

17 McKenzie M ,Liolitsa D ,Michael G *et al.* Mitochondrial disease: mutations and mechanisms (J). *Neurochem Res* 2004; 29(3) : 589-600.

18 Landar A ,Zmijewski JW ,Dickinson DA *et al.* Interaction of electrophilic lipid oxidation products with mitochondria in endothelial cells and formation of reactive oxygen species (J). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 59(5) : H1777-H87.

19 Betancourt AM ,King AL ,Fetterman JL *et al.* Mitochondrial-nuclear genome interactions in non-alcoholic fatty liver disease in mice (J). *Biochem J* 2014; 461(2) : 223-32.

20 Laura Bordone ,Maria Carla Motta ,Frederic Picard *et al.* Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic β cells (J). *PLoS Biol* 2006; 4(2) : e31.

21 Emre Y ,NT. Uncoupling protein UCP2: When mitochondrial activity meets immunity (J). *FEBS Lett* 2010; 584(8) : 1437-42.

22 Della-Morte d ,Dave kr ,DeFazio RA *et al.* Resveratrol pretreatment protects rat brain from cerebral ischemic damage via a sirtuin1-uncoupling protein 2 pathway (J). *Neuroscience* 2009; 159(3) : 993-1002.

(2015-09-14 修回)

(编辑 袁左鸣)

慢病毒转染大鼠破骨样细胞研究

傅继凡 陈 健¹ (厦门大学医学院 福建 厦门 361000)

【摘要】 目的 探讨慢病毒转染大鼠破骨样细胞的可行性。方法 诱导大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs) 培养成破骨样细胞(OLC) 后,将其用绿色荧光蛋白(GFP) 标记的对照慢病毒进行转染,荧光显微镜下观察不同感染复数(MOI) 时慢病毒转染 OLC 的荧光率,并用 TRAP 染色鉴定 OLC。选择最适宜的 MOI 并加入不同干预进行对照,分为 OLC 对照组、NFAT2 抑制剂(VIVIT) 组、NFAT2iRNA 慢病毒组、对照病毒组,用 RT-PCR 进行基因验证。结果 对照病毒转染后,OLC 随着 MOI 值的升高,荧光转染率增加; MOI = 15 时荧光数最多(41.00±9.19) 个/视野。不同干预后,NFAT2 抑制剂组和 NFAT2iRNA 慢病毒组的 NFAT2 的基因表达明显低于 OLC 对照组和对照病毒组($P < 0.05$)。结论 慢病毒可转染大鼠破骨样细胞,并在一定范围内随 MOI 升高转染率增高。

【关键词】 慢病毒;破骨样细胞;活化 T 细胞核因子家族

【中图分类号】 R3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9202(2016) 03-0516-04; doi: 10.3969/j.issn.1005-9202.2016.03.002

Research of lentivirus transfect osteoclast-like cells

FU Ji-Fan ,CHEN Jian.

College of Medicine ,Xiamen University ,Xiamen 361000 ,Fujian ,China

【Abstract】 Objective To explore the feasibility of lentivirus transfect osteoclast-like cells. **Methods** After the bone mesenchymal stem cells(BMSC) of rat were induced osteoclast-like cells(OLC) ,the contrast lentivirus that marked Green fluorescent protein(GFP) was used to transfect the OLC. The fluorescent ratio of different multiplicity of infection(MOI) was observed under fluorescent microscope ,and then Tartrate resistant acid phosphatase(TRAP) staining was used to identify the osteoclast-like cells. The most appropriate MOI value was selected and then divided into OLC ,NFAT inhibitor(VIVIT) ,NFAT2iRNA lentivirus ,control lentivirus groups ,respectively. **Results** The number of fluorescent cells was increased with elevating of MOI value after contrast lentivirus transfect osteoclast-like cells. The maximum fluorescent number was(41.00±9.19) /view when MOI = 15. After different intervention ,the mRNA expression of NFAT2 in NFAT inhibitor group and NFAT2iRNA lentivirus group were more decreased than those of OLC and control lentivirus groups($P < 0.05$) . **Conclusions** Lentivirus could transfect osteoclast-like cells of rat. Furthermore ,fluorescent transfect rate is increased with the rise of MOI value in a certain range.

【Key words】 Lentivirus; Osteoclast-like cells; Nuclear factor of activated T cells

骨代谢的平衡由骨形成和骨吸收维持,成骨细胞(OB) 和破骨细胞(OC) 起着重要作用。其中,OC 是一种具有独特骨吸收功能的多核巨细胞,来源于造血细胞系,属于终末细胞,不能增殖和传代^[1]。而破骨样细胞(OLC) 是指具有 OC 性质,通过

原代培养或实验诱导生成的,用于实验研究的细胞。到目前为止,还没有成熟的 OC 株。自从 Testa 等^[2] 首次在体外培养骨髓造血细胞时发现能够形成 OC 后,骨髓诱导培养法分化 OLC 的技术形成并逐渐开展应用。获得 OC 的方法多种多样,包括诱导培养、直接培养等技术都逐渐趋于稳定成熟,有助于着手从基因水平深入研究骨吸收的机制,从而进一步开发代谢性骨病的治疗药物。本文拟证实慢病毒转染 OLC 的可行性,为进一步利用 OLC 进行基因学研究奠定重要基础。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81272168);福建省医学创新课题资助项目(No. 2012-CXB-32)

1 厦门大学附属中山医院康复医学科

通讯作者:陈 健(1963-) ,男,博士,主任医师,硕士生导师,主要从事骨质疏松研究。

第一作者:傅继凡(1990-) ,女,在读硕士,主要从事骨质疏松研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物 4 周龄雌性 SD 大鼠,购自吴氏实验动物

中心。

1.2 主要试剂、材料和仪器 低糖 DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司),中胎牛血清(Bioind) 红细胞裂解液,双抗、磷酸盐缓冲液(PBS,美国 Gibco 公司),鼠 M-CSF、RANKL(美国 Peprotech 公司),抗酯酸性蛋白酶染色试剂盒(TRAP,美国 Sigma 公司),NFAT 抑制剂(德国 Calbiochem 公司),Trizol(美国 Ambion 公司),逆转录试剂盒(TaKaRa),SYBR Green 试剂(In-vitrogen),NFAT2RNAi 慢病毒、对照病毒由厦门欣基公司包装合成,引物由上海生工公司合成;10 cm 培养皿、六孔板(美国 Corning 公司);CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司),DM2500 荧光显微镜(德国 Leica 公司),PCR 扩增仪(美国 Bio-Rad 公司),荧光定量 PCR 仪 7500 型(美国 ABI 公司)。

1.3 大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)的分离与诱导培养 取 SD 大鼠麻醉后处死,无菌条件下取双侧股骨和胫骨,剔除多余软组织,用 5 ml 注射器吸取适量低糖 DMEM 冲洗骨髓腔,直至骨髓腔变白,取冲洗液充分吹打成细胞悬液后离心,800 r/min 3 min。弃上清加红细胞裂解液,混匀静置 2 min,800 r/min 离心 3 min,弃上清去除红细胞,得到白细胞沉淀。重悬于含 25.0 ng/ml M-CSF + 50.0 ng/ml RANKL 的低糖 DMEM 完全培养液(含 10% FBS、1% 青霉素与链霉素),接种于 10 cm 培养皿,37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养 24 h。取未贴壁细胞,调整细胞密度为 2.5 × 10⁵ 重悬于含 25.0 ng/ml M-CSF + 50.0 ng/ml RANKL(大鼠)的低糖 DMEM 完全培养液,接种于六孔培养板,继续培养,首次半定量换液,以后每隔 3 d 换液。

1.4 慢病毒转染 OLC 并分组 以 hela 细胞(2.5 × 10⁴/孔)对比,待获得的 OLC 生长融合达约 60% 时,对照病毒(无 NFAT2 沉默)转染按感染复数(MOI)15、5、1 各分为三组,18 h 后首次换液,此后每 2~3 d 换液 1 次于第 5 天观察荧光表达情况,荧光显微镜(×200)下随机选取 5 个视野拍摄 OLC 和 hela 细胞,并用 Image-Pro Plus 专业图像分析软件计数。

1.5 TRAP 染色及计数 将 OLC 于转染后第 5 天弃培养基, PBS 冲洗 2 遍,柠檬酸盐/丙酮固定液室温下固定 30 s,用蒸馏水冲洗、晾干,按试剂盒说明书行 TRAP 染色,倒置相差显微镜(×200)下随机选取 5 个视野计数 3 个核以上破骨细胞,并在 200 倍光镜下,用 Image-Pro Plus 专业图像分析软件计数。

1.6 NFAT2 抑制剂干预 OLC 将获得的 OLC 融合率达到 60% 左右时,进行不同干预并分为 OLC 对照组、NFAT2 抑制剂(VIVIT)组、NFAT2iRNA 慢病毒组、对照病毒组。NFAT2iRNA 慢病毒组和对照病毒组病毒剂量均以 MOI = 15 为参数,VIVIT 试剂以 2 μmol/L 每孔连续干预 3 d,此后每 2~3 d 换液 1 次于第 5 天进行 RT-PCR 检测。

1.7 RT-PCR 检测 细胞总 RNA 用 Trizol 提取。取总 RNA 2 μg,按反转录试剂盒(TaKaRa)步骤完成反转录。以 GAPDH 为内参照,取 2 μl 反转录产物分别以下述引物进行 PCR 扩增。引物序列及反应条件:①NFAT2: 顺向 GGAGGGAAGAAGATG-GTGTGT,反向 CTGGTTATTCTCTGTTGCGG;②GAPDH: 顺向 AGTCCAGCCTCTCATAG,反向 CGTTGAACCTGCCGTGGG-TAG;反应条件:95℃ 30 s 后,95℃ 5 s,60℃ 34 s,反复循环 40 次,95℃ 15 s,60℃ 1 min,95℃ 15 s 后结束反应。采用 2^{-ΔCt} 的

方法计算基因相对表达量,公式:目的基因表达量 = 2^{-ΔCt}, ΔCt = Ct 目的基因 - Ct 内参基因。

1.8 统计学方法 应用 SPSS13.0 软件选用单因素方差分析(One-way ANOVA)、LSD 方法统计。

2 结果

2.1 细胞生长特性 倒置显微镜下观察,大鼠 BMSCs 培养 24 h 后开始贴壁,呈梭形,诱导后细胞逐渐变大,集落融合成多核破骨细胞,第 9 天时细胞状态最佳,数量最多,随后细胞开始皱缩,出现大量空泡。MOI = 15、5、1 均未见明显的细胞毒性。见图 1。

2.2 转染及计数 带有绿色荧光蛋白(GFP)标记的对照病毒转染 OLC 后第 5 天在倒置荧光显微镜下观察,可见转染上的 OLC 发出较强的绿色荧光,胞体大、形态不一、核数 ≥ 3、细胞外围有一明显皱褶缘。随着 MOI 值的升高,heLa 的转染数增加,各组之间比较均有显著差异(P < 0.01)。OLC 组在 MOI = 15 时,转染数最多,与 MOI = 5、1 比较有统计学差异(P < 0.01)。MOI = 15 时,OLC 皱褶缘明显、荧光强;MOI = 5、1 时,转染的 OLC 荧光较弱,皱褶缘少,其他细胞转染较多。见图 2 表 1。

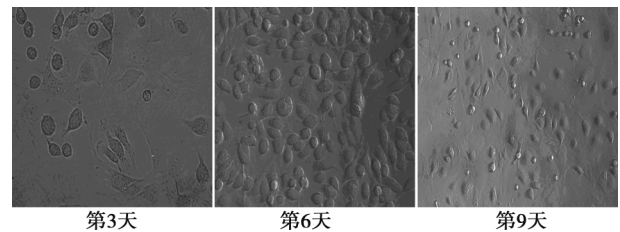


图 1 不同时间点 OLC 的形态(×200)

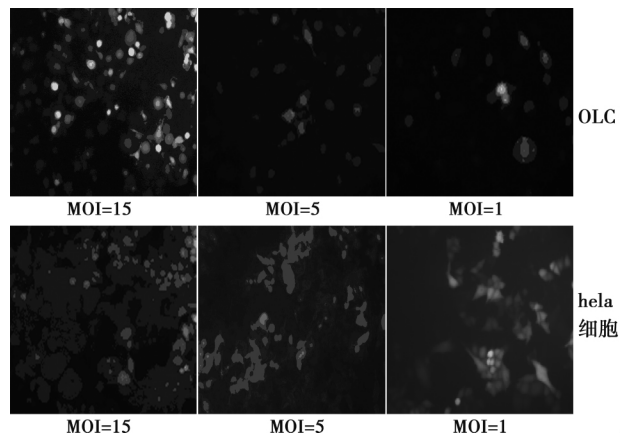


图 2 荧光显微镜 OLC 及 hela 细胞(×200)

表 1 不同 MOI 值细胞计数的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	MOI = 15	MOI = 5	MOI = 1
hela	308.40 ± 26.09 ¹⁾²⁾	187.80 ± 23.89 ¹⁾	52.00 ± 12.25
OLC	41.00 ± 9.19	4.60 ± 1.14 ³⁾	1.80 ± 1.10 ³⁾

与 MOI = 1 比较: 1) P < 0.01; 与 MOI = 5 比较: 2) P < 0.01; 与 MOI = 15 比较: 3) P < 0.01

2.3 TRAP 染色及数量 诱导的 OLC 经 TRAP 染色后胞质深染呈紫红色 而胞核阴性,核数目 ≥ 3 ,多位于周边。经 Image-Pro Plus 计数分析后,MOI = 15 组 (53.60 ± 3.65)、MOI = 5 组 (47.20 ± 3.83)、MOI = 1 组 (48.80 ± 7.12) 细胞数量均无显著差异 ($P > 0.05$)。见图 3。

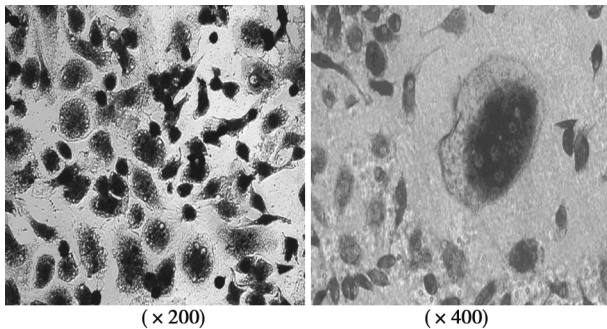


图 3 诱导法 OLC 的 TRAP 鉴定

2.4 NFAT2iRNA 慢病毒转染 OLC 后 NFAT2 的表达 不同病毒转染 OLC 后荧光显微镜下观察,与对照病毒组比较,NFAT2iRNA 慢病毒组 OLC 数目少,荧光强度弱,未见皱褶缘。经过不同干预后,NFAT2 抑制剂组 (0.0097 ± 0.0017) 和 NFAT2iRNA 慢病毒组 (0.0096 ± 0.0020) 的 NFAT2 基因表达明显低于 OLC 对照组 (0.0158 ± 0.0026) 和对照病毒组 (0.0159 ± 0.0025) ($P < 0.05$)。而 OLC 对照组和对照病毒组、NFAT2 抑制剂组和 NFAT2iRNA 慢病毒组之间的 NFAT2 基因表达无显著差异 ($P > 0.05$)。见图 4。

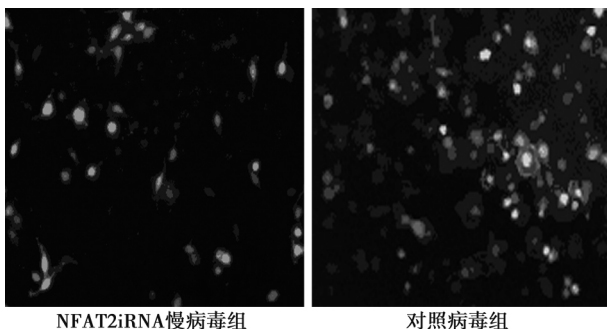


图 4 慢病毒转染后第 5 天荧光显微镜下破骨样细胞 ($\times 200$)

3 讨论

骨代谢疾病如骨质疏松、Paget 病、牙周炎等病理变化都存在骨吸收异常,其中 OC 起重要作用⁽³⁾。OC 在体外很脆弱,培养难度高,纯度不高。本实验将大鼠 BMSC 在体外培养过程中加 25.0 ng/ml M-CSF + 50.0 ng/ml RANKL 进行诱导,获得一定量的成熟 OLC,观察培养至第 9 天时数量最多,与其他培养方法比较,与体内 OC 生物学功能最接近⁽⁴⁾,最适合用于体外深入研究。

慢病毒载体是以人类免疫缺陷 I 型病毒(HIV-1)为基础发展起来的基因治疗载体,可以将外源基因有效地整合到宿主染色体上,从而达到持久稳定的表达。在感染能力方面不同于腺

病毒和逆转录病毒,可有效地感染一些较难转染的细胞,如原代细胞、干细胞、不分化细胞等,适用于 OC 的体外研究⁽⁵⁾。GFP 是一种新型报告基因,与目的基因构成融合基因后,通过载体(如质粒、慢病毒、腺病毒)转染,细胞可表达 GFP 蛋白,产生绿色荧光。本实验发现慢病毒转染效果与 MOI 值有密切关系,随 MOI 值的增加而升高,TRAP 染色进一步验证 MOI = 15、5、1 对细胞均无较明显毒性作用。

Ca^{2+} /NFATc1 信号通路是 OC 内重要的信号系统,参与调节 OC 的分化和成熟⁽⁶⁾。活化 T 细胞核因子家族中的 NFATc1 已被证实是其中重要的转录调节因子,参与许多 OC 特异性基因的表达调控,对 OC 分化和骨吸收功能至关重要⁽⁷⁾。有研究表明,NFATc1 基因敲除的小鼠表现为骨质疏松⁽⁸⁾;其基因缺陷的胚胎干细胞不能分化成 OC,但表达外源性 NFATc1 的前体细胞在没有 RANKL 的情况下也能向 OC 分化⁽⁹⁾。因此,可选择最适宜的 MOI 值用 NFAT2iRNA 慢病毒对 OC 进行基因验证。NFAT2iRNA 慢病毒进入 OC 转染成功后使 NFAT2 基因沉默,表达下降,而对照病毒没有使 NFAT2 沉默的作用,同时加入 VIVIT 作为对照,VIVIT 组和 NFAT2iRNA 慢病毒组的 NFAT2 基因表达明显低于 OLC 对照和对照病毒组,说明转染成功。此外,荧光显微镜也进一步证明 NFAT2 对 OC 的分化和成熟的重要性。

体外成功转染 OC 的主要措施:保证转染前细胞活性处于最佳状态;病毒转染前更换新培养基效果最好;加病毒后一般需在 8~12 h 更换培养基。经过反复大量实验,发现对于 OC 18 个小时为最佳换液时间;采用 1~2 个月大鼠,所诱导的 OC 最多;动物从处死到分离细胞速度要快,OC 不易受损;严格无菌操作,诱导因子足量;采用差速贴壁法纯化 OC,因所分离成纤维细胞等贴壁速度快,在培养 24 h 后收集未贴壁细胞接种至另一培养板中可提高纯度;纯化后 OC 为更好贴壁,2~3 d 内需要静置培养,不宜挪动。

综上所述,此次 OC 转染成功为今后骨代谢疾病的基因治疗开拓了广阔的道路,利用携带目的基因慢病毒载体转染 OLC,研究骨吸收的具体分子机制及有关 OC 内分化的信号通路是今后进一步实验的方向。

4 参考文献

- 1 Duong LT, Rodan GA. Regulation of osteoclast formation and function (J). Rev Endocr Metab Disorders 2001; 2(1): 95-104.
- 2 Testa NG, Allen TD, Lajtha LG, et al. Generation of osteoclasts in vitro (J). J Cell Sci, 1981; 47(1): 127-37.
- 3 Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases (J). Science 2000; 289(5484): 1508-14.
- 4 付应雷, 顾建红, 王世涛, 等. 2 种方法诱导形成的破骨细胞特性比较 (J). 中国兽医学报 2013; 33(1): 94-7.
- 5 Kubo S, Kataoka M, Tateno C, et al. In vivo stable transduction of humanized liver tissue in chimeric mice via high-capacity adenovirus-lentivirus hybrid vector (J). Hum Gene Ther 2010; 21(1): 40-50.
- 6 Hwang SY, Putney J. Calcium signaling in osteoclasts (J). Biochim Biophys Acta 2011; 1813(5): 979-83.
- 7 Negishi KT, Takayanagi H. Ca^{2+} -NFATc1 signaling is an essential axis of

- osteoclast differentiation (J). *Immunol Rev* 2009; 231(1): 241-56.
- 8 Winslow MM, Pan MG, Starbuck M *et al.* Calcineurin/NFAT signaling in osteoblasts regulates bone mass (J). *Dev Cell* 2006; 10(6): 771-82.
- 9 Takayanagi H, Kim S, Koga T *et al.* Induction and activation of the tran-

scription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts (J). *Dev Cell* 2002; 3(6): 889-901.

(2015-05-11 修回)

(编辑 袁左鸣)

蜂胶总黄酮对异丙肾上腺素致病理性心肌肥厚小鼠心功能的影响

孙光伟^{1,2} 隋欣¹ 贾琼¹ 王伟楠¹ 隋殿军¹ (吉林省中医药科学院, 吉林 长春 130021)

【摘要】 目的 探讨蜂胶总黄酮(TFP)对异丙肾上腺素(ISO)诱导的病理性心肌肥厚(PCH)小鼠心功能的影响。方法 8周龄雄性小鼠20只,适应性饲养1w,随机分为对照组、ISO组、TFP组及ISO+TFP组。预先口服TFP(25 mg·kg⁻¹·d⁻¹)7d之后持续给予ISO(25 mg·kg⁻¹·d⁻¹)7d制备小鼠PCH模型。试验结束后24h进行超声心动图检测,计算心脏重量/体重(HW/BW)比值,检测心房钠尿肽(ANP)的mRNA和蛋白表达水平。结果 与对照组比较,ISO组小鼠收缩期左室内径(LVIDs)、舒张期左室内径(LVIDd)及左室收缩末期容积(LVVs)均明显升高,而射血分数(EF)、缩短分数(FS)明显降低,HW/BW及ANP蛋白、mRNA水平亦明显升高($P<0.05$);与ISO组比较,TFP+ISO组LVIDs、LVIDd及LVVs均明显降低,而EF、FS明显升高($P<0.05$),HW/BW及ANP蛋白、mRNA水平亦明显降低($P<0.05$)。结论 TFP可对抗ISO诱导的小鼠PCH,并对心功能损伤具有保护作用。

【关键词】 蜂胶总黄酮; 异丙肾上腺素; 心肌肥厚; 心功能

【中图分类号】 R-322 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9202(2016)03-0519-02; doi: 10.3969/j.issn.1005-9202.2016.03.003

The protective effect of total flavonoids of propolis on isoproterenol-induced pathological cardiac hypertrophy in mice

SUN Guang-Wei, SUI Xin, JIA Qiong *et al.*

Jilin Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Changchun 130021, Jilin, China

【Abstract】 Objective To study the protective effect of total flavonoids of propolis (TFP) on isoproterenol (ISO)-induced pathological cardiac hypertrophy (PCH) and cardiac function mice. **Methods** Twenty 8-week-old male mice were randomly divided into control, ISO, TFP and ISO+TFP groups. Echocardiography was used to test LVIDs, LVVs, EF, FS; and HW/BW ratio was calculated, and mRNA and protein expression levels of ANF were detected. **Results** Compared with those of control group, LVIDs, LVIDd and LVVs in ISO group were increased significantly, but EF, FS were decreased, and HW/BW, mRNA and protein expression levels of ANF were increased ($P<0.05$). Compared with those of ISO group, LVIDs, LVIDd and LVVs in TFP 25 mg·kg⁻¹·d⁻¹+ISO group were decreased significantly, but EF, FS were increased, and HW/BW, mRNA and protein expression levels of ANF were decreased ($P<0.05$). **Conclusions** TFP could be against ISO-induced PCH in mice, and has a protective effect on cardiac dysfunction.

【Key words】 Total flavonoids of propolis; Isoproterenol; Cardiac hypertrophy; Cardiac function

病理性心肌肥厚(PCH)是心脏长期处于压力负荷过重的情况下产生的一种代偿功能。PCH会造成心肌需氧增加,此时冠状动脉的供血量不能满足相应的需求,就会造成心肌缺血,最后将导致心肌收缩力减退,最终发展为心力衰竭^[1]。造成PCH的原因有多种,包括高血压、主动脉瓣狭窄等^[2]。目前,治疗PCH主要应用增强心肌收缩力的药物(如洋地黄类、 β 受体兴奋药)以及减轻心脏负荷的药物(如硝酸甘油等),但是其可使左心室流出道梗阻加重致使应用受限^[3]。蜂胶总黄酮(TFP)是蜂胶中的有效成分,具有抗氧化的作用^[4],本课题组前期结果显示TFP具有心肌保护作用,但其对心肌肥厚是否具有保护作用尚不清楚。本研究旨在探讨其对异丙肾上腺素

(ISO)诱导的PCH小鼠心功能的影响及其机制。

1 材料和方法

1.1 动物 8周龄雄性C57BL/6小鼠20只,体重22~24g,由吉林大学基础医学院动物实验中心供给,合格证号:SCXK-(吉)2007-0003。动物饲养于通风动物房内,室温(20±2)℃,自由进食与饮水。

1.2 实验药品和试剂 TFP由长春中医药大学合成,批号:1019907,使用时以0.5%羧甲基纤维素钠配制成混悬液;ISO缓释渗透微泵购自Sigma公司,心房钠尿肽(ANP)抗体购自Santa Cruz公司;TRIzol、RNA提取试剂盒,ANP引物均购自Invitrogen公司。

1.3 实验方法^[4] 20只小鼠适应性饲养1w,随机分为对照组、ISO组、TFP组及ISO+TFP组。各组小鼠1.5%异氟醚麻醉,小鼠的肩胛间区域皮下植入含有PBS或ISO的缓释渗透微泵,释放速度是25 mg·kg⁻¹·d⁻¹,持续7d。预先口服给予TFP(25 mg·kg⁻¹·d⁻¹)7d之后持续给予ISO(25 mg·kg⁻¹·

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81173543)

1 长春中医药大学 2 吉林大学中日联谊医院

通讯作者:隋殿军(1955-),男,教授,博士生导师,主要从事中医药防治心血管疾病研究。

第一作者:孙光伟(1978-),女,副主任医师,博士,主要从事心血管疾病的临床与基础研究。