文章编号:1000-5404(2008)19-1821-03

论著

connexin43 基因体外转染大鼠 L6 骨骼肌成肌细胞的研究

王 多[1,2] 张 雷[1],邵素霞[1],吕 萍[1],张金平[1],崔 轶[3] ([1]河北医科大学组织胚胎学教研室,石家庄 050017;[2]河北师范大学生命科学学院动物学教研室,石家庄 050016;[3]河北青年管理干部学院信息技术与传播系,石家庄 050031)

摘 要:目的 将含有 connexin 43 基因的质粒在脂质体的介导下转染进入大鼠 L6 骨骼肌成肌细胞,使用 G418 根据有限稀释法筛选单克隆细胞株 L6 myoblast-Cx43。**方法** 通过免疫细胞化学技术、Western blot 技术,对整合有 connexin43 基因的阳性细胞克隆进行检测。**结果** 两个阳性克隆组 Cx43 蛋白表达均明显高于对照组。**结论** 获得的两个持续高表达 connexin43 蛋白的细胞株可用于进行移植细胞之间及移植细胞与宿主细胞之间能否形成良好的电偶联的研究。

关键词: connexin43; 骨骼肌成肌细胞; 基因表达; 转染; 细胞克隆
中图法分类号: R322.74; R394-33; R394.3 **文献标识码:** A

Transfecting connexin 43 into rat L6 skeletal myoblast *in vitro*

WANG Duo[1,2], ZHANG Lei[1], SHAO Su-xia[1], LU Ping[1], ZHANG Jin-ping[1], CUI Yi[3] ([1]Institute of Histology and Embryology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, [2]Department of Laboratory Animals, College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016; [3]Department of Infromation Technology and Communication, Hebei Youth Administration Cadre College, Shijiazhuang 050031, China)

Abstract: Objective To transfect pBillneo-connexin43 (Cx43) plasmids into L6 skeletal myoblasts mediated by cationic liposome. Methods L6 myoblast-Cx43 monoclone cells were selected by using G418. The expression of connexin 43 was analyzed by immunocytochemical staining and Western blot. Results Two L6 myoblast-Cx43 cell clones were obtained, expressing Cx43 gene in higher level than that in control group. Conclusion L6 myoblast-Cx43 monoclonal engineering cell has been prepared successfully. It can be used to investigate electrical coupling between the grafted cells or between the grafted cells and the host cardiomyocytes.

Key words: connexin43; L6 skeletal myoblast; gene expression; transfection; cell clone selection

目前,骨骼肌成肌细胞已成为心梗区细胞移植研究的热点。但近年来大量研究证实由于移植细胞不能同宿主细胞形成良好的电偶联,不能同宿主心肌细胞同步收缩而导致实验动物严重心律失常[1,2]。有研究报道骨骼肌成肌细胞在成熟分化过程中 connexin43 (Cx43)蛋白的表达会逐渐减少[2]。而 Cx43 蛋白是形成心肌细胞间缝管连接的主要蛋白,心脏的电冲动正是通过缝管连接迅速传遍各心肌细胞,使心肌细胞同步节律性收缩。移植细胞、移植细胞同宿主细胞及心肌细胞之间的电信号传导有赖于缝管连接通道结构和功能的完整性,因此缝管连接蛋白表达对于实现同步收缩意义重大[3]。高量表达的 Cx43 蛋白促进了骨骼肌成肌细胞间缝管连接的形成,也促进了细胞分化。本研究旨在建立用基因工程方法改造的、能持续高量表达 Cx43 蛋白的大鼠 L6 骨骼肌成肌细胞株,为以后的相关研究提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 试剂 G418 购自 Amresco 公司;阳离子脂质体 Lipofetamine 2000 购自 Invitrogen 公司;兔抗大鼠 Cx43 蛋白多克隆抗体购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 质粒 重组质粒 pBillneo-Cx43 及空载体质粒 pBillneo 由美国 BYERE 教授惠赠,两种质粒都具有 *Eco*R Ⅰ单酶切位点、氨苄青霉素和 G418 抗性筛选基因。其中的 Cx43 基因长度为 1.7 kb,空载体为 6.9 kb。

1.1.3 细胞 大鼠 L6 骨骼肌成肌细胞株(ATTC, CRL-1458),购自上海中华细胞库。

基金项目:河北省科技厅指令计划(07276101D-129);河北医科大学 2005 年青年基金(0000039)
Supported by the Mandatory Project of Hebei Science & Technology Department (07276101D-129) and the Youth Foundation of Hebei Medical University (0000039)

作者简介:王 多,女,河北石家庄人,硕士,主要从事心脏形态学方面的研究。电话:(0311)86268842, E-mail: wangduo99317@sina.com.cn
通信作者:邵素霞,E-mail: shaosuxia502@sohu.com

收稿日期:2007-11-21;修回日期:2008-03-31

1.2 实验方法

1.2.1 质粒 pBillneo-Cx43 的提取、纯化 将携带 Cx43cDNA 的真核表达载体 pBillneo 导入大肠杆菌 DH5α 菌株,用含氨苄青霉素的 LB 平板选择阳性菌落。按天根小提质粒试剂盒和 Wizard® Purefection Plasmid DNA Purification System 操作说明进行质粒的提取纯化。

1.2.2 大鼠 L6 骨骼肌成肌细胞培养 复苏大鼠 L6 骨骼肌成肌细胞后,用 DMEM 完全培养基常规条件下培养,每 48 小时换液。为保持其理想未分化状态,当细胞达到 60% ~70% 融合时,即进行传代。

1.2.3 稳定转染 将大鼠 L6 骨骼肌成肌细胞按每孔 1×10^5 接种 6 孔培养板,培养 20 h 左右,利用脂质体试剂 Lipofectamine2000 将质粒 pBillneo-Cx43 和质粒 pBillneo 分别转入该细胞:①吸取 10 μg 质粒 DNA 滴加到 100 μl 双无 DMEM(无血清和抗生素)中轻混稀释;②将 10 μl Lipofectamine2000 滴加到 100 μl 双无 DMEM 中轻混稀释;③将稀释的 DNA 和稀释的 Lipofectamine2000 吸取到同一管中混匀,室温孵育 25 min;④将 6 孔培养板中原培养基吸弃,换成新鲜无双抗无血清的 DMEM 培养基,将 DNA-Lipofectamine2000 转染混合物滴加到培养板中,37 ℃, 5% CO_2 转染 6 h 后换成含 20% 小牛血清的 DMEM 培养基,待其生长 48 h 后,用含 G418 的 DMEM 培养液筛选。将质粒 pEGFP-N_2 以相同条件转染大鼠 L6 骨骼肌成肌细胞作为评估转染效率的参照。

1.2.4 有限稀释法筛选单克隆阳性细胞

1.2.4.1 G418 加压筛选 将已培养 48 h 转染 pBillneo-Cx43 质粒及 pBillneo 质粒的细胞用 G418(400 mg/ml)加压筛选。每隔 3 天换一次液,G418 浓度不变,维持 14 d。

1.2.4.2 筛选及扩增单克隆细胞 将筛选 14 d 混合阳性细胞消化并精确计数。稀释细胞悬液至 1 个/μl,在 96 孔板中每孔加 1 μl,然后加入含 G418(400 mg/ml)的 DMEM 培养基 200 μl。镜下观察,将只含有 1 个细胞的孔标出,该孔长出的细胞将成为单克隆细胞。获得 3 个单克隆细胞:①转染 pBillneo-Cx43 组获得 2 个单克隆细胞,分别为阳性克隆 1 组和阳性克隆 2 组;②转染 pBillneo 组获得 1 个单克隆细胞,为对照组。扩增培养,当细胞数达到一定量时,进行蛋白检测。

1.2.5 Western blot 检测筛选出的单克隆细胞 Cx43 蛋白的表达 分别提取 3 组单克隆细胞总蛋白,用考马斯亮蓝进行蛋白定量,制备不连续 SDS-聚丙烯酰胺凝胶。取各组变性胞浆蛋白上样于凝胶加样孔内,进行恒压电泳,然后进行转膜,脱脂奶粉封闭,加兔抗大鼠 Cx43 蛋白多克隆抗体,4 ℃孵育过夜,加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗,37 ℃孵育 1 h,最后显色。将显色条带扫描至计算机中,用 Scion-Image 软件对结果进行半定量分析,用任意单位 AU(Area × Density)表示凝胶谱带的面积 × 荧光强度值。

1.2.6 免疫细胞化学法检测阳性单克隆细胞中 Cx43 蛋白的表达 将获得的 3 组单克隆细胞分别爬片,用 4% 多聚甲醛固定 60 min;用 1% Triton-100 溶液浸泡,4 ℃,24 h;滴加 10% 正常山羊血清,37 ℃孵育 30 min;Cx43 特异性一抗 4 ℃孵育过夜;二抗、辣根酶标记链酶卵白素工作液 37 ℃各孵育 1 h;DAB 显色 10 min;乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片。通过Motic 6.0 图像分析软件检测阳性细胞的平均光密度。

2 结果

2.1 细胞克隆

以 EGFP 为标记显示转染效率的实验结果表明:在细胞融合度为 60% ~70%、DNA:脂质体比例为1:1、转染时间为 6 h 的条件下转染效率最高。经 G418 筛选,转染 pBillneo-Cx43 和 pBillneo 组均有细胞克隆形成,倒置显微镜下观察,两种克隆细胞仍为梭形,贴壁生长(图 1)。转染 pBillneo-Cx43 组经过有限稀释法获得 2 个细胞克隆分别为分别为阳性克隆 1 组和阳性克隆 2 组;转染 pBillneo 组经过有限稀释法获得 1 个细胞克隆,为对照组。

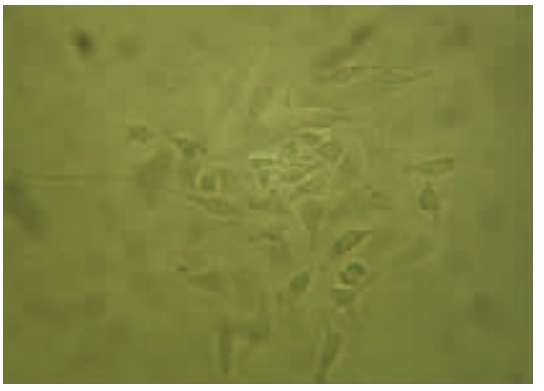
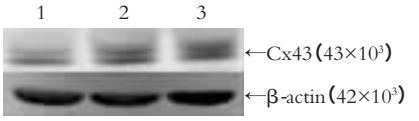


图 1 阳性克隆 1 组培养 16 d 的形态学观察 (倒置显微镜 ×400)

2.2 Western blot 检测阳性克隆细胞 Cx43 蛋白表达

Western blot 检测结果显示:阳性克隆 1 组、阳性克隆 2 组的 Cx43 蛋白表达明显高于对照组(图 2),统计结果显示组间差异显著($P<0.05$),但阳性克隆 1 组和 2 组的 Cx43 蛋白表达无明显差异(表 1)。



1:对照组;2: 阳性克隆 1 组;3:阳性克隆 2 组

图 2 Western blot 方法检测对照组、阳性克隆 1 组和阳性克隆 2 组 Cx43 蛋白表达

表 1 Western blot 半定量凝胶灰度数据分析($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	Cx43 蛋白的灰度值/β-actin 的灰度值
对照组	6	0.890 ±0.101
阳性克隆 1 组	6	2.138 ±0.168 [a]
阳性克隆 2 组	6	2.236 ±0.098 [a]

a: $P<0.05$,与对照组比较

2.3 免疫细胞化学法检测阳性单克隆细胞中 Cx43 蛋白表达

筛选出的混合阳性细胞,呈梭形,略圆钝。细胞质中出现了棕黄色的颗粒状物质,但颜色深浅不均(图 3);而对照组细胞细胞质则未见棕黄色物质(图 4)。通过 Motic 6.0 图像分析软件检测组间阳性细胞的平均光密度,结果显示两个阳性克隆组 Cx43 蛋白表达明显高于对照组,且阳性克隆 2 组 Cx43 蛋白表达明显高于阳性克隆 1 组(表 2)。



图 3　筛选出的混合阳性细胞 Cx43 蛋白免疫细胞化学结果　(S-P ×400)

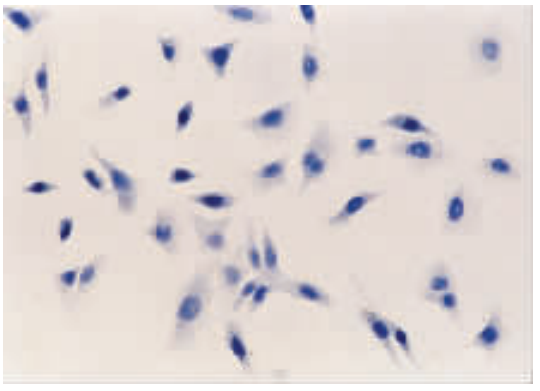


图 4　对照组细胞 Cx43 蛋白免疫细胞化学结果　(S-P ×400)

表 2　对照组、克隆 1 组和克隆 2 组 Cx43 蛋白的平均光密度数据分析($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	平均光密度值
对照组	10	0.044 ±0.012
阳性克隆 1 组	10	0.138 ±0.015[a]
阳性克隆 2 组	10	0.155 ±0.016[ab]

a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与阳性克隆 1 组比较

3　讨论

基因治疗是将目的基因转移至靶细胞内,并使基因表达,以达到治疗的目的。目前基因治疗中常用的方法有电穿孔法,磷酸钙沉淀法,病毒性载体,基因枪,脂质体转染等方法[4]。

本实验采用的是脂质体转染法,脂质体转染法是近年采用相对较多的转染方法。影响脂质体转染效率主要有以下几个因素:①转染载体大小:载体越大越不易转染进入细胞[5];②细胞密度:细胞转染时种植过密会减少细胞同脂质体-质粒复合物接触的机会;细胞种植过稀会增加脂质体-质粒复合物对细胞的毒性;③孵育时间:孵育时间过长会增加脂质体-质粒复合物对细胞的细胞毒性,过短会减少脂质体-质粒复合物进入细胞的几率;④脂质体与质粒的比率;⑤转染细胞的种类以及细胞本身的生理状态会影响到阳性脂质体介导的基因转染效率[6,7]。在本实验针对以上的影响因素进行了相应的实验条件的调整:在转染实验前 1d 接种骨骼肌成肌细胞,进行转染当天细胞应达到 60% ~ 70% 的覆盖。在转染之前应用 37℃ 新鲜的无血清培养基孵育细胞 30 min,可提高转染效率。在具体操作过程中,脂质体-质粒混合物应当尽量均匀的加入细胞培养皿。孵育时间选择为 6 h 为宜。脂质体-质粒复合物的比率为 1∶1为宜。

免疫细胞化学法和蛋白免疫印迹法结果显示阳性克隆 1 组和阳性克隆 2 组细胞 Cx43 蛋白表达明显高于对照组。免疫细胞化学法显示两个克隆组分别为对照组的 3.15 倍和 3.52 倍,且克隆 2 组明显高于克隆 1 组;蛋白免疫印迹法结果显示两个克隆组分别为对照组的 2.4 倍和 2.5 倍,虽然两组间没有显著差异,但阳性克隆 2 组仍高于阳性克隆 1 组。这一结果说明阳性克隆 2 组可以用做进一步研究的种子细胞。国外 Tolmachov 等[2]的实验结果表明采用逆转录病毒的方法可获得 Cx43 蛋白表达高于对照组 4 倍的阳性克隆细胞。本实验未达到这一效果可能有以下两个原因:①所挑取的克隆数较少,未找到高表达 Cx43 蛋白的克隆细胞;②两个实验所采用的转染方法不一样。

目前,只有少量的报道说在脂质体的介导下可以成功的将基因转入骨骼肌成肌细胞[2]。本实验成功建立了高表达 Cx43 蛋白的骨骼肌成肌细胞株,为探讨骨骼肌成肌细胞移植治疗心肌梗死及 Cx43 基因在治疗中的作用奠定了重要基础。

参考文献:

[1] Zebedin E, Mille M, Speiser M, *et al*. C2C12 skeletal muscle cells adopt cardiac-like sodium current properties in a cardiac cell environment [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 292(1): H439 – H450.

[2] Tolmachov O, Ma Y L, Themis M, *et al* . Overexpression of connexin 43 using a retroviral vector improves electrical coupling of skeletal myoblasts with cardiac myocytes *in vitro* [J]. BMC Cardiovasc Disord, 2006, 6: 25.

[3] 乔颜春,孙　青. 连接蛋白 connexin43 的研究进展[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2005, 25(4):345 – 347.

[4] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 哺乳动物培养细胞中导入克隆化基因[M]//萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南. 第 3 版. 北京:科学出版社, 2005: 1256 – 1289.

[5] Choudhary J, Grant S G. Proteomics in postgenomic neuroscience: the end of the beginning [J] . Nat Neurosci, 2004, 7(5): 440 – 445.

[6] 陈　红, 钱　坤, 张苏明. 不同转染方法及 GFP 表达载体对小鼠胚胎干细胞转染效率的比较[J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2006, 35(4): 536 – 537,541.

[7] Ahamd A, Evans H M, Ewert K, *et al*. New multivalent cationic lipids reveal bell curve for transfection efficiency versus membrane charge density: lipid-DNA complexes for gene delivery [J]. J Gene Med, 2005, 7(6): 739 – 748.

(编辑　汪勤俭)