

有效的脂肪介导的关节软骨细胞基因转移

H Madry and SB Trippe

Orthopaedic Research Laboratories, Department of Orthopaedic Surgery
Harvard Medical School and Massachusetts General Hospital Boston, MA, USA

本文着重探讨了非病毒、脂肪介导的基因转染是否可作为有效的关节软骨细胞转染的潜在工具。lacZ 报告基因通过不同的转染试剂分别转入人正常关节软骨细胞、人关节炎关节软骨细胞、正常的小牛关节软骨细胞，以决定最佳的转染条件。不同的转染试剂包括阳离子脂质体Cellfectin, DMRIE-C, LipofectAm-ine, Lipofectin, LipoTaxi, TransFast以及脂肪介导的FuGENE 6 试剂。最佳条件再进一步用软骨细胞体外移植模型进行评估。转染效率是细胞型特异的，并可受到DNA浓度、脂肪/DNA比例和基质降解酶(hyaluronidase)的影响。X-gal染色分析表明在正常的小牛关节软骨细胞中的效率为41.0%，正常人关节软骨细胞中的效率为20.7%，在人关节炎关节软骨细胞中为7.8%。经转染的软骨细胞可以成功地在体外培养实验中铺满关节软骨面积。经移植的遗传修饰的软骨细胞黏着到关节软骨上并能够在两周内持续产生b-galactosidase。本文阐述的脂肪介导的关节软骨细胞转染实验的评估和优化内容将在以后的关节软骨损坏和基因修复研究中发挥重要作用，并有可能在基因治疗中为基因转入提供更有效的方法。

介绍

受伤的成人关节软骨是不可以治愈的[1]。目前治疗关节软骨损伤的方法有关节持续被动运动、骨膜或骨软骨嫁接、软骨板穿孔和其它细胞水平的策略。这种多样性证实了关节软骨修复仍未彻底解决。关于恢复变性关节疾病中关节软骨损伤的治疗方法则更有限。关节连接处内侧滑液细胞中表达重组基因的可行性为通过基因治疗方法处理关节疾病提供了希望[8-11]。遗传修饰的软骨细胞同样可以增强软骨修复或缓解软骨变性的进程[12]。然而某种程度上由于关节软骨细胞包埋于胞外基质中，很难实现外源基因直接转入软骨细胞[13]。最近的研究结果表明分离的关节软骨细胞可以在体外通过病毒载体进行转染，并可进一步移植到软骨组织[14-17]。非病毒的基因转入系统[18]相对来说可以避免逆转录病毒随机插入而引起的突变、产生腺病毒免疫原性及复制感受态的危险。阳离子脂质体[19]和其它脂肪介导转染系统有着更多的优势：容易操作、安全、对所转染的DNA分子大小没有限制[20,21]。DNA用

量、转染试剂/DNA比例都可以影响最终的转染效率，每一种方法针对不同细胞类型其最佳转染条件也不同[22]。在最优化条件下，一些细胞采用这些方法无论在体内或体外都展示了很高的转染效率，因此已经被应用于人类基因治疗[20,23]。已有非病毒转染系统应用于禽胚胎软骨细胞[24-26]和幼年哺乳动物软骨细胞[27,28]的报道，然而对于在成人关节软骨细胞中的应用还无报道。尤其是对通过脂肪介导的转染方式的可操作性和有效性到目前为止仍无研究。

在本文中我们检测了一个假设的真实性，即脂肪介导的转染系统可以有效转染关节软骨细胞的培养物。我们使用E. coli 的b-galactosidase (lacZ) 基因决定最佳DNA用量和转染试剂/DNA比例，试验中所用的细胞培养物来自于人正常关节软骨细胞、人关节炎关节软骨细胞、正常的小牛关节软骨细胞。此外，也进行补充性处理的尝试以增加转染效率。最终以已转染表达lacZ的软骨细胞来扩增小牛关节软骨器官培养物。

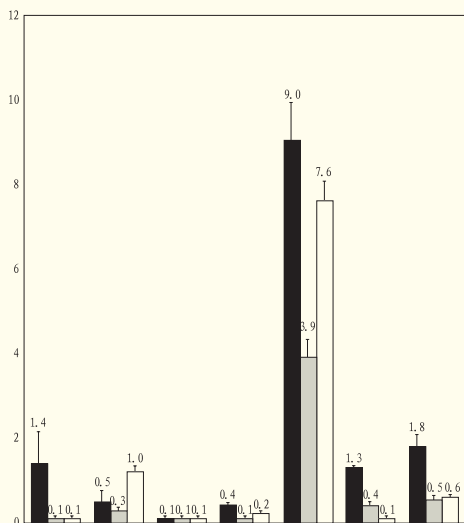


图1: 人正常关节软骨细胞、人关节炎关节软骨细胞、牛关节软骨细胞非病毒转染的最大效率比较。按下列条件优化牛关节软骨细胞的转染条件: DMRIE-C: 0.75 μ g DNA, ratio 4:1; LipofectAmine: 0.75 μ g DNA, ratio 4:1; Cellfectin: 1.0 μ g DNA, ratio 4:1; Lipofectin 0.5 μ g DNA, ratio 6:1; FuGENE 6: 1.0 μ g DNA, ratio 3:1; TransFast: 1 μ g DNA, ratio 3:1; LipoTaxi: 1 μ g DNA, ratio 7:1. 对人正常关节软骨细胞按下列条件优化: DMRIE-C: 0.75 μ g DNA, ratio 4:1; LipofectAmine: 0.75 μ g DNA, ratio 4:1; Cellfectin: 0.5 μ g DNA, ratio 6:1; Lipofectin 0.5 μ g DNA, ratio 6:1; FuGENE 6: 1.0 μ g DNA, ratio 3:1; TransFast: 1 μ g DNA, ratio 3:1; LipoTaxi: 1 μ g DNA, ratio 7:1. 对人关节炎关节软骨细胞按下列条件优化: DMRIE-C: 0.75 μ g DNA, ratio 4:1; LipofectAmine: 0.75 μ g DNA, ratio 4:1; Cellfectin: 0.5 μ g DNA, ratio 6:1; Lipofectin 0.5 μ g DNA, ratio 6:1; FuGENE 6: 1.0 μ g DNA, ratio 2:1; TransFast: 1 μ g DNA, ratio 3:1; LipoTaxi: 1 μ g DNA, ratio 7:1. 所有比例均为 v/w.

结果

转染小牛关节软骨细胞

对于所有测试的转染试剂, 转染效率随脂肪/DNA比例以及DNA用量的不同而改变。在8种转染系统中, FuGENE 6的转染效率最高(图1)。DNA用量对于转染效率的影响是呈双相变化的。随着DNA用量的增加(直至1 μ g), 转染效率也呈剂量依赖地提高。如果剂量增加, 转染效率将随之减小(表1)。基因表达在FuGENE 6/DNA比例为3: 1 (v/w)时达最大。其它转染系统的最高效率同样决定于脂肪/DNA比例以及DNA用量, 但仍然低于FuGENE 6的最大效率-26% (P<0.001)。为了确认FuGENE 6的转染效率是否可以进一步提高, 经FuGENE 6转染的软骨细胞始终由透明质酸酶处理。在转染前及转染过程中使用透明质酸酶处理可以有效提高FuGENE 6的转染效率, 从6.9%提高至41.0% (P<0.0001) (图2)。

转染正常人关节软骨细胞

在所有测试的转染系统中, FuGENE 6转染正常人关节软骨细胞的效率最高(图1)。在使用1 μ g DNA和3: 1 FuGENE 6/DNA(v/w)下, FuGENE 6的转染效率高达9.0%(表1)。其他转染系统的效率明显低于FuGENE 6, 最高者为LipoTaxi, 1.8% (P<0.0001), 最低仅为Cellfectin, 0.1% (P<0.0001)。

Cell type	Lipid/DNA ratio (v/w)	DNA (μ g)	Efficiency (%) \pm s.d.
Bovine articular chondrocytes	2:1	0.2	0.4 \pm 0.2
	2:1	0.5	1.1 \pm 0.1
	2:1	1.0	6.2 \pm 1.0
	2:1	1.25	5.7 \pm 0.2
	3:1	0.2	0.4 \pm 0.1
	3:1	0.5	5.3 \pm 0.5
	3:1	1.0	7.6 \pm 0.5
	3:1	1.25	6.2 \pm 0.3
	3:1	1.5	5.7 \pm 0.6
	4:1	1.0	5.8 \pm 0.6
Normal human articular chondrocytes	2:1	0.5	0.4 \pm 0.4
	2:1	0.75	7.2 \pm 0.4
	2:1	1.0	8.4 \pm 0.6
	2:1	1.25	8.9 \pm 1.1
	2:1	1.5	7.1 \pm 0.1
	3:1	0.5	7.1 \pm 0.4
	3:1	0.75	8.7 \pm 0.5
	3:1	1.0	9.0 \pm 0.9
	3:1	1.25	8.1 \pm 0.2
	3:1	1.5	6.9 \pm 0.8
Osteoarthritic human articular chondrocytes	2:1	0.75	3.3 \pm 0.4
	2:1	1.0	3.9 \pm 0.3
	2:1	1.25	2.3 \pm 0.1
	3:1	0.75	2.8 \pm 0.2
	3:1	1.0	3.1 \pm 0.1
	3:1	1.25	2.3 \pm 0.3

表1: 不同FuGENE 6/DNA比例对人正常关节软骨细胞、人关节炎关节软骨细胞、牛关节软骨细胞转染的效率

用4U/ml透明质酸酶在FuGENE 6转染前和转染中处理正常人关节软骨细胞12小时可以明显提高转染效率, 从9.0 \pm 0.9%提高至20.7 \pm 0.7% (P<0.0001)。另外, 透明质酸酶处理可以增加DMRIE-C的转染效率2.7倍 (P = 0.02)。除透明质酸酶之外, 也尝试使用其他可增加转染效率的物质。Polybrene被认为是促进脂肪/DNA混合物与细胞膜相互作用的一种多价阳离子, 但在透明质酸酶中混入polybrene并不能提高转染效率 (8.5 \pm 0.4%, P>0.05)。

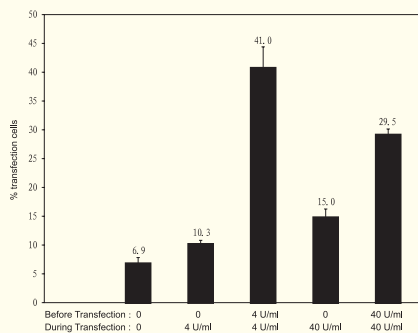


图2: 透明质酸酶处理牛关节软骨细胞对FuGENE 6转染效率的影响。转染条件: 1.0 μ g DNA, FuGENE 6/DNA(v/w)为3: 1。透明质酸酶按设定浓度在转染前12小时加入并一直存在转染过程中或仅在转染过程中加入。

转染人关节炎关节软骨细胞

在人关节炎关节软骨细胞, 比较各类脂肪介导的转染试剂, FuGENE 6的效率最高, 为3.9% (图1)。具体条件是用1 μ gDNA, 脂肪/DNA比例2:1 (v/w) (表1)。正如在正常人关节软骨细胞和小牛关节软骨细胞中一样, 透明质酸酶的应用 (4U/ml, 12小时处理) 同样可以提高FuGENE 6对于人关节炎关节软骨细胞的转染效率, 可高达7.8%, 并且比非处理对照高出2倍 ($P < 0.01$)。同时, polybrene在有透明质酸酶存在或无透明质酸酶存在下, 对于FuGENE 6转染效率的影响有变化, 但无剂量依赖效应 (数据在此未提供)。

转染后的小牛关节软骨细胞移植

小牛关节软骨细胞在最适条件下(脂肪/DNA比例3: 1(v/w), 4U/ml 透明质酸酶存在)由FuGENE 6介导进行转染。转染细胞接着被移植到器官培养的关节软骨细胞板上进行X-gal染色分析。在解剖显微镜下这些培养的软骨板显示X-gal染色多点集中的模式, 分散在整个软骨表面 (图3a)。而在没有lacZ表达载体存在的转染移植对照中, 没有发现X-gal染色信号。当培养软骨板上的细胞密度减至 0.5×10^5 /板时, 软骨表面呈现相同、但强度减弱的染色模式。器官培养物的横切组织学分析显示, 经移植的细

胞形成一层X-gal染色呈阳性和阴性的细胞, 并黏着在关节软骨的表面 (图3b)。Safranin O染色显示经移植的软骨细胞被包埋在富含蛋白多糖的基质当中。lacZ的表达在转染后8天达到最高值, 在14天时开始下降, 21天时X-gal染色完全消失 (数据在此未提供)。

讨论

非病毒脂肪介导的转染试剂对于哺乳动物关节软骨细胞的转染效率一直以来没有系统的评估。目前结果显示在关节软骨细胞初始培养物中有效转入外源基因是可行的, 这些关节软骨细胞初始培养物来自新生儿小牛和正常成年人

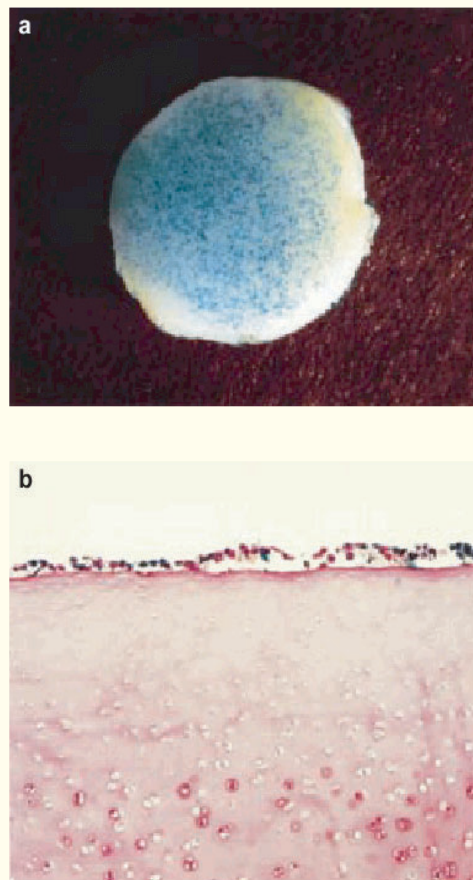


图3: 移植遗传修饰的牛关节软骨细胞的软骨器官培养物。转染条件: pCMVSPORTbGal, FuGENE 6/DNA为3:1 (v/w), 1 μ gDNA, 并以4 U/ml 透明质酸酶在转染前12小时开始处理并持续存在整个转染过程。细胞经胰蛋白酶消化后接种至软骨组织培养物表面。8天后, 样本以X-gal染色。(a) 生长有X-gal阳性细胞的软骨器官培养物表面 (b) 5 μ m的器官培养截面 Safranin O染色表明软骨细胞生长在关节表面, 放大率 $\times 100$ 。X-gal阳性转染软骨细胞为深蓝色。

细胞。结果显示来源于患关节炎的人软骨细胞的转染效率明显降低。此外，结果表明最适转染条件同样可以用于遗传修饰的软骨细胞，这些软骨细胞能够在进行器官培养的小牛关节软骨表面有效生长。

在所有脂肪介导的转染系统中，FuGENE 6的转染效率最高：在小牛关节软骨细胞中为7.6%，正常人关节软骨细胞中为9.0%，患关节炎的关节软骨细胞中为3.7%。在有补充物处理之下，小牛关节软骨细胞的转染效率可增加至41.0%，正常人关节软骨细胞增加至20.7%，患关节炎的关节软骨细胞中可增至7.8%。如此高的转染效率足以满足分子生物学实验的要求。虽然在关节炎软骨细胞中的效率相对较低，但也足以引发相关的生物学反应并可能进一步用于基因治疗。在动脉壁细胞研究中，含有成纤维细胞生长因子-1或血小板来源生长因子B的表达载体只需转染0.1-1%的细胞便足以在体内产生生物效应[30,31]。

通过优化脂肪对于DNA的摩尔电荷比和DNA用量可以明显改善转染的效率[22]。因为细胞膜带负电，为了最佳作用效果，脂肪/DNA复合物的静电荷必须为正电[32]。对于非脂质体模式的FuGENE 6来说，转染小牛和正常人关节软骨细胞的最佳脂肪/DNA比例为3: 1，转染关节炎患者的软骨细胞最佳比例为2: 1。

以往的试验结果表明脂质体模式基因转染效率在不同细胞类型中相差可达100倍[19]。到目前为止，脂肪介导的软骨细胞转染只在鸡胚胎软骨细胞 [25,26] 和兔原生关节软骨细胞 [28] 中有所报道。譬如，应用阳离子脂质体Lipofectin[25]或Lipofect- Amine[26]转染肥大的和非肥大的鸡胚胎软骨细胞来检测不同的启动子功能。但这些技术是否适用于成人软骨细胞仍是一个未知数，因为这些细胞很难转染[27]。我们发现对于禽胚胎软

骨细胞有效的脂质体类型对于新生的以及成年哺乳动物软骨细胞并不适用。综上所述，对于不同物种、不同发育阶段的软骨细胞，其最适转染方式都是非常特异的。

数据显示新生小牛关节软骨细胞的转染效率高于成年人关节软骨细胞，这可能是由细胞扩增速率的差异而产生的。其他细胞类型的研究表明最适宜的脂质体转染条件需要处于有丝分裂状态[33,34]。其他因素包括细胞特异内质体和溶酶体活性的差异、外源DNA的核转运能力以及在细胞核中的稳定性，这些都可以影响最终的转染效率[35]。转染效率也会受到外源DNA和转染细胞接触时间的影响，而且通过进一步改善脂肪/DNA复合物和细胞的接触时间来优化转染效率。

为了改善软骨细胞的转染效率，我们对其它几个因子也进行了评估。透明质酸酶曾被用来增加Lipofectin[25]和DOTAP[24] (N-[1-(2,3-Dioloxo)propyl]-N,N,N-trimethylammonium-methylsulfate)鸡胚胎软骨细胞的转染效率，在有磷酸钙存在的情况下，透明质酸酶也可以有效提高人青少年时期的肋骨软骨细胞[27]以及1-2月龄的兔关节软骨细胞[28]的转染效率。透明质酸酶通过部分降解细胞外围基质从而改善脂肪/DNA复合物和细胞膜之间的相互作用。目前的研究结果表明透明质酸酶可以显著提高本文采用的三类软骨细胞。将透明质酸酶和小牛关节软骨细胞混合24小时可以增加转染效率5.9倍，而对关节炎患者的关节软骨细胞的改变仅为2倍，这可能是由两种细胞外基质的差异而导致的。此外我们也检测了一种多价阳离子polybrene对转染效率的影响[29]。有趣的是polybrene的存在可以抵消透明质酸酶对于人关节软骨细胞转染的改善。用polybrene单独处理或和透明质酸酶混合处理关节炎患者的软骨细胞后，其对转染效率的影响并不稳定。

利用关节软骨细胞转染的研究来培养表达治疗基因的软骨细胞来重新生长关节软骨。这种应用需要被转染的软骨细胞紧密结合到关节软骨，并能在规定时间内持续表达被转染的基因。结果表明被转染的软骨细胞能够有效地结合到关节表面，产生细胞外基质并可在移植后持续表达转化基因至少2周时间。如此久的表达时间足可与腺病毒转染关节炎软骨细胞的效果相媲美，通过腺病毒转染关节炎软骨细胞后lacZ的表达可在细胞中维持8天[14]而在器官培养物中的表达可持续长达27天[17]。

综上所述。我们的实验结果表明脂肪介导的转染方式足以最大程度地实现关节软骨细胞的基因转化，甚至是成年人的关节软骨细胞。数据进一步显示这个方法可以用来辅助软骨细胞移植研究中的基因转化。还有待更多的研究来决定一个最适的体内条件以进一步完善这个脂肪介导的转染途径。

材料和方法

材料

试剂除特殊注明外，均来自于GIBCO Life Technologies (Grand Island, NY, USA)公司。DMRIE-C 是由阳离子脂肪 1,2-dimyristyloxypropyl-3-dimethyl-hydroxyethylammonium bromide (DMRIE)和胆固醇按1:1摩尔比组成的脂质体转染试剂。LipofectAmine是由多价阳离子脂肪 2,3-dioleoyloxy-N-[2(spermincarboxamido)ethyl]-N, N-dimethyl-1-propanaminiumtrifluoroacetate和中性脂肪dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) 按3:1重量比组成的脂质体转染试剂。Cellfectin是由阳离子脂肪N, NI, NII, NIII-tetramethyl-N, NI, NII, NIII-tetrapalmitylspermine和 DOPE按1:1.5摩尔比组成的脂质体转染试剂。Lipofectin是由阳离子脂肪N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-n, n, n-trimethylammonium

chloride和DOPE按1:1重量比组成的脂质体转染试剂。而FuGENE 6 (Roche)则是一种非脂质体模式的脂肪混合物。TransFast(Promega, Madison, WI, USA)是由阳离子脂肪化合物N, N[bis(2-hydroxyethyl)-N-methyl-N-[2,3-di(tetradecanoxy)propyl] ammonium iodide 和DOPE共同组成的阳离子脂质体转染试剂。LipoTaxi (Stratagene, La Jolla, CA, USA) 同样也是一种阳离子脂质体。此外，I类胶原酶来自于Worthington Biochemical (Lakewood, NJ, USA) (活性单位350-400 U/mg)，小牛睾丸透明质酸酶和polybrene均来自 Sigma (St Louis, MO, USA)。塑料器皿和耗材来自Falcon (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA)。

细胞培养

正常人的关节软骨来自肿瘤手术中切除的膝盖或髋关节，关节炎患者的关节软骨来自于膝关节整形处理的骨关节，小牛关节软骨则来自于1-2周大的小牛犊的桡腕关节[36]。对于人的软骨，需要将骨化区去除干净。而对于小牛软骨，下层血管化的软骨部分也需清除干净。搜集的软骨组织经漂洗后切成大小约2 X 2 mm的小块，并转入含有100 U/ml penicillin G、100 U/ml streptomycin (基本培养基)和透明质酸酶的DMEM溶液中，实验材料在37°C下于含有5% CO₂的饱和蒸气环境下温育16小时。从组织上剥离下来的软骨细胞经过125μm滤膜过滤以除去未裂解的组织基质。小牛软骨细胞经0.08-0.09%的胶原酶裂解，人软骨细胞由0.2%的胶原酶裂解。细胞数目通过血细胞计数器计量。苔盼蓝染色显示细胞生长活性均超过90%。分离的软骨细胞单层铺于含有10%小牛胎儿血清基本培养基的24孔细胞板上，每孔细胞密度约6X10⁴。转染实验所用细胞均为培养1-2天后细胞密度达到60-70%的原代培养细胞。

质粒DNA和转染流程

实验所用真核表达载体 pCMVSPORT含有细胞巨化病毒极早期启动子和增强子引导的E. coli lacZ基因, 表达载体在DH5 α 感受态细胞中扩增。按Qiagen Endofree Plasmid Maxi Kit说明书操作获得超纯的不含内毒的质粒DNA[37]。软骨细胞单层培养物在Opti-MEM或DMEM(FuGENE 6, Effectene)溶液中漂洗。在转染过程中, 脂质体/DNA以及非脂质体脂肪/DNA复合物在无菌的聚丙烯管中按照说明书制备, 然后加入到软骨细胞。细胞37 $^{\circ}$ C中温育培养, 不同试剂的温育时间不同, FuGENE 6和Trans-Fast温育4小时, LipoTaxi温育6个小时, DMRIE-C、LipofectAmine、Lipofectin和Cellfectin温育9-10个小时, 之后经DMEM漂洗并在生长培养基中继续温育48小时。为了最大优化DNA剂量和转染试剂/DNA比例对于转染效率的影响, 总DNA使用剂量从0.2克到1.5克, 转染试剂/DNA比例(v/w)在2:1至14:1范围内变化。小牛睾丸透明质酸酶(0、4或40 U/ml)和polybrene(0、5、8或15 g/ml)在特定时间点添加。

软骨组织培养和细胞移植

关节软骨细胞培养物来自1-2周大的小牛犊的桡腕关节。关节板样品(直径7 mm)分别在含有2%小牛胎儿血清基本培养基的6孔培养板上培养。2-5天后经转染的软骨细胞按照修改过的方法进行移植[38]。分离的小牛关节软骨细胞通过FuGENE 6进行转染, 接下来转染细胞要经历24小时温育、胰蛋白酶处理、在 5×10^3 细胞/升的生长培养基中漂洗和再悬浮。转染后的软骨细胞以 1×10^5 的密度转移到直径6-mm生长板的表面。鉴于最初试验表明移植细胞层仅仅松散地附着在软骨表面, 因此软骨板在移植之前在2.5%胰蛋白酶中37 $^{\circ}$ C预处理1小时, 接着用PBS缓冲液漂洗两次以改善细胞与软骨之间的连接。培养物培养21天并分别在转染后的第2天、第8天、第14天和第21天进行分析。

X-gal染色和组织学分析

转染效率通过X-gal染色和组织学分析在48小时内的按标准间隔时间段进行检测。转染的软骨细胞经固定后于37 $^{\circ}$ C染色6小时检测 β -galactosidase酶活性(in-situ-galactosidase Staining Kit, Stratagene)。X-gal染色阳性细胞数目用显微镜在24孔板上依次以 0.77 mm^2 为计数单位进行统计。当转染效率非常低时(<1.0%), 培养板上所有被染色细胞都在统计之列。每孔的细胞数目是基于所有被观察的细胞(包括被染色的和未被染色的), 最终选取24孔板上3-4个有代表性板孔中10-20个上述 0.77 mm^2 计数单位的平均结果(每板孔的总细胞数)。最终转染效率由阳性细胞占总细胞的比例而定。经转染移植的软骨细胞形成的软骨器官培养物在10%福尔马林中固定后包埋在paraffin中。5 μ m厚的组织切片经由Safranin O染色然后在光学显微镜下统计X-gal染色阳性细胞的分布。

统计学分析

所有数据以均值 \pm 单个实验标准方差的形式表示。每个实验条件均重复四次。小牛关节软骨细胞转染的最优条件根据实验方法的不同重复2-4次。而正常人关节软骨细胞转染的最优条件要重复5次, 关节炎患者软骨细胞则需要重复8次。为了决定不同试验组的差异, 进行了t检验。小于0.05的P值则被认为差异显著。

致谢

感谢T Fondren, H Mankin和D Burke提供人关节软骨细胞样品, C Trahan协助样品的组织学处理, 以及L Weissbah和M Cucchiari对于本文有益的讨论。感谢German Academy for Natural Scientists LEOPOLDINA and NIH grants AR31068 and AR45749-01对于本文工作的大力支持。

Reference 参考文献

详见Gene Therapy (2000),286-291