

DOI:10.11798/j.issn.1007-1520.201303002

· 论著 ·

## 重组腺病毒 Ad-GFP 转染新生小鼠 离体耳蜗基底膜的实验分析

马登滨<sup>1</sup>, 陈杰<sup>1,2</sup>, 高下<sup>1,2</sup>

(1. 南京医科大学附属鼓楼医院耳鼻咽喉头颈外科, 江苏南京 210008; 2. 南京大学医学院附属鼓楼医院耳鼻咽喉头颈外科, 江苏南京 210008)

**摘要:** **目的** 观察重组腺病毒 Ad-GFP 转染新生小鼠离体耳蜗基底膜培养组织的情况。**方法** 取新生 1~5 d 小鼠的耳蜗基底膜, 离体培养 1 d 后, 加入重组腺病毒 Ad-GFP 继续培养 1 d, 在荧光显微镜及 Confocal 显微镜下观察病毒对离体耳蜗基底膜的转染情况。**结果** 耳蜗基底膜离体培养 1 d 后, 在显微镜下观察, 可见基底膜贴壁生长良好, 外周有新生上皮细胞和成纤维细胞长出; 高倍显微镜下可见耳蜗内外毛细胞和支持细胞等结构。离体耳蜗基底膜培养组织加入重组腺病毒 Ad-GFP 继续培养 1 d 后, 可见重组腺病毒 Ad-GFP 能高效转染新生小鼠离体耳蜗基底膜及其外周长出的新生上皮细胞和成纤维细胞; 在新生小鼠离体耳蜗基底膜上, 不仅大上皮嵴细胞区域、小上皮嵴细胞区域的细胞能被高效转染, 毛细胞也能被高效转染。**结论** 重组腺病毒 Ad-GFP 能高效转染新生小鼠离体耳蜗基底膜培养组织。

**关键词:** 基因转染; 重组腺病毒; 耳蜗; 基底膜; 小鼠

**中图分类号:** Q784; R764.35 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-1520(2013)03-0188-04

## Recombinant adenovirus transfects organ of Corti from neonatal mouse in vitro

MA Deng-bin, CHEN Jie, GAO Xia

(Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, Nanjing Drum Tower Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210008, China)

**Abstract:** **Objective** To detect the transfection of organ of Corti from neonatal mouse with Ad-GFP in vitro. **Methods** One day after tissue cultivation, the organ of Corti from neonatal mouse was transfected with Ad-GFP in vitro. One day after transfection, the transfection efficiency was analyzed with Confocal and fluorescence microscopes. **Results** One day after the tissue cultivation, the organ of Corti grew well and new epithelial cells and fibroblasts were found around the tissue. One day after the transfection, the hair cells, the cells in lesser and greater epithelial ridges, the new epithelial cells and fibroblasts around the tissue were effectively transfected by Ad-GFP. **Conclusions** Ad-GFP can transfect organ of Corti from neonatal mouse effectively in vitro.

**Key words:** Gene transfection; Adenovirus; Cochlea; Organ of Corti; Mouse

基因转染日益成为实验研究和临床应用的热门课题。在耳科领域中, Zheng 等<sup>[1]</sup> 通过

往离体耳蜗基底膜中转染毛细胞的发育基因 Math1, 发现了新生毛细胞样细胞, 为感音神经性聋的治疗带来了曙光; Suzuki 等<sup>[2]</sup> 通过往庆大霉素致聋的活体耳蜗中转染神经营养因子 GDNF 基因, 使不易通过血迷路屏障的 GDNF 在耳蜗中大量表达, 有效地防止药物性聋。所有这些实验都不可避免地要求真核表达载体在耳蜗组织内有效转染和表达。本实验通过对

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30973302); 江苏省科教兴卫工程医学重点人才基金(RC2007010); 南京市医学重点科技发展项目(201108019)。

作者简介: 马登滨, 男, 硕士研究生; 陈杰, 男, 硕士, 副主任医师, 两者为共同第一作者。

通讯作者: 高下, Email: xiagao213@yahoo.com.cn.

重组腺病毒载体 Ad-GFP 转染新生小鼠离体耳蜗基底膜进行研究,为基因转染活体耳蜗的实验奠定了基础。现报道如下。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料和试剂

C57/B6 小鼠(南京大学模式动物研究所);HEK293 细胞(南京大学模式动物研究所);重组腺病毒 Ad-GFP(南京鼓楼医院耳科);无血清培养基的配置:96.4 ml DMEM (SH30022-01, hyclone)、1 ml serum-free supplement (I-1884, sigma)、2.4 ml 20% 葡萄糖 (G-2020, sigma)、1 ml 谷氨酰胺 (G-6392, sigma)、0.2 ml 青霉素 G (P-3414, sigma) 配成 100 ml 无血清培养基;鼠尾胶(重庆吉盛);Confocal 显微镜(Leica);荧光显微镜(E800, Nikon)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 重组腺病毒 Ad-GFP 的滴度测定 用空斑测定法进行重组腺病毒 Ad-GFP 的滴度即感染效率(空斑形成单位,PFU)测定。

1.2.2 新生小鼠耳蜗基底膜的解剖与培养 取新生 1~5 d 的 C57/B6 小鼠,75% 乙醇浸泡消毒,眼科剪断头,剪开颅骨,去除脑组织,剪下颞骨部分,移入 PBS 培养液,去除多余组织及骨质,打开听泡,剥去蜗壳,用游丝镊沿蜗轴环行分离螺旋韧带,取下整个耳蜗基底膜组织,用尖刀切取基底膜片段,置于已经包被了鼠尾胶的 35 mm 培养皿中,组织块周围滴加数滴无血清培养液,培养箱内预孵 20 min 后取出,以使之贴壁良好,再加入无血清培养液,放回 37℃ CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,以后隔日换培养液。

1.2.3 重组腺病毒 Ad-GFP 对新生小鼠离体耳蜗基底膜的转染 离体耳蜗基底膜培养 1 d 后见基底膜生长良好,外周可见新生上皮细胞和成纤维细胞长出,加重组腺病毒 Ad-GFP 5 μl,放回 37℃ CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养。

1.2.4 新生小鼠离体耳蜗基底膜转染情况的观察 转染 24 h 后,分别在荧光显微镜下和 Confocal 显微镜下观察新生小鼠离体耳蜗基底膜培养组织上的绿色荧光,以了解重组腺病毒

Ad-GFP 对新生小鼠离体耳蜗基底膜的转染情况及转染效率。

## 2 结 果

### 2.1 重组腺病毒 Ad-GFP 的滴度测定

利用空斑测定法进行重组腺病毒 Ad-GFP 的滴度测定,其结果为  $1.8 \times 10^9$  pfu/ml。

### 2.2 新生小鼠耳蜗基底膜的离体培养

新生小鼠耳蜗基底膜离体培养 24 h 后,在显微镜下观察,可见基底膜贴壁生长良好,外周有新生上皮细胞和成纤维细胞长出,高倍显微镜下可见耳蜗内外毛细胞和支持细胞等结构(图 1)。

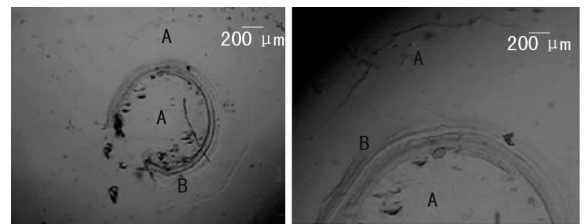


图 1 耳蜗基底膜离体培养图 A:新生上皮细胞和成纤维细胞;B:耳蜗毛细胞

### 2.3 重组腺病毒 Ad-GFP 对新生小鼠离体耳蜗基底膜培养组织的转染情况

重组腺病毒 Ad-GFP 能高效地转染新生小鼠离体耳蜗基底膜及其外周长出的新生上皮细胞和成纤维细胞,表现为被转染的细胞呈绿色荧光(图 2, 3),在新生小鼠离体耳蜗基底膜上,不仅大上皮嵴细胞区域、小上皮嵴细胞区域的细胞能被高效转染,毛细胞也能被高效转染(图 4)。

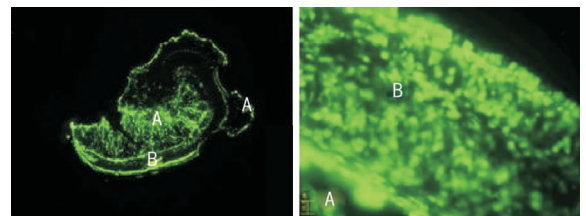


图 2 Ad-GFP 转染离体耳蜗基底膜图 A:外周新生上皮细胞和成纤维细胞;B:基底膜

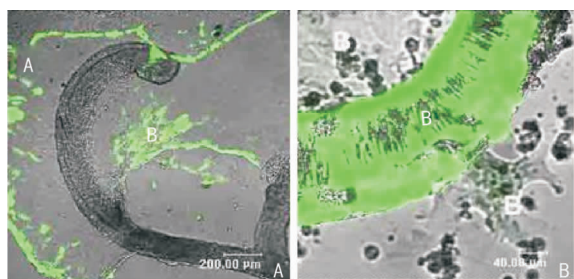


图3 Ad-GFP转染离体耳蜗基底膜图 A:外周新生上皮细胞和成纤维细胞;B:基底膜

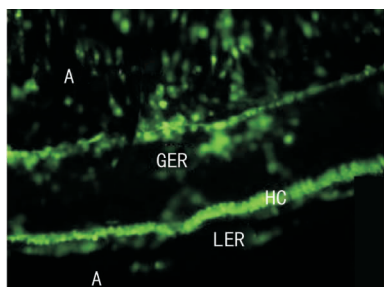


图4 Ad-GFP转染离体耳蜗基底膜图 A:新生上皮细胞和成纤维细胞;HC:毛细胞;GER:大上皮嵴细胞区域;LER:小上皮嵴细胞区域

### 3 讨论

近年来,大量实验研究<sup>[3-5]</sup>表明神经营养因子对耳蜗有显著的保护作用,但这类神经营养因子是大分子蛋白,难以透过耳蜗的血迷路屏障,因此这类神经营养因子的内耳给药方法成为世界研究的热点。目前比较成熟的方法有直接灌注法、微离子泵持续灌注法等。但由于这类神经营养因子半衰期短,需要多次重复耳蜗灌注,才能维持耳蜗内的有效浓度,但多次耳蜗给药势必会对耳蜗造成损伤。因此,其在耳蜗中的应用受到很大的限制。近年来,由于基因工程技术的进步和基因转染方法的建立,使得这类神经营养因子在耳蜗中长期而高效表达成为可能<sup>[2,6-7]</sup>。另外,在细胞中表达 Atonal 同源基因以产生新生毛细胞也主要借助基因转染技术<sup>[1]</sup>。所以,基因转染日益成为耳科实验研究和临床应用的热门课题。并且耳蜗也是基因转染的理想器官,因为外淋巴使基因转染载体快速到达整个耳蜗同时耳蜗是一个相对独立的器官,便于药物的高度集中,而不影响其他组织。因此耳蜗的基因转染无疑具

有潜在价值和广阔的应用前景。

基因转染需要借助基因转染载体。理想的基因转染载体应具备以下特点<sup>[8-9]</sup>:①能有效的传递所需大小的一种或多种目的基因;②具有靶组织或细胞特异性,不被免疫系统所识别;③具有较好的稳定性和较易重复生产;④能大量、高纯度的纯化;⑤不产生炎症,对受体和环境安全;⑥能以可调节方式按需要长期表达一种或多种基因。目前基因转染载体主要有非病毒载体和病毒载体。非病毒载体具有容易制备、免疫原性小、缺少病毒组分、炎症反应及细胞毒性小等优点,但转染效率远不如病毒载体高。非病毒载体主要有阳离子脂质体、阳离子多聚体和纳米载体系统等。本文作者曾经成功地构建了真核表达质粒载体 pIRES2-DsRed2-Hath1<sup>[10]</sup>,该质粒能通过阳离子脂质体有效地转染 HEK293T 细胞,目的基因能有效表达,其转染效率比较高并且实现了其与 pIRES2-EGFP-NT3 质粒的共转染<sup>[11-12]</sup>。但脂质体介导质粒转染的效率与被转染细胞的细胞类型和组织结构等密切相关,在笔者用脂质体介导质粒转染离体耳蜗基底膜时,发现离体耳蜗基底膜虽然能被转染,但被转染的细胞通常位于耳蜗基底膜的边缘部位,且转染效率很低,在新生小鼠离体耳蜗基底膜一转的范围内仅转染进 17 个细胞<sup>[13]</sup>。而病毒载体无疑是最有效的基因转染工具,它能高效转染哺乳动物绝大多数的组织和细胞,能携带基因长片段,能同时转染多个基因,但也存在制备难度大、免疫原性大、潜在危害等缺点。常用的病毒载体有腺病毒(adenoviral vectors, AV)、单纯疱疹病毒(herpes simplex viral vectors, HSV)、腺病毒相关病毒(aden-associated virus, AVV)等。其中,腺相关病毒载体存在携带外源基因能力有限、病毒滴度低、制备繁琐等缺点;单纯疱疹病毒载体尽管有嗜神经性,但细胞毒性大,在活体试验中有严重的免疫反应。而本组所选择的腺病毒载体凭借其安全性好、感染效率高、病毒滴度高等特点,成为研究非增殖细胞基因表达的最佳系统,是神经系统疾病基因治疗的常用载体。本实验发现,重组腺病毒载体 Ad-GFP 不仅能高效转染新生小鼠离体耳蜗基底膜外周长出的新生上皮细胞和成纤维细胞,而且对新生小鼠离体耳蜗基底膜本身也能高

效转染;在新生小鼠离体耳蜗基底膜上,不仅大上皮嵴细胞区域、小上皮嵴细胞区域的细胞能被高效转染,毛细胞也能被高效转染。这表明重组腺病毒载体是高效的耳蜗基底膜转染载体,本文作者已经成功构建了携带目的基因 *Hath1* 和红色荧光蛋白 *DsRed2* 基因的重组腺病毒载体<sup>[14]</sup>,这为毛细胞再生的实验研究打下了很好的基础。同时也为神经营养因子在耳蜗中长期而高效表达的实验研究奠定了很好的基础。

本实验以新生小鼠的离体耳蜗基底膜的培养组织作为研究对象,具有下面优点:①保持了原有组织器官的结构特征,接近在体生活状态;②易于施用各种物理、化学和生物因素,具有可控制性、易操作性;③便于使用相差显微镜、荧光显微镜等各种不同的技术方法来观察和研究;④经济、耗资少,可提供大量生物性状相似的实验对象;⑤新生 1~5 d 小鼠的耳蜗基底膜获取方法简单。但本研究不能取代小鼠耳蜗的活体研究,在活体状态,其转染效率怎样,用什么方法将重组腺病毒载体导入活体小鼠的耳蜗,重组腺病毒对活体耳蜗的毒性怎样,重组腺病毒的免疫活性怎样等,这些都需要重组腺病毒对活体小鼠耳蜗转染的进一步研究。

#### 参考文献:

[1] Zheng JL, Gao WQ. Overexpression of *Math1* induces robust production of extra hair cells in postnatal rat inner ears [J]. *Nat Neurosci*, 2000, 3(6):580-586.

[2] Suzuki M, Yagi M, Brown JN, et al. Effect of transgenic GDNF expression on gentamicin-induced cochlear and vestibular toxicity [J]. *Gene Ther*, 2000, 7(12):1046-1054.

[3] Staecker H, Kopke R, Malgrange B, et al. NT-3 and/or BDNF therapy prevents loss of auditory neurons following loss of hair cells [J]. *Neuroreport*, 1996, 7(4):889-

894.

[4] Wise AK, Richardson R, Hardman J, et al. Resprouting and survival of guinea pig cochlear neurons in response to the administration of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 [J]. *J Comp Neurol*, 2005, 487(2):147-165.

[5] Duan M, Agerman K, Ernfors P, et al. Complementary roles of neurotrophin 3 and a N-methyl-D-aspartate antagonist in the protection of noise and aminoglycoside-induced ototoxicity [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(13):7597-7602.

[6] Chen X, Frisina RD, Bowers WJ, et al. HSV amplicon-mediated neurotrophin-3 expression protects murine spiral ganglion neurons from cisplatin-induced damage [J]. *Mol Ther*, 2001, 3(6):958-963.

[7] Bowers WJ, Chen X, Guo H, et al. Neurotrophin-3 transduction attenuates cisplatin spiral ganglion neuron ototoxicity in the cochlea [J]. *Mol Ther*, 2002, 6(1):12-18.

[8] Gleich LL. Gene therapy for head and neck cancer [J]. *Laryngoscope*, 2000, 110(5 Pt 1):708-726.

[9] Crystal RG. Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success [J]. *Science*, 1995, 270(5235):404-410.

[10] 陈杰,高下,麻晓峰,等.人 *Hath1*-cDNA 基因的克隆及其真核表达载体的构建 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2007, 13(3):178-181.

[11] 陈杰,高下,朱敏生,等.真核表达载体 pIRES2-DsRed2-Hath1 的构建及其在 HEK293T 细胞中的表达 [J]. *中国现代医学杂志*, 2007, 17(18):2211-2214.

[12] 陈杰,高下,徐琳,等. LipofectamineTM2000 介导 pIRES2-DsRed2-Hath1、pIRES2-EGFP-NT3 质粒对 HEK293T 细胞共转染的实验研究 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2010, 16(5):335-340.

[13] 陈杰,高下,朱敏生,等. Lipofectamine2000 介导 pIRES2-EGFP-NT3 转染小鼠离体耳蜗基底膜的实验研究 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2007, 13(6):419-423.

[14] 陈杰,高下,徐琳,等.携带 *Hath1* 和红色荧光蛋白 *DsRed2* 基因的重组腺病毒的构建和鉴定 [J]. *中国耳鼻咽喉颅底外科杂志*, 2008, 14(6):407-411.

(修回日期:2013-01-01)