文章编号:1000-5404(2008)05-0417-04

论著

强力霉素可调控的双重稳定表达 AT2R 的骨髓间充质干细胞的建立

苗 莉[1],景 涛[1],何国祥[1],蒋清安[1],刘建平[1],冉擘力[1],王海东[2] (第三军医大学西南医院:[1]心血管内科,重庆市介入心脏病学研究所,[2]胸心外科,重庆 400038)

摘 要:目的 构建四环素类抗生素可调控的双重稳定表达 AT2R 的骨髓间充质干细胞。方法 将四环素可调控系统(Tetracycline-on, Tet-on)的 4 种质粒用脂质体转染法连续两个回合转染体外培养的大鼠骨髓间充质干细胞并抗性筛选,分别采用发光计检测不同细胞克隆荧光素酶活性改变以及 RT-PCR 法检测 AT2R 目的基因表达情况,根据各个细胞克隆受强力霉素调控表达的程度,筛选出高诱导、低背景表达目的基因 AT2R 的骨髓间充质细胞系,并检测在不同浓度(0 ~ 10^4 ng/ml)强力霉素干预下以及转染后不同时间(0 ~ 8 周)目的基因的蛋白表达情况。结果 连续两个回合的转染及筛选后获得的引入 Tet-on 系统的细胞系,高诱导低背景表达 AT2R,在强力霉素诱导下 48 h 内可以使 AT2R 表达显著增加,强力霉素在一定浓度范围内可以诱导 AT2R 的表达呈剂量依赖性的增加,且至少在 8 周内保持稳定。结论 构建的含四环素调控系统的骨髓间充质干细胞系诱导活性可靠,使外源 AT2R 基因的表达处于有效的主动控制下。

关键词:AT2R;间充质干细胞;强力霉素;可调控表达
中图法分类号:R329.2;R394-33;R978.14 文献标识码:A

Dual-stable expression of angiotensin Ⅱ type 2 receptor gene medicated by doxycycline regulatable system of mesenchymal stem cells

MIAO Li[1], JING Tao[1], HE Guo-xiang[1], JIANG Qing-an[1], LIU Jian-ping[1], RAN Bo-li[1], WANG Hai-dong[2] ([1]Department of Cardiology, [2]Department of cardiothoracis surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct mesenchymal stem cells (MSCs) of Dual-stable expression of angiotensin Ⅱ type 2 receptor (AT2R) gene medicated by tetracycline regulatable system. Methods Rat MSCs were transfected twice successively with tetracycline induced regulatable system by DOTAP liposomal transfection reagent. The luciferase protein activity was detected in different cell clones by luminometer and the expression of AT2R mRNA was evaluated by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) respectively. According to the expression levels regulated by doxycycline in different cell clones, the MSC line was filted with high induction and low background. The expression of AT2R in MSCs was evaluated in different concentration of doxycycline (0 – 10^4 ng/ml) and time after transfection (0 – 8 weeks) by western blot. Results The expression rate of AT2R in double stable MSCs was increasing significantly by addition of doxycycline in a concentration-dependent manner by western blot, and the high expression was detected at 48 h after induced by doxycycline and could keep up over 8 weeks. Conclusion The well established double stable MSC lines make the AT2R gene under the active control of doxycycline and can be used as a good model to study the biological effect of AT2R.

Key words: angiotensin Ⅱ type 2 receptor; mesenchymal stem cells; doxycycline; regulatable expression

近来研究表明血管紧张素Ⅱ2 型受体(angiotensin Ⅱ type 2 receptor, AT2R)在血管内膜损伤后对细胞的增殖迁移有明显的负性影响,使损伤血管增强表达 AT2R 可能有利于动脉粥样硬化及再狭窄的防治[1]。但导入体内基因的表达能否被实时、定量的控制在临床治疗中甚为重要,最近几年已有一系列人工控制系统出现,其中四环素可调节系统具有严密开或关的基因诱导表达作用,并且高效、无毒,已被成功的

基金项目:国家自然科学基金(30400180);第三军医大学中青年基金(2004)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30400180) and the Program for the Young Scholars of Third Military Medical University (2004)
作者简介:苗 莉,女,河南省郑州市人,博士,主治医师,主要从事冠心病的发病机制及防治方面的研究。电话:(023)68765171,E-mail:miaoliwhd@163.com
通信作者:景 涛,E-mail:a65427862@online.cta.cq.cn
收稿日期:2007-11-12;修回日期:2008-01-02

应用于部分细胞中基因的诱导表达研究[2]。本研究引入 Tet-on 系统[3,4]，通过连续 2 个回合的筛选，获得高诱导、低背景表达 AT2R 的大鼠骨髓间充质干细胞系(mesenchymal stem cells，MSC)，为进一步在体的研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 质粒和细胞

调节质粒 pUHD17-1 hyg 及荧光报告质粒 pUHC 13-3 由 Ronnstrand L. 博士(瑞典，Ludwing Institute for Cancer Research)赠送 携带新霉素抗性基因片段质粒 pSV2neo 由 Park H. Y 教授(美国，波士顿大学医学院)赠送，应答质粒 pUHD10-3/AT2R 由本研究室构建，经酶切鉴定和测序鉴定证实基因片段完全正确。余 3 种成分组成的 Tet-on 哺乳动物调控表达系统在前期工作中已进行酶切鉴定。大鼠 MSC 用密度梯度离心法由大鼠骨髓中分离并培养后鉴定获得。

1.2 调节质粒 pUHD17-1 hyg 稳定转染 MSC

按 DOTAP 脂质体转染试剂盒(Roche 公司)说明书的要求将载体质粒 pUHD17-1 hyg 转染生长融汇至 50% 的 MSC，48 h 后加入潮霉素 B(50 μg/ml)选择性培养基，3～4 d 换液 1 次，直至 14 d 左右出现阳性克隆。挑选分离 30 个较大的阳性克隆，命名为潮霉素抗性 MSC1～30 号，大量扩增并冻存。

1.3 潮霉素抗性 MSC 荧光素酶诱导表达及分析

将 30 个不同潮霉素抗性细胞克隆分为加或不加强力霉素(1 μg/ml)组。用 DOTAP 脂质体转染试剂，将荧光报告质粒 pUHC 13-3 瞬时转染导入筛选出的潮霉素抗性 MSC 克隆。同时按分组加入强力霉素(1 μg/ml)，转染后培养 48 h。按照荧光素酶活性检测试剂盒(Sigma 公司)说明书的要求检测荧光素酶表达情况。简要步骤：350 μl 1×细胞裂解液充分裂解细胞，取 20 μl 细胞裂解物与 100 μl 荧光素酶反应底物混合，发光计(Promega 公司)检测荧光素酶活性。重复 5 次。得到高诱导、低背景 Tet-on 细胞系，大量扩增并冻存。

1.4 pUHD10-3/AT2R 与 pSV2neo 共转染 Tet-on 细胞系

将应答质粒 pUHD10-3/AT2R 与携带新霉素抗性基因片段的筛选质粒 pSV2neo 按 5∶1 的比例混合后，按 DOTAP 脂质体转染试剂盒说明书的要求转染前面获得的高诱导、低背景 Tet-on 细胞系。48 h 后加入 G418(100 μg/ml)选择性培养基，至 14 d 左右出现阳性克隆。挑选分离 30 个较大的阳性克隆，命名为 G418 抗性 MSC1～30 号，大量扩增并冻存。

1.5 建立强力霉素(Doxycycline，Dox)诱导双重稳定表达 AT2R 基因 MSC 细胞系

转染后 30 个不同 G418 抗性 MSC 克隆，分别分为加或不加强力霉素组。按分组给予强力霉素(1 μg/ml)48 h 后，检测 AT2R mRNA 表达情况(RT-PCR)。简要步骤：Trizol 试剂盒(Promega 公司)提取细胞总 RNA，取 10 μg 总 RNA 进行逆转录，再取 1 μg 逆转录产物进行 PCR 扩增。AT2R 引物序列(707 bp)：正义 5′-TGATAATCTCAACGCAACTGG-3′和反义 5′-TCAAGACTTGGTCACGGGTAA-3′。以三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH，452 bp)的 PCR 作为内参照。扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上进行电泳分析。

1.6 双重稳定 MSC 细胞系在强力霉素干预下 AT2R 蛋白表达检测

实验分组：①对照组、转染后无强力霉素干预组、强力霉素干预 48 h 组及 72 h 组(1 μg/ml)；②转染后未经强力霉素干预组、转染后不同浓度干预 72 h 组(10^{-3}、10^{-2}、0.1、1、10、10^2、10^3、10^4 ng/ml 8 个不同浓度)；③转染后 1 周未经强力霉素干预组、转染后强力霉素干预组(1 μg/ml)表达持续时间(1～8 周)。免疫印迹简要步骤：细胞用 Tripure™ 试剂盒(Promega 公司)提取总蛋白，用 Bradford 法定蛋白浓度，SDS-PAGE 电泳分离，再电转移至 PVDF 杂交膜，并以兔抗 AT2R 多抗(1∶500，Santa Cruz 公司)为第一抗体，辣根过氧化物酶标记的羊抗兔(1∶5 000，Sigma 公司)为二抗，碱性磷酸酶显色，凝胶扫描成像系统进行分析，免疫细胞化学染色检测时一抗工作浓度为 1∶400，阴性对照用 PBS 代替一抗工作液，激光共聚焦显微镜下观察及图像分析。蛋白表达量用 Intensity (INT)表示。

1.7 统计学方法

数据资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间差异比较采用 t 检验，多样本均数比较采用方差分析。

2 结果

2.1 潮霉素抗性细胞系荧光素酶诱导表达结果

含潮霉素抗性基因的调节质粒 pUHD17-1 hyg 转染 MSC 后，经潮霉素筛选，14 d 左右形成阳性克隆，同时伴大部分细胞死亡。将筛选出的 30 个细胞克隆用荧光报告质粒 pUHC 13-3 瞬间转染后，分别检测有或无强力霉素干预的情况下荧光素酶的表达情况，结果发现 5 号克隆背景低，加入强力霉素诱导表达明显增高，最符合要求(表 1)。故选择 5 号克隆大量扩增后进行下一步的实验。

表 1 部分潮霉素抗性细胞克隆强力霉素干预对荧光素酶活性的影响($n=5$)

克隆编号	Dox 干预前	Dox 干预后	增长倍数
1	$(5.57 \pm 0.79) \times 10^3$	$(4.61 \pm 0.90) \times 10^{4a}$	8.27
5	$(1.58 \pm 0.12) \times 10^3$	$(2.96 \pm 0.32) \times 10^{5a}$	187.34
18	$(2.21 \pm 0.30) \times 10^3$	$(7.11 \pm 0.34) \times 10^{4a}$	32.17
23	$(1.61 \pm 0.08) \times 10^4$	$(4.50 \pm 0.41) \times 10^4$	2.80
26	$(5.69 \pm 0.73) \times 10^3$	$(2.13 \pm 0.46) \times 10^{5a}$	37.43

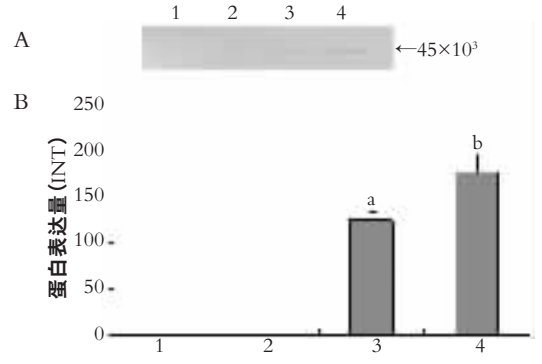
a：$P<0.05$，与 Dox 干预前比较

2.2 30 个 G418 抗性的细胞系 AT2R mRNA 表达结果

经 G418 筛选出 30 个细胞克隆，图像分析显示未受到强力霉素干预情况下 21 号克隆背景表达低，在强力霉素(1 μg/ml)干预后 AT2R mRNA 表达增加程度最为显著[吸光度值分别为 (0.02 ± 0.004)，(1.56 ± 0.20)，$P<0.05$]，诱导倍数为 78 倍。最终筛选出 21 号克隆作为强力霉素诱导双重稳定表达 AT2R 基因的细胞系。

2.3　强力霉素诱导双重稳定表达 AT2R 基因的细胞系蛋白表达结果

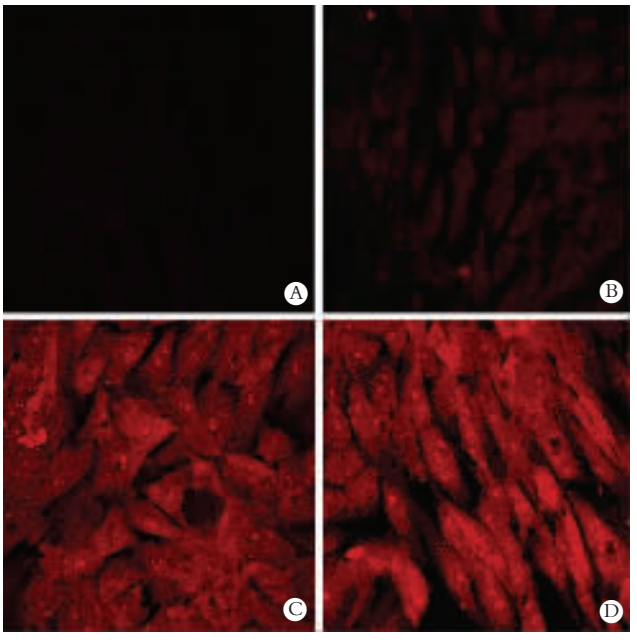
免疫印迹法检测 AT2R 蛋白在双重稳定 MSC 中的表达发现,未转染对照组(图 1,图 2A)及转染组未经强力霉素干预(图 1,图 2B)检测不到 AT2R 蛋白,转染后经强力霉素 1 μg/ml 干预 48 h 后 AT2R 蛋白被显著诱导表达($P<0.05$)(图 1,图 2C),干预 72 h 后表达进一步增强[与 48 h 组比较,差异显著($P<0.05$)](图 1,图 2D)。对转染后可诱导表达的持续性检测结果显示,在转染后 1、2、4、6、8 周,该细胞系中 AT2R 蛋白表达均在强力霉素(1 μg/ml)干预下被显著诱导表达,其表达强度不受时间延长的影响[与对照组比较,差异显著($P<0.05$),转染后各组间比较,差异显著($P>0.05$,图 3)]。对转染细胞在不同浓度强力霉素干预下检测发现,强力霉素在一定浓度范围内呈剂量依赖性的增加 AT2R 蛋白诱导表达量,在 10^2 ng/ml 时达到峰值,更高浓度的强力霉素作用下表达量反而降低(组间比较 $P<0.05$,图 4)。



A:电泳结果;B:定量分析结果

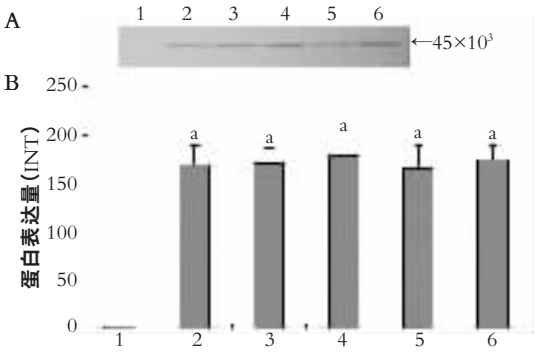
1:未转染组;2:转染组 Dox(-);3:转染组 Dox 干预 48 h;4:转染组 Dox 干预 72 h;a:$P<0.05$,与 2 比较;b:$P<0.05$,与 3 比较

图 1　Dox 诱导 AT2R 蛋白表达的时相性



A:未转染组;B:转染组 Dox(-);C:转染组 Dox 干预 48 h;D:转染组 Dox 干预 72 h

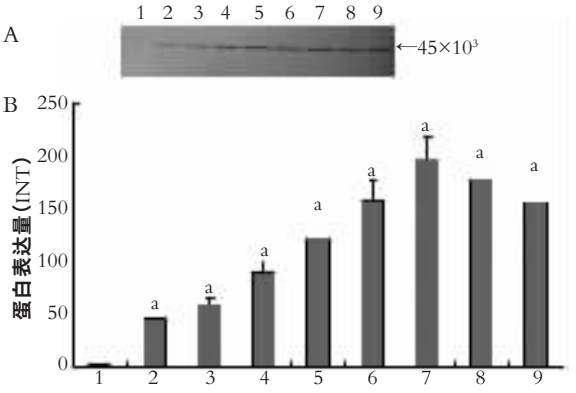
图 2　双重稳定 MSC 细胞中 AT2R 的表达　(激光共聚焦显微镜 ×400)



A:电泳结果;B:定量分析结果

1:转染后 1 周未经 Dox 干预组;2~6:分别为转染后 1、2、4、6、8 周经 Dox 1 μg/ml 干预组;a:$P<0.05$,与 1 比较

图 3　Dox 诱导 AT2R 蛋白表达的持续性



A:电泳结果;B:定量分析结果

1:转染后未经干预组;2~9:分别为 10^{-3}~10^4 ng/ml 不同浓度 Dox 干预组;a:$P<0.05$,与 1 比较

图 4　不同浓度 Dox 干预下 AT2R 蛋白的表达

3　讨论

近来体内外的系列研究显示 AT2R 具有抗血管平滑肌细胞增殖的作用,使其表达增加可以拮抗血管损伤后内膜的过度增生,我室的前期研究亦显示,通过腺病毒转染 AT2R 使损伤的大鼠颈总动脉内膜增殖减轻[5]。但在正常情况下,AT2R 在心血管组织中表达极少,若引入的 AT2R 基因表达处于无调控状态,将可能造成严重后果。因此,我们期望能够主动控制引入体内的靶基因的表达。

Tet-on 基因表达系统由 Gossen 等[6]于 1995 年成功构建,该系统在构建时引入了人类巨细胞病毒启动子及单纯疱疹病毒的 VP16 活性功能域,因此,专门用于哺乳动物细胞表达的调控。该系统使用两个嵌合结构使目的基因置于四环素可调控启动子的控制下[6,7]。四环素类抗生素作为细胞中的"基因开关",可以在时间上准确地进行控制,强力霉素是这一调节系统中最为有效的诱导因子。本研究中所用的 Tet-on 系统由四个质粒组成:调节质粒 pUHD17-1 hyg,含小的人类巨细胞病毒启动子和嵌合的四环素-诱导反式作用因子(Tetracycline induced transactivator,rtTA)编

码序列;荧光报告质粒 pUHC 13-3 含四环素操纵基因序列及荧光素酶基因;筛选质粒 pSV2neo 携带新霉素抗性基因片段;含目的基因 AT2R 的应答质粒 pUHD10-3/AT2R。为获得理想的实验结果,必须仔细筛选 Tet-on 表达克隆,因为在不同的阳性克隆中 rtTA 的最大表达量存在差异。本实验通过连续 2 个回合的转染和筛选,最大程度地屏弃那些无强力霉素诱导就有较高目的基因"泄露"及强力霉素诱导后增长倍数低的细胞克隆,最终建立起具有低背景、高诱导表达特点的由强力霉素诱导调控的双重稳定表达 AT2R 基因 MSC 细胞系。对该细胞系进行强力霉素干预可在48 h 内迅速诱导 AT2R 表达,干预后 72 h 表达进一步增强,并且这种表达强度在 8 周内不受时间延长的影响。而且强力霉素在一定浓度范围内呈剂量依赖性的增加 AT2R 的诱导表达量。说明该细胞系导入的目的基因受到强力霉素的良好调控,可以实现对 AT2R 表达的时间及水平有效的控制。

MSC 具有多向分化潜能以及容易通过转基因技术获得目标基因并在体内外长期表达,且取材方便,不存在组织配型及免疫排斥问题,是基因治疗中接受目标基因的优秀载体细胞[8,9]。本研究以 MSC 作为载体平台,使 AT2R 的表达受到强力霉素的良好调控,为下一步实现将 AT2R 引入体内长期表达并有效调控打下基础。

参考文献:

[1] Sales V L, Sukhova G K, Lopez-Ilasaca M A, *et al*. Angiotensin type 2 receptor is expressed in murine atherosclerotic lesions and modulates lesion evolution[J]. Circulation, 2005, 112(21):3328-3336.

[2] Garrick M D, Kuo H C, Vargas F, *et al*. Comparison of mammalian cell lines expressing distinct isoforms of divalent metal transporter 1 in a tetracycline-regulated fashion[J]. Biochem J, 2006, 398(3):539-546.

[3] Toniatti C, Bujard H, Cortese R, *et al*. Gene therapy progress and prospects: transcription regulatory systems[J]. Gene Ther, 2004, 11(8):649-657.

[4] Koponen J K, Kankkonen H, Kannasto J, *et al*. Doxycycline-regulated lentiviral vector system with a novel reverse transactivator rtTA2S-M2 shows a tight control of gene expression *in vitro* and *in vivo*[J]. Gene Ther, 2003, 10(6):459-466.

[5] 唐 兵,何国祥,李 德,等. 血管紧张素Ⅱ2型受体介导抑制大鼠颈动脉新生内膜增生的机制[J]. 中国循环杂志,2006,21(2):148-151.

[6] Gossen M, Freundlieb S, Bender G, *et al*. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells[J]. Science, 1995, 268(5218):1766-1769.

[7] Stieger K, Le-Meur G, Lasne F, *et al*. Long-term doxycycline-regulated transgene expression in the retina of nonhuman primates following subretinal injection of recombinant AAV vectors[J]. Mol Ther, 2006, 13(5):967-975.

[8] Kanki-Horimoto S, Horimoto H, Mieno S, *et al*. Implantation of mesenchymal stem cells overexpressing endothelial nitric oxide synthase improves right ventricular impairments caused by pulmonary hypertension[J]. Circulation, 2006, 114(1 Suppl):I181-I185.

[9] Shyu K G, Wang B W, Hung H F, *et al*. Mesenchymal stem cells are superior to angiogenic growth factor genes for improving myocardial performance in the mouse model of acute myocardial infarction[J]. J Biomed Sci, 2006, 13(1):47-58.

(编辑 邓强庭)

(上接416页)

3 讨论

LASIK 手术是近几年来发展起来并逐步趋向完善的一种角膜屈光手术,因其效果稳定、视力恢复快、并发症少、复发率低,已成为治疗近视和散光最常用的方法之一[1,2]。但在治疗高度近视散光患者时,LASIK 也存在术后屈光度过矫、欠矫、回退及术后视觉质量下降等问题,对此目前临床上尚无一种切实有效的解决手段。随着飞点扫描准分子激光系统的临床推广,小光斑飞点扫描准分子激光系统联合红外线制导眼球自动跟踪治疗近视和高度散光时,克服了患者术中转眼带来的不良后果。其光斑小,频率快,大大减少了术后角膜皱折和眩光等并发症的发生率。ALLEGRETTO 酷眼准分子激光光斑只有 0.95 mm,治疗近视和高度近视散光,患者术后视力恢复快,稳定快,无偏心切削、中心岛形成及不规则散光。应用飞点扫描准分子激光对高度及超高度近视进行多区切削,可节省角膜厚度,有较好的临床效果及较高的预测性和安全性[3]。卢林德等[4]也报道了小光斑飞点扫描主动眼球跟踪准分子激光行 LASIK 术治疗近视的效果好,安全性高。

本研究表明,采用小光斑飞点扫描准分子激光系统矫正不同程度近视所伴随的高度近视散光术后各时期未见明显最佳矫正视力丢失,安全性值得肯定;其术后不同时期裸眼视力与术前比较均有显著提高,但在术后中、远期超高度近视组(≥ -10.00 D)的裸眼视力与≤ -6.00 D 组比较存在统计学差异,其远期疗效较中低度组差。从手术的预测性来看,3 组术后 12 个月预计矫正柱镜屈光度和实际矫正柱镜屈光度均有很好相关性,但组间比较中低度组优于超高度组。而在稳定性方面,各组术后中远期柱镜屈光度均未见明显波动,也说明采用小光斑飞点扫描准分子激光系统矫正高度散光可以获得稳定的术后疗效。因此,采用小光斑飞点扫描切削模式治疗高度近视散光具有较好的安全性、有效性、预测性和稳定性,但与以往大光斑切削模式比较,其在改善视觉质量方面的优势如何,尚待进一步研究。

关键词:小光斑飞点扫描;LASIK;高度近视散光
中图法分类号:R779.63 文献标识码:B

参考文献:

[1] 孙晓萍, 邓应平. 准分子激光原位角膜磨镶术后角膜扩张[J]. 眼科新进展, 2007, 27(6):463-467.

[2] 胡春明, 阴正勤, 汪 辉, 等. 儿童高度近视性屈光参差 LASIK 术后视力屈光度及角膜地形图分析[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(15):1517-1519.

[3] 王泽欧, 赵英杰, 顾雪芬. 应用飞点扫描准分子激光多区切削矫正高度及超高度近视的效果分析[J]. 中国实用眼科杂志, 2006, 24(8):859-861.

[4] 卢林德, 杨 斌, 覃小平, 等. 小光斑飞点扫描准分子激光治疗近视的疗效观察[J]. 广西医科大学学报, 2005, 22(1):89-90.

(编辑 王 红)