论著

文章编号:1000-5404(2006)17-1756-03

腺病毒介导HO-1基因转染肾小管上皮细胞及对PBMC增殖影响的实验研究

戴卫华, 吴雄飞, 金锡御 (第三军医大学西南医院肾科,重庆 400038)

提 要: 目的 观察Ad-HO-1感染对HK-2细胞存活率的影响,探讨表达目的蛋白血红素氧化酶-1(HO-1)的HK-2细胞能否有效降低外周血单个核细胞(peripheral blood monoeuclear cell,PBMC)增殖反应活性。**方法** Ad-HO-1按感染强度(multiplicity of infection,MOI)100、200和400分别转染人肾小管上皮细胞株(HK-2)3 h,转染2 d后观察绿色荧光蛋白的表达,转染2、4 d后进行活细胞计数(台盼蓝染色法)。激光共聚焦法检测HO-1和GFP蛋白在HK-2中的表达,Western Blot检测HK-2细胞HO-1蛋白表达,^{3}H-TdR法检测HK-2转染后抑制PBMC增殖能力。**结果** 重组腺病毒Ad-HO-1(MOI 200)感染HK-2细胞2 d后90%的细胞表达绿色荧光,2、4 d时活细胞百分率与对照组无显著差异。激光共聚焦检测表达GFP的细胞均表达HO-1蛋白,位置分布基本一致。Western blot检测显示HK-2感染Ad-HO-1后有能与HO-1单抗特异性结合的蛋白免疫印迹条带,对PBMC增殖能力有显著抑制作用。**结论** Ad-HO-1能介导HO-1目的蛋白的表达,具有抑制PBMC增殖的生物学活性。

关键词: 血红素氧化酶-1;基因转染

中图法分类号: R322.61; R392.12; R967 **文献标识码**: A

Transfection of Ad-HO-1 on renal tubular epithelial cell HK-2 and its effect on PBMC proliferation

DAI Wei-hua, WU Xiong-fei, JIN Xi-yu (Department of Kidney, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the cytotoxicity of Ad-HO-1 and its capacity of mediating the expression of HO-1 in cultured HK-2 cells. **Methods** The HK-2 cells were infected by Ad-HO-1 with 100, 200 and 400 MOI for 3 h, followed by the green fluorescence observation 2 days later. The live cells ratio was detected 2 and 4 days later. The expression of HO-1 and GFP in HK-2 were detected under laser scan confocal microscope. The expression of HO-1 was detected by Western blot analysis. ^{3}H-TdR was used to assay the ability of HO-2 cells infected with Ad-HO-1 to inhibit the PBMC proliferation. **Results** Over 90% HK-2 cells expressed green fluorescence after infected by Ad-HO-1 (MOI 200) for 2 days. The live cell ratio at 2 and 4 days had not any difference from those of the control group. The expressions of HO-1 and GFP in the Ad-HO-1 transfected HK-2 cells were determined under laser scan confocal microscope. The locations of these two proteins were the same. HK-2 cells infected by Ad-HO-1 had protein immune blot strap combined with HO-1 antibody. When the MOI of Adv-HO-1 was 0.01, 0.1, 1 and 10, the proliferative capacity of PBMC was inhibited significantly. **Conclusion** The stable expression of HO-1 mediated by Ad-HO-1 in cultured tubular epithelial cells can inhibit the cell proliferation of PBMC.

Key words: HO-1; gene transfer

HO-1系统可保护细胞免受氧化刺激损伤,减轻缺血再灌注损伤,维持微循环稳定。有实验证实,HO-1可改变移植器官P、E选择素的表达,减轻白细胞浸润,并通过下调iNOS发挥抗排斥效应。肾小管上皮细胞不仅可作为T细胞的效应靶分子,也可作为抗原递呈细胞影响T细胞的活性[1,2],构建的HO-1基因重组腺病毒载体(Ad-HO-1)转染肾小管上皮细胞能否产生良好的转染率和正确的基因产物以及在体外能否有

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170436)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30170436)

作者简介:戴卫华(1974-),男,湖南省益阳市人,博士,主治医师,主要从事肾移植后慢性肾病方面的研究。电话:(023)68754188

通讯作者:吴雄飞,电话:(023)68754188,E-mail: wuxfei@126.com

收稿日期:2005-10-08;**修回日期**:2006-01-10

效的降低 T 淋巴细胞的增殖反应是本课题的关键[3,4]。为此，本研究采用 Ad-HO-1 感染体外培养的人肾小管上皮细胞（HK-2），从 2 个方面探讨其生物学功能：观察 Ad-HO-1 感染 HK-2 后对细胞存活率的影响，探讨表达目的蛋白的 HK-2 细胞能否有效降低外周血单个核细胞（peripheral blood monoeuclear cell，PBMC）增殖反应活性。

1　材料与方法

1.1　主要试剂及设备

HO-1 表达基因腺病毒（滴度为 5×10^{10} pfu/ml，本课题组构建），人肾小管上皮细胞株 HK-2（西南医院刘宏博士惠赠），PE 标记兔抗鼠 HO-1 单抗、Biotin 标记兔抗鼠 HO-1 单抗、辣根过氧化酶标记抗生物素（HRP-Avidin）购自美国 Pharmingen 公司。激光共聚焦显微镜（Leica 德国），Mini VE Completel 蛋白电泳系统（Pharmacia 英国）。

1.2　细胞培养

HK-2 细胞培养于高糖型 DMEM 培养基中，培养条件为 37 ℃，5% CO_2，胰酶/EDTA 消化传代。

1.3　实验方法及检测指标

1.3.1　Ad-HO-1 感染 HK-2 细胞后绿色荧光蛋白表达观察　HK-2 细胞以 1×10^5 细胞/孔接种 6 孔培养板，培养 24 h 后 37 ℃ 下用 Ad-HO-1 按感染强度（multiplicity of infection，MOI）100、200 和 400 分别转染 HK-2 细胞 3h，更换培养液后继续培养，荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达。

1.3.2　Ad-HO-1 对 HK-2 细胞存活率影响的观察　同法按 MOI 为 100、200 和 400 的 Ad-HO-1 对 HK-2 转染 3 h，于转染后 2、4 d 观察细胞形态变化，台盼蓝染色法计活细胞百分率，观察 6 次取均值。对照组为同批培养的未转染细胞。

1.3.3　激光共聚焦检测 HK-2 中 HO-1 和 GFP 表达　HK-2 细胞培养于预置一载玻片的培养皿中 24 h，用 MOI 为 100 的 pAdEasy- HO-1 腺病毒感染 3 h，更换培养液后继续培养 24 h，以激光共聚焦法检测 HO-1 和 GFP 蛋白在细胞中的表达：细胞爬片 4% 多聚甲醛固定，1% BSA 封闭 30 min，加 PE-抗鼠 HO-1 单抗（1∶400）37 ℃ 湿盒孵育 30 min，甘油封片，激光共聚焦显微镜下观察。

1.3.4　Western blot 检测转染后 HK-2 细胞 HO-1 蛋白表达　提取已经感染 Ad-HO-1 3d 的 HK-2 和对照组（感染 Ad-GFP 腺病毒）细胞总蛋白。采用 PIERCE 公司的 BCA Protein Assay Kit 试剂盒提取细胞总蛋白，考马斯亮蓝法（波长 595 nm）测定样品蛋白浓度，调整蛋白浓度至 5 mg/ml，各时相点取 10 μl 样品，上样后恒压 120 V 电泳，硝酸纤维素膜恒流（100 mA）电转 4 h，将硝酸纤维素滤膜浸于 Bloking buffer 室温封闭 60 min，先后与特异性一抗工作液、辣根过氧化物酶偶联的二抗（1∶28 000）、增强化学发光底物反应液孵育，暗室中胶片感光、显影及定影。

1.3.5　HK-2 转染后抑制人外周血单个核细胞（PMBC）增殖能力检测（^{3}H-TdR 法）　本实验分阴性对照组（不加影响因素）、转空载体组（感染 Ad-GFP 腺病毒）和感染组（感染 Ad-HO-1 腺病毒）。常规法获取健康人外周血单个核细胞，调整细胞密度至 1×10^6/ml。以腺病毒平均感染复数（MOI）为 0.001、0.01、0.1、1、10 的 Ad-GFP 和 Ad-HO-1 感染 3 h 后的 HK-2 作为刺激细胞，调整细胞浓度为 1×10^6/ml，经丝裂霉素处理后，分别以 50 μl/孔加入 3 个复孔。加入浓度为 1×10^6/ml 的人外周血单个核细胞 100 μl 培养 96 h，结束前 18 h 加 ^{3}H-TdR 0.5 微居里/孔，细胞收集器收集细胞于滤纸上，液闪计数 CPM 值。按下式进行计算：

$$\text{刺激指数(SI)}=\frac{^3\text{H 实验组测定值(CPM)}-\text{阴性对照测定值}}{\text{阳性对照测定值}-\text{阴性对照测定值}}$$

1.4　统计学处理

所得数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 11.5 统计软件进行组间 t 检验分析。

2　结果

2.1　Ad-HO-1 感染 HK-2 后绿色荧光蛋白表达结果

Ad-HO-1 按感染强度（multiplicity of infection，MOI）100、200 和 400 分别转染 HK-2 细胞，绿色荧光蛋白表达率分别为 15%、90% 和 100%（图 1）。

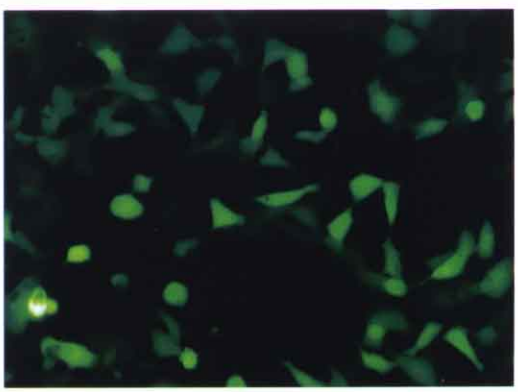


图 1　Adv-HO-1（MOI 200）感染后 2 d 后 HK-2 绿色荧光表达情况　（荧光显微镜 ×200）

2.2　Ad-HO-1 对 HK-2 存活率影响的观察结果

MOI 为 100、200 和 400 的 Ad-HO-1 对 HK-2 转染 3 h，培养后 2、4 d 时未见如 293 细胞的形态变化，活细胞所占百分率与对照组相比无显著差异（$P>0.05$）（表 1）。

表 1　Adv-HO-1 对 HK-2 存活率影响的观察结果（%，$\bar{x}\pm s$）

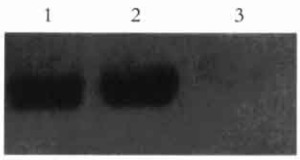
组别	转染后 2 d	转染后 4 d
对照组	96.1 ± 2.1	88.1 ± 2.4
100 MOI	96.9 ± 2.3	89.4 ± 2.7
200 MOI	93.5 ± 2.0	86.2 ± 2.0
400 MOI	94.8 ± 2.4	87.3 ± 2.9

2.3 共聚焦显微镜检测 HK-2 感染 Ad-HO-1 后 GFP 和 HO-1 表达

激光共聚焦检测结果显示，表达 GFP 的细胞均表达 HO-1 蛋白，绿色荧光与红色荧光的强弱分布位置基本一致，都分布在细胞质中。

2.4 Western blot 检测 HK-2 感染 Ad-HO-1 后 HO-1 表达结果

Ad-HO-1 感染 HK-2 后用 Western blot 检测显示 HK-2 有能与抗鼠 HO-1 单抗特异性结合的蛋白免疫印迹条带，而 Ad-GFP 感染的 HK-2 无特异条带，表明该蛋白条带系 Ad-HO-1 感染 HK-2 细胞后产生的(图 2)。



1,2：转染 Ad-HO-1 腺病毒的 HK-2 细胞；3：转染空载体 Ad-GFP 的 HK-2 细胞

图 2 Ad-HO-1 转染 HK-2 的 Western Blot 分析

2.5 HK-2 感染 Ad-HO-1 后刺激 PBMC 增殖结果

HK-2 感染 Ad-HO-1 后(MOI 为 0.01、0.1、1、10 时)对 PBMC 增殖刺激能力有显著抑制作用(表 2)。

表 2 HK-2 感染 Ad-HO-1 后对 PBMC 增殖刺激能力的影响(CPM)

组别	腺病毒感染强度				
	0.001	0.01	0.1	1	10
阴性对照组	130 ± 63	130 ± 63	130 ± 63	130 ± 63	130 ± 63
空载体组	5 600 ± 574	5 600 ± 574	5 600 ± 574	5 600 ± 574	5 600 ± 574
HO-1 转染组	3 678 ± 476[a]	1 462 ± 281[b]	709 ± 181[b]	301 ± 90[b]	237 ± 83[b]

a：$P<0.05$；b：$P<0.01$，与空载体组比较

3 讨论

目前所广泛应用的第一代腺病毒载体因其病毒蛋白引起的机体免疫反应以及以非基因组 DNA 存在的形式使其介导的外源基因不能在机体靶细胞内长期表达，这是其应用的限制条件之一。在本课题的载体构建中采用了新的构建系统，为了观察我们所构建的腺病毒在细胞中的表达情况，我们进行了体外实验研究。有实验研究表明 HO-1 的表达是移植物存活所必须的[5,6]，因此，转染前后的 HK-2 对比细胞存活、生存如未发现明显差别，则能说明该载体具有很高的安全性。首先，经过转染的 HK-2 细胞能否表达目的蛋白是我们必需了解的，所以我们使用 Western Blot 检测经 Ad-HO-1 和 Ad-GFP 转染的 HK-2 细胞所获蛋白样品。结果显示 HK-2 细胞中含有与抗鼠 HO-1 单抗特异性结合的蛋白免疫印迹条带，而对照细胞相应位置无阳性特异条带，表明该蛋白条带系 Ad-HO-1 转染 HK-2 细胞后产生的蛋白 HO-1。Western Blot 检测表明，目的基因蛋白可以在 HK-2 细胞中正常表达。

考虑到体外腺病毒感染实质性器官的实际情况，即实质器官结构复杂性使得腺病毒很难在肾脏各部分均匀分布，以及为了保证肾脏的生物学功能而只能在低温下进行肾脏的感染等这些因素严重削弱了腺病毒对实质性器官的有效感染效率。因此，我们希望在体外能模拟体内状况，在低感染效率的情况下观察基因靶细胞抑制 PBMC 增殖能力。Ad-HO-1 转染后对 PBMC 增殖的影响结果表明，Ad-HO-1 能显著抑制 PBMC 增殖能力，对照组与 Ad-HO-1 组相比较，有非常显著性差别。本研究中，感染 HK-2 细胞效率低到一定程度，Ad-HO-1 即不能有效抑制靶细胞刺激淋巴细胞增殖能力，这表明如果体外感染供体肾的效率低于一定程度，基因治疗可能起不到任何作用，在 MOI 为 1 和 10 时，两组均对 PBMC 增殖刺激能力有显著性抑制，两组之间无统计学差异，这表明最有效的方法是提高感染效率。

参考文献：

[1] SERINSOZ E, BOCK O, GWINNER W, *et al*. Local complement C3 expression is upregulated in humoral and cellular rejection of renal allografts [J]. Am J Transplant, 2005, 5(6): 1490 - 1494.

[2] NORONHA I L, OLIVEIRA S G, TAVARES T S, *et al*. Apoptosis in kidney and pancreas allograft biopsies [J]. Transplantation, 2005, 79(9): 1231 - 1235.

[3] ZHANG X, SHAN P, JIANG D, *et al*. Small interfering RNA targeting heme oxygenase-1 enhances ischemia-reperfusion-induced lung apoptosis [J]. J Biol Chem, 2004, 279(11): 10677 - 10684.

[4] WU G, MARIN-GARCIA J, ROGERS T B, *et al*. Phosphorylation and hypoxia-induced heme oxygenase-1 gene expression in cardiomyocytes [J]. J Card Fail, 2004, 10(6): 519 - 526.

[5] PILEGGI A, MOLANO R D, BERNEY T, *et al*. Prolonged allogeneic islet graft survival by protoporphyrins [J]. Cell Transplant, 2005, 14(2 - 3): 85 - 96.

[6] BEDARD E L, JIANG J, PARRY N, *et al*. Peritransplant treatment with cobalt protoporphyrin attenuates chronic renal allograft rejection [J]. Transpl Int, 2005, 18(3): 341 - 349.

(编辑 薛国文)