文章编号:1000-5404(2008)03-0189-03

论著

外源性人端粒酶逆转录酶基因转染对正常人毛乳头细胞的影响

刘官智,伍津津,朱堂友,鲁元刚,杨亚东,杨桂红 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所皮肤科,重庆市创伤愈合与组织工程研究所,重庆 400042)

摘 要:目的 研究外源性人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)基因转染对体外培养正常人毛乳头细胞的影响。方法 采用脂质体转染法,将 hTERT 基因导入体外培养的正常人毛乳头细胞,经 G418 筛选得到阳性克隆,连续传代培养。检测转染细胞内 hTERT 基因的整合和表达情况,初步分析转染细胞的生物学特性。结果 转染后获得 1 个阳性细胞克隆,扩大培养后细胞生长良好,传代次数增加,已连续传至 35 代。检测证实转染细胞内 hTERT 基因在 DNA、mRNA 和蛋白质水平均有表达,且此转染细胞具有体外培养正常毛乳头细胞的生物学特性。结论 外源性 hTERT 基因转染可以延长体外培养正常人毛乳头细胞的寿命且可保持其正常的生物学特性。

关键词:毛乳头细胞;端粒酶;人端粒酶逆转录酶;转染
中图法分类号:R322.99;R345.5;R394.2 文献标识码:A

Effect of human telomerase reverse transcriptase gene transfection on human dermal papilla cells

LIU Guan-zhi, WU Jin-jin, ZHU Tang-you, LU Yuan-gang, YANG Ya-dong, YANG Gui-hong (Department of Dermatology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene on normal human dermal papilla cells. Methods The hTERT gene was introduced into cultured normal human dermal papilla cells by Liposome-mediated transfection, then the positive cells were selected with G418. After the positive cells were passaged on, the integration and expression of hTERT gene were detected and the biological characteristics of the transfected cells were analyzed. Results A positive cell clone was selected, and the 35th passage of transfected dermal papilla cells was obtained so far. Expression of hTERT gene was detected on DNA, mRNA and protein levels. The transfected cells possess the biological characteristics of normal human dermal papilla cells. Conclusion The lifespan of normal human dermal papilla cells can be extended by hTERT gene transfection, and the transfected cells keep the normal biological characteristics.

Key words: dermal papilla cells; telomerase; human telomerase reverse transcriptase; transfection

毛乳头细胞在毛囊生长发育和周期性再生调控中起主导作用[1-4]。研究毛乳头细胞生物学功能变化的调控机制对毛囊生物学有重大意义[3,5]。在通常的体外培养条件下,毛乳头细胞经过十几次的传代后就会停止增殖,发生衰老和死亡,因此极大地限制了其研究和应用。将外源性人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)基因转入目的细胞,可诱导细胞端粒酶活性,延缓细胞衰老,甚至使细胞永生化,是目前建立永生化细胞系的一种常用手段[6]。因此,我们应用基因转染技术,将外源性 hTERT 基因导入体外培养的正常人头皮毛乳头细胞,以期延长毛乳头细胞的寿命,甚至使细胞逾越危机期,实现永生化。

基金项目:国家自然科学基金(30570972)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30570972)
作者简介:刘官智,男,四川省自贡市人,博士研究生,主治医师,主要从事毛囊细胞生物学和组织工程皮肤方面的研究。电话:(023)68757819,E-mail:liuguanzhi2005@sina.com
通信作者:伍津津,电话:(023)68757817,E-mail:wjjjj@163.com
收稿日期:2007-05-29 修回日期:2007-09-03

1 材料与方法

1.1 材料

正常人头皮取自 1 位整形美容门诊手术患者(患者已签署知情同意书),女性,30 岁。hTERT 荧光真核表达载体 pIRES2-EGFP-hTERT(hTERT 全长 cDNA 克隆至 pIRES2-EGFP 荧光真核表达载体的 *Eco*R Ⅰ 酶切位点之间),由第三军医大学西南医院消化内科杨仕明教授惠赠。主要试剂:DMEM、胎牛血清购自 Gibco 公司,Lipofectamine™2000 转染试剂盒购自 Invitrogen 公司,*Taq* DNA 酶、RT-PCR 试剂盒、DL 2000 DNA 标准购自 TaKaRa 公司,免疫印迹试剂盒购自碧云天生物技术研究所,人血管内皮生长因子(VEGF) ELISA 试剂盒购自晶美生物公司,hTERT 多克隆抗体、α 平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin, α-SMA)单克隆抗体购自中杉公司。

1.2 方法

1.2.1 毛乳头细胞的分离与培养 采用伍津津等[7]的酶消

化法分离培养毛乳头细胞。

1.2.2 基因转染及阳性克隆的筛选 扩增并提取质粒，将产物按其构建时的方法进行酶切鉴定[6]。将培养的第3代毛乳头细胞接种至6孔板，按Lipofectamine™2000说明书进行基因转染。24 h后传代，48 h后倒置荧光显微镜下观察荧光，部分细胞有绿色荧光蛋白表达后，加入400 μg/ml的G418进行筛选，待对照组未转染细胞全部死亡后，将G418浓度降为200 μg/ml继续维持筛选，直至出现阳性细胞克隆，滤纸片法将细胞克隆移至24孔板扩大培养。

1.2.3 PCR检测hTERT基因整合 提取第3代未转染毛乳头细胞、第30代转染毛乳头细胞和HeLa细胞的基因组DNA，HeLa细胞为阳性对照。hTERT上游：5′-CGGAAGAGTGTCTG-GAGCAA-3′，下游：5′-GGATGAAGCGGAGTCTGGA-3′，PCR产物145 bp。反应条件：95 ℃预变性5 min；PCR循环：94 ℃ 30 s，53 ℃ 45 s，72 ℃ 1 min，30个循环，最后72 ℃延伸10 min。PCR产物以2%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.4 RT-PCR检测hTERT mRNA表达 提取第3代未转染毛乳头细胞、第30代转染毛乳头细胞和HeLa细胞的总RNA，逆转录反应合成cDNA。hTERT引物序列及产物大小同1.2.3，内参照GAPDH上游：5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′，下游：5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′，PCR产物452 bp。反应条件同1.2.3，PCR产物以2%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.5 Western blot检测hTERT蛋白表达 取第3代未转染毛乳头细胞、第30代转染毛乳头细胞和HeLa细胞，制备蛋白样品，电泳、转膜后，以hTERT多克隆抗体为一抗，行免疫印迹检测。

1.2.6 生物学特性鉴定

1.2.6.1 细胞形态学观察 在倒置显微镜下观察转染毛乳头细胞和未转染毛乳头细胞的形态。

1.2.6.2 细胞生长曲线测定 将第3代未转染毛乳头细胞和第30代转染毛乳头细胞接种于24孔板，每孔细胞数1.5×10^4。隔日计数1次，根据细胞数绘制其生长曲线。

1.2.6.3 α-SMA免疫组化染色 取第3代未转染毛乳头细胞和第30代转染毛乳头细胞，行常规细胞爬片，采用S-P免疫组化试剂盒、DAB显色试剂盒，按说明书进行操作。

1.2.6.4 染色体核型分析 取第30代转染毛乳头细胞，加入终浓度为0.4 μg/ml的秋水仙素，37 ℃培养4 h，收集细胞，经低渗、固定、制片后行Giemsa染色，油镜观察。

1.2.6.5 ELISA法检测VEGF水平 收集第3、9代未转染毛乳头细胞和第30代转染毛乳头细胞的培养上清，采用人VEGF ELISA试剂盒测定VEGF含量。

1.3 统计学处理

计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 13.0统计软件对毛乳头细胞上清中VEGF水平进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 转染阳性克隆的筛选

转染48 h后在倒置荧光显微镜下观察，部分毛乳头细胞核见均一绿色荧光（图1）。加入400 μg/ml的G418进行筛选，第2天即有部分细胞死亡，第10天未转染细胞全部死亡，而转染细胞仍有部分细胞存活，将G418浓度降为200 μg/ml继续维持筛选，3周后出现1个阳性细胞克隆。扩大培养后细胞生长良好，增殖能力强，现已连续传至35代，传代中细胞生长增殖速度无明显变化。

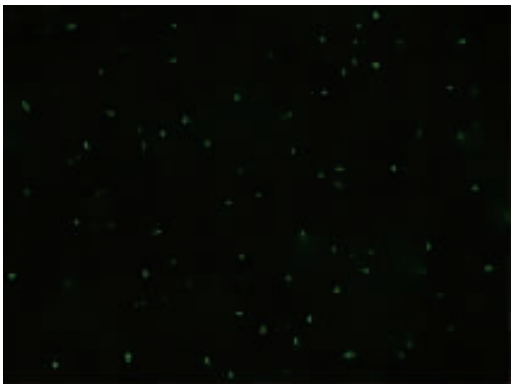
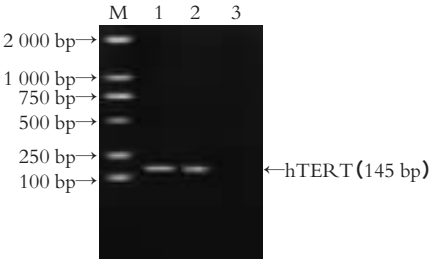


图1 转染后绿色荧光蛋白在细胞中的表达
（倒置荧光显微镜×40）

2.2 PCR检测hTERT基因整合

PCR产物电泳鉴定结果显示，转染毛乳头细胞和HeLa细胞扩增后均可见145 bp的hTERT特异性条带，而未转染毛乳头细胞未扩增出任何条带（图2）。表明hTERT基因已稳定整合入转染毛乳头细胞的基因组中。

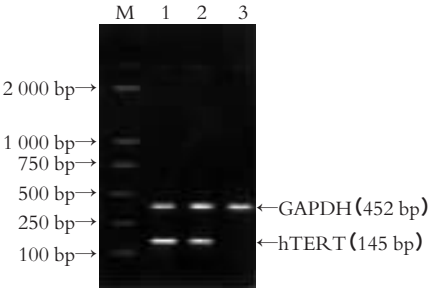


M：DNA标准（DL 2000）；1：HeLa细胞；2：转染毛乳头细胞；3：未转染毛乳头细胞

图2 细胞基因组DNA中hTERT基因PCR产物电泳图

2.3 RT-PCR检测hTERT mRNA表达

所有细胞均有452 bp的内参照GAPDH特异性扩增条带，转染毛乳头细胞和HeLa细胞扩增后有145 bp的hTERT特异性条带，而未转染毛乳头细胞未扩增出hTERT特异性条带（图3）。表明转染毛乳头细胞稳定表达hTERT mRNA。



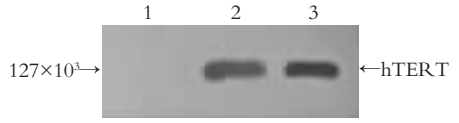
M：DNA标准（DL 2000）；1：HeLa细胞；2：转染毛乳头细胞；3：未转染毛乳头细胞

图3 hTERT基因RT-PCR产物电泳图

2.4 Western blot检测hTERT蛋白表达

结果显示转染毛乳头细胞和HeLa细胞在相对分子质量127

$\times 10^3$处见 hTERT 蛋白特异性条带，而未转染毛乳头细胞无此蛋白条带（图 4）。表明转染毛乳头细胞稳定表达 hTERT 蛋白。



1：未转染毛乳头细胞；2：转染毛乳头细胞；3：HeLa 细胞

图 4　hTERT 蛋白 Western blot 检测结果

2.5　生物学特性鉴定

2.5.1　细胞形态学观察　　倒置显微镜下见转染毛乳头细胞呈梭形，细胞质丰富，随着细胞数目增多，逐渐出现融合前凝集性生长，与未转染毛乳头细胞形态和生长特性基本相同。

2.5.2　细胞生长曲线　　细胞生长曲线显示转染毛乳头细胞生长速度较未转染毛乳头细胞明显提高（图 5）。表明外源性 hTERT 基因转染对毛乳头细胞生长增殖有促进作用。

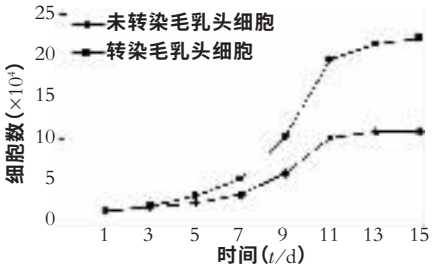


图 5　毛乳头细胞生长曲线

2.5.3　α-SMA 免疫组化染色　　免疫组化显示转染毛乳头细胞和未转染毛乳头细胞细胞质 α-SMA 染色均阳性。

2.5.4　染色体核型分析　　转染毛乳头细胞的核型显示，共 23 对染色体，其中含 XX 性染色体，仍为二倍体细胞，染色体形态结构正常。

2.5.5　毛乳头细胞上清中 VEGF 水平　　结果显示，第 3 代未转染毛乳头细胞和第 30 代转染毛乳头细胞上清中分泌的 VEGF 水平无显著差异［（399.51 ± 61.79）、（347.75 ± 72.93）pg/ml，$P > 0.05$］，但均显著高于第 9 代未转染毛乳头细胞上清中分泌的 VEGF 水平［（214.88 ± 61.69）pg/ml，$P < 0.01$］。

3　讨论

细胞永生化是指细胞获得持续生长增殖能力的特性。此过程包含端粒维持机制的激活和某些生长调控通路的改变，因此永生化细胞系不仅具有无限的生长增殖潜力，还表现出生长增殖速度的提高。细胞自发性永生化的概率非常小，而人类细胞则更罕见。因此，学者们通过基因转染等技术将外源性永生化基因转入目的细胞内，以增加永生化的发生概率，进而建立永生化细胞系。

hTERT 基因在衰老中的作用是近年研究热点，它对端粒酶的激活起关键作用。当外源性 hTERT 基因转入目的细胞并有效表达后，可激活细胞端粒酶，维持端粒长度，使细胞染色体稳定而直接逾越危机期，发生永生化[8]。hTERT 基因介导的永生化细胞系已逾越危机期，且保留了更多正常细胞的生物学特征，同胚胎干细胞一样，是真正意义上的永生化。目前应用 hTERT 基因已建立了许多永生化细胞系[9]，但尚少见应用 hTERT 基因构建永生化人毛乳头细胞的相关报道。

我们利用基因转染技术，将外源性 hTERT 基因导入体外培养的正常人毛乳头细胞，经 G418 筛选获得阳性细胞克隆。扩大培养后细胞生长良好，增殖速度较未转染毛乳头细胞明显提高，且传代次数增加，现已连续传至 35 代，传代中细胞生长增殖速度无明显变化。通过 PCR、RT-PCR 及 Western blot 法检测证明 hTERT 基因已稳定整合入毛乳头细胞的基因组中，在 mRNA 和蛋白质水平稳定表达。进一步研究其生物学特性，结果显示，转染毛乳头细胞形态和生长特性与未转染毛乳头细胞基本相同，α-SMA 染色阳性，染色体核型正常，表明其具有体外培养正常毛乳头细胞的特征而无转化特征。毛乳头细胞可分泌多种细胞因子，对毛囊生长发育、周期性调控及毛发生长起重要作用，VEGF 是毛乳头细胞分泌的多种细胞因子之一，我们以毛乳头细胞培养上清中分泌的 VEGF 水平来代表其分泌功能，研究结果显示转染后长期传代的毛乳头细胞上清中 VEGF 水平与低代未转染毛乳头细胞无显著差异，但较高代未转染毛乳头细胞显著增高，表明转染毛乳头细胞具有正常毛乳头细胞的分泌功能。

本研究表明，外源性 hTERT 基因转染可以延长体外培养正常人毛乳头细胞的寿命且可保持其正常的生物学特性。但这些细胞能否真正实现永生化，以及这些细胞在长期传代过程中外源性基因是否会丢失，其生物学特性和功能是否会发生改变等，还需要进一步研究。

参考文献：

[1] Roh C, Tao Q, Lyle S. Dermal papilla-induced hair differentiation of adult epithelial stem cells from human skin[J]. Physiol Genomics, 2004, 19(2): 207 – 217.

[2] Rendl M, Lewis L, Fuchs E. Molecular dissection of mesenchymal-epithelial interactions in the hair follicle[J]. PLoS Biol, 2005, 3(11): e331.

[3] Botchkarev V A, Kishimoto J. Molecular control of epithelial-mesenchymal interactions during hair follicle cycling[J]. J Investing Dermatol Symp Proc, 2003, 8(1): 46 – 55.

[4] 朱堂友，郝　飞，伍津津，等. 人毛囊细胞来源双层皮肤替代物的构建和组织学特征[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(12): 1187 – 1189.

[5] 宋志强，阎　衡，李春兰，等. 休止期毛乳头细胞差异表达基因的分析[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(7): 665 – 667.

[6] Chang M W, Grillari J, Mayrhofer C, *et al*. Comparison of early passage, senescent and hTERT immortalized endothelial cells[J]. Exp Cell Res, 2005, 309(1): 121 – 136.

[7] 伍津津，刘荣卿，叶庆佾，等. 毛乳头细胞高效培养方法探索[J]. 中华皮肤科杂志, 1997, 30(6): 383 – 385.

[8] Yeager T R, Reddel R R. Constructing immortalized human cell lines[J]. Curr Opin Biotechnol, 1999, 10(5): 465 – 469.

[9] Fujita T, Otsuka-Tanaka Y, Tahara H, *et al*. Establishment of immortalized clonal cells derived from periodontal ligament cells by induction of the hTERT gene[J]. J Oral Sci, 2005, 47(4): 177 – 184.

（编辑　龙　亮）