显微镜下两组均能观察到绿色荧光蛋白表达, 感染效率约为 30%, 并且在转染后第 10 天荧光依旧可见。

2.4 RT-PCR 及 Real time PCR 检测各组细胞内 Pax6 的表达 168 bp 的 GAPDH 作为内参, 1% 琼脂糖凝胶电泳于相应位置可见目的条带。取转染 72 h 后的两组骨髓间充质干细胞分别行 RT-PCR, 以设计的 Pax6 Real

time PCR 引物作为 RT-PCR 的引物, 扩增产物为 95 bp, 经电泳 40 min 后凝胶成像仪观察结果见图 6, 可见实验组在 95 bp 左右出现阳性条带, 对照组则未见相应条带。利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法, 以对照组作为参照标准, 即表达水平为 1, 计算对照组与实验组骨髓间充质干细胞中 Pax6 基因相对表达水平, 可见实验组表达水平明显高于对照组, 差异有显著性意义(图 7)。

3 讨论 Discussion

众多针对眼疾的干细胞研究为各类重大致盲眼病患者带来希望, 一系列突破性的进展为将来细胞移植成为临床治疗方法奠定了基础, 目前在全球各国开展的临床试验更是能观察到乐观结果。针对视网膜退行性病变的相关研究最多, 大量文献证实, 通过定向诱导、共培养、重编程等方法, 各种来源干细胞均可分化为视网膜色素上皮细胞, 并移植到视网膜色素病变、黄斑变性动物模型视网膜下腔, 成功改善宿主的视功能^[14-20]。基于临床前研究的成果, 美国 ACT 公司早于 2011 年便开始进行人类胚胎干细胞治疗干性年龄相关性黄斑变性和少年型黄斑营养不良的临床试验, 并成功使患者视力提高^[21]; 科学家 Takahashi 则获日本政府批准, 用患者身上取下的皮肤细胞重编程为多能干细胞, 对老年性黄斑变性患者进行治疗; 中国重庆市视觉损伤与再生修复重点实验室正进行胚胎干细胞治疗视网膜变性疾病的 II 期临床研究; 印度、巴西、泰国等国也对骨髓间充质干细胞治疗视网膜色素病变开展临床试验^[22]。此外, 针对骨髓间充质干细胞在糖尿病视网膜病变、青光眼、缺血性视网膜病、视神经萎缩等眼病治疗的有效性、安全性的临床试验也在积极进行^[23-24]。

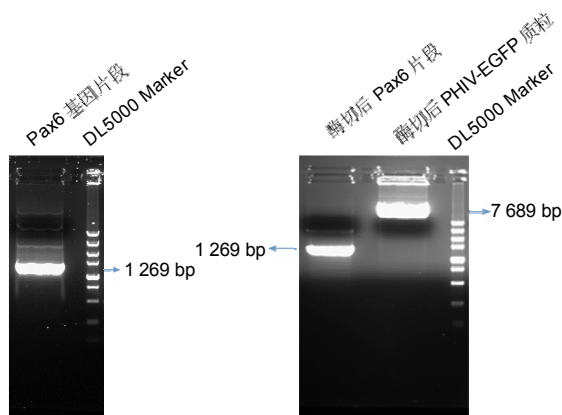


图 1 目的基因片段 Pax6 的获取和鉴定

Figure 1 Obtaining and characterization of Pax6 gene

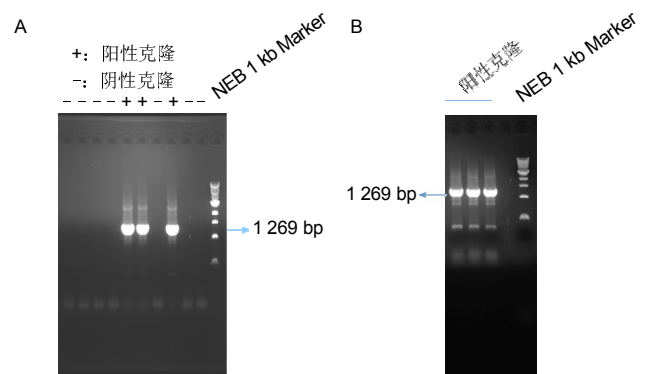


图 2 慢病毒载体 Pax6-EGFP 电泳鉴定结果

Figure 2 Electrophoresis analysis of the acquired Pax6-EGFP 图注: 图中 A 为重组质粒连接后转化到 DH5 α 感受态, 挑选 10 个克隆, 经菌液 PCR 筛选后可见 3 个阳性克隆; B 为 3 个阳性克隆的质粒进行 PCR, 均可见长度为 1 269 bp 左右基因片段, 与目的基因 Pax6 大小基本一致。

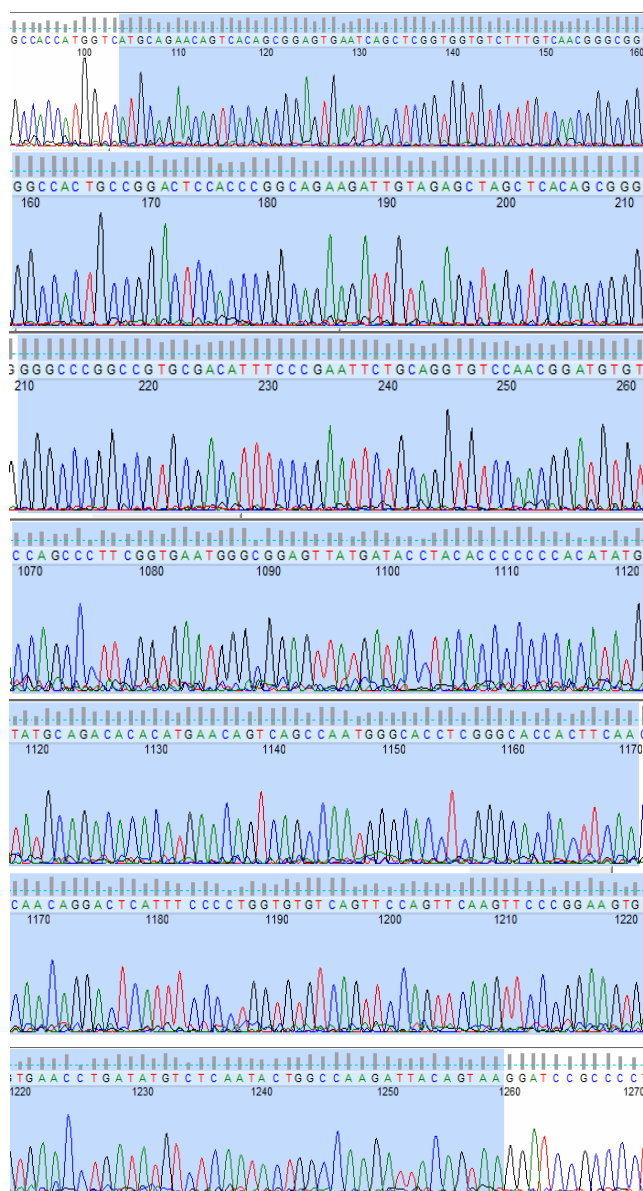


图3 Pax6 序列比对结果

Figure 3 Results of Pax6 gene sequence alignment

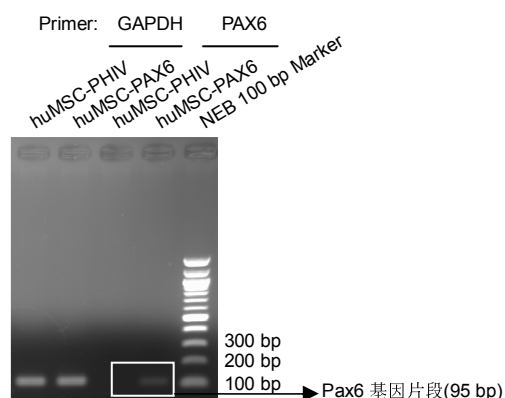


图6 RT-PCR 所得 GAPDH 及 Pax6 基因

Figure 6 Electrophoresis analysis of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and Pax6 in reverse transcription-PCR products

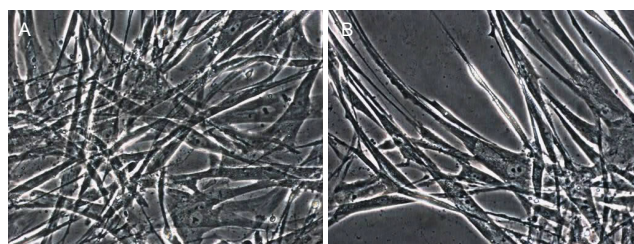


图4 MOI= 20 时普通显微镜下细胞形态(×200)

Figure 4 Morphology of transfected bone marrow mesenchymal stem cells when the multiplicity of infection was 20 (×200)

图注: 图中 A 为空白组 pHIV-EGFP 转染人骨髓间充质干细胞的细胞形态; B 为实验组 Pax6-EGFP 转染人骨髓间充质干细胞的细胞形态。

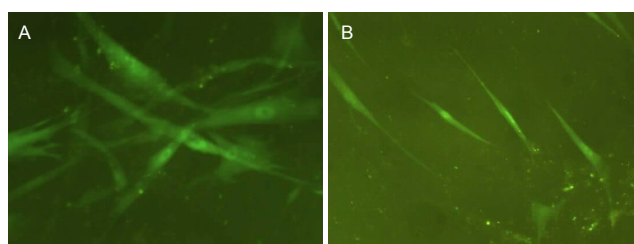


图5 MOI=20 时荧光显微镜下绿色荧光蛋白表达情况(×200)

Figure 5 Green fluorescent protein expression of transfected bone marrow mesenchymal stem cells when the multiplicity of infection was 20 (×200)

图注: 图中 A 为空白组 pHIV-EGFP 转染人骨髓间充质干细胞的绿色荧光蛋白表达情况; B 为实验组 Pax6-EGFP 转染人骨髓间充质干细胞的绿色荧光蛋白表达情况。

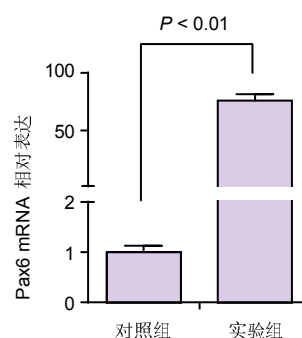


图7 骨髓间充质干细胞中 Pax6 基因相对表达水平

Figure 7 Pax6 gene relative expression level in bone marrow mesenchymal stem cells of control group and experimental group

干细胞治疗中常用的有胚胎干细胞、多能干细胞和间充质干细胞, 相比较于其他干细胞, 骨髓间充质干细胞最明显的优势在于^[25-29]: ①取自自体骨髓, 取材方便, 并且诱导所得组织在进行移植时不存在组织配型及免疫排斥等问题, 亦不涉及伦理道德问题; ②外源基因易于植入并可整合到骨髓间充质干细胞的基因组中, 稳定表达而不影响其干细胞特性, 且外源基因的表达具有组

织特异性, 受所定位微环境调控, 因此骨髓间充质干细胞已成为体内基因治疗的靶细胞, 并在体外基因转移治疗方面被看作是转基因的潜在载体; ③骨髓间充质干细胞的细胞特性稳定, 扩增 1 代和 2 代后的细胞同质性均达到 95% 以上, 种属间具有高度的进化保守性, 连续传代培养和冷冻保存后仍具有多向分化潜能。因此实验选择骨髓间充质干细胞作为靶细胞。

基因转染是调节靶基因表达水平的最常用手段, 其中转染方法多样, 常以高转染效率、低细胞毒性、较高稳定性、对细胞正常生理特性影响较小及较好的可重复性为选择标准。化学方法如脂质体转染, 虽然广谱、高效、无毒, 但表达量较低, 持续时间较短, 不符合构建过表达 Pax6 稳定细胞株的目的; 电穿孔法同样操作方便、低毒性、效率高, 但如何提高转染后细胞存活率是难点^[30]。实验采用的慢病毒载体系统, 不仅能高效地将目的基因整合到被转染细胞基因组中, 而且使目的基因长期稳定表达; 另外, 病毒转录单位能自我删除、不被表达, 具安全性; 其自身的免疫原性特征很低, 不会引起宿主的剧烈免疫应答; 已被证实不存在成瘤风险; 自带绿色荧光蛋白, 便于直接观察其在干细胞中的转染及表达情况^[31-33]。各方面特性使该慢病毒系统成为合适载体。

目前已有研究利用 Pax6 诱导小鼠胚胎干细胞分化成为视网膜神经祖细胞和视网膜神经节细胞样细胞^[34], 但 Pax6 是否能够增强骨髓间充质干细胞修复视神经损伤的潜能, 它将会在骨髓间充质干细胞分化命运的演变上扮演什么角色, 目前尚不明确。因此实验聚焦于眼域转录因子 Pax6 基因在脊椎动物眼发育过程中的关键作用以及它对视网膜祖细胞分化的调控作用, 通过基因修饰策略, 构建过表达 Pax6 基因的骨髓间充质干细胞, 希望为进一步研究如何提高骨髓间充质干细胞向视网膜神经细胞分化能力做铺垫。

从实验结果可以看出, 通过慢病毒重组载体转染的方法和一系列实验, 证实已获得过表达 Pax6 的骨髓间充质干细胞: ①使用携带目的基因的慢病毒重组质粒 Pax6-EGFP, 设置了 10、20 及 40 的病毒感染复数梯度, 观察发现病毒感染复数为 20 时, 骨髓间充质干细胞生长形态未见明显变化, 对细胞的损伤较轻, 72 h 后约 30% 细胞出现荧光, 说明该自带绿色荧光蛋白的慢病毒重组质粒已转染进细胞, 并且转染后的靶细胞能够存活及表达, 满足实验的需要; ②RT-PCR 产物的电泳结果显示与目的基因大小相符的条带, 提示反转录得到 Pax6 cDNA; ③通过 Real time PCR 检测, 得出实验组 Pax6

mRNA 表达水平为空载体对照组 76 倍的结论, 实现了 Pax6 基因的过表达。这些是研究 Pax6 基因如何影响骨髓间充质干细胞分化的第一步, 也是干细胞替代治疗的研究基础。但需要指出的是, 慢病毒转染的安全问题仍存在争论, 细胞转染率也有待提高, 如何更安全、高效地将目的基因整合到靶细胞内是下一步需要解决的问题。

致谢: 感谢香港中文大学杨书才博士在实验过程中给予的指导和帮助。

作者贡献: 实验设计、实验实施为刘静雯、任静、陈胜、秦波, 实验评估为李柏军、刘身文, 资料收集为刘静雯、任静、陈胜。刘静雯成文, 秦波审校, 秦波对文章负责。

利益冲突: 所有作者共同认可文章内容不涉及相关利益冲突。

伦理问题: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 通讯作者对于研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] Yu-Wai-Man P. Traumatic optic neuropathy-Clinical features and management issues. Taiwan J Ophthalmol. 2015;5(1):3-8.
- [2] Wang S, Qu X, Zhao RC. Clinical applications of mesenchymal stem cells. Bone. 2009; 44(5):828-829.
- [3] 徐如霞, 李静, 贾亚丁. 骨髓间充质干细胞在眼科疾病中应用研究进展[J]. 中国实用眼科杂志, 2014, 32(3):260-263.
- [4] Tzameret A, Sher I, Belkin M, et al. Epiretinal transplantation of human bone marrow mesenchymal stem cells rescues retinal and vision function in a rat model of retinal degeneration. Stem Cell Res. 2015; 15(2):387-394.
- [5] Jiang Y, Zhang Y, Zhang L, et al. Therapeutic effect of bone marrow mesenchymal stem cells on laser-induced retinal injury in mice. Int J Mol Sci. 2014; 15(6):9372-9385.
- [6] 郑学栋, 徐国兴, 侯泽江, 等. 联合共培养系统诱导骨髓间充质干细胞分化为视网膜色素上皮样细胞[J]. 中华眼视光学与视觉科学杂志, 2011, 13(2):88-93.

- [7] Duan P, Xu H, Zeng Y, et al. Human bone marrow stromal cells can differentiate to a retinal pigment epithelial phenotype when co-cultured with pig retinal pigment epithelium using a transwell system. *Cell Physiol Biochem*. 2013;31(4-5):601-613.
- [8] Kicic A, Shen WY, Wilson AS, et al. Differentiation of marrow stromal cells into photoreceptors in the rat eye. *J Neurosci*. 2003;23(21):7742-779.
- [9] 孙旭芳,姜焕荣,杨红.大鼠骨髓间充质干细胞体外培养及其向视网膜神经样细胞诱导分化的实验研究[J].中国现代医学杂志, 2007,17(16):1974-1976.
- [10] 刘东宁,阴正勤,吴楠,等.大鼠骨髓间充质干细胞体外分化为视网膜神经节样细胞的实验研究[J].眼科研究, 2007, 25(12): 900-903.
- [11] 李志清,黄悦,孙慧敏.PAX6基因在眼发育中的调控作用[J].国际眼科杂志,2013,13(4):685-687.
- [12] David Wan-Cheng Li.认识人类配对盒基因Pax6,一个控制眼和大脑发育的关键基因[J].中华实验眼科杂志, 2015, 33(7):577-587.
- [13] Farhy C, Elgart M, Shapira Z, et al. Pax6 is required for normal cell-cycle exit and the differentiation kinetics of retinal progenitor cells. *PLoS One*. 2013; 8(9):e76489.
- [14] Maruotti J, Wahlin K, Gorrell D, et al. A simple and scalable process for the differentiation of retinal pigment epithelium from human pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med*. 2013;2(5):341-354.
- [15] Rowland TJ, Blaschke AJ, Buchholz DE, et al. Differentiation of human pluripotent stem cells to retinal pigmented epithelium in defined conditions using purified extracellular matrix proteins. *J Tissue Eng Regen Med*. 2013;7(8):642-653.
- [16] Lane A, Philip LR, Ruban L, et al. Engineering efficient retinal pigment epithelium differentiation from human pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med*. 2014; 3(11):1295-1304.
- [17] Dang Y, Zhang C, Zhu Y. Stem cell therapies for age-related macular degeneration: the past, present, and future. *Clin Interv Aging*. 2015;10:255-264.
- [18] Li Y, Tsai YT, Hsu CW, et al. Long-term safety and efficacy of human-induced pluripotent stem cell (iPS) grafts in a preclinical model of retinitis pigmentosa. *Mol Med*. 2012;18:1312-1319.
- [19] Duan P, Xu H, Zeng Y, et al. Human bone marrow stromal cells can differentiate to a retinal pigment epithelial phenotype when co-cultured with pig retinal pigment epithelium using a transwell system. *Cell Physiol Biochem*. 2013;31(4-5):601-613.
- [20] Buchholz DE, Pennington BO, Croze RH, et al. Rapid and efficient directed differentiation of human pluripotent stem cells into retinal pigmented epithelium. *Stem Cells Transl Med*. 2013;2(5):384-393.
- [21] Schwartz SD, Hubschman JP, Heilwell G, et al. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet*. 2012;379(9817):713-720.
- [22] He Y, Zhang Y, Liu X, et al. Recent advances of stem cell therapy for retinitis pigmentosa. *Int J Mol Sci*. 2014; 15(8):14456-14474.
- [23] Park SS, Bauer G, Abedi M, et al. Intravitreal autologous bone marrow CD34+ cell therapy for ischemic and degenerative retinal disorders: preliminary phase 1 clinical trial findings. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;56(1):81-89.
- [24] Mead B, Berry M, Logan A, et al. Stem cell treatment of degenerative eye disease. *Stem Cell Res*. 2015; 14(3): 243-257.
- [25] Pittenger MF, Mbalaviele G, Black M, et al. Mesenchymal stem cells. In: Manfred RK, Bernhard OP, John RW. *Hum Cell Culture*. Vol V. New York: Kluwer Academic Publishers, 2002: 189-207.
- [26] Kondo T, Johnson SA, Yoder MC, et al. Sonic hedgehog and retinoic acid synergistically promote sensory fate specification from bone marrow-derived pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(13):4789-4794.
- [27] 卢建民,马翔.骨髓间充质干细胞及其在眼科应用的研究进展[J].国际眼科杂志,2009,9(10):1952-1956.
- [28] Myers TJ, Granero-Molto F, Longobardi L, et al. Mesenchymal stem cells at the intersection of cell and gene therapy. *Expert Opin Biol Ther*. 2010;10(12): 1663-1679.
- [29] 王月丽,魏继楼,程红蕾,等.外源基因转染细胞技术的研究进展[J].现代生物医学进展, 2014, 14(7):1382-1384.
- [30] de Girolamo L, Lucarelli E, Alessandri G, et al. Mesenchymal stem/stromal cells: a new "cells as drugs" paradigm. Efficacy and critical aspects in cell therapy. *Curr Pharm Des*. 2013;19(13):2459-2473.
- [31] Trapani I, Puppo A, Auricchio A. Vector platforms for gene therapy of inherited retinopathies. *Prog Retin Eye Res*. 2014;43:108-128.
- [32] 方芳,朱平.慢病毒载体的改进为基因治疗带来了新的希望[J].中国实验血液学杂志,2013,21(5):1336-1339.
- [33] Pan S, Wan J, Liu S, et al. Lentivirus carrying the Atoh1 gene infects normal rat cochlea. *Neural Regen Res*. 2013;8(17):1551-1559.
- [34] Kayama M, Kurokawa MS, Ueda Y, et al. Transfection with pax6 gene of mouse embryonic stem cells and subsequent cell cloning induced retinal neuron progenitors, including retinal ganglion cell-like cells, in vitro. *Ophthalmic Res*. 2010;43(2):79-91.