文章编号:1000-5404(2005)21-2125-03

论著

促血小板生成素基因转染小鼠骨髓基质细胞体外表达的实验研究

赵咏梅[1],刘 林[1],姜 鹏[2],陈幸华[1],孔佩艳[1] ([1]第三军医大学新桥医院血液内科,重庆 400037;[2]兰州军区乌鲁木齐总医院呼吸内科,乌鲁木齐 830000)

提 要:目的 探讨促血小板生成素(thrombopoietin, TPO)基因修饰的小鼠骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)体外表达TPO的变化特点。**方法** 以脂质体介导法将TPO cDNA真核表达质粒转染BMSCs,RT-PCR方法检测TPO mRNA的表达,免疫组化法及Western blot测定TPO蛋白的表达。**结果** 转染TPO基因的BMSCs其TPO mRNA及TPO蛋白表达量明显高于空载体组($P<0.01$)及未转染组($P<0.01$)。**结论** 阳离子脂质体能有效介导TPO cDNA真核表达质粒转染BMSCs,且转染后BMSCs中TPO mRNA及TPO蛋白的表达显著上调。

关键词: TPO cDNA; 骨髓基质细胞; 转染; 基因治疗
中图法分类号: R322.81; R392.11; R394.2 **文献标识码**: A

Expression of thrombopoietin *in vitro* after transfected into mouse bone marrow stromal cells

ZHAO Yong-mei[1], LIU Lin[1], JIANG Peng[2], CHEN Xing-hua[1], KONG Pei-yan[1] ([1]Department of Hematology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, [2]Department of , Urumqi General Hospital of Lanzhou Military Command Area, Urumqi 830000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the changes of thrombopoietin (TPO) expression in mouse bone marrow stromal cells (BMSCs) *in vitro* after TPO gene transfection. **Methods** The bone marrow stromal cells of Balb/C mice aged 6 to 8 weeks were isolated and randomly divided into control group, pcDNA3.1 vector group and TPO transfection group. After TPO cDNA eukaryotic expressing vector encapsulated lipofectamine™ 2000 was transfected into BMSCs for 72 h, the expression of TPO mRNA and TPO protein in BMSCs were detected by RT-PCR and immunohistochemistry, Western blotting. **Results** The expressions of TPO mRNA and TPO protein in TPO gene transfected BMSCs were significantly enhanced as compared to pcDNA3.1 vector group and normal control BMSCs (all $P<0.01$). **Conclusion** TPO cDNA eukaryotic expression vector could be transfected into BMSCs efficiently by lipofectamine™ 2000, and the expressions of TPO mRNA and TPO protein were up-regulated in TPO gene transfected BMSCs.

Key words: TPO cDNA; bone marrow stromal cells; transfection; gene therapy

促血小板生成素(thrombopoietin,TPO)是体内调节血小板生成的首要调节因子,而且具有显著的早期造血调控作用,与其他造血生长因子如促红细胞生成素(EPO)、粒系集落刺激因子(G-CSF)、干细胞因子(SCF)及IL-3等有相加或协同作用,共同促进红系和粒系祖细胞增殖[1,2]。自1987年Anklesaria等[3]首次采用逆转录病毒载体成功地将*Neo* R基因转染到小鼠骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)以来,人们不断尝试在体外将造血生长因子、细胞因子等基因转染BMSCs,然后再回输体内。本实验采用携带外源基因TPO cDNA的真核表达载体转染BMSCs,观察TPO在mRNA及蛋白水平的表达,为基因修饰的BMSCs联合造血干细胞移植在临床方面的应用提供实验理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 L-DMEM培养基(美国Gibco公司);Lipofectamine 2000(美国Invitrogen公司);胎牛血清及马血清(美国Hyclone公司);Tripure Isolation Regent(mRNA提取试剂:美国R&D公司);RT-PCR试剂盒(RNA PCR Kit AMV Ver3.0:日本TaKaRa公司);含小鼠TPO cDNA编码区的质粒pZGmpl-1081(美国ATCC,No: 69566);山羊抗TPO单克隆抗体IgG与山羊

基金项目:第三军医大学校管基金资助项目(2002D078)
Supported by the Scientific Research Foundation of Third Military Medical University(2002D078)
作者简介:赵咏梅(1971-),女,陕西省长安县人,硕士研究生,主治医师,主要从事造血干细胞移植机制方面的研究。电话:(023)60854037,E-mail:zymjip@21cn.com
通讯作者:刘 林,电话:(023)68755609
收稿日期:2005-05-08;修回日期:2005-08-05

抗 GAPDH 多克隆抗体(美国 Santa Crus 公司);二抗生物素标记兔抗羊 IgG、三抗辣根酶标记链霉卵白素工作液、DAB 显色剂(北京中山生物技术有限公司)。Western blot 检测试剂盒(美国 Cell signaling Technology 公司);免疫印迹化学发光试剂(ECL:上海普飞生物技术有限公司)。

1.1.2 仪器 PTC-200 型 PCR 扩增仪(美国 Applied Biosystem 公司);Lamda Bio-20 紫外分光光度计(美国 P-E 公司);凝胶密度扫描系统(美国 UVP 公司);CMIAS 真彩色病理图像分析系统(北京航天大学与空军总院共同研制);电泳-电转移系统(Mini PROTEAN System:美国 Bio-RAD 公司)。

1.1.3 实验动物 6~8 周龄健康 BALB/c 小鼠购于第三军医大学实验动物中心,体质量 18~22 g,雌雄不限。

1.2 方法

1.2.1 小鼠 BMSCs 的分离及培养 参考文献[4]方法。用随机数字表将细胞按完全随机的原则分为正常对照组,pcDNA3.1 空载体转染组和 TPO 转染组。

1.2.2 扩增、纯化质粒 pZGmpl-1081 将质粒 pZGmpl-1081 转化感受态大肠杆菌 DH5α,在含氨苄青霉素、X-gal/ IPTG 的 LB 琼脂培养基的平皿上,37 ℃培养 14 h。挑选白色单菌落,接种于 3 ml LB 培养基(含 60 μg/μl 氨苄青霉素)的试管中,于 37 ℃振荡过夜。收集菌液,柱离心法提取并纯化质粒。

1.2.3 脂质体法转染小鼠 BMSCs 按 Lipofectamine 2000 说明书操作。

1.2.4 RT-PCR 法检测小鼠 BMSCs TPO mRNA 的表达 收获转染 pZGmpl-1081(转染后 72 h)、pcDNA3.1 空载体(转染后 72 h)及正常小鼠 BMSCs,用 Tripure 常规一步法抽提细胞总 RNA,并按 RT-PCR 试剂盒说明配置反应体系,在 PCR 仪中进行反应。PCR 引物分别为:TPO 正义:5′-GGTGGACTTCCTCCTTCTCC-3′,反义:5′-TCGCTAGCTGCTCTGATGAA-3′(合成长度 405 bp)。GAPDH 正义:5′-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3′,反义:5′-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3′(合成长度 195 bp)。PCR 反应循环参数为:94 ℃变性 5 min →94 ℃变性 30 s→57 ℃退火 30 s→72 ℃延伸 50 s 的热循环,共 35 次。扩增产物在 1.5 % 琼脂糖凝胶上电泳分析。

1.2.5 免疫组化染色法测定小鼠 BMSCs TPO 蛋白的表达

采用 S-P 法,严格按照试剂盒说明书操作:将正常小鼠 BMSCs 及转染 TPO cDNA 的 BMSCs 细胞爬片用冰丙酮固定 10 min,3 % H_2O_2 孵育 5 min,以消除内源性过氧化酶活性。蒸馏水冲洗,PBS 浸泡 5 min;在细胞玻片上加 5% ~10% 山羊血清,置室温下 10 min;倾去血清加特异性一抗工作液,湿盒中 4 ℃过夜。第 2 天 PBS 充分冲洗,滴加 1∶100 生物素标记二抗,湿盒中 37 ℃下放置 30 min;PBS 冲洗 3 次,加 1∶100 辣根过氧化酶标记的链霉卵白素,置湿盒中 37 ℃下 30 min;PBS 冲洗,新配制的 DAB 液显色。自来水充分冲洗后,递度乙醇脱水,二甲苯透明,光学树脂封片,显微镜下观察。阳性对照采用自身对照;阴性对照采用 PBS 取代第一抗体,其余步骤及试剂不变。阳性结果判断以细胞内出现棕黄色颗粒为阳性。图像分析采用全自动图像分析仪在 200 倍视野下,于每张细胞片的上、下、左、右和中间随机选 5 个视野,测量 100 个细胞内棕黄色阳性颗粒的平均光密度值。

1.2.6 Western blot 检测小鼠 BMSCs TPO 蛋白的表达 ①蛋白提取和定量 分别往正常对照组,pcDNA3.1 空载体转染组(转染后 72 h)及 TPO 转染组(转染后 72 h)每个 250 ml 培养瓶各加入 2 ml 冰冷的细胞裂解液,收集细胞裂解液至 EP 管中,1 500 × g 4 ℃离心 10 min,取上清用紫外分光光度计进行蛋白定量。②SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE):根据目的蛋白分子质量大小选择 8 % 的分离胶和 3 % 的浓缩胶进行 SDS-PAGE。电泳后用 R250 考马斯亮蓝染色,脱色液脱色,用凝胶成像系统扫描并观察结果。③Western blot 用半干电转仪按说明书将蛋白转移至 PVDF 膜,0.02 % 的氨基黑中快速染色,漂洗 PVDF 膜,加封闭液封闭 90 min。然后加入以 1∶1 000 封闭液稀释的一抗,4 ℃过夜。含 0.05 % Tween220 的 TBS 洗膜 5 min ×3。室温下与结合有 HRP 的二抗孵育 90 min。二抗用封闭液稀释至 1∶1 000。含 0.05 % Tween220 的 TBS 洗膜 5 min ×3,再用 TBS 洗膜 5 min。将膜置 ECL 中显色,直至显出清晰条带。结果用凝胶成像系统扫描存盘。

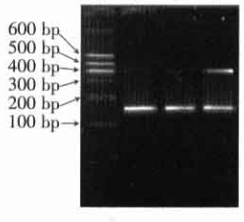
1.3 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 医学统计软件包进行 t 检验和单因素方差分析。

2 结果

2.1 半定量 RT-PCR 结果

RT-PCR 后,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,在 405 bp 处各组均显示出 TPO 阳性电泳带(图 1)。TPO 与 GAPDH(195 bp) mRNA 的光密度比值间比较,正常对照组为(0.17 ± 0.01)、pcDNA3.1 空载体转染组为(0.18 ± 0.02)、TPO 转染组为(0.62 ± 0.04),正常对照组与 TPO 转染组两组间差异显著(t = 102.51;P < 0.01);正常对照组与 pcDNA3.1 空载体转染组两组间无显著性差异(t = 1.75;P > 0.05)。



1: DNA Marker; 2: Normal control; 3: pcDNA3.1; 4: TPO cDNA

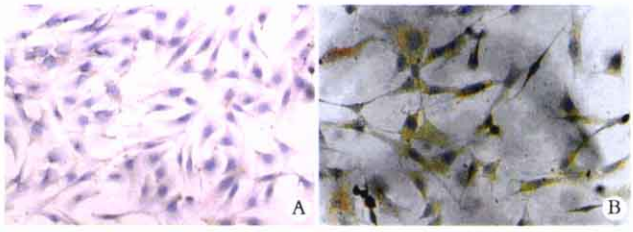
图 1 小鼠骨髓基质细胞 TPO mRNA 的表达

Fig 1 Expression of TPO mRNA in mouse BMSCs

2.2 免疫组化结果

免疫组化普通镜检发现 TPO cDNA 转染后的 BMSCs 中 TPO 在其胞浆内表达呈棕黄色颗粒状物质,随抗体孵育时间的延长而染色逐渐加深。胞核未见表达或偶见表达。正常对照组及 pcDNA3.1 空载体转染组 BMSCs 阳性细胞数明显减少(图 2)。图像分析显示,TPO 转染组 TPO 光密度值为(0.57 ± 0.03),正常对照组为(0.19 ± 0.01),pcDNA3.1 空载体转染组为(0.20 ± 0.02),TPO 转染组是正常对照组的 3.06 倍,两组间差异显著(t = 34.57,P < 0.01)。pcDNA3.1 空载体转染组与

正常对照组间无显著性差异（$t=0.95$，$P>0.05$）。



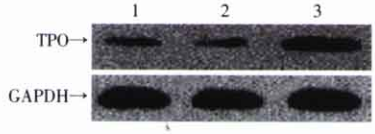
A：Normal；B：At 72 h after TPO transfection

图 2　正常组及转染 TPO cDNA 组小鼠 BMSCs TPO 蛋白的表达（S-P×200）

Fig 2　Expression of TPO protein in mouse BMSCs（S-P×200）

2.3　Western blot 结果

TPO 蛋白表达（TPO/GAPDH IOD 比值）在正常对照组为（0.30±0.04），pcDNA3.1 空载体转染组为（0.28±0.04），TPO 转染组为（0.74±0.06）。TPO 转染组与正常对照组、TPO 转染组与 pcDNA3.1 空载体组相比差异均显著（分别为 $t=16.96$，$P<0.01$；$t=17.64$，$P<0.01$），3 组间差异显著（$F=233.44$，$P<0.01$）（图 3）。



1：Normal control；2：pcDNA3.1；3：TPO cDNA

图 3　小鼠骨髓基质细胞 TPO 蛋白的表达

Fig 3　Expression of TPO protein in mouse BMSCs

3　讨论

对于大剂量化疗及造血干细胞移植后引起的血小板减少，临床上依赖输注血小板悬液，但长期输注血小板有可能带来许多严重副作用，如：体内产生血小板抗体、乙型、丙型肝炎、甚至 AIDS。长期以来人们一直在寻找促进血小板快速恢复的方法，早在 1958 年，Kelemen 就提出 TPO 的概念，认为 TPO 是调节血小板生成的一种激素样因子，随后几十年来研究者发现 TPO 在体内外均具有刺激巨核细胞增殖、促进血小板生成作用。1994 年 De Sauvage 等[5]克隆出 TPO 蛋白，并阐明了其 cDNA 结构和氨基酸序列。最近的研究表明，TPO 在巨核细胞分化过程中还介导 GP6 转录的脱甲基化作用[6]。Kirito 等[7]研究发现，从 TPO(－/－)小鼠分离纯化的 sca-1(＋)/c-kit(＋)/Gr-1(－)骨髓细胞，其血管内皮生长因子（VEGF）的含量明显减少，而给予 TPO 后原始造血细胞 VEGF 的表达明显升高。如今人们开始尝试将 TPO 用于基因治疗以促进血小板生成。而骨髓基质细胞是造血微环境的主要成分，易体外培养和扩增，外源基因的表达可持续较长的时间，并且其代谢活力高，有利于重组蛋白的分泌，是基因治疗理想的靶细胞之一。

本实验通过体外将携带外源基因 TPO cDNA 的真核表达载体转染 BMSCs，系统地探讨 TPO 在转录水平及蛋白水平表达的变化，结果表明转染空载体组及未转染的正常 BMSCs 组其 TPO mRNA 的表达量很弱，这与文献[8]所报道的 TPO 主要由肝脏实质细胞、窦状隙内皮细胞以及肾近曲小管上皮细胞分泌，骨髓基质细胞有少量分泌一致，但转染 TPO 基因组其 TPO mRNA 的表达量明显增加，并有统计学意义。免疫组化结果显示，TPO 基因组 BMSCs 中 TPO 阳性表达产物较正常 BMSCs 组及空载体组有显著差异。对此我们进一步进行蛋白定量检测，Western blot 结果表明：TPO 转染组与 control 组、TPO 转染组与空载体组相比差异均显著，即 TPO 基因转染 BMSCs 后，BMSCs 分泌的 TPO 蛋白量明显增多。因此我们推测若将 TPO 基因修饰的 BMSCs 回输体内，血液循环中的 TPO 水平可能会上升，作用于靶器官从而发挥其生理作用，促进血小板生成、参与造血调控。这对于进一步进行动物实验、研究 TPO 基因修饰的 BMSCs 回输经致死剂量照射小鼠在促进血小板早期恢复、造血早期重建方面具有重要的理论和临床意义。

参考文献：

[1] Drachman J G. Role of thrombopoietin in hematopoietic stem cell and progenitor regulation [J]. Curr Opin Hematol, 2000, 7(3): 183－190.

[2] Fujiwara T, Harigae H, Kameoka J, *et al*. A case of familial thrombocytosis: possible role of altered thrombopoietin production [J]. Am J Hematol, 2004, 76(4): 395－397.

[3] Anklesaria P, Sakakeeny M A, Klassen V, *et al*. Expression of a selectable gene transferred by a retroviral vector to hematopoietic stem cells and stromal cells in murine continuous bone marrow cultures[J]. Exp Hematol, 1987, 15(2): 195－202.

[4] 孔佩艳，郭朝华，常　诚，等. CD34 抗原在小鼠造血基质细胞的表达及其意义[J]. 重庆医学，2002，31(1)：19－21.

[5] De Sauvage F J, Hass P E, Spencer S D, *et al*. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand[J]. Nature, 1994, 369(6481): 533－538.

[6] Kanaji S, Kanaji T, Jacquelin B, *et al*. Thrombopoietin initiates demethylation-sed transcription of GP6 during megakaryocyte differentiation [J]. Blood, 2005, 105(10): 3888－3892.

[7] Kirito K, Fox N, Komatsu N, *et al*. Thrombopoietin enhances expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in primitive hematopoietic cells through induction of HIF-1alpha[J]. Blood, 2005, 105(11): 4258－4263.

[8] Sungaran R, Markovic B, Chong B H. Localization and regulation of thrombopoietin mRNA expression in human kidney, liver, bone marrow, and spleen using *in situ* hybridization[J]. Blood, 1997, 89(1): 101－107.

（编辑　栾　嘉）