论著

文章编号:1000-5404(2010)04-0334-04

人 APOEε2 及 ε4 等位基因修饰的神经干细胞的建立

江 涌[1,2],吴海涛[1],孙晓川[1],陈礼刚[2],邹 莉[2],郭宗铎[1],顾应江[2],刘洛同[2] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经外科[1];646000 四川泸州,泸州医学院附属第一医院神经外科[2])

[摘要] **目的** 构建 APOE ε2 和 APOE ε4 的真核表达载体,转染 APOE 敲除鼠神经干细胞,分别建立转染 APOE ε2 和 ε4 的神经干细胞系。**方法** 以前期克隆得到的 APOE ε3 cDNA 为基础,通过定点突变技术得到 APOE ε2 和 APOE ε4 cDNA,亚克隆入表达载体 pEGFP-N1,构建 pEGFP-N1-APOE ε2 及 pEGFP-N1-APOE ε4 的真核表达载体,经双酶切和测序确定序列及阅读框正确。以脂质体转染法转染 APOE 敲除鼠神经干细胞,通过 G418 筛选,建立转染 APOE ε2 和 ε4 的神经干细胞系。采用 RT-PCR、Western blot 及免疫荧光法检测 APOE 的表达。**结果** APOE 敲除鼠 NSCs 转染 6 h 后发出绿色荧光,48 h 达到高峰,荧光显微镜下观察转染率约(40.0±2.3)%,转染 pEGFP-N1-APOE 的 NSCs 在筛选至第 10 天可见细胞克隆形成。经鉴定保持了自我更新、多向分化保持性,其中分化为神经元的比例为(32.15±2.61)%,各组之间无明显差异。**结论** 成功构建了稳定表达源性 APOEε2 及 ε4 的神经干细胞克隆,相应等位基因修饰的神经干细胞能高效表达目的基因蛋白并保留其干细胞特性。

[关键词] 载脂蛋白 E 类;等位基因;真核表达载体;神经干细胞;基因表达
[中图法分类号] R322.8;R329.2;R394-33 **[文献标志码]** A

Establishment of human apolipoprotein E ε2 and ε4 modified neural stem cells

Jiang Yong[1,2], Wu Haitao[1], Sun Xiaochuan[1], Chen Ligang[2], Kuai Li[2], Guo Zhongduo[1], Gu Yingjiang[2], Liu Luotong[2] ([1]Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan Province, 646000; [2]Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To construct the eukaryotic expression vector of apolipoprotein E (APOE) ε2 and ε4 and establish APOE subtype gene-modified neural stem cells (NSCs) based on the clone of human APOE ε3 gene. **Methods** APOE ε3 cDNA was cloned in our previous work. Site-directed mutagenesis was used to obtain cDNA encoding APOE ε2 and ε4 isforms. The APOE ε2 and ε4 isforms were inserted in the eukaryotic expression vector pEGFP-N1. Primary NSCs were isolated, cultivated and purified from rat embryo pallium of APOE knock-out mice. Recombinant plasmid was transfected into NSCs with Lipofectamine 2000 and selectively cultured with G418. After NSCs expressed the EGFP gene and APOE, they were amplified. Expression of target gene in the amplified NSCs was analyzed by RT-PCR, Western blotting and laser confocal microscopy, respectively. **Results** The eukaryotic expression vectors of APOEε2 and APOEε4 were constructed. The plasmids were transfected into NSCs by Lipofectamine 2000(40.0±2.3)%. The NSCs could express EGFP after transfection. Some clones expressing EGFP were formed after selective culture with G418 at 10 day. The differented rate of neuronis (32.15±2.61)%. RT-PCR, Western blotting and laser confocal microscopy demonstrated that the human APOE gene isoforms (ε2, ε4) were expressed in NSCs. **Conclusion** Eukaryotic expression vector of APOE (ε2, ε4) can be transfected into NSCs and multipotent NSCs expressing target gene can be obtained and are able to renew, thus laying a foundation for further studies on the function of APOE subtype.

[Key words] apolipoproteins E; alleles; eukaryotic expression vector; neural stem cell; gene expression

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30973087), the Key Program of Chongqing Municipal Health Bureau (05-1-017) and the Scientific Research Fund for the Youth of Sichuan Education Commission (08zb049). Corresponding author: Sun Xiaochuan, Tel: 86-23-89011151, E-mail:sunxch1445@gmail.com

[基金项目] 国家自然科学基金(30973087);重庆市卫生局重点项目(05-1-017);四川省教育厅青年基金(08zb049)
[通信作者] 孙晓川,电话:(023)89011151, E-mail:sunxch1445@gmail.com

创伤性脑损伤(traumatic brain injury, TBI)是神经外科常见急重症之一,其致残率、病死率居各类创伤之首,严重威胁人类的生存质量与生命健康[1]。近年

来,随着对脑创伤耐受性差异的基因基础及作用机制的研究探索,载脂蛋白E(apolipoprotein E, APOE)基因多态性与脑损伤的相关性逐渐成为神经科学的研究热点[2]。APOE位于19号染色体长臂上,APOE基因存在等位基因多态性,主要有3个等位基因:ε2、ε3、ε4,分别编码对应的3种蛋白apoE2、apoE3、apoE4[3]。国内外研究显示,携带APOE ε4等位基因患者可能与预后不良相关,从而为TBI的救治提供了新的靶点[2]。

本实验在前期工作[4]所获得的人APOE ε3真核表达载体基础上,采用定点突变技术获得人源性APOE ε2及APOE ε4真核表达载体。将真核表达载体分别转染APOE敲除鼠的神经干细胞(neural stem cells, NSCs)并筛选组成高效表达的细胞系,从而建立了APOE ε2、APOE ε4的神经干细胞模型,为进一步深入研究其基因型在生理及脑损伤等病理条件下的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

PMD19-T-APOEε3、表达载体pEGFP-N1及G418等由本实验室保存。High Fidelity PrimeScript™ RT-PCR Kit、TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0、TaKaRa DNA Ligation Kit、*E. coli* Competent Cell JM109、限制性内切酶*Eco*RⅠ/*Bam*HⅠ、T_4DNA连接酶、DNA Marker DL 2000、λ-*Hind* Ⅲ DNA Marker均购自TaKaRa公司,质粒小量抽提试剂盒、胶回收试剂盒购自上海华舜公司。Nestin抗体、GFAP抗体及Gal-C抗体购自Chemicon公司。NF200抗体购自Santa Cruz公司。FCS购自Hyclone公司。Lipofectamine 2000购自Invitrogen公司。兔抗人apoE多抗为DAKO公司产品。羊抗兔IgG购自武汉博士德公司APOE敲除鼠的孕鼠60只购自北京大学实验动物中心。

1.2 人源性APOE ε2及APOE ε4等位基因真核表达

1.2.1 引物设计与合成 根据实验要求设计并合成下列引物,引物由大连宝生物公司合成,APOEε2定点突变引物,1F01: 5′-TGACCTGCAGAAGTGCCTGGCAGTGTAC-3′(下划线为突变碱基),1R01: 5′-TCGGCATCGCGGAGGAGCCGCTTAC-3′; APOEε4定点突变引物,2F01: 5′-TGGAGGACGTGC-GCG-GCCGCCTGGTGCAG-3′(下划线为突变碱基),2R01: 5′-TGTC-CGCGCCCAGCCGGCCTG-3′。

1.2.2 目的基因获得及纯化 以前期实验[4]获得的质粒PMD19-T-APOEε3为模板,分别以1F01/1R01和2F01/2R01为引物进行反向PCR扩增后分别切胶回收,并对其回收产物进行磷酸化处理(BKL)后,经乙醇沉淀后,分别命名为ε2-PCR和ε4-PCR。将ε2-PCR和ε4-PCR分别使用TaKaRa DNA Ligation Kit中的SolutionⅠ进行自连,热转化至*E. coli* Competent Cell JM109中,涂布平板过夜培养菌体。取阳性克隆PCR终产物经*Eco*RⅠ/*Bam*HⅠ进行双酶切后胶回收,同时pEGFP-N1进行双酶切后,切胶回收。胶回收片段与胶回收的线性化pEGFP-N1载体经T_4DNA连接酶连接形成真核表达载体pEGFP-N1-APOEε2及pEGFP-N1-APOEε4。用*Eco*RⅠ/*Bam*HⅠ进行双酶切检测,并送大连宝生物公司测序。

1.3 APOE敲除鼠神经干细胞的分离培养与鉴定

将APOE敲除鼠的孕鼠(E15 d)脱颈处死,在无菌条件下剖腹取出胎鼠。解剖显微镜下分离胎鼠大脑皮质并剥离脑膜及血管,机械分离并制备单细胞悬液,重悬于NSCs培养液(主要成分为DMEM/F12 1∶1、bFGF 20 μg/L、B27 20 μg/L)。按1×10^6/ml的细胞浓度接种入培养瓶中,置入37 ℃、5% CO_2培养箱。相差显微镜观察NSCs的生长、增殖情况。培养至第5天,原代克隆形成后进行常规传代培养。取第3代神经球行Nestin免疫组化鉴定。

1.4 APOE ε2及ε4修饰的神经干细胞系的建立

1.4.1 脂质体法转染NSCs 转染前1 d,将培养瓶中的NSCs(第3代)离心收集,并机械分离制备单细胞悬液。将其分置于6孔培养板,每孔加入2 ml(分为空载体pEGFP质粒组、pEGFP-N1-APOE各亚型重组质粒组、空白对照组)。待细胞融合度至90% ~95%,分别将APOE(ε2、ε4)重组质粒按照lipofectamine 2000操作说明进行转染。在37 ℃,5% CO_2中保温5 ~6 h后,更换NSCs培养基。在37 ℃、5% CO_2中培养48 ~72 h后,更换含有G418的NSCs选择性培养液进行筛选2周。转染后予激光共聚焦显微镜观察EGFP荧光表达。

1.4.2 RT-PCR检测APOE转录水平的表达 分别收集转染细胞,按Trizol试剂说明书抽提细胞总RNA,取1 μg进行反转录。使用High Fidelity PrimeScript™ RT-PCR Kit, Oligo dT Primer为反转录引物,以两步法行反转录。以β-actin(165 bp)为内参进行PCR反应,反应条件为:98 ℃ 10 s,68 ℃ 1 min,30个循环。取等体积RT-PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳并照相。

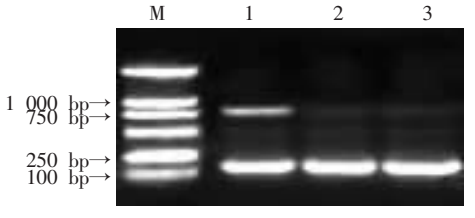
1.4.3 Western blot鉴定 离心收集转染细胞,试剂盒常规提取总蛋白。Brandford法定量。裂解后取20 μg处理后的蛋白样品进行SDS-PAGE电泳,结束后取出凝胶,用转印仪将蛋白转移到硝化纤维膜上。转移膜经5%脱脂奶粉室温振荡封闭后,以一抗(兔抗人apoE抗体)及二抗(辣根酶标记的羊抗兔IgG)孵育,然后ECL显色后在凝胶电泳成像仪中成像及拍照。

1.4.4 APOE ε2及ε4基因修饰的NSCs的诱导分化 离心收集稳定转染的NSCs,以神经干细胞分化培养液重悬,接种于预置多聚赖氨酸包被盖玻片的培养板。培养10 d后收集覆盖细胞的盖玻片,按ABC法进行NF200, GFAP, Gal-C细胞免疫组化染色,分别鉴定神经元、星形胶质细胞及少突胶质细胞。

2 结果

2.1 APOE ε2、APOE ε4等位基因的真核表达载体构建

在前期获得的APOE ε3真核表达载体的基础上,采用定点突变技术获得相对应的真核表达载体pEGFP-N1-APOEε2及pEGFP-N1-APOEε4。PCR扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果见图1,显示约5.7 kb的特异性条带。

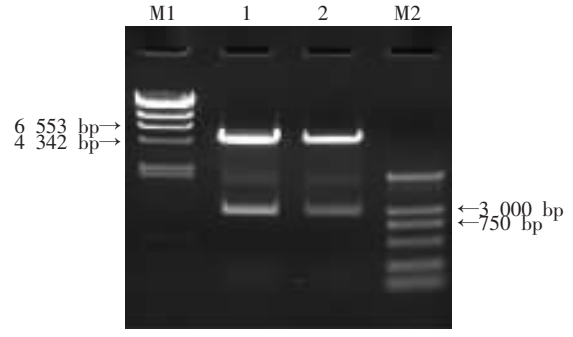


M: λ-*Hind*Ⅲ DNA标准;1: pEGFP-N1-APOEε2;2: pEGFP-N1-APOEε4

图1 pEGFP-N1-APOEε2和pEGFP-N1- APOEε4重组表达质粒琼脂糖凝胶电泳结果

2.2 重组质粒的鉴定

pEGFP-N1载体本身大小为4.7 kb,将APOE基因克隆到pEGFP-N1载体上得到的质粒大小约为5.7 kb,分别将pEGFP-N1-APOEε2及pEGFP-N1-APOEε4以*Eco*RⅠ/*Bam*HⅠ双酶切后得到约4.7 kb和950 bp 2个片段(图2)。并送大连宝生物公司对插入部分进行测序,证实真核表达载体的方向及序列正确,阅读框也正确无误。以上结果表明定点突变正确,重组真核表达质粒构建成功。



M1:λ-*Hind*Ⅲ DNA标准;1:pEGFP-N1-APOEε2;2:pEGFP-N1-APOEε4;M2:DNA标准DL 2000

图2 重组质粒插入片段的限制性酶切分析

2.3 神经干细胞分离及培养

细胞培养24 h后未见明显集落形成,48 h后可见球状团块产生,呈悬浮生长状态的神经球(neurosphere)(2~10个细胞)逐渐形成。随换液及传代次数增多而逐渐减少,仅剩大小不等、折光性强的神经球(图3),免疫细胞化学染色显示呈Nestin免疫阳性。

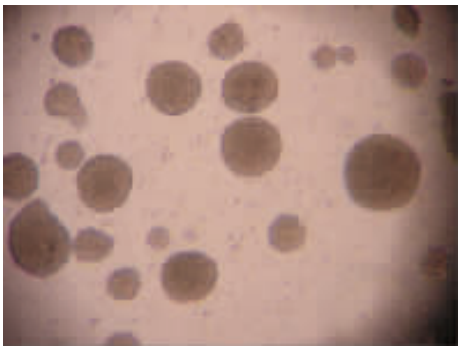
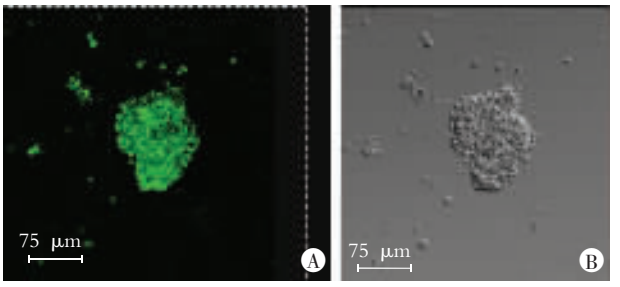


图3 神经干细胞培养72 h后形成的神经球 (×200)

2.4 pEGFP-N1-APOE各亚型修饰APOE敲除鼠NSCs的建立

APOE敲除鼠NSCs分别转染各亚型pEGFP-N1-APOE后约6 h后发出绿色荧光,48 h达到高峰,在激光共聚焦显微镜下可观察到重组质粒pEGFP-N1-APOE转染的神经干细胞团中可见EGFP荧光细胞,荧光细胞主要集中于干细胞团中,细胞呈圆形,未见突起(图4)。荧光显微镜下观察转染率(40.0±2.3)%。转染48 h后用G418进行筛选,筛选4 h即可观察到部分未表达EGFP的NSCs开始贴壁、死亡,培养至48 h,大约一半的未表达EGFP细胞已经死亡;未转染组NSCs在第6天时细胞已全部死亡;而转染pEGFP-N1-APOE与转染pEGFP的NSCs在筛选至第10天可见细胞克隆形成。筛选传3代培养的细胞,其中一部分进行Nestin免疫染色仍呈阳性。一部分细胞经5% FCS诱导分化96 h后再行NF200、GFAP、Gal-2免疫染色,可有阳性表达(图5~7),表明转染后的细胞仍具有NSCs的特性。其中分化为神经元的比例为(32.15±2.61)%,各组之间无明显差异。RT-PCR检测结果表明,稳定表达pEGFP-N1-APOE的NSCs可以表达APOE基因和内参β-actin基因,而在未转染人源性APOE基因的NSCs中仅有内参没有APOE的表达(图8)。Western blot检测表明仅转染pEGFP-N1-APOE的NSCs组可见一条特异性蛋白质条带(图9)。



A:激发;B:未激发

图4 激光共聚焦显微镜观察转基因神经干细胞 (×200)

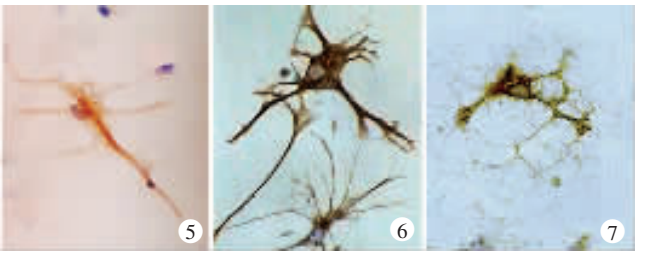
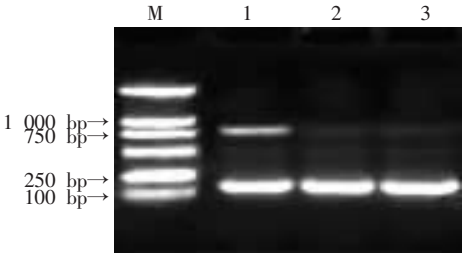


图5 免疫细胞化学检测示细胞呈NF200免疫阳性 (ABC×400)
图6 免疫细胞化学检测示细胞呈免疫GFAP阳性 (ABC×400)
图7 免疫细胞化学检测示细胞呈Gal-C免疫阳性 (ABC×400)



M:标准(DL 2000);1:稳定表达APOE基因的神经干细胞;2:表达EGFP的神经干细胞;3:未转染的神经干细胞

图8 稳定表达APOE基因的神经干细胞、表达EGFP的神经干细胞及未转染的神经干细胞RT-PCR结果

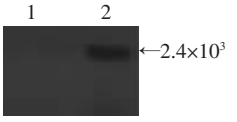


图9 仅表达EGFP的神经干细胞(1)及表达APOE基因的神经干细胞(2)Western blot结果

3 讨论

APOE基因多态性与脑损伤病情及转归的相关性是目前脑创伤领域的研究热点[5,6]。APOE基因存在多态性,主要有3个等位基因:ε2、ε3、ε4,分别编码相

应蛋白:apoE2、apoE3、apoE4。它们之间的差异仅在于肽链一级结构上第112位和第158位的氨基酸不同,apoE3在112位是半胱氨酸,158位是精氨酸;apoE2在这两个位置上都是半胱氨酸,apoE4却都是精氨酸。虽然不同的基因型所编码的蛋白只存在个别氨基酸的微小差异,但是不同的亚型却具有完全不同的神经生物学作用[7,8]。国内外临床研究发现[9],携带APOE ε4的患者对脑损伤的耐受性降低,更易出现不良预后。本课题组前期研究也发现[10,11],在中国黄种人群中,APOEε4基因是颅脑损伤急性期病情加重的危险因素之一。但是,各基因型在生理及脑损伤等病理条件下的作用机制尚未完全阐明。因此,在"野生型"APOEε3克隆获得的基础上[4],采用基因重组定点突变技术获得"变异体"APOEε2及APOEε4具有重要意义,可为进一步研究其各等位基因的生物学作用及其功能差异奠定基础[12]。

本实验获得相对少见的人源性APOEε2及ε4等位基因cDNA序列,包含起始密码子及终止密码子,含有信号肽编码区,从而顺利构建含人源性APOEε2及ε4等位基因的真核表达载体。与人类相比,鼠类只有一种APOE,所编码的apoE氨基酸序列与人的apoE差异较大(约30%),但二者的apoE受体结合域高度相似,其中包括几个被认为对受体结合很关键的残基[13]。如将携带人APOE等位基因的载体转染APOE敲除鼠的神经干细胞,既可排除鼠本身APOE的干扰,又能利用鼠的apoE受体,就可进一步研究人APOE各等位基因的生理功能和病理作用。

本研究结果显示,我们构建的人APOE基因的真核细胞表达载体,可用脂质体转染APOE敲除鼠的NSCs。经G418抗性筛选后,能获得相对稳定表达APOE各亚型的NSCs克隆。由于克隆到pEGFP中的目的基因APOE与pEGFP具有相同的读码框,而无读码框内终止信号,最终目的基因表达的蛋白与荧光蛋白形成融合体,故在激光共聚焦显微镜下可观察到筛选后的NSCs发出绿色荧光[14]。实验中,我们通过激光共聚焦显微镜观察到NSCs胞体内有融合蛋白的绿色荧光表达,表明转染细胞成功,利于进行后续的相关研究。

由于pEGFP-N1带有抗G418的neo基因,转染后利用G418进行细胞的阳性克隆筛选是一个重要的步骤。本实验中筛选至第6天可见未转染质粒的细胞几乎全部死亡,而转染了质粒的细胞虽然也有大量死亡,但是筛选至10 d后可见细胞克隆形成。经G418筛选传3代,激光共聚焦显微镜下仍可见EGFP的表达,NSCs的形态与对照组无明显差异,转染后的NSCs可继续增殖及传代培养。经5% FCS诱导96 h后,免疫荧光组织化学染色显示NF200、GFAP、Gal-2表达阳性。表明转染APOE各亚型重组质粒后对NSCs的生长、分化无明显影响。实验进一步利用RT-PCR的方法从mRNA水平对APOE进行了检测,结果证实转染后的NSCs中APOE的表达显著增强;同时用Western blot方法从蛋白质水平对APOE进行了检测,结果表明转染细胞出现相应apoE的表达,从蛋白质表达水平证实了转染后的NSCs有APOE相应蛋白的表达。

本实验成功构建了稳定表达人源性APOE ε2及ε4的NSCs克隆,并且经鉴定保持了NSCs自我更新,多向分化等特性,其分化潜能也无特殊影响。它的建立为体外研究APOE各等位基因的功能提供了细胞模型,并为进一步研究其影响脑损伤病情变化及其预后的分子机制奠定良好的实验基础。

参考文献:

[1] Jiang Y, Sun X C. Traumatic brain injury: nature and genetic influences[J]. Neural Regen Res. 2008, 3(7): 786-790.
[2] Sun X C, Jiang Y. Genetic susceptibility to traumatic brain injury and apolipoprotein E gene[J]. Chin J Traumatol, 2008, 11(4): 247-252.
[3] 江涌, 孙晓川. 载脂蛋白E多态性与颅脑损伤[J]. 中华创伤杂志, 2005, 21(2): 154-157.
[4] 邵莉, 江涌, 孙晓川, 等. 人载脂蛋白Eε3等位基因的克隆及表达[J]. 重庆医科大学学报, 2008, 33(7): 784-787.
[5] Jordan B D. Genetic influences on outcome following traumatic brain injury. Neurochen Res. 2007, 32(4-5): 905-915.
[6] Dardiotis E, Fountas K N, Dardioti M, *et al*. Genetic association studies in patients with traumatic barin injury. Neurosurg Focus, 2010, 28(1): E9.
[7] Hatters D M, Peters-Libeu C A, Weisgraber K H. Apolipoprotein E structure: insights into function[J]. Trends Biochem Sci, 2006, 31(8): 445-454.
[8] Mahley R W, Weisgraber K H, Huang Y. Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, in cluding Alzheimer's disease. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(15): 5644-5651.
[9] Zhou W, Xu D, Peng X, *et al*. Meta-analysis of APOE4 allele and outcome after traumatic brain injury[J]. J Neurotrauma, 2008, 25(4): 279-290.
[10] Jiang Y, Sun X, Xia Y, *et al*. Effect of APOE polymorphisms on early responses to traumatic brain injury[J]. Neurosci Lett, 2006, 408(2): 155-158.
[11] Jiang Y, Sun X, Gui L, *et al*. Correlation between APOE -491AA promoter in epsilon4 carriers and clinical deterioration in early stage of traumatic brain injury[J]. J Neurotrauma, 2007, 24(12): 1802-1810.
[12] 吴海涛, 江涌, 张晓东, 等. 载脂等蛋白E基因多态性影响星形胶质细胞损伤后早期NF-κB表达的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(2): 103-106.
[13] Chan W M, Ho Y Y. Inhibition of cell proliferation by apolipoprotein E isoform expression[J]. Arch Biochem Biophys, 2006, 451(2): 97-102.
[14] 谭新杰, 胡长林, 蔡文琴. 绿色荧光蛋白作为神经干细胞示踪标记的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(7): 691-693.

(**收稿**:2009-10-19;**修回**:2009-11-10)
(编辑 王 红)