论著

文章编号:1000-5404(2009)22-2186-03

大鼠EPO真核表达载体的构建及其在骨髓间充质干细胞中的表达

王文益,赵聪敏,廖 伟 (第三军医大学新桥医院儿科,重庆 400037)

摘 要:目的 构建表达大鼠促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)的真核表达质粒pEGFP-N1/EPO,并检测其在体外的表达。**方法** 从大鼠肾脏获得EPO基因片段并用RT-PCR方法扩增,将其连接于真核表达质粒pEGFP-N1,测序鉴定后,用脂质体包裹转染大鼠骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs),采用免疫组化和RT-PCR检测EPO的表达。**结果** 经酶切和测序鉴定证实本实验构建的重组表达质粒正确,该质粒在体外转染大鼠MSCs细胞后可表达EPO蛋白。**结论** 成功构建的pEGFP-N1/EPO重组质粒能在体外表达EPO蛋白。

关键词: 促红细胞生成素;真核表达载体;骨髓间充质干细胞;缺氧缺血性脑病
中图法分类号: R341;R394-33;R394.2 **文献标识码:** A

Construction of eukaryotic expression vector of rat EPO and its expression in bone marrow mesenchymal stem cells

WANG Wen-yi, ZHAO Cong-min, LIAO Wei (Department of Pediatrics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To construct eukaryotic expression plasmid pEGFP-N1/EPO and to detect its expression *in vitro* in order to provide experimental evidence for further study on the treatment of hypoxic-ischemic brain damage. **Methods** The total RNA was extracted from rat kidney. EPO cDNA fragment was obtained by RT-PCR amplication, inserted into pEGFP-N1 vector and identified by restriction endonuclease digestion and nucleotide sequencing. MSCs cells were transfected with the plasmid using Lipofectamine 2000. The expression of EPO protein was detected by immunohistochemistry technique and RT-PCR. **Results** Confirmed by restriction endonuclease digestion and sequencing, the recombinant plasmid contained the sequence of rat EPO gene was successfully constructed. After transfection with the plasmid, EPO protein could be expressed in MSCs cells. **Conclusion** The constructed eukaryotic expression vector pEGFP-N1/EPO can express rat EPO *in vitro*.

Key words: erythropoietin; eukaryotic expression vector; bone marrow mesenchymal stem cells; hypoxic-ischemic brain damage

促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是一种耐热的含唾液酸的酸性糖蛋白,通过EPO受体(erythropoietin receptor, EPO-R)发挥生物学效应,能促进造血祖细胞的增殖分化。近年来发现其具有阻断兴奋性氨基酸的毒性、抗神经细胞凋亡、抑制炎症反应、促进新生血管形成[1]等效应,在脑损伤的神经保护中起重要作用,已成为脑保护研究中的热点之一。

基金项目: 重庆市科委项目(2007BB5057);重庆市计生委项目(2009C175)
Supported by the Project of Chongqing Science & Technology Commission(2007BB5057) and the Project of Chongqing Family Planning Commission(2009C175)

作者简介: 王文益,男,四川省资阳市人,硕士,医师,主要从事发育早期脑损伤方面的研究。E-mail:xuehaitianshu@163.com
通信作者: 赵聪敏,电话:(023)68755602,E-mail:zhao_54@163.com
廖 伟,电话:(023)68774602,E-mail:liaowei01@163.com

收稿日期: 2009-06-13;**修回日期:** 2009-09-25

大鼠骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有来源广泛、取材方便、免疫原性低、安全性好、能分化为神经干细胞等优势。因此,我们将大鼠EPO cDNA片段连接到pEGFP-N1(-)载体,转染并测定EPO在MSCs中的表达,拟构建真核表达载体pEGFP-N1/EPO,为进一步探讨EPO对缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)大鼠的基因治疗及生物学行为改善奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

质粒pEGFP-N1(-)(卡那霉素抗性)购自Invitrogen公司,克隆宿主菌 *E. coli* Competent Cells JM109、RNA reagent反转录酶、琼脂糖、High Fidelity PrimeScript™ RT-PCR Kit、PrimeSTAR HS DNA Polymerase、PrimeSTAR HS DNA Polymerase with GC

buffer、TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0、TaKaRa DNA A-Tailing Kit、TaKaRa DNA Fragment Purification Kit Ver. 2.0、TaKaRa DNA Ligation Kit、pMD19-T Simple Vector、*Hind* Ⅲ、*Kpn* Ⅰ内切酶均购自大连宝生物公司,标准胎牛血清购自天津 TBD 公司,DMEM/F12 培养基购自美国 Hyclone 公司,Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司,质粒小量提取试剂盒及去内毒素质粒小量提取试剂盒购自北京博大泰克公司,小鼠抗大鼠 CD44、CD45、CD90 抗体购自美国 Santa 公司,山羊抗大鼠 EPO 单克隆抗体购于美国 R&D 公司,抗山羊 PV6003 二抗试剂盒购自北京中杉公司。

1.2　方法

1.2.1　目的基因的获取及 RT-PCR 扩增　　从大鼠肾脏组织中提取 EPO 的 Total RNA,由宝生物技术有限公司设计合成 4 条引物。上游引物 F:5′-AAGCTTATGGGGGTGCCCGAACG-3′,下游引物 R:5′-GGTACCGTCCTGTCCCCTCTCCTGC-3′;外围引物,上游引物 F1:5′-CAGCAGCCAGGCGCGGAGAT-3′,下游引物 R1:5′-TGGAGGGTTGGCGTGACACAGT-3′。在引物中分别加入 *Hind* Ⅲ/*Kpn* Ⅰ酶切位点。

使用 High Fidelity PrimeScript™ RT-PCR Kit,取 1 μl 大鼠肾脏组织提取的 EPO 的 Total RNA 为模板,以 R1 引物进行反转录,反应程序:65 ℃预变性 5 min,冰上放置 2 min 后,加入 PrimeScript RTase,30 ℃反转录 10 min, 42 ℃延伸 30 min,95 ℃灭活反转录酶 5 min,然后以上述的反转录液为模板,F1/R1 为引物,加入 PrimeSTAR HS DNA Polymerase 进行 PCR 扩增 ,反应程序: 94 ℃预变性 3 min,98 ℃变性 10 s,60 ℃退火 5 s,72 ℃延伸 1 min,30 个循环,末轮循环 72 ℃聚合 10 min。

因一次 PCR 结果不满意,行二次 PCR 反应。二次 PCR:取上述反应液,以 F/R 引物,使用 PrimeSTAR HS DNA Polymerase with GC buffer 进行二次 PCR 扩增。反应程序:94 ℃预变性 3 min,98 ℃变性 10 s,53 ℃退火 15 s,72 ℃延伸 30 s,30 个循环,末轮循环 72 ℃聚合 10 min。

1.2.2　PCR 产物纯化　　①使用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 切胶回收上述的 PCR 产物;②使用 TaKaRa DNA A-Tailing Kit 上 A 处理;③使用 TaKaRa DNA Fragment Purification Kit Ver. 2.0 精制,命名为 CTB865-PCR。

1.2.3　测序分析　　克隆测序:使用 TaKaRa DNA Ligation Kit 中的连接酶,将 CTB865-PCR 与 pMD19-T Simple Vector 连接后,热转化至 *E. coli* Competent Cells JM109 中,涂布平板,37 ℃过夜培养。挑选阳性菌落植菌,提取质粒并命名为 CTB865-T-1、CTB865-T-2。送宝生物公司对 CTB865-T-1、CTB865-T-2 质粒测序。测序结果表明,CTB865-T-2 质粒符合预期要求。

1.2.4　目的基因亚克隆　　用 *Hind* Ⅲ和 *Kpn* Ⅰ双酶切 CTB865-T-2 质粒及载体 pEGFP-N1 (-)。TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 切胶回收目的片段。并取 1 μl 进行琼脂糖凝胶电泳。

1.2.4.1　克隆　　使用 TaKaRa DNA Ligation Kit 中的连接酶,将目的片段与 pEGFP-N1 Vector 连接后,热转化至 *E. coli* Competent Cells JM109 中,涂布平板,37 ℃过夜培养。挑选阳性菌落植菌,提取质粒并命名为 pEGFP-N1/EPO 质粒。

1.2.4.2　酶切验证　　使用 *Hind* Ⅲ/*Kpn* Ⅰ对 pEGFP-N1/EPO 质粒进行双酶切鉴定,全量电泳,重组子插入片段的序列测定由上海生工公司协助完成。

1.2.5　pEGFP-N1/EPO 体外表达　　将呈对数生长的第 5 代(P5) MSCs 细胞以 1×10^5/孔接种于 6 孔板贴壁生长,待细胞融合达 90%时,按 Lipofectamine2000 转染常规步骤进行基因转染。转染后 24 ~ 48 h 将贴壁生长细胞行 EPO 免疫组化染色,抗山羊 PV6003 二抗试剂盒显色,免疫组化染色结果采用真彩色医学图像分析软件(Media Cybernetics 公司 Image-pro plus)进行分析,放大 100 倍,随机选择 10 个细胞质积分光密度(integrated optical density,IOD)值作为该贴壁生长细胞片染色 IOD 值,计算阳性染色积分光密度与阴性染色积分光密度的统计学差异。观察 pEGFP-N1/EPO 质粒转染后 EPO 在细胞内的表达情况。收集细胞行 RT-PCR,检测细胞中的 EPO mRNA 表达情况。

1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行两组间比较配对 t 检验。

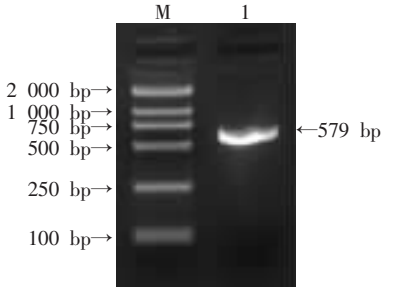
2　结果

2.1　基因扩增结果

以大鼠 EPO 的 cDNA 为模板,以 F/R 为引物进行二次 PCR,扩增得到约 579 bp 的片段(图 1)。DNA 序列测定表明扩增片段的核苷酸序列与 GenBank 上的 EPO 编码区基因完全一致。

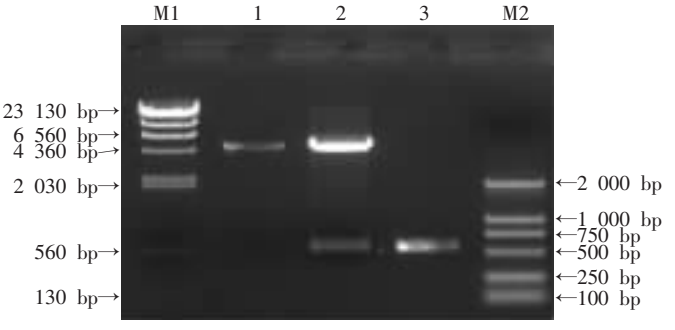
2.2　重组质粒 pEGFP-N1/EPO 的鉴定

使用 *Hind* Ⅲ/*Kpn* Ⅰ对重组质粒 pEGFP-N1/EPO 进行双酶切鉴定,全量电泳,产生和 pEGFP-N1(4.7×10^3)、EPO cDNA (579 bp)大小一致的片段(图 2)。重组质粒 pEGFP-N1/EPO 送上海生工公司测序,结果显示重组质粒 pEGFP-N1/EPO 中插入的 EPO 序列与 GenBank 上的 EPO 编码区基因完全一致。



M:DNA 标准;1:RT-PCR 产物

图 1　大鼠 EPO cDNA 琼脂糖电泳结果

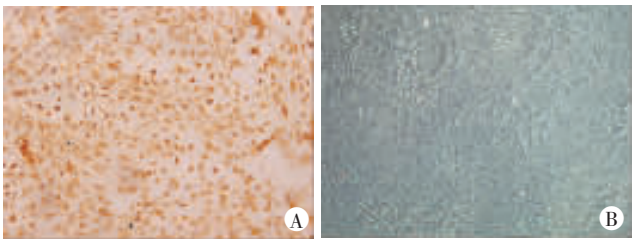


M1:λ-*Hind* Ⅲ DNA 标准;1:pEGFP-N1 Vector;2:重组质粒 pEGFP-N1/EPO 酶切结果;3:插入目的片段;M2: DNA 标准(DL 2 000)

图 2　重组质粒 pEGFP-N1/EPO 双酶切琼脂糖电泳鉴定结果

2.3 EPO 在 MSCs 细胞中的表达

重组质粒 pEGFP-N1/EPO 在脂质体 Lipofectamine 2000 介导下转染 P5 MSCs 细胞,将转染后的贴壁生长细胞行 EPO 免疫组化染色,结果显示,细胞质内呈阳性反应,未转染的贴壁生长细胞细胞质内呈阴性反应(图3)。

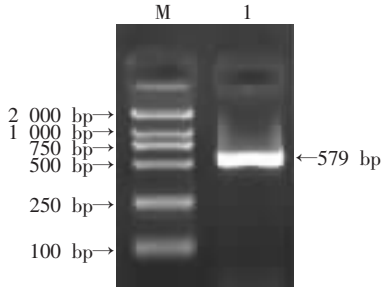


A:对照组; B:转染重组质粒组

图3 转染重组质粒 pEGFP-N1/EPO 的大鼠 MSCs EPO 的体外表达 (二步法 ×200)

免疫组化染色结果表明转染重组质粒组 EPO 表达免疫组化染色 IOD 值显著高于未转染组(分别为 201.41、193.61,$P<0.05$)。

RT-PCR 检测转染后的细胞中的 EPO mRNA 表达情况,能扩增出和目的片段大小一致的片段(图4)。说明 pEGFP-N1/EPO 质粒转染 MSCs 细胞后可表达 EPO 蛋白。



M:DNA 标准(DL 2 000);1:RT-PCR 产物

图4 转染重组质粒 pEGFP-N1/EPO 的大鼠 MSCs EPO mRNA RT-PCR 检测

3 讨论

出生窒息引起的 HIBD,常引起不可逆的组织损伤,产生永久性神经功能缺陷,是儿童脑瘫、癫痫及智力低下等神经系统伤残疾病的重要原因。我国估计有 0.2% ~0.4% 的足月儿和 60% 的早产儿或小于胎龄儿遭受围生期窒息,其中 10% ~60% 于新生儿期死亡,25% 的成活儿可呈现永久性脑损害如脑瘫、癫痫、智力低下、学习困难及视听障碍等临床后遗症,给家庭和社会带来巨大压力[2]。尽管目前临床对 HIBD 有许多治疗措施,但大多干预其发病的某单一机制,治疗效果不尽理想,特别是对中、重度 HIBD,仍然缺乏有效的治疗手段。

目前许多临床及实验研究都显示 EPO 不仅影响造血系统,而且在应激时发挥重要的机体保护作用,在脑缺血缺氧损伤时能增强神经祖细胞向脑缺血区的迁移,减少经 NMDA 受体介导的兴奋性氨基酸神经毒性作用,提高脑功能与激活 JAK 信号通路,对抗谷氨酸引起的神经胶质细胞 AQP4 的通透性增加,减轻由此所导致的脑水肿[3-5],从而减少由于缺氧缺血所造成的神经细胞死亡。然而外源性 EPO 半衰期短,较难透过血脑屏障,而临床上多次脑内注射实施困难,因此,将基因通过细胞移植导入脑内,使其在脑内持续表达,就可以发挥其神经保护作用,而且脑内的 EPO 不进入血循环,可以避免红细胞增多和纯红再障等不良反应。研究表明脑缺血后单核细胞趋化蛋白-1、巨噬细胞炎症蛋白-1、白细胞介素-8 能趋化移植的 MSCs 到达受损脑区,表达脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)和神经生长因子(nerve growth factor, NGF),调节大脑的 IL-6、Fas,使之处于一合适的水平[6,7],从而导致神经前体细胞的增殖、分化和迁移,上调脑的局部可塑性,达到改善神经功能的效果。

基于此,同时为了避免病毒性真核表达载体安全性差的风险[8,9],本实验采取了进入靶细胞后以附加体的形式存在的质粒,采用分子克隆技术,构建了 pEGFP-N1/EPO 真核表达质粒,经 PCR 鉴定、DNA 测序证明构建成功,并能体外表达 EPO;取得了令人鼓舞的阶段性结果,从而完成了重组 EPO 基因的 MSCs 移植的第一步工作,为下一步 HIBD 的临床治疗提供了坚实的实验室基础和新的治疗途径。

参考文献:

[1] George J, Shmilovich H, Deutsch V, *et al*. Comparative analysis of methods for assessment of circulating endothelial progenitor cells[J]. Tissue Eng, 2006, 12(2): 331-335.

[2] 吴圣楣. 新生儿医学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 398-399.

[3] Wang L, Zhang Z G, Zhang R L, *et al*. Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 secreted by erythropoietin-activated endothelial cells promote neural progenitor cell migration[J]. J Neurosci, 2006, 26(22): 5996-6003.

[4] Gunnarson E, Song Y, Kowalewski J M, *et al*. Erythropoietin modulation of astrocyte water permeability as a component of neuroprotection [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(5): 1602-1607.

[5] 黄 燕, 王景周, 张 涛, 等. 促红细胞生成素对血管性痴呆大鼠神经干细胞增殖分化的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(9): 805-808.

[6] Wang L, Li Y, Chen X, *et al*. MCP-1, MIP-1, IL-8 and ischemic cerebral tissue enhance human bone marrow stromal cell migration in interface culture[J]. Hematology, 2002, 7(2): 113-117.

[7] 刘 洋, 张 萱, 代 英, 等. 骨髓间充质干细胞对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠学习记忆功能的重建作用[J]. 中华儿科杂志, 2008, 46(9): 648-653.

[8] 陈 宁, 宋世兵, 董子明, 等. 人组织因子 RNA 干扰真核表达载体的构建[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2006, 41(6): 1118-1120.

[9] 宁寒冰, 张 玲, 李建生, 等. 端粒重复序列结合因子2真核表达载体的构建及表达[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2006, 41(3): 439-441.

(编辑 汪勤俭)