论著

文章编号:1000-5404(2011)09-0940-04

真核表达载体 pEGFP-N2/AT2R 的构建及其在原代血管平滑肌细胞的表达

左玉梅[1],王 媛[2],刘建平[1] (400038 重庆,第三军医大学:西南医院心血管内科,重庆市介入心脏病学研究所[1],训练部教务处[2])

【摘要】 **目的** 体外构建携带血管紧张素Ⅱ2型受体(ANG Ⅱ Type 2 Receptor,AT2R)基因的增强型绿色荧光蛋白真核表达载体,并观察其在大鼠血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)中的表达。**方法** 以 pUHD-10.3/AT2R 质粒为模板,PCR 扩增 AT2R 基因的全长 cDNA 序列,再将其克隆入载体 pEGFP-N2,构建其真核表达载体 pEGFP-N2/AT2R。以基因转染技术,将 AT2R 导入原代 VSMCs。倒置荧光显微镜观测转染后 VSMCs 生长变化及 AT2R 在其中的表达等情况。图像分析技术检测 AT2R 在 VSMCs 中的转染效率。Western blot 检测转染 AT2R 基因的 VSMCs 表达其编码蛋白。RT-PCR 法对 AT2R 基因修饰的 VSMCs 进行鉴定。**结果** 成功构建 AT2R 基因的真核表达载体 pEGFP-N2/AT2R,该真核载体能携带 AT2R 基因转染并有效表达于 VSMCs,其转染效率约 40%,RT-PCR 及 Western blot 均可检测到 AT2R mRNA 及蛋白在血管平滑肌细胞中高表达。**结论** 成功地将克隆到的 AT2R 基因克隆入 pEGFP-N2 载体中,并实现了 AT2R 基因在原代 VSMCs 的表达。

【关键词】 血管紧张素Ⅱ2型受体基因;克隆;原代血管平滑肌细胞;绿色荧光蛋白
【中图法分类号】 R394-33;R322.12;R394.2 【文献标志码】 A

Construction of eukaryotic expressing vector pEGFP-N2/AT2R and its expression in primary vascular smooth muscle cells

Zuo Yumei[1], Wang Yuan[2], Liu Jianping[1] ([1]Department of Cardiology, Southwest Hospital, [2]Office of Division of Educational Affairs, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【**Abstract**】 **Objective** To clone Ang Ⅱ type 2 receptor (AT2R) gene, obtain enhanced green fluorescent protein(EGFP) vector for the gene, and then observe its expression in primary vascular smooth muscle cells (VSMCs) after transfection. **Methods** Utilizing plasmid pUHD-10.3/AT2R as a template, the full length cDNA fragment of AT2R was amplified by polymerase chain reaction (PCR). Eukaryotic expression vector pEGFP-N2/AT2R was constructed by cloning AT2R gene into vector pEGFP-N2. After transfecting AT2R into primarily cultured VSMCs, invert fluorescent microscopy was employed to observe VSMCs growth as well as AT2R expression in VSMCs. Transfection efficiency of AT2R in VSMCs was evaluated by image analyzor, the protein and mRNA expressions of AT2R in VSMCs were examined by Western blotting and RT-PCR. **Results** Eukaryotic expression vector pEGFP-N2/AT2R was successfully constructed. The eukaryotic vector expressing AT2R gene was efficiently transfected and expressed in VSMCs. The transfection efficiency of AT2R gene in VSMCs was about 40%. RT-PCR and Western blotting indicated that AT2R was expressed in cultured VSMCs at mRNA and protein levels. **Conclusion** cDNA sequence encoding AT2R gene is successfully cloned into pEGFP-N2 which can be efficiently expressed in primary VSMCs.

【**Key words**】 Ang Ⅱ type 2 receptor; cloning; primary vascular smooth muscle cells; enhanced green fluorescent protein

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30670521). Corresponding author: Liu Jianping, E-mail: liujianping1022@hotmail.com

再狭窄(restenosis, RS)已成为经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)发展的阻力[1]。血管损伤后新生内膜形成是血管 RS 等病变的病理基础,新生内膜的主要成因则是血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,VSMCs)的增殖及内膜下迁移,并发生表型变化[2-3]。血管紧张素Ⅱ(angiotensinⅡ,AngⅡ)导致细胞增殖迁移的效应主要由血管紧张素Ⅱ1型受体(angⅡ type 1 receptor,AT1R)介

【基金项目】 国家自然科学基金(30670521)
【通信作者】 刘建平,E-mail:liujianping1022@hotmail.com

导。血管紧张素Ⅱ2 型受体(ang Ⅱ type 2 receptor,AT2R)介导 AngⅡ所产生的生物学作用均与 AT1R 所介导的相拮抗[4-5]。增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein,EGFP)在波长 490 nm 的紫外线激发下,用显微镜可以直接观察到绿色荧光,增强了报告基因的敏感性。本实验拟构建含 EGFP-AT2R 融合蛋白的真核表达载体,转染体外培养的原代大鼠 VSMCs,观测 AT2R 基因在原代 VSMCs 中的表达情况,为进一步研究 AT2R 基因修饰的原代 VSMCs 治疗血管 RS 奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

真核载体 pEGFP-N2 由烧伤研究所王林冻存惠赠,pUHD-10.3/AT2R 质粒及扩增质粒用的 *E. coli* DH5α 菌株为本科室冻存,高保真酶(PrimeSTARTM HS DNA Polymerase)、限制性内切酶 *Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ、T_4 DNA Ligase(大连宝生物 TaKaRa 公司),上下游引物合成(大连宝生物 TaKaRa 公司),特级胎牛血清(美国 Gibco 公司),脂质体 Lipofectamine™ 2000(美国 Invitrogen 公司),α 平滑肌肌动蛋白(α-SM actin)小鼠抗大鼠单克隆抗体(武汉博士德公司)、兔抗 AT2R 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),HRP 羊抗兔 IgG 及 FITC 标记兔抗小鼠 IgG(北京中杉公司),SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒(碧云天公司)。

1.2 方法

1.2.1 重组真核表达载体 PEGFP-N2/AT2R 的构建与鉴定 引物设计,上游序列:5′-CGGAATTCATGAAGGACAACTTCAGTTTTGCTG-3′;下游序列:5′-CGGGATCCCAGACACAAAGGTGTCCATTTCTC-3′。下划线部分分别带有 *Eco*RⅠ、*Bam*HⅠ酶切位点。以 pUHD10.3/AT2R 质粒为模板,PCR 扩增 AT2R 基因全长编码序列(反应条件:98 ℃预变性 2 min,98 ℃变性 10 s,61 ℃退火,延伸 1 min,共 30 个循环),双酶切后克隆入载体 pEGFP-N2,转化大肠杆菌感受态 DH5α 菌、挑单克隆菌行限制性内切酶切及测序鉴定,测序正确者命名为 pEGFP-N2/AT2R。

1.2.2 原代 VSMCs 培养与鉴定[6] 采用断颈部脱臼处死 SD 大鼠,无菌条件下分离全段主动脉,眼科镊剥脱动脉外膜及结缔组织,纵向剖开,无菌棉球轻擦内膜面以去除其内皮细胞,相同培养基冲洗 3 次,置无菌培养皿中,滴加少许培养液保持组织湿润,剪组织成 1 mm×1 mm 大小,以约 0.5 cm 的间距摆放组织块于细胞培养瓶底,10% 胎牛血清培养基原代组织块法培养并传代。制作细胞爬片以 α 平滑肌(α-SM)肌动蛋白运用免疫荧光法对细胞进行鉴定。

1.2.3 pEGFP-N2/AT2R 向靶细胞原代 VSMCs 的导入与检测 以脂质体 Lipofectamine™ 2000 介导 pEGFP-N2/AT2R 质粒转移至原代 VSMCs。实验分 pEGFP-N2/AT2R 转染组及 pEGFP-N2 转染组。当细胞生长为 80~90% 融合时,按脂质体试剂盒方法配制转染液,在各组中加入相应的转染液,转染 48 h 后,倒置荧光显微镜观测绿色荧光蛋白的表达并拍照。

1.2.4 原代 VSMCs 转染效率的检测 将转染后 VSMCs 用核荧光标记物 DAPI 标记胞核,荧光显微镜下,拍摄同一视野表达绿色荧光蛋白的原代 VSMCs 与经 DAPI 标记的原代 VSMCs 图像,Image Pro Plus 图像仪计算转染效率。

1.2.5 转染细胞 AT2R 基因编码蛋白的检测 采用 Western blot 技术,将转染 AT2R 基因的 VSMCs 总蛋白转移至硝酸纤维膜,浸泡于含 AT2R 兔多抗(1∶1 000)封闭液中,4 ℃过夜孵育,加 HRP 羊抗兔二抗(1∶500),室温孵育 1 h,25.2 ℃,与化学发光底物结合 5~10 min,保存图片。以 pEGFP-N2 转染相同细胞作对照,GAPDH 作内参。实验重复 3 次。

1.2.6 RT-PCR 检测 AT2R mRNA 表达的变化 转染后 48 h 后,用 Trizol 法提取细胞总 RNA,行逆转录合成 cDNA,反应条件为 42 ℃ 10 min,30 ℃ 20 min,99 ℃ 5 min,4 ℃ 5 min。并以之为模板,PCR 检测原代 VSMCs 转染后 AT2R 的表达。以 pEGFP-N2 转染的原代 VSMCs 作对照。实验重复 3 次。

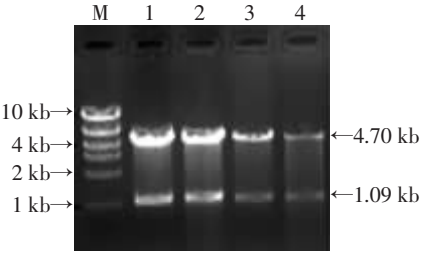
1.3 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 统计软件行 t 检验。

2 结果

2.1 重组真核表达载体 pEGFP-N2/AT2R 的鉴定

重组真核载体 pEGFP-N2/AT2R 经 *Eco*RⅠ和 *Bam*HⅠ酶切,1% 琼脂糖凝胶电泳检测,可见 4.70 kb 与 1.09 kb 片段(图 1)。测序证实,与 GenBank NM_012494 公布的序列一致。



M:DNA 标准;1~4:4 个不同克隆提取的 pEGFP-N2/AT2R 质粒

图 1 重组真核表达载体 pEGFP-N2/AT2R 的双酶切电泳结果

2.2 VSMCs 的培养及鉴定

倒置显微镜下大多细胞呈小梭形、三角形或多角形,密度较高时呈峰/谷状生长(图 2A)。α-SM actin 单克隆抗体行免疫荧光染色见细胞质有大量平滑肌细胞特有的 α-SM actin 表达,呈平行丝条状绿色荧光,多见 1~2 个细胞核(图 2B)。

2.3 转染细胞绿色荧光蛋白检测结果

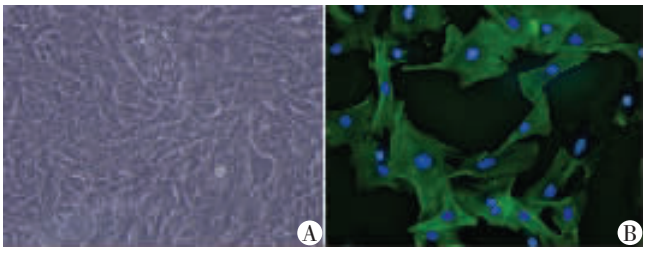
用 Lipofectamine™ 2000 介导纯化的质粒 pEGFP-N2/AT2R 转染原代 VSMCs,倒置荧光显微镜检测到有效的 GFP 表达(图 3),其转染效率约 40%。

2.4 AT2R 基因编码蛋白的检测

Western blot 检测显示,转染 AT2R 基因的 VSMCs 蛋白在约 44×10^3 处出现较强的相应染色带,而 pEGFP-N2 转染相同细胞的该条带则较弱(图 4),提示真核载体 pEGFP-N2/AT2R 能携带 AT2R 基因成功修饰原代 VSMCs,并表达相应的编码蛋白。

2.5 转染 AT2R 基因后 mRNA 的检测

转染后的原代 VSMCs 仍良好生长,RT-PCR 检测 pEGFP-N2/AT2R 转染组 AT2R mRNA 水平高于 pEGFP-N2 转染组(图 5)。



A:原代细胞传代后第8天 (×200);B:血管平滑肌细胞鉴定结果 (×400)

图2 倒置荧光显微镜观察大鼠血管平滑肌细胞体外培养

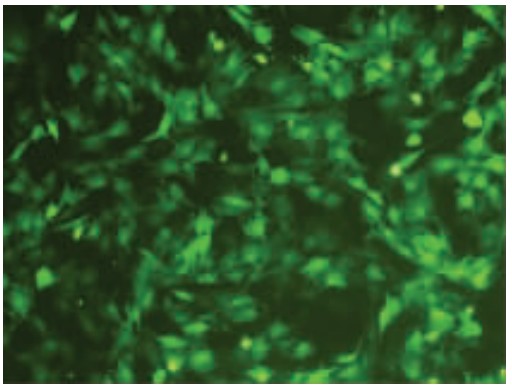
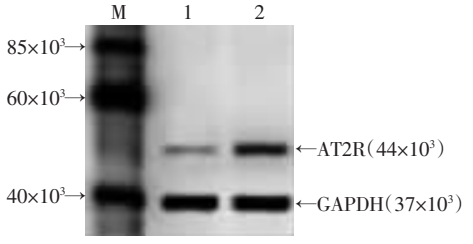
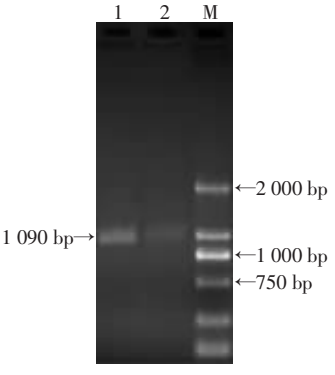


图3 已转入AT2R基因的原代VSMCs表达绿色荧光蛋白
(倒置荧光显微镜 ×200)



M:标准;1:pEGFP-N2转染组;2:pEGFP-N2/AT2R转染组

图4 Western blot检测转染后VSMCs AT2R蛋白表达



1:pEGFP-N2/AT2R转染组;2:pEGFP-N2转染组;M:DNA标准(DL 2000)

图5 RT-PCR检测转染后VSMCs AT2R mRNA表达

3 讨论

自Gruentzing成功行首例经皮腔内冠脉成型术(PTCA)以来,经皮冠状动脉介入治疗(PCI)取得迅猛发展,现全球每年有100万例PCTA术,其中约15万例发生术后血管RS。RS的防治已是现今心血管疾病研究的热点之一[7-8]。

血管损伤使VSMCs表型发生变化,由收缩表型向合成表型转化,获得增殖活性和迁移能力,从血管中膜进入内膜并在内膜大量增殖、分泌大量细胞外基质(extracelluler matrix, ECM),促进新生内膜的形成,导致RS发生,因此,血管损伤后新生内膜形成是血管RS等病变的病理基础。而AT2R介导AngⅡ所产生的生物学作用均与AT1R所介导的相拮抗,尤其对血管张力、VSMC的增殖与迁移等具明显负调控作用[9]。AT2R基因敲除小鼠研究证实AT2R能促胚胎后期VSMCs分化;离体的血管组织培养表明,转染AT2R基因能显著抑制血管的芽状生长。血管内皮损伤时,AT2R表达上调,激活G蛋白,灭活AT1R激活的胞外信号激酶ERK1/2,致丝裂原活化蛋白激酶入胞核减少,降低多种原癌基因表达,终止细胞因子与生长因子受体的信号传递,最终抑制VSMCs的分裂与增殖[10-13]。

如何高效、稳定、安全地将目的基因转染至靶细胞是基因治疗的瓶颈问题。基因治疗的载体有病毒与非病毒载体,虽然病毒载体转染率比非病毒载体高,但其存在细胞毒性、免疫原性与基因突变等问题[14]。而非病毒载体无明显致病作用,其转染率可靠一些新技术提高。真核表达载体pEGFP-N2[15]含人巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)启动子,该启动子可使插入其多克隆位点的外源基因早期转录,增强其编码蛋白的翻译与表达。插入的外源基因5′端有增强绿色荧光蛋白(EGFP)基因,其表达产物能在488 nm激发波处形成鲜明的绿色荧光,最终产物为目的基因所表达蛋白与荧光蛋白之融合体。

本实验选取原代VSMCs作基因转染之靶细胞,构建了含EGFP-AT2R融合蛋白的真核表达载体,AT2R基因被该载体携带已成功转染并有效表达于体外培养的原代VSMCs,为进一步采用AT2R基因治疗血管RS奠定了基础。

参考文献:

[1] Bosiers M, Deloose K, Keirs K, *et al*. Prevention and treatment of in-stent restenosis[J]. J Cardiovasc Surg (Torino), 2010, 51(4):591-598.

[2] Inoue T, Node K. Molecular basis of restenosis and novel issues of drug-eluting stents[J]. Circ J, 2009, 73(4):615-621.

[3] Vorpahl M, Virmani R, Ladich E, *et al*. Vascular remodeling after coronary stent implantation[J]. Minerva Cardioangiol, 2009, 57(5):621-628.

[4] Sata M, Fukuda D. Crucial role of renin-angiotensin system in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. J Med Invest, 2010, 57(1/2):12-25.

[5] Lemarie C A, Schiffrin E L. The angiotensin Ⅱ type 2 receptor in car-

diovascular disease[J]. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2010, 11(1):19 -31.
[6] 苗莉,何国祥,景涛,等. 观察大鼠血管平滑肌细胞与间充质干细胞直接接触培养对细胞的诱导分化[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(9):814 -816.
[7] Throndson K, Sawatzky J A. Angina following percutaneous coronary intervention: in-stent restenosis[J]. Can J Cardiovasc Nurs, 2009, 19(3):16 -23.
[8] Tiroch K A, Byrne R A, Kastrati A. Pharmacological prevention and management of restenosis[J]. Expert Opin Pharmacother, 2010, 11(11):1855 -1872.
[9] Jing T, Wang H, Srivenugopal K S, *et al*. Conditional expression of type 2 angiotensin Ⅱ receptor in rat vascular smooth muscle cells reveals the interplay of the angiotensin system in matrix metalloproteinase 2 expression and vascular remodeling[J]. Int J Mol Med, 2009, 24(1):103 - 110.
[10] Jones E S, Vinh A, McCarthy C A, *et al*. AT2 receptors: functional relevance in cardiovascular disease[J]. Pharmacol Ther, 2008, 120(3):292 -316.
[11] 景涛,何国祥,刘建平,等. AT2R 基因可调控表达对体外培养 VSMC 纤维黏连蛋白表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(11):999 - 1002.
[12] Steckelings U M, Rompe F, Kaschina E, *et al*. The past, present and future of angiotensin II type 2 receptor stimulation[J]. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2010, 11(1):67 -73.
[13] 屈小玲,刘德峰,刘建平. AT2R 基因在体电穿孔转染抑制大鼠颈总动脉新生内膜新生[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(6):562 -565.
[14] 曹谊林. 组织工程学理论与实践[M]. 上海:上海科学技术出版社, 2004:50 -56.
[15] Gerena-Lopez Y, Nolan J, Wang L, *et al*. Quantification of EGFP expression on Molt-4 T cells using calibration standards[J]. Cytometry A, 2004, 60(1):21 -28.

(收稿:2010-12-01 修回:2011-01-27)

(编辑 龙 亮)

文章编号:1000-5404(2011)09-0943-01

个案与短篇

以三叉神经痛为首发症状的 POEMS 综合征 1 例

张晓飞[1,2],张映琦[1],陈康宁[1],胡 俊[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院神经内科[1];264200 山东 烟台,解放军 107 医院高干科[2])

【关键词】 POEMS 综合征;三叉神经痛
【中图法分类号】 R745.1 【文献标志码】 B

POEMS 综合征是临床上一种比较罕见的多系统损害的疾病,该综合征的主要特征有:多发性神经病变(polyneuropathy, P)、脏器肿大(organomegaly, O)、内分泌系统的病变(endocrinopathy, E)、M-蛋白(M-protein, M)及皮肤改变(skin changes, S),取五大征的英文首字母,命名 POEMS 综合征[1]。几乎所有 POEMS 患者病程中都有多发性周围神经损害,且多以周围神经病变为首发症状就诊,但一般情况下颅神经较少受累。而以颅神经损害为首发症状的病例更是罕见。我们现报告 1 例以三叉神经痛为首发症状的 POEMS 综合征患者。

1 病例资料

患者,女性,53 岁,因"头面部疼痛 5 个月"于 2009 年 10 月收入西南医院神经内科。患者无诱因于 2009 年 5 月逐渐出现右侧鼻旁、上唇及眶周的闪电样、针刺样疼痛,伴有烧灼感,持续数秒,每日发作数次,咀嚼时疼痛易发。在院外诊断为"三叉神经痛",予以"卡马西平"等药物治疗。病程中出现持续性低热,同时伴有浅表淋巴结肿大、双足和眼睑水肿,行胸部 CT"双侧少量胸腔积液,右侧腋窝淋巴结",取右颈部淋巴结活检示"淋巴结反应性增生",经抗感染、抗炎、止痛等治疗后症状缓解。1 个月后患者再次出现左侧鼻旁、上唇及眶周麻木、闪电样针刺感、烧灼感,后范围扩大累及头顶部,为明确诊断遂来我科就诊。

【通信作者】 胡 俊,E-mail:hujuncq@163.com

入院后查体:患者神志清,双眼睑轻度水肿,皮肤粘膜色素沉着明显,以面部、四肢远端显著;肝肋下 4 cm 可扪及,质软,无触痛,脾肋下未扪及。神经系统检查:双侧瞳孔等大等圆,直径 3 mm,双侧角膜反射消失,双眼视乳头边界清。面部呈洋葱皮样痛、触觉减退,双侧咬肌、颞肌无萎缩,双侧咀嚼动作力稍弱。双侧额纹、眼裂、鼻唇沟对称,双侧皱额、蹙眉、闭目好,露齿时口角无偏歪。四肢运动未见异常,双上肢肘关节以下、双下肢膝关节以下痛、触觉减退,深感觉未见异常。双侧上肢腱反射(++),膝反射、跟腱反射减弱(+/-),双侧病理征阴性。入院后行辅助检查:尿本周氏蛋白定性:弱阳性。骨髓细胞学检查:增生性骨髓象。自身免疫抗体谱:ANA 阳性,斑点核性,滴度 1:320;甲状腺球蛋白抗体 2.6%,甲状腺微粒体抗体 2.5%。血清蛋白电泳:α1 球蛋白 3.5%,α2 球蛋白 8.4%,β 球蛋白 13.8%,γ 球蛋白 33%,白蛋白 41.3%。经全科讨论后诊断为:POEMS 综合征。

2 讨论

POEMS 综合征是一种少见的、多系统受累的疾病,是一种与浆细胞增生或浆细胞瘤有关的临床症候群。1956 年 Crow[2] 首次报道 2 例多发性神经病伴骨髓瘤、皮肤色素沉着等症状的病例。POEMS 综合征目前尚缺乏特异性诊断标准,目前应用较多的是 2003 年 Dispenzieri 等[3] 提出的标准,其主要标准为:①多发性周围神经病;②单克隆性浆细胞增多,其次要标准为:①硬化性骨病;②巨大淋巴结增生病;③脏器肿大;④水肿;

(下转 963 页)