

# 重组慢病毒对不同哺乳动物细胞基因转移及表达效率的研究

张雅丽,程 通,蔡毅君,张 涛,魏丽华,  
杨炳春,郑 舟,张 军,夏宁邵\*

(厦门大学 生命科学学院,国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心,福建 厦门 361005)

**摘要:**慢病毒是一种具有独特优点和巨大应用潜力的哺乳动物细胞基因转移载体,我们对慢病毒载体对不同哺乳动物细胞的基因转移及表达效率进行了平行比较研究.应用第三代重组慢病毒系统构建了携带 CMV 启动子-EGFP 报告基因表达元件的重组慢病毒 Lenti-EGFP,分别对多种不同哺乳动物细胞进行转导实验,在转导 48 h 后应用流式细胞仪检测报告基因在不同细胞株中的转移及表达效率.我们共使用了 29 种哺乳动物细胞株,包括 14 种人类组织细胞,5 种猴组织细胞,9 种鼠组织细胞,1 种兔组织细胞.结果显示,重组慢病毒具有良好的基因转移能力,可有效进入多数哺乳动物细胞,对不同种属来源的细胞没有表现出特别的偏嗜性,但对贴壁培养细胞的基因转移效率明显高于对悬浮培养细胞.本研究为重组慢病毒系统的合理使用提供了基础.

**关键词:**慢病毒;绿色荧光蛋白;哺乳动物细胞

**中图分类号:**R 373

**文献标识码:**A

**文章编号:**0438-0479(2008)03-0392-05

对哺乳动物细胞进行基因转移是基因功能及基因治疗研究中的重要环节.重组慢病毒是近年逐步发展起来的新型基因转移载体,相比其它常用的病毒载体如逆转录病毒、痘病毒等具有较独特的优点,如可有效感染非分裂期细胞、具稳定整合能力、细胞毒性低、免疫反应小等<sup>[1]</sup>.慢病毒载体目前已发展至第三代,在系统稳定性和安全性等方面获得了很大提高,显示出巨大的应用潜力<sup>[2-3]</sup>.研究已显示,逆转录病毒<sup>[4]</sup>、痘病毒<sup>[5]</sup>、杆状病毒<sup>[6]</sup>等病毒载体在易感细胞范围和表达特点都有其各自的特点和局限,可根据实验目的选择合适的载体.而目前在较大范围内平行比较慢病毒载体对不同哺乳动物细胞株的基因转移及表达效率的研究较为少见.本研究即以增强型绿色荧光蛋白(EGFP)为报告基因,应用第三代重组慢病毒系统构建了携带 EGFP 表达元件的重组慢病毒,应用离心转导方法比较了重组慢病毒载体对 29 种不同类型和组织来源的哺乳动物细胞株的基因转移及表达效率,为重组慢病毒系统的合理使用提供理论和试验基础.

## 1 材料和方法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 细胞株、病毒、质粒及单克隆抗体

CV-1、293、143B、Hep G2、PLC/PRF/5、293FT、JC、L-929、P815、TIB75、Huh-7 购自 ATCC;Hela、CHO、NIH3T3、Raji、BHK21、A-549、PA317、Vero-E6、LCL-cm、MOL T4、293 T、Hep3B、MT4、H9、COS-1、Bsc-1、SHM-D33 细胞株由本实验室保存.293FT 细胞、慢病毒包装质粒、pVSVG 质粒购自 Invitrogen 公司,带有 CMV 启动子引导的 EGFP 报告基因表达元件的慢病毒转移载体 pLL3.7 由韩家淮教授赠予.

#### 1.1.2 试 剂

脂质体 LipofectAMINE2000 和 DMEM、RPMI1640、MEM 培养基购自 Invitrogen 公司.细胞培养用胎牛血清(FBS)购自 HyClone 公司.其它试剂均为进口或国产分析纯试剂.

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 重组慢病毒的生产

293FT 细胞以 70% 的汇合率铺于 9 cm 细胞培养平皿中,6 h 后用脂质体将 18 μg 慢病毒包装质粒和 6 μg 慢病毒转移质粒混合转染,转染 12 h 后更换为完全培养基,72 h 后收集细胞培养上清.收集的细胞培养上清在 4 25 000 r/min 离心 90 min (Beckman 超

收稿日期:2007-10-29

基金项目:教育部科学技术研究重大项目培育基金(705031),福建省自然科学基金(C0710041),厦门市病毒性疾病预防新药研发平台建设基金(3502Z20041008)资助

\*通讯作者:nsxia@xmu.edu.cn

速离心机,sw-28 转头),弃上清,每管加入 200  $\mu\text{L}$  无血清 DMEM 培养基,4 过夜,振荡 1 min,收集上清。

### 1.2.2 重组慢病毒效价的鉴定

浓缩后的重组慢病毒用 293FT 细胞鉴定其效价,将 293FT 细胞铺于 24 孔细胞培养板 ( $5 \times 10^4$  个/well),6 h 后分别加入 100  $\mu\text{L}$  经 10 倍梯度系列稀释后的待测病毒液。培养 48 h 后用流式细胞仪(Beckman Coulter EPICS XL)检测孔中表达 EGFP 的细胞阳性率,计算重组病毒效价,计算公式为: TU/mL (Transducing unit/mL) =  $(F * Ci/V) * D$ 。F 是流式细胞仪测得的 EGFP 阳性率, Ci 是转导时细胞总数, V 是慢病毒液的体积 (mL), D 为稀释倍数 (稀释倍数取转导曲线线性范围内的数值)。

### 1.2.3 重组慢病毒对哺乳动物细胞的转导实验

将待转导的哺乳动物细胞铺于 24 孔细胞培养板中,每孔细胞数约为  $2 \times 10^5$  个,37 培养 10 h。加入 Polybrene 至终浓度为 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,加入一定量的慢病毒,室温下 600 g 离心 60 min,12 h 后换液。培养 48 h 后进行检测实验。

### 1.2.4 绿色荧光的观察

细胞样品置于 Nikon TE2000 倒置荧光显微镜下采用蓝光激发观察,用 Nikon DXM1200F CCD 采集荧光图像。

### 1.2.5 流式细胞仪检测基因转移效率及阳性细胞平均荧光强度

待检测的细胞经胰酶消化并吹散为单细胞悬液,1 500 r/min 离心 5 min,用含 5% 胎牛血清的 PBS 重新悬浮。细胞悬浮液经 200 目的尼龙网过滤后使用流式细胞仪检测,激发波长为 488 nm,检测波长为 525 nm,用 EXPO32 软件对采集的数据进行分析。每个细胞样品收集大约  $2 \times 10^3$  个细胞,以未加病毒处理的细

胞作为阴性对照,设定 eGFP 阳性细胞区(B 区),使阴性对照样品在 B 区中的细胞数不超过 2%。基因转移效率为样品在 B 区中的细胞数量百分率减去阴性对照样品在 B 区中的数量百分率;阳性细胞平均荧光强度为样品在 B 区中细胞荧光强度的平均值。

## 2 结果

### 2.1 重组慢病毒 Lenti-EGFP 的构建及鉴定

将带有 CMV 启动子引导的 EGFP 报告基因表达元件的慢病毒转移载体 pLL3.7 与慢病毒包装质粒通过脂质体方法共转染 293FT 细胞获得重组慢病毒 Lenti-EGFP。经浓缩的重组慢病毒用 293FT 细胞鉴定其效价,将 293FT 细胞铺于 24 孔细胞培养板 ( $5 \times 10^4$  /well),6 h 后分别加入 100  $\mu\text{L}$  经 10 倍梯度系列稀释后的待测病毒。培养 48 h 后用流式细胞仪(Beckman Coulter EPICS XL)检测孔中表达 EGFP 的细胞数量,测定得重组病毒的滴度  $8 \times 10^6$  (TU/mL)。结果显示,重组慢病毒 Lenti-EGFP 可有效转导 (MOI = 1) 293FT 细胞并高效表达 EGFP (图 1)。

### 2.2 重组慢病毒对不同哺乳动物细胞的基因转移及表达效率的比较

本研究共使用了 293、Hep G2、PLC/PRF/5、CV1、MT4、143B、CHO、Hela、BHK21、JC、NIH3T3 等 29 种哺乳动物细胞株,分别包括 14 种人类组织细胞,5 种猴组织细胞,9 种鼠组织细胞,1 种兔组织细胞。重组慢病毒 Lenti-EGFP 以 MOI = 1 分别对哺乳动物细胞进行离心转导实验,12 h 后换液,继续培养 48 h 后用流式细胞仪检测报告基因的转移效率和阳性细胞平均荧光强度。结果如表 1 所示,重组慢病毒在多数不同来源的哺乳动物细胞中可有效介导报告基因的表达,其中对 293、Hela、COS-1、TIB75 等细胞显示

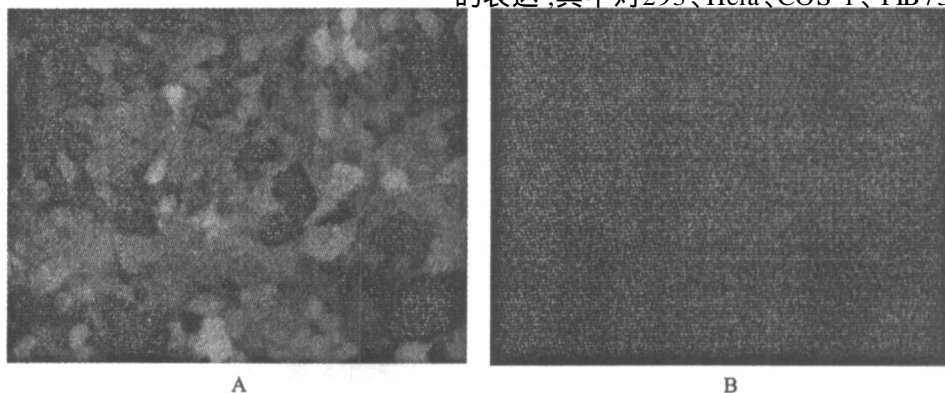


图 1 重组慢病毒 Lenti-EGFP 可有效地将 EGFP 基因导入 293FT 细胞中进行表达

Fig. 1 EGFP gene can be effectively transduced and expressed in 293FT cells with recombinant lentivirus Lenti-EGFP

A. 293FT cells transduced with Lenti-EGFP; B. 293FT cells control

表 1 重组慢病毒 Lenti-EGFP 对不同哺乳动物细胞的基因转移效率及表达效率的比较

Tab. 1 Comparison of the gene-transfer and expression efficiencies in different mammalian cell lines transduced with Lenti-EGFP

细胞株	组织来源	培养特征	转导效率*		平均荧光强度*	
			0	20 40 60 80 100	50	150 250 350
人						
293	肾脏	粘附	~95	~300		
A-549	肺癌	粘附	~95	~50		
Hela	宫颈癌	粘附	~95	~180		
PLC/ PRF/ 5	肝癌	粘附	~95	~160		
293 T	肾脏	粘附	~95	~140		
Hep3B	肝癌	粘附	~95	~50		
Huh-7	肝癌	粘附	~95	~160		
Hep G2	肝癌	粘附	~95	~50		
293FT	肾脏	粘附	~95	~50		
143B	骨肉瘤	粘附	~95	~50		
MT4	T 淋巴母细胞	悬浮	~70	~50		
H9	淋巴瘤	悬浮	~45	~50		
MOL T4	T 淋巴细胞	悬浮	~45	~50		
Raji	Burkitt 淋巴瘤	悬浮	~35	~50		
Lcl-cm	淋巴瘤	悬浮	~20	~50		
猴						
CV-1	肾脏	粘附	~95	~50		
COS-1	肾脏	粘附	~95	~50		
Vero-E6	肾脏	粘附	~95	~50		
Bsc-1	肾脏	粘附	~95	~50		
啮齿类						
TIB75	肝脏	粘附	~95	~300		
JC	乳腺癌	粘附	~95	~50		
CHO	卵巢	粘附	~95	~50		
NIH3T3	胚胎成纤维	粘附	~95	~50		
BHK21	肾脏	粘附	~95	~50		
PA317	胚胎成纤维	粘附	~95	~50		
C127	乳腺	粘附	~95	~50		
SHM-D33	骨髓瘤	悬浮	~95	~50		
P815	肥大细胞	悬浮	~95	~50		
兔						
R K13	肾脏	粘附	~95	~50		

\*: 结果为 3 次实验的平均值.

出较为理想的转导效果.

### 2.3 重组慢病毒对不同种属来源及培养特征细胞的基因转移效率比较

本实验所使用的细胞分属于灵长类及啮齿类,我们将重组慢病毒对这两类细胞中的悬浮细胞系与贴壁细胞系的基因转移效率进行了归纳比较,结果如表 2 所示.从结果可看出,在灵长类动物的细胞中重组慢病

毒对贴壁细胞的基因转移效率均要显著高于对悬浮细胞系的基因转移效率 ( $t = 2.1098, p < 0.05$ ),在啮齿类细胞中只有 2 种悬浮细胞系,其基因转移效率也明显低于同种属的贴壁细胞系.此外从比较结果还可看出,在不同种属间,重组慢病毒对灵长类与啮齿类贴壁培养细胞系的基因转移效率无显著差异 ( $t = 1.8595, p > 0.05$ ),对灵长类和啮齿类悬浮培养细胞系的基因

表 2 重组慢病毒对不同种属悬浮培养细胞与贴壁培养细胞基因转移效率的比较

Tab.2 Comparison of the transduction efficiencies in adherent and suspend culture cells of different organisms transduced with Lenti-EGFP

		贴壁培养细胞数	悬浮培养细胞数
灵长类	细胞株数	14	5
	平均基因转移效率	(83.91 ±9.13) %	(34.93 ±13.65) %
啮齿类	细胞株数	7	2
	平均基因转移效率	(78.74 ±13.47) %	(23.78 ±3.58) %

转移效率的差别也不明显。

### 3 讨论

慢病毒载体是一类新型的基因转移载体,相比其它基因转移方法具有较为独特的优点,在基因功能及基因治疗研究中的应用日益广泛,显示出良好的应用前景<sup>[7-9]</sup>。然而目前仍缺乏对慢病毒载体对不同哺乳动物细胞株的基因转移效率进行平行定量比较的研究报告。为在研究中更好地使用慢病毒载体,了解其对不同类型细胞的基因导入能力是必要的。

本研究使用目前应用最多的第三代重组慢病毒系统构建了携带 CMV-EGFP 报告基因表达元件的重组慢病毒 Lenti-EGFP,通过离心转导方法分析其对 29 种较常用的不同来源及类型的哺乳动物细胞株的基因转移及表达效率。结果显示,重组慢病毒对多数细胞株均体现出良好的基因转移效率,对不同种属来源的细胞没有表现出特别的偏嗜性。此特点与重组痘苗病毒<sup>[5]</sup>和重组杆状病毒<sup>[6]</sup>有所不同,这两种病毒载体对不同种属来源细胞的基因转移效率存在较明显差别,对灵长类来源细胞明显优于啮齿类来源细胞。重组慢病毒的这一优点应与其以 VSV-G 作为外膜蛋白有关,VSV-G 被认为具有较广泛的细胞嗜性<sup>[10]</sup>。本研究结果也显示,尽管重组慢病毒体现出较好的细胞适应性,但其对悬浮培养细胞的基因转移效率相对低于对贴壁培养细胞,在灵长类和啮齿类来源细胞中均体现出这种差别。类似的现象也出现在对其它病毒载体的基因转移效率研究中<sup>[11]</sup>。这也进一步说明了重组慢病毒对哺乳动物细胞的进入能力可能与细胞的生长性质和相应的表面特征存在关系,有待深入研究阐明。同时我们也注意到,目前研究中常用的悬浮培养细胞多数与造血组织有关,其对包括重组病毒载体在内的许多基因转移方法普遍不敏感可能与其组织特性有关。造血组织是基因治疗研究的重要对象,因此获得可对造血组织相关细胞实现高效转导的方法对于更好地开展此方面的研究将具有重要意义。慢病毒载体具有良好的应用潜力,同时其相对灵活的构建方法也便于进行改

进研究。

本研究结果也显示,不同细胞中慢病毒介导的报告基因表达效率并不完全与转移效率成正比,如 293、A-549、Huh-7、Hela 等细胞具有相似水平的基因转移效率,但其报告基因表达强度有较大的差别。这表明外源基因在靶细胞中的导入受多种因素影响,转移载体对细胞的外源基因导入能力只是其中一方面,启动子的活性以及靶细胞合成蛋白的水平等均可能会对表达结果造成影响。在本研究中,我们是通过 CMV 启动子引导报告基因 EGFP 的表达来评估重组慢病毒对细胞的基因转移能力,CMV 启动子是一种较为通用的哺乳动物细胞表达启动子,具有良好的细胞适应性,并且在此前的研究中,我们曾选用部分细胞株通过脂质体转染方法将携带有 CMV-EGFP 表达元件的质粒转入细胞中进行表达,结果显示 CMV 启动子在这些细胞中均能有效引导 EGFP 基因的表达,尽管表达水平在不同细胞中存在差别,但均可为仪器所检测<sup>[6]</sup>,因此认为 CMV 启动子引导的报告基因表达应能基本反映重组慢病毒对不同细胞的外源基因转移能力。重组慢病毒已逐步成为基因功能及治疗研究中极具潜力的基因转移载体,本研究平行比较了其不同来源及类型的哺乳动物细胞株的外源基因转移能力,为重组慢病毒系统的合理使用提供理论和试验基础。

### 参考文献:

- [1] Naldini L, Blömer U, Gallay P, et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector[J]. Science, 1996, 272(5259): 263 - 267.
- [2] Iwakuma T, Cui Y, Chang L J. Self-inactivating lentiviral vectors with U3 and U5 modifications [J]. Virology, 1999, 261(1): 120 - 132.
- [3] Klages N, Zufferey R, Trono D. A stable system for the high-titer production of multiply attenuated lentiviral vectors[J]. Mol Ther, 2000, 2(2): 170 - 176.
- [4] Anson D S. The use of retroviral vectors for gene therapy-what are the risks? A review of retroviral pathogenesis and its relevance to retroviral vector-mediated gene deliv-

- ery[J]. *Genet Vaccines Ther*, 2004, 2(9): 1 - 13.
- [5] 吴婷, 欧山海, 陈敏, 等. 重组痘苗病毒对不同哺乳动物细胞株的感染效率及 EGFP 表达水平研究[J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2005, 44(6): 866 - 869.
- [6] 许辰煜, 程通, 卢五迅, 等. 杆状病毒对不同哺乳动物细胞基因转移及表达效率的研究[J]. *生物工程学报*, 2004, 20(1): 73 - 77.
- [7] Lai Z, Brady R O. Gene transfer into the central nervous system in vivo using a recombinant lentivirus vector[J]. *J Neurosci Res*, 2002, 67(3): 363 - 371.
- [8] Ralph G S, Binley K, Wong L F, et al. Gene therapy for neurodegenerative and ocular diseases using lentiviral vectors[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2006, 110(1): 37 - 46.
- [9] Philpott N J, Thrasher A J. Use of nonintegrating lentiviral vectors for gene therapy[J]. *Hum Gene Ther*, 2007, 18(6): 483 - 489.
- [10] Burns J C, Friedmann T, Driever W, et al. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(19): 8759 - 8760.
- [11] Condreay J P, Witherspoon S M, Clay W C, et al. Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(1): 127 - 132.

## Gene-transfer and Expression Efficiencies of Recombinant Lentivirus in Different Mammalian Cell Lines

ZHANG Ya-li, CHENG Tong, CAI Yi-jun, ZHANG Tao, WEI Li-hua,

YANG Bing-chun, ZHENG Zhou, ZHANG Jun, XIA Ning-shao \*

(National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases,

School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract :** Lentivirus vector was widely used as gene expressing vector in mammalian cells. Yet few comparing transduction and expression efficiencies of a recombinant lentivirus in different mammalian cells were performed. In this study, we applied the 3rd generation lentivirus expression system to construct a recombinant lentivirus which was expressing EGFP as a report gene, then used it to transduce several different mammalian cell lines under the same conditions. After 48 h post of infection, the flow cytometer was employed for analysis of the transduction and expression efficiencies of EGFP gene in different cell lines. Twenty nine different cell lines were examined, including 14 human cell lines, 5 monkey cell lines, 9 rodent cell lines and 1 rabbit cell line. Results showed that recombinant lentivirus Lenti-EGFP was able to transduce most of the mammalian cells, preferably for the primate cell lines, and efficiencies were higher in adherent culture cell lines than in suspend culture cell lines. There no apparent partiality was observed for cells of different organ origin. This study offered essential knowledge for rationally propagating recombinant lentivirus.

**Key words :** lentivirus; green fluorescent protein; mammalian cells