

灭活 CVB1 在离体骨骼肌细胞中基因转移的研究

陈国俊, 汪学文, 张成, 刘焯霖, 陈元, 方丹云

(中山医科大学附属第一医院神经科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】研究灭活后的柯萨奇病毒 B1 在原代培养骨骼肌细胞中对报道基因 pCDNA3-LacZ 转移效率的影响。【方法】①用聚乙二醇沉淀和蔗糖低温超速离心法提纯并用 β -丙内酯灭活病毒; ②分别用不同浓度的转铁蛋白聚赖氨酸(TfpL)+LacZ、灭活 CVB1+LacZ 以及灭活 CVB1+TfpL+LacZ 在肌肉细胞进行基因转移, 以报告基因产物 β -半乳糖苷酶染色阳性的细胞数作为基因转移效率指标。【结果】灭活 CVB1+TfpL+LacZ 在肌肉细胞中使基因转移效率由 TfpL+LacZ 组的不到 1% 提高到 15%~20%。【结论】灭活 CVB1 也能象腺病毒一样促进基因转移, CVB1 的嗜肌肉特性为在肌肉组织中研究靶向明确的新载体提供了实验依据。

关键词: 柯萨奇病毒 B 组; 肌; 骨骼; 基因转移

中图分类号: R375 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)04S0-0022-03

Gene Transfer Efficiency Enhancement by Inactivated Coxsackie B1 Virus in Skeletal Muscle Cells in Vitro

CHEN Guo-jun, WANG Xue-wen, ZHANG Cheng, LIU Zhuo-lin, CHEN Yuan, FANG Dan-yun

(Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To study the effect of inactivated Coxsackie virus B1, which was considered to have high affinity to skeletal muscle cells, on gene transfer efficiency of reporter gene, pCDNA3-LacZ, in primary muscle cells. 【Methods】① Virus was purified by polyethylene sedimentation followed by sucrose supercentrifugation, ② Transferrin-polylysine (TfpL)+LacZ, inactivated CVB1+LacZ and inactivated CVB1+TfpL+LacZ were designed in different concentrations for the use of gene transfer, then, positive cells contained β -galactosidase were calculated as gene transfer efficiency. 【Results】Inactivated CVB1 enhanced gene transfer efficiency from less than 1% in TfpL+LacZ group to 15%~20% per cent in CVB1+TfpL+LacZ group. 【Conclusions】Like adenovirus, inactivated CVB1 can also increase gene transfer efficiency in muscle cells, which provides experimental basis for constructing new vector targeting to muscle cells.

Key words: Coxsackie virus B groups; muscle, skeletal; gene transfer

在肌肉细胞的基因转移中, 目前最常用的是腺病毒(adenovirus, AV)载体。AV 降解溶酶体的特性, 还促进了在 HeLa 细胞中转铁蛋白(transferrin, Tf)-聚赖氨酸(polylysine, pL)介导的报道基因转移, 效率比 TfpL-DNA 复合物提高了 1 000 倍。更有意义的是, 在肌细胞中采用该法将灭活 AV 携带

报道基因获得成功, 并且宿主的排异反应大为降低, 报道基因表达时间延长而基因转移效率并没有明显降低^[1]。但 AV 载体靶细胞范围广泛也正意味着对肌细胞的特异性不高。柯萨奇 B1 病毒(Coxsackie virus B1, CVB1)是一种小而无囊膜的单链正股 RNA 病毒, 直径为 28 nm, 现已将 CVB1 用

收稿日期: 2000-04-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39800045); 广东省自然科学基金博士启动基金资助项目(994041)

作者简介: 陈国俊(1964-), 男, 江苏扬州人, 博士, 讲师, 主要研究肌营养不良症基因转移; 汪学文, 深圳南山区人民医院; 陈元, 方丹云,

来制备稳定的实验性肌炎模型。已经证明 CVB1 具有嗜肌肉特性并认为与病毒的外壳蛋白有关^[2]。目前尚不能将 CVB1 制成疫苗,为此,我们将灭活 CVB1、TfpL 和报道基因 pCDNA3-LacZ 设计成不同浓度和不同组合,在原代培养骨骼肌细胞中进行了基因转移研究,希望在靶向于肌肉细胞的基因治疗中探索一种新思路。

1 材料与方法

1.1 CVB1 病毒

购自预防医学科学院毒种室。质粒:pCDNA3-LacZ 长约 8 kb,由 CMV 启动子驱动,本室保存。TfpL 为 Sigma 公司产品。

1.2 CVB1 提纯和灭活

参照 Novotny 和 Mapoles^[3] 报道的方法加以修改。简言之,聚乙二醇沉淀法将病毒悬液初步浓缩;在 10%~50%蔗糖梯度中上样,低温超速离心;电镜观察并做病毒活性测定; β -丙内酯(β -propiolactone, BPL)20 mL/L 浓度灭活,测定残存毒力^[4]。

1.3 原代骨骼肌细胞培养

取 1~3 d 新生 SD 大鼠,断头处死,消毒并取前后肢,去皮去骨并剪碎,胰酶消化 30~60 min,50 μ m 不锈钢网过滤,常温下 1 000 r/min 离心 10 min。无血清混合培养基重悬,计数并接种于 6 孔板内,每孔 10^5 个细胞。前 3 d 每天换液(F-10;DMEM 高糖培养基=50:50,100 mL/L 小牛血清),3 d 后隔天换液。

1.4 基因转移试验

①肌细胞培养至第 3 天时,细胞约 50%~80%融合,试验前吸去培养基,用无血清培养基洗 1 次;②I 液为 pCDNA3 分别按 3、6、15 和 50 μ g 溶于 20 mmol/L HEPES(含有 150 mmol/L NaCl)100 μ L 中;II 液为 TfpL 分别按 10、20 和 30 μ g 溶于 20 mmol/L HEPES(含有 150 mmol/L NaCl)100 μ L 中。实验之前取溶液 II 缓慢逐滴加入溶液 I 中,总量达 200 μ L,室温静置 30 min。③将上述液体加入 6 孔板内的细胞中,然后加 800 μ L 无血清混合培养基,随后各加入 6、10 和 20 μ L 的灭活 CVB1 液(6.4×10^{15} 病毒颗粒/L),对照组加入同体积的病毒贮存液。37 $^{\circ}$ C 继续培养 4~6 h,取出后加入 12.5%的混合培养基 4 mL,继续培养 20 h。

④换液继续培养 24 h。

1.5 X-gal 染色和阳性细胞计数

X-gal 染色参照 Trivedi^[5] 的方法。阳性细胞计数:每个显微镜视野计取每 1 000 个细胞中 X-gal 染色阳性的肌细胞数。

2 结果

2.1 各种浓度的质粒和 TfpL 对转染效率的影响

经酚-氯仿提取后的质粒能满足一般的基因转移需要。本实验中 15 μ g DNA 与 10 μ g TfpL 组合时出现了 1%~2%的阳性细胞(其它浓度的组合则未显示出阳性细胞)。即 DNA 与 TfpL 之比为 3:2(图 1)。由图可见,被染蓝的部分位于细胞浆内,细胞形态保持良好(箭头所指,下同)。

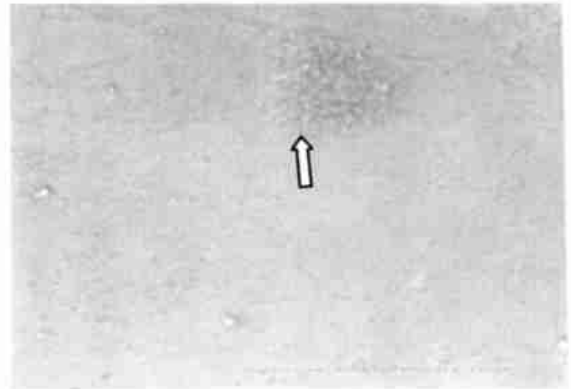


图 1 TfpL 组出现 1%~2%的阳性细胞

Fig. 1 1%~2% positive cells in TfpL group
X-gal staining($\times 40$)

2.2 CVB1 与 TfpL 协同作用

10 μ L CVB1 (6.4×10^{10} 病毒颗粒) + 15 μ g DNA 产生了 5%左右的阳性细胞(图 2)。当 15 μ g

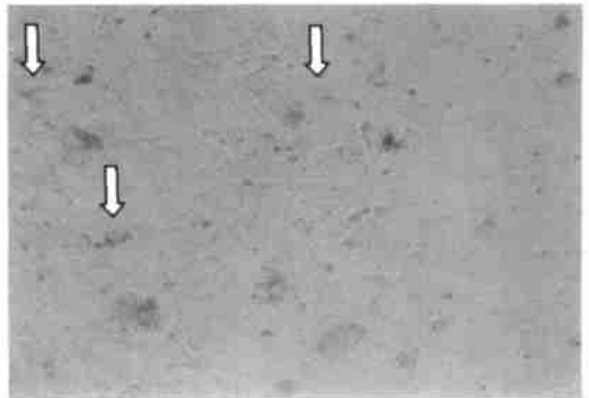


图 2 CVB1 组出现 5%的阳性细胞

Fig. 2 5% positive cells in TfpL group
X-gal staining($\times 10$)

DNA、10 μ g TfpL 与 10 μ L CVB1 一起加进骨骼肌细胞时, 被染蓝的细胞数增加到 15% ~ 20% (图 3)。CVB1 促进了 TfpL 在肌细胞中受体介导的基因转移。质粒 DNA、TfpL 与 CVB1 的不同组合对基因转移效率的影响见表 1。

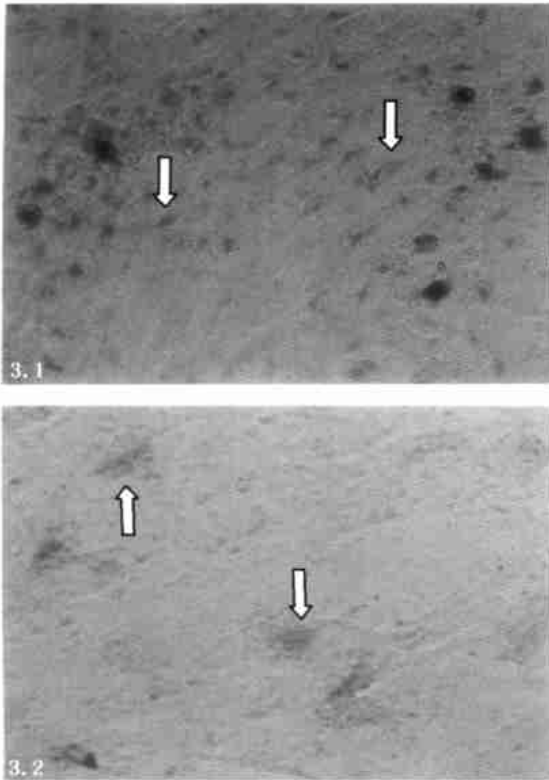


图 3 CVB1 + TfpL 组阳性细胞增至 15% ~ 20%

Fig. 3 Positive cells increased to 15% ~ 20% in CVB1 + TfpL group

3.1 X-gal staining ($\times 10$), 3.2 X-gal staining ($\times 40$)

表 1 质粒 DNA、TfpL 与 CVB1 不同组合的基因转移效率

Table 1 Gene transfer efficiency of different combinations of DNA, TfpL and CVB1

Different combinations	Percentage of positive cells
pCDNA3lacZ + TfpL	1% ~ 2%
pCDNA3lacZ + CVB1	5%
pCDNA3lacZ + TfpL + CVB1	15% ~ 20%

3 讨论

实验中, 单纯质粒 DNA 用至 50 μ g 都未获得阳性结果, TfpL 组的转移效率仅为 1% 左右。可能

与肌细胞肌膜屏障有关, 但确切原因还不清楚。CVB1 组获得了 5% 的阳性细胞, 说明 CVB1 具有促进基因转移的作用, 已经证明, CVB1 感染在 HEP-2 细胞中能增加细胞通透性, 促进细菌入侵。灭活 CVB1 与 TfpL 共同作用, 使转移效率增加到 15% ~ 20%, 推测 CVB1 使肌细胞对 DNA 摄取增加, 或可能降低了溶酶体对外源物质破坏的能力。

实验说明, 灭活 CVB1 也能象灭活 AV 一样促进基因转移, 用灭活 CVB1 构建的载体, 体积小于 AV 复合物, 有可能在越过细胞的分子屏障中发挥优于 AV 的作用。灭活 CVB1 同时避免了因活病毒复制所引起的免疫损伤, 由此构建的 CVB1-pL-DNA 复合物同时具有靶向明确和促进基因转移的特点, 简单操作, 提高效率。实验的意义还在于, 用组织特异性灭活病毒作载体, 将作为一种新思路, 不仅为肌肉病, 而且还为其它组织疾病的基因治疗如灭活肝炎病毒治疗肝癌, 灭活脑炎病毒治疗脑组织退行性疾病提供了一种靶向明确的高效的基因转移方法。

参考文献:

- [1] Petrof B J, Lochmuller H, Massie B, *et al*. Impairment of force generation after adenovirus-mediated gene transfer to muscle is alleviated by adenoviral gene inactivation and host CD8⁺ T cell deficiency [J]. *Hum Gene Ther*, 1996, 7(15): 1913.
- [2] Tam P E, Schmidt A M, Ytterberg S R, *et al*. Duration of virus persistence and its relationship to inflammation in the chronic phase of Coxsackie virus B1-induced murine polymyositis [J]. *J Lab Clin Med* 1994, 123(3): 346.
- [3] Novotny J, Avobodva J, Ransnas L A, *et al*. A method for the preparation of purified antigens of Coxsackie B3 virus from a large volume of cell culture supernatant [J]. *Acta Virol*, 1992, 36(4): 483.
- [4] 姜述德, Pye D. β -丙内酯灭活脊髓灰质炎病毒 [J]. *中华微生物学与免疫学杂志*, 1985, 5(2): 92.
- [5] Trivedi R A, Dickson G. Liposome-mediated gene transfer into normal and dystrophin-deficient mouse myoblast [J]. *J Neurochem*, 1995, 64(5): 2230.

(编辑 刘清海)