论著

文章编号:1000-5404(2014)02-0092-06

基因捕获筛选 TGF-β1 诱导间充质干细胞 C3H/10T1/2 平滑肌分化的差异表达基因

王明科[1,2],姜 帆[3],孙慧勤[1],叶 枫[3],程 晋[3],粟永萍[1],邹仲敏[3] (400038 重庆,第三军医大学军事预防医学院:全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室[1],毒理学研究所[3];200433 上海,海军医学研究所[2])

[摘要] **目的** 利用基因捕获方法,分离转化生长因子-β1(transforming growth factor-β1, TGF-β1)诱导小鼠胚胎间充质干细胞 C3H/10T1/2(简称 10T1/2 细胞)平滑肌分化前后差异表达基因。**方法** 5 ng/mL TGF-β1 诱导 10T1/2 细胞平滑肌分化,倒置显微镜下观察细胞形态学改变,RT-PCR 鉴定平滑肌分化相关基因 alpha 平滑肌肌动蛋白(alpha smooth muscle actin, αSMA)、平滑肌 22 alpha (smooth muscle 22 alpha, SM22α)、平滑肌肌球蛋白重链(smooth muscle myosin heavy chain, SM-MHC)和血清应答因子(serum response factor, SRF),免疫细胞化学实验检测 αSMA。TGF-β1 诱导建立的 10T1/2细胞基因捕获阳性克隆库分化前后进行 LacZ 染色。cDNA 末端快速扩增法(rapid amplification of cDNA ends, RACE)及电子克隆分离差异表达序列,在 GenBank 网站 nBLAST 进行生物信息学分析,用 GenBank 网站在线软件 BankIt 提交 GenBank 获取 ID 号,用 pI/Mw 软件计算蛋白分子量、等电点。Real-time PCR 检测新基因 *mgt-16* 在 BALB/c 小鼠小肠、骨骼肌及心肌的表达。**结果** 细胞形态学、RT-PCR 及免疫细胞化学实验鉴定 TGF-β1 成功诱导 10T1/2 细胞平滑肌分化。LacZ 染色筛选获得 2 个平滑肌分化后差异表达克隆。RACE、电子克隆和 nBLAST 分析后发现为线粒体核糖体蛋白 S6(mitochondrial ribosomal protein S6,*Mrps6*)和新基因 *mgt-16*。*mgt-16* 基因位于 19 号染色体,编码一个 93 个氨基酸的蛋白(命名为 *mgt-16*),相对分子质量为 9 772.02,等电点为 6.04,提交后 ID 号为 GU266552。新基因 *mgt-16* 在 BALB/c 小鼠小肠表达较高,而在骨骼肌、心肌表达较低。**结论** 利用基因捕获分离获得了 TGF-β1 诱导平滑肌分化前后 2 个差异表达基因:*Mrps6* 和新基因 *mgt-16*。

[关键词] 基因捕获;转化生长因子-β1;间充质干细胞;平滑肌分化

[中图法分类号] R322.74;R394-33;R394.3 [文献标志码] A

Identification of differentially expressed genes upon TGF-β1-induced smooth muscle differentiation of mesenchymal stem cell line C3H/10T1/2 by gene trap screening

Wang Mingke[1,2], Jiang Fan[3], Sun Huiqin[1], Ye Feng[3], Cheng Jin[3], Su Yongping[1], Zou Zhongmin[3] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, [3]Institute of Toxicology, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Naval Medical Research Institute, Shanghai, 200433, China)

[**Abstract**] **Objective** To identify genes involved in transforming growth factor beta-1 (TGF-β1)-induced smooth muscle differentiation of murine embryonic mesenchymal stem cell line C3H/10T1/2 (10T1/2 cells) by gene trap screening. **Methods** 10T1/2 cells were induced by 5 ng/mL TGF-β1 to differentiate into smooth muscle cells (SMCs), which were identified by cell morphology, RT-PCR identification of smooth muscle-related genes including alpha smooth muscle actin (αSMA), smooth muscle 22 alpha (SM22α), smooth muscle myosin heavy chain (SM-MHC), serum response factor (SRF), and immunocytochemical detection of αSMA. LacZ staining was used before and after TGF-β1 induced phenotypic modulation of gene trapped 10T1/2 clones to SMCs. Differentially expressed gene sequences were obtained by rapid amplification of cDNA ends (RACE) and in silico cloning. Then the sequences were searched in GenBank using BLAST algorithm for bioinformatics analysis and submitted to GenBank by its online software BankIt. The molecular weight and isoelectric point of differentially expressed genes were calculated by pI/Mw software. The mRNA expression of a novel gene (*mgt-16*) in the intestine, skeletal muscle and heart in BALB/c mice were detected

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31201035);国家重点基础研究发展计划(973 计划,2005CB522605);全军"十一五"计划一般课题(06H029)

[通信作者] 邹仲敏,E-mail:zouzhmin@yahoo.com

粟永萍,E-mail:suyp2003@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131121.1845.021.html(2013-11-21)

by real-time PCR. **Results** The model of SMCs differentiation was successfully established based on cell morphology, RT-PCR and immunocytochemical staining. Two gene trapped clones with differential expression patterns of trapped genes were obtained by LacZ staining before and after TGF-β1 treatment. It was found that the trapped genes were mitochondrial ribosomal protein S6 (*Mrps6*) and a novel gene (*mgt-16*) when the RACE-obtained sequences were searched in GenBank using BLAST algorithm. *mgt-16* (GenBank accession No. GU266552) was mapped to mouse chromosome 19, encoded a protein whose length was 93 amino acids, molecular weight was 9 772.02 and isoelectric point was 6.04. Real-time PCR results showed that *mgt-16* was highly expressed in the intestine, while lowly expressed in the skeletal muscle and heart. **Conclusion** Two differentially expressed genes, *Mrps6* and novel gene *mgt-16*, which may be involved in smooth muscle differentiation induced by TGF-β1, are obtained by gene trap screening. These findings may expand our understanding of TGF-β1 signaling pathway and the underlying molecular mechanisms involved in the differentiation of mesenchymal stem cells into SMCs.

[**Key words**] gene trap; transforming growth factor beta-1; mesenchymal stem cells; smooth muscle differentiation

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (31201035), the National Basic Research Program (973 Program, 2005CB522605) and the Project of the "Eleventh Five-year Plan" for Medical Science Development of PLA (06H029). Corresponding author: Zou Zhongmin, E-mail: zouzhmin@yahoo.com; Su Yongping, E-mail: suyp2003@163.com

转化生长因子β (transforming growth factor beta, TGF-β)超家族是生长因子中的一个大家族,包括TGF-β1、TGF-β2和TGF-β3 3种异构体,骨形成蛋白、活化素、抑制素和其他细胞因子(如Nodal)等可参与细胞的生长、凋亡、分化、迁移,细胞外基质的形成,免疫调节,血管生成,胚胎发育及肿瘤的侵袭和转移等重要的生物学过程[1]。TGF-β1的适时和适量产生可以促进创伤愈合,而TGF-β1表达失调则可能导致创伤难愈或瘢痕过度增生[2]。TGF-β1还可诱导胚胎干细胞[3]、人类间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)[4]等向平滑肌分化,敲除TGF-β1可导致胚胎在平滑肌细胞(smooth muscle cells,SMCs)成熟前就已经死亡[5],但TGF-β信号通路调节平滑肌分化的具体分子机制还不是十分清楚[6]。

C3H/10T1/2细胞(简称10T1/2细胞)是Reznikoff等[7]从C3H小鼠胚胎分离而建立的间充质干细胞株,在研究中胚层发育和分化中可发挥重要作用[8]。本实验拟10T1/2细胞为MSCs模型,首先建立TGF-β1诱导10T1/2细胞平滑肌分化模型,之后在前期已建立的10T1/2细胞基因捕获阳性克隆库[9]基础上,利用cDNA末端快速扩增法(rapid amplification of cDNA ends, RACE)结合生物信息学方法分离TGF-β1诱导10T1/2细胞基因捕获阳性克隆库平滑肌分化前后的差异表达基因,为进一步研究平滑肌分化分子机制及TGF-β信号通路奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠间充质干细胞株C3H/10T1/2 (ATCC);DMEM高糖培养基购自HyClone公司,胎牛血清(FBS)购自Gibco公司,胰酶购自Amersco公司;TGF-β1购自美国Peprotech公司;LacZ染色试剂盒购自Activemotif公司;*Taq*聚合酶DNA Marker、M-MLV逆转录酶(RNase H$^-$)、TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV)购自TaKaRa公司;cDNA合成试剂盒购自Toyobo公司;Trizol购自Invitrogen公司;RACE试剂盒(SMART™ RACE cDNA Amplification Kit)购自Clontech公司;FastStart Universal SYBR Green Master购自Roche公司;雄性BALB/c小鼠(由解放军海军医学研究所实验动物中心提供);兔抗小鼠aSMA多克隆抗体购自Abcam公司;荧光素(FITC)标记的羊抗兔二抗购自Santa Cruz公司。

1.2 方法

1.2.1 10T1/2细胞的培养及成平滑肌分化 10T1/2细胞的培养参考文献[10]。成平滑肌分化:取生长状态良好的10T1/2细胞,按8×10^4/孔接种于24孔板。以0.5% FBS、100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素的DMEM高糖培养基预诱导24 h后,加入5 ng/mL TGF-β1 DMEM培养液再诱导24 h,同时以不加TGF-β1诱导液培养为对照。倒置相差显微镜下观察细胞形态学变化并照相保存结果。

1.2.2 RT-PCR 以3×10^5/孔接种10T1/2细胞于6孔板,5 ng/mL TGF-β1诱导后按Trizol说明书提取细胞RNA。用TaKaRa One Step RNA PCR Kit(AMV)进行一步法RT-PCR检测平滑肌分化相关基因αSMA、SM22α、SM-MHC和SRF,方法参考文献[11]。目的基因、引物序列及PCR条件见表1。

1.2.3 免疫细胞化学实验 10T1/2细胞TGF-β1诱导后免疫细胞化学实验检测aSMA蛋白表达,方法参考文献[10]。

1.2.4 LacZ染色 复苏建立的10T1/2细胞基因捕获阳性克隆库[9],TGF-β1诱导前后进行LacZ染色,步骤详见试剂盒说明书。

表1 引物序列及PCR条件

目的基因	引物序列	长度(bp)	退火温度(℃)	循环数
αSMA	上游5′-GCATCCACGAAACCACCTAT-3′	251	55.5	20
	下游5′-TCCACATCTGCTGGAAGGTA-3′			
SM22α	上游5′-CCAACAAGGGTCCATCC-3′	398	55.0	30
	下游5′-GCCCAAAGCCATTAGAGT-3′			
SM-MHC	上游5′-AGGAAACACCAAGGTCAAGCA-3′	362	55.5	40
	下游5′-CCCTGACATGGTGTCCAATC-3′			
SRF	上游5′-GCCTCAACTCGCCAGACT-3′	251	55.5	35
	下游5′-GTTGGTGATGGGGAAGGA-3′			
GAPDH	上游5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3′			
	下游5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3′	452	58.0	25

1.2.5 RACE 按Trizol说明书提取TGF-β1诱导差异表达克隆细胞RNA。用primer premier 5.0设计引物,进行第一链cDNA合成、阳性对照PCR实验及RACE,方法参考文献[11]。

1.2.6 16号克隆被捕获基因(*mgt-16*)全长的获取 按Trizol说明书提取细胞RNA。根据16号克隆3′RACE结果在NCBI网站表达序列标签(expressed sequence tag, EST)数据库中进行nBLAST多重比对,拼接后重新nBLAST至无法延伸为止。在EST电子延伸基础上设计上游引物18 bp:5′-GTCATGGCCTCCGTCAAC-3′,在16号克隆3′RACE测序结果基础上设计下游引物20 bp:5′-GCCTTAACCCTCTAGGACAG-3′。用TaKaRa One Step RNA PCR Kit(AMV)进行一步法RT-PCR,反应条件如下:50 ℃ 30 min逆转录反应,94 ℃ 2 min使逆转录酶失活,变性94 ℃ 30 s,退火52 ℃ 30 s,延伸72 ℃ 1.5 min,35个循环后72 ℃ 5 min,4 ℃ 10 min后进行巢式PCR。方法为取上述PCR产物1∶50稀释后为PCR模板,上游引物不变,下游引物20 bp:5′-CACCCCAGTAAAATCTCATC-3′,用TaKaRa *Taq*聚合酶、5% DMSO做巢式PCR。反应条件如下:预变性94 ℃ 1 min,变性94 ℃ 30 s,退火53 ℃ 30 s,延伸72 ℃ 1 min,35个循环后72 ℃ 5 min,4 ℃ 10 min后取5 μL PCR产物琼脂糖凝胶电泳,部分PCR产物送上海Invitrogen公司测序。

1.2.7 生物信息学分析 同源性分析采用GenBank网站nBLAST(http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi);蛋白质分子量和等电点计算采用pI/Mw软件(http://www.proteomics.com.cn/proteomics/pi_tool.asp)。新基因序列的提交利用GenBank网站在线软件BankIt(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/?tool=genbank)。

1.3 Real-time PCR

取雄性BALB/c小鼠小肠、骨骼肌及心肌组织各0.1 g按Trizol说明书提取RNA,用FastStart Universal SYBR Green Master进行Real-time PCR。程序:95 ℃ 2 min,95 ℃ 15 s,60 ℃ 20 s,72 ℃ 20 s,40个循环。引物序列:*mgt-16*上游5′-CCACTCCCTCAGATTGCTCA-3′,下游5′-GAAGACTTGGGCTCACTTCTGT-3′;GAPDH上游5′-GCCTTCCGTGTTCCTACC-3′,下游5′-AGAGTGGGAGTTGCTGTTG-3′。结果以Ct值形式表示,以GAPDH为内参,用$2^{-\Delta Ct}$计算基因的相对表达量。

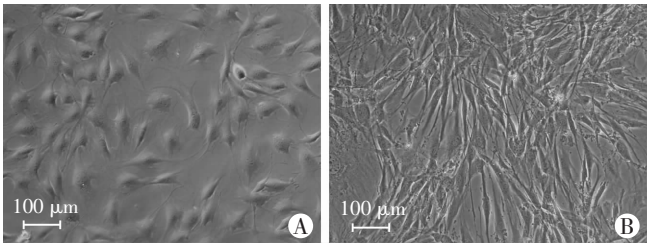
1.4 统计学分析

用Quantity One软件测量RT-PCR各条带灰度值后和相应GAPDH的灰度值相比得出相对表达量。实验数据以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件进行样本组间差异t检验或单因素方差分析。

2 结果

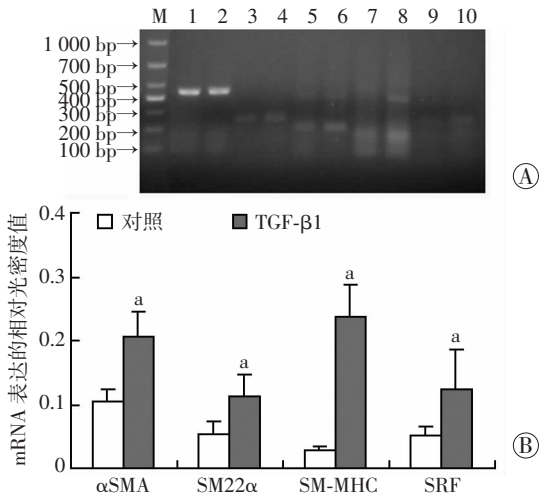
2.1 成平滑肌分化

TGF-β1诱导10T1/2细胞24 h后可见细胞胞体伸长,由成纤维细胞状变为长梭状,胞膜清晰,无空泡,可重叠生长,汇合后形成SMCs特征性的"峰谷"样生长外观,而对照组成梭形和多角形外观(图1)。RT-PCR检测可见TGF-β1诱导后平滑肌分化相关基因αSMA、SM22α、SM-MHC和SRF表达增强,而对照组表达相对较弱(图2)。免疫细胞实验检测可见TGF-β1诱导后细胞胞浆内αSMA绿色荧光蛋白表达增强,而正常培养的10T1/2细胞表达相对较弱(图3)。



A:10T1/2细胞正常培养;B:5 ng/mL TGF-β1诱导10T1/2细胞24 h

图1 10T1/2细胞成平滑肌分化细胞形态学变化 (倒置相差显微镜)



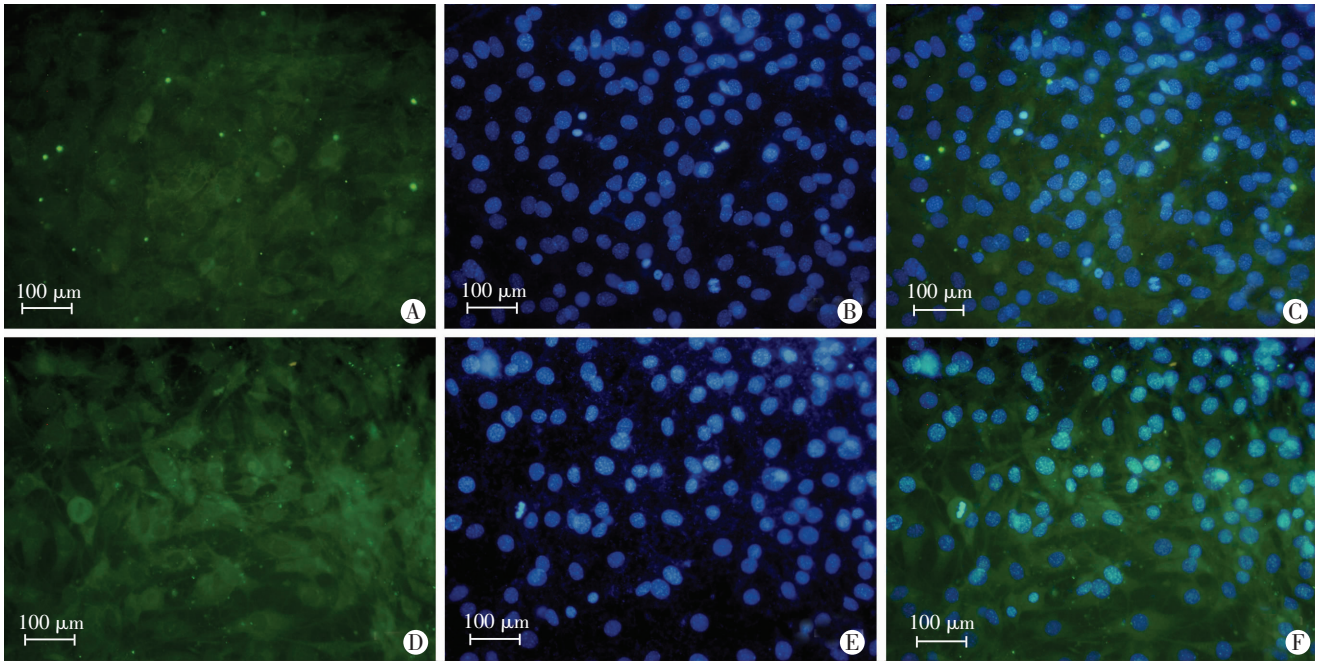
A:RT-PCR鉴定10T1/2细胞成平滑肌分化电泳结果 M:标准(DL 1 000);1~10:相邻泳道分别为对照和TGF-β1诱导后的GAPDH、αSMA、SM22α、SM-MHC和SRF;B:RT-PCR灰度值定量分析结果

a:$P<0.05$,与对照比较

图2 RT-PCR的10T1/2细胞成平滑肌分化相关标志基因表达检测

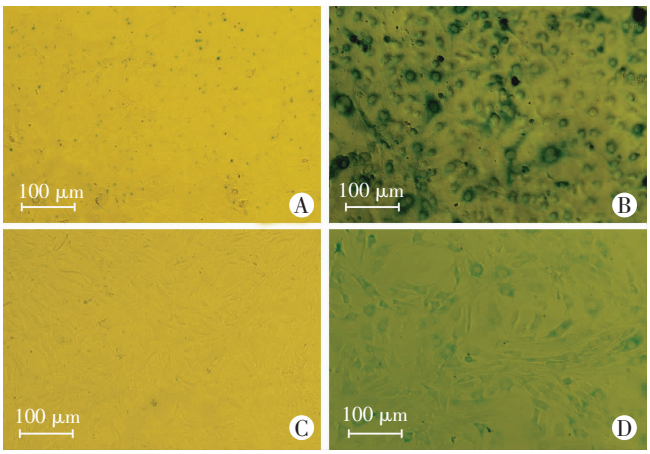
2.2 LacZ染色

LacZ染色可见捕获高表达基因的87号克隆蓝色呈泛细胞胞浆分布,而16号克隆蓝色呈细胞胞浆点状分布,TGF-β1诱导后LacZ染色,16、87号克隆蓝色细胞阳性率均下降(图4),而捕获低表达基因的10T1/2细胞基因捕获阳性克隆未见有LacZ染色变为阳性。



A:正常培养的 10T1/2 细胞弱表达 αSMA;D:10T1/2 细胞平滑肌诱导 2 d 后 αSMA 表达增强;B、E:分别为 A、D 的 DAPI 复染结果;C、F:叠加图

图 3　10T1/2 细胞平滑肌诱导后 αSMA 免疫荧光观察　(倒置荧光显微镜)

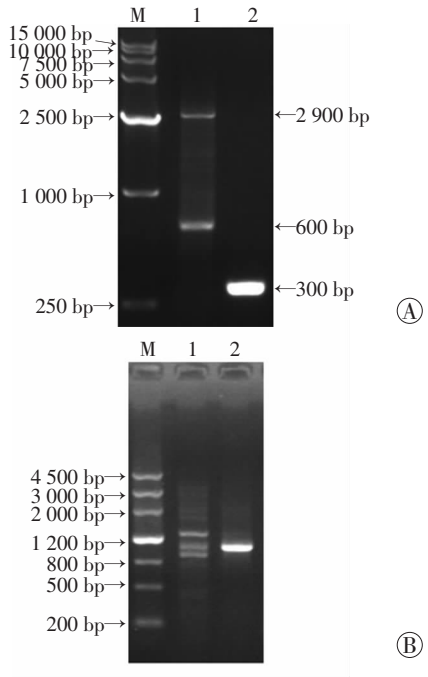


A、B:正常培养的 16 号和 87 号克隆;C、D:16、87 号克隆 TGF-β1 诱导 24 h

图 4　TGF-β1 诱导前后差异表达克隆 LacZ 染色观察　(倒置相差显微镜)

2.3　RACE 结果

利用试剂盒提供的阳性对照转铁蛋白受体为模板以 3′ RACE TFR Primer 和 UPM 配对 3′RACE 出现 2.9 kb 和 0.6 kb 两条带,以 3′RACE TFR Primer 和 5′RACE TFR Primer 配对 3′ RACE 出现 0.3 kb 条带(图 5A),与预期大小一致,说明试剂盒可用。提取 16、87 号克隆 RNA 后做 3′RACE,电泳结果见图 5B, 16 号克隆 3′RACE 出现 900、1 000、1 400 bp 左右 3 条带, 87 号克隆 3′RACE 出现约 1 000 bp 条带,将 PCR 产物送 Invitrogen 测序后发现 16 号克隆 900 bp 左右条带,87 号克隆 1 000 bp左右条带均为基因捕获载体 ROSAFARY 序列加部分基因序列组成,说明 3′RACE 获取被捕获基因 mRNA 3′端成功,而 16 号克隆 3′RACE 1 000、1 400 bp 左右2 条带不含 ROSAFARY 载体序列,根据基因捕获原理说明为非特异条带。



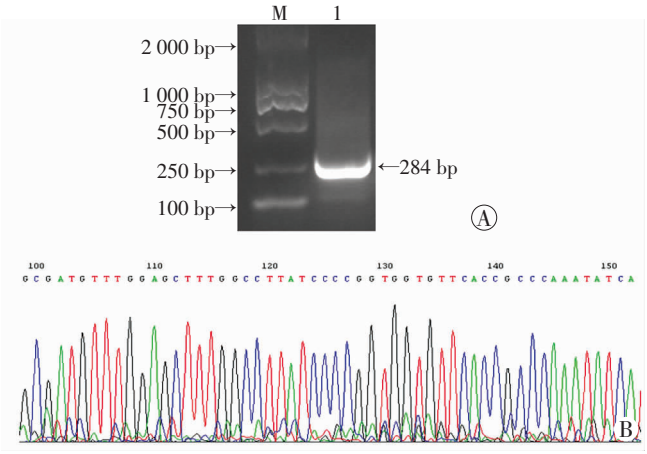
A:阳性对照 3′RACE 电泳结果　M:标准(DL 15 000);1:3′RACE TFR Primer 和 UPM 配对 3′RACE;2:5′和 3′RACE TFR Primer 配对 3′RACE;B:16、87 号克隆 3′RACE 电泳结果　M:标准(DL 4 500);1:16 号克隆 3′RACE;2:87 号克隆 3′RACE

图 5　阳性对照及 16、87 号克隆 3′RACE 电泳结果

2.4　16 号克隆被捕获基因全长的获取

根据 16 号克隆被捕获基因(命名为 *mgt-16*)3’RACE 测序结果在 EST 数据库中 nBLAST 多重比对,拼接后重新 nBLAST 至无法延伸为止。在 EST 电子延伸基础上设计引物做巢式 RT-PCR,电泳出现 284 bp 条带(图 6A),测序后获得 16 号克隆

被捕获基因序列，巢式 RT-PCR 部分测序结果见图 6B。

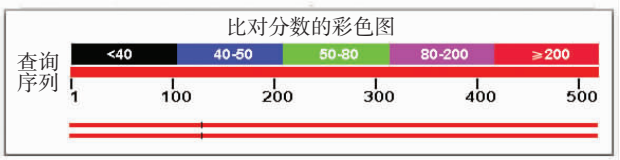


A：16 号克隆 RT-PCR 电泳结果 M：DNA 标准（DL 2 000）；1：*mgt-16*；B：16 号克隆 RT-PCR 电泳产物测序结果

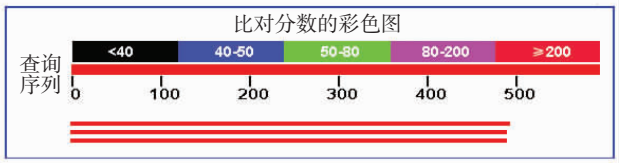
图 6 *mgt-16* 基因 RT-PCR 电泳及测序结果

2.5 生物信息学分析

以 16 号克隆被捕获基因 *mgt-16* 基因全长在 GenBank 数据库中 nBLAST，发现被捕获基因 *mgt-16* 为新基因，长 516 bp，位于 19 号染色体（图 7A），含 2 个外显子和 1 个内含子，编码 93 个氨基酸，蛋白相对分子质量为 9 772.02，等电点为 6.04，提交 GenBank 后获 ID 号为 GU266552。根据 87 号克隆 3′RACE 测序结果在 GenBank 网站基因组 nBLAST，发现被捕获基因为已知基因线粒体核糖体蛋白 S6（mitochondrial ribosomal protein S6，*Mrps6*），同源性为 83%（图 7B）。



	描述	总分	查询符合度	E 值	一致性	
基因组序列 小鼠 19 号染色体		958	100%	0.0	99%	A



描 述	总分	查询符合度	E 值	一致性	
转录本 小鼠线粒体核糖体蛋白 S6	905	83%	0.0	99%	
基因组序列 小鼠 16 号染色体	905	82%	0.0	100%	B

A：16 号克隆被捕获基因基因组 nBLAST；B：87 号克隆 3′RACE 测序结果基因组 nBLAST

图 7 16 号克隆被捕获基因及 87 号克隆 3′RACE 测序结果基因组 nBLAST

2.6 Real-time PCR 检测小鼠各组织 *mgt-16* 的 mRNA 表达

Real-time PCR 检测结果显示，新基因 *mgt-16* 的 mRNA 在 BALB/c 小鼠小肠表达较高，相对表达量为 $(9.81 \pm 1.28) \times 10^{-5}$，而在骨骼肌、心肌中表达较低，相对表达量分别为 $(2.55 \pm 0.187) \times 10^{-6}$ 和 $(2.07 \pm 0.416) \times 10^{-6}$，与小肠中的 *mgt-16* 基因表达相比差异均具有统计学意义（$P < 0.05$）。

3 讨论

血管在胚胎发育中是第一个发育的器官。血管生成涉及胚胎发育、月经周期、损伤组织修复、肿瘤、炎症、类风湿和糖尿病视网膜病等多种生理病理过程[12]。正常生理情况下，SMCs 是构成血管壁中膜最主要的细胞，具有收缩、调节血管张力和维持血压等功能，主要表达收缩状态的蛋白，为收缩表型而不表现增殖能力，当 SMCs 去分化为增殖状态时参与了血管性疾病如动脉粥样硬化和血管再狭窄、高血压、哮喘、肿瘤等疾病的发生和发展[13]。因此，研究 SMCs 分化分子机制有助于预防增殖相关血管性疾病，对于理解和预防其他血管相关性疾病也十分重要。

10T1/2 细胞为小鼠胚胎时期间充质来源干细胞，具有成肌、成脂、成内皮、成神经元分化等多向分化的能力，可作为较好的研究 MSCs 生物学特性的模型应用于创伤愈合的基础研究[10,14]。研究[15]表明，TGF-β1 也可诱导 10T1/2 细胞分化为 SMCs。本实验通过细胞形态学证实 TGF-β1 诱导后 10T1/2 细胞出现 SMCs 特征性的“峰谷”样生长外观，RT-PCR 证实 αSMA、SM22α、SM-MHC、SRF 等平滑肌分化相关基因表达增强，免疫荧光实验证实胞浆 αSMA 蛋白表达增强，说明本实验条件下成功建立了 TGF-β1 诱导 10T1/2 细胞平滑肌分化模型。

寻找差异表达的基因方法主要有差异显示、基因表达序列分析、抑制消减杂交、表达序列标签比较分析、DNA 微阵列等，但它们均有一定的缺点即以mRNA为研究起始材料，在检测低丰度及少量细胞表达的基因时存在局限或即使找出差异表达序列但往往只是基因的部分片段[16]。而 1989 年 Gossler 等[17]介绍的基因捕获技术利用单个载体可在一个实验中产生大量突变体，十分适合高通量、大范围的寻找差异表达基因，也适合于检测短暂表达或表达水平较低的基因、多效基因，还可能发现新基因，基因捕获载体的插入打断被捕获基因还能达到“基因敲除”的效果[18-19]。本实验应用的基因捕获载体 ROSAFARY 为逆转录病毒载体，由启动子捕获元件（SAβgeopA）和 polyA 捕获元件（PGKhygSD）两部分组成。在插入内源基因后，SAβgeopA 部分的 SA 序列在转录后剪接时可和内源基因前一外显子接头，形成 LacZ 与被捕获基因的融合转录本，如读码框架一致，βgeo 部分可被前一外显子的启动子激活形成 LacZ 融合蛋白，通过 LacZ 染色可

提示被捕获基因在细胞内的表达强度和亚细胞分布。PGKhygSD 自带启动子且含潮霉素耐药基因,不管捕获基因表达与否均可通过潮霉素筛选获得基因捕获阳性克隆,且捕获的基因可由 3′RACE 获得[11,20]。

本实验通过复苏课题组前期建立的基因捕获 10T1/2 细胞阳性克隆库[9],发现了 2 个 TGF-β1 处理后 LacZ 染色阳性率明显下调的基因捕获克隆,为 16、87 号克隆。利用 RACE、EST 电子延伸结合 RT-PCR 获取了 16、87 号克隆被捕获基因部分或全长序列,在 GenBank 中 nBLAST 后发现 16 号克隆被捕获基因为新基因(命名为 *mgt-16*),87 号克隆被捕获基因为 *Mrps6*。LacZ 染色显示 87 号克隆蓝色呈泛细胞胞浆分布,而 16 号克隆蓝色呈细胞胞浆点状分布。根据基因捕获原理[11],LacZ 染色提示 *Mrps6* 为泛细胞胞浆表达蛋白,*mgt-16* 为细胞胞浆点状表达蛋白。此外,根据基因捕获原理[11]及 *mgt-16* 和 ROSAFARY 载体的融合转录本序列结合 ROSAFARY 载体 LacZ 读码框不难得出 *mgt-16* 的蛋白编码序列。我们推断 *mgt-16* 编码一个 93 个氨基酸的蛋白(*mgt-16*)。*Mrps6* 和 *mgt-16* 基因在 TGF-β1 诱导后均显著下调,提示 *Mrps6* 和 *mgt-16* 基因可能均参与 TGF-β1 诱导间充质干细胞平滑肌分化过程,具体机制有待下一步研究。Real-time PCR 检测结果显示,新基因 *mgt-16* 在 BALB/c 小鼠含平滑肌丰富的小肠表达较高,而在另外两种肌肉类型(骨骼肌、心肌)中表达较低。*mgt-16* 在含平滑肌丰富的小肠较高表达可能与维持小肠平滑肌稳态,防止小肠平滑肌过度增生有关,这是值得下一步深入研究的问题。

总之,本实验首先建立 TGF-β1 诱导 10T1/2 细胞平滑肌分化模型,之后以 10T1/2 细胞基因捕获阳性克隆库为基础,使用 TGF-β1 诱导其平滑肌分化,TGF-β1 诱导前后 LacZ 染色筛选获得 2 个差异表达克隆。通过 RACE 及生物信息学等方法获得 2 个差异表达基因,在 GenBank 中 nBLAST,发现为 *Mrps6* 和新基因 *mgt-16*,LacZ 染色发现 *Mrps6* 呈泛细胞胞浆分布,新基因 *mgt-16* 呈细胞胞浆点状分布。Real-time PCR 检测发现 *mgt-16* 在 BALB/c 小鼠小肠表达较高,而在骨骼肌、心肌中表达较低。一方面揭示了 *Mrps6* 参与 TGF-β1 诱导间充质干细胞平滑肌分化的新功能,另一方面克隆了参与 TGF-β1 诱导间充质干细胞平滑肌分化的新基因 *mgt-16*,下一步将深入研究 *Mrps6* 和新基因 *mgt-16* 在 TGF-β1 信号通路中的作用及参与 TGF-β1 调控平滑肌分化的具体分子机制。

参考文献:

[1] Rahimi R A, Leof E B. TGF-beta signaling: a tale of two responses [J]. J Cell Biochem, 2007, 102(3): 593 – 608.
[2] Haroon Z A, Amin K, Saito W, *et al*. SU5416 delays wound healing through inhibition of TGF-beta 1 activation [J]. Cancer Biol Ther, 2002, 1(2): 121 – 126.
[3] Han Y, Li N, Tian X, *et al*. Endogenous transforming growth factor (TGF) beta1 promotes differentiation of smooth muscle cells from embryonic stem cells: stable plasmid-based siRNA silencing of TGF beta1 gene expression[J]. J Physiol Sci, 2010, 60(1): 35 – 41.
[4] Kim Y M, Kim J, Heo S C, *et al*. Proteomic identification of ADAM12 as a regulator for TGF-beta1-induced differentiation of human mesenchymal stem cells to smooth muscle cells[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e40820.
[5] Dickson M C, Martin J S, Cousins F M, *et al*. Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice[J]. Development, 1995, 121(6): 1845 – 1854.
[6] Kurpinski K, Lam H, Chu J, *et al*. Transforming growth factor-beta and notch signaling mediate stem cell differentiation into smooth muscle cells[J]. Stem Cells, 2010, 28(4): 734 – 742.
[7] Reznikoff C A, Brankow D W, Heidelberger C. Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division[J]. Cancer Res, 1973, 33(12): 3231 – 3238.
[8] Pinney D F, Emerson C P Jr. 10T1/2 cells: an *in vitro* model for molecular genetic analysis of mesodermal determination and differentiation [J]. Environ Health Perspect, 1989, 80: 221 – 227.
[9] 王明科, 邹仲敏, 罗成基, 等. 多用途基因捕获 C3H/10T1/2 细胞阳性克隆库的构建及鉴定[J]. 第四军医大学学报, 2008, 29(6): 508 – 512.
[10] 王明科, 邹仲敏, 粟永萍, 等. 小鼠胚胎间充质干细胞系 C3H/10T1/2 的多向分化潜能研究[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(21): 2029 – 2033.
[11] Wang M, Sun H, Jiang F, *et al*. Cloning and characterization of a novel gene with alternative splicing in murine mesenchymal stem cell line C3H/10T1/2 by gene trap screening[J]. BMB Rep, 2010, 43(12): 789 – 794.
[12] Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease [J]. Nat Med, 2003, 9(6): 653 – 660.
[13] Rzucidlo E M. Signaling pathways regulating vascular smooth muscle cell differentiation[J]. Vascular, 2009, 17(Suppl 1): S15 – S20.
[14] Wang M, Su Y, Sun H, *et al*. Induced endothelial differentiation of cells from a murine embryonic mesenchymal cell line C3H/10T1/2 by angiogenic factors *in vitro*[J]. Differentiation, 2010, 79(1): 21 – 30.
[15] Lien S C, Wei S Y, Chang S F, *et al*. Activation of PPAR-alpha induces cell cycle arrest and inhibits transforming growth factor-beta1 induction of smooth muscle cell phenotype in 10T1/2 mesenchymal cells [J]. Cell Signal, 2013, 25(5): 1252 – 1263.
[16] 樊红, 李钰. 克隆新基因 cDNA 全长的策略和方法[J]. 国外医学:遗传学分册, 2002, 25 (1): 11 – 13.
[17] Gossler A, Joyner A L, Rossant J, *et al*. Mouse embryonic stem cells and reporter constructs to detect developmentally regulated genes[J]. Science, 1989, 244 (4903): 463 – 465.
[18] Yoo S, Kim Y, Lee H, *et al*. A gene trap knockout of the Tiam-1 protein results in malformation of the early embryonic brain[J]. Mol Cells, 2012, 34(1): 103 – 108.
[19] 魏小慧, 郑肖兰, 郑服丛. 启动子捕获技术及其研究进展[J]. 江西农业学报, 2009, 21(4): 66 – 68.
[20] Chen W V, Delrow J, Corrin P D, *et al*. Identification and validation of PDGF transcriptional targets by microarray-coupled gene-trap mutagenesis[J]. Nat Genet, 2004, 36(3): 304 – 312.

(**收稿**:2013-07-31;**修回**:2013-09-26)
(编辑 张 维)