doi:10.11659/jjssx.06E019007

·基础研究·

Pax6 基因在小鼠骨髓间充质干细胞中的过表达

方可心,丁 玲,辛 颖,马静怡,李 倩,高 杰 (贵州医科大学组织学与胚胎学教研室,贵州 贵阳 550004)

[摘 要] **目的** 体外研究 Pax6 基因在小鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)中的表达情况。**方法** 利用全骨髓贴壁法体外分离培养小鼠 BMSCs,将包装成功的 Pax6 慢病毒表达颗粒感染 BMSCs,经 G418 梯度及荧光蛋白双筛选后,使用细胞免疫荧光染色、蛋白印迹技术及反转录 PCR(RT-PCR)技术检测 Pax6 的表达情况,流式细胞术检测 Pax6/BMSCs 阳性细胞的比例。**结果** Pax6 成功在 BMSCs 内过表达,流式结果显示 Pax6 阳性率超过 90%。**结论** 建立 Pax6 稳定表达的细胞株 Pax6/BMSCs 可为下一步其在眼表组织工程方面的研究奠定基础。

[关键词] Pax6;骨髓间充质干细胞;G418 筛选;流式细胞术
[中图分类号] R329.2 [文献标识码] A [收稿日期] 2019-06-03

Overexpression of Pax6 gene in mouse bone marrow mesenchymal stem cells

FANG Ke-xin, DING Ling, XIN Ying, MA Jing-yi, LI Qian, GAO Jie (Department of Histology and Embryology, Guizhou Medical University, Guiyang Guizhou 550004, China)

Abstract: Objective To study the expression of Pax6 gene in mouse bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) in vitro. **Methods** BMSCs of mouse were isolated and cultured in vitro. The successfully packaged Pax6 lentivirus expression particles were infected with BMSCs. After G418 gradient and fluorescent protein double screening, the expression of Pax6 was detected by immunofluorescence staining, western blot, and reverse transcription PCR (RT-PCR). The proportion of Pax6/BMSCs positive cells was detected by flow cytometry. **Results** Pax6 was successfully expressed in BMSCs. Flow cytometry showed that the positive rate of Pax6 was more than 90%. **Conclusion** Establishment of cell lines Pax6/BMSCs with stable expression of Pax6 lays a foundation for the further study of ocular surface tissue engineering.

Keywords: Pax6; bone marrow mesenchymal stem cells; G418 screening; flow cytometry

角膜位于眼球壁的最前方,内外环境因素均可导致角膜疾病,并严重影响视力和外观。角膜缘干细胞(limbal stem cells,LSCs)位于角膜上皮基底层,能够维持角膜上皮正常生理功能。多项研究表明,LSCs 可用于眼表疾病的临床治疗[1-3],但因来源缺乏,其研究和应用受限[4-5]。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells,BMSCs)是来源于中胚层的具有多向分化潜能的一种成体干细胞[6]。BMSCs 具有取材方便、易于分离培养扩增、低免疫原性的特点,目前广泛应用于组织损伤修复和疾病治疗,并且无致瘤性,是再生医学最具潜力的种子细胞之一[7-8]。

人配对盒基因 6(paired box gene,Pax6)是脊椎动物 Pax 家族成员之一,对于眼球的形成控制起着非常重要的作用。研究表明,Pax6 基因不仅与虹膜发育有关,同时与角膜及神经视网膜的形成也密切相关[9]。有文献报道了干细胞治疗角膜疾病的突破性成果,提出 Pax6 是调控 LSCs 分化的关键因子之一,且 p63 协同 Pax6 促进了 LSCs 定向分化[10]。迄今为止,BMSCs 在角膜方面的研究多集中在角膜上皮细胞。然而,角膜上皮细胞的增殖分化潜能限制了其在眼表修复中的应用。因此,结合国内外研究进展,本研究拟利用分子生物学技术在小鼠 BMSCs 中过表达 Pax6 基因,建立 Pax6/BMSCs 稳定细胞株,以期为细胞定向分化提供充足的种子细胞来源并奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

健康清洁级 C57BL/6 小鼠 10 只,体质量 18~20 g,周龄 7~8 周,由贵州医科大学实验动物中心提供[动物合格证号:SYXK(黔)2018-001]。DMEM/F12 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司;小鼠抗大鼠 CD45-PE、CD29-FITC 和 CD34-直标单克隆抗体购自 BD Pharmingen;兔抗 Pax6 多克隆抗体(稀释浓度 1∶200)和 Cy3 荧光山羊抗兔二抗(稀释浓度 1∶300)购自碧云天公司;APC 荧光山羊抗兔二抗(稀释浓度 1∶100)购自 Abcam。载体 LV-

[基金项目] 贵州医科大学 2018 年度学术新苗培养及创新探索专项项目(黔科合平台人才[2018]5779-21);贵州省普通高校科技拔尖人才支持计划[黔科合 KY 字 2016(071)号];贵州省科技支撑计划(黔科合支撑[2017]2970 号)

[通信作者] 高 杰,E-mail:604752746@qq.com

EF1a-Pax6-AcGFP1-CMV-Neo-WPRE 及病毒包装由武汉枢密脑科学技术有限公司提供技术支持。Pax6 引物由上海生工设计合成。上游引物:5′-ATCAGAGTCGACATGCAGAACAGTCACAGCGGAG-3′,下游引物:5′-ATCTGAGGATCCTTACTGTAATCGAGGCCAGTACTG-3′。

1.2 方法

1.2.1 小鼠 BMSCs 分离与培养 颈椎脱臼处理小鼠,75%酒精浸泡 5 min,无菌条件下分离取下胫骨、股骨,去除肌肉及软组织,暴露骨髓腔,DMEM/F12 培养基冲洗骨髓腔至发白,收集冲洗液。1 000 r/min 离心 5 min收集细胞,弃上清,以 $4\times10^5/cm^2$ 接种于 DMEM/F12 完成培养液(含 100 U/mL 青霉素、100 U/mL链霉素、12%胎牛血清)的培养瓶中,置于37 ℃、5% CO_2 培养箱培养。48 h 后半换液,去除不贴壁细胞,以后每 3 d 换液。待细胞融合 80% ~90%,弃培养基,PBS 洗 2 遍后 0.25%胰蛋白酶消化 3 min,用完全培养液终止消化,1 000 r/min 离心 5 min,完全培养液重悬后以 1∶2传代培养。

1.2.2 小鼠 BMSCs 的表面分子鉴定 每日用倒置显微镜观察细胞的形态及生长情况。P3 代细胞融合 90%后以 0.25%胰蛋白酶对细胞进行正常消化,1 000 r/min离心 5 min 后弃上清,PBS 溶液重悬,轻轻吹打成单细胞悬液,细胞计数,调整细胞数,取 95 μL 细胞悬液(1×10^6 个细胞)至 1.5 mL EPP 管中,分别加入小鼠抗大鼠 CD45-PE、CD29-FITC 和 CD34-直标单克隆抗体及其同型对照各 5 μL,充分混匀后 4 ℃避光孵育过夜,测试前 1 000 r/min 离心 5 min 后,弃上清,PBS 洗涤 1 次,补足溶液体积 500 μL,混匀,200 目滤网过滤,流式细胞仪检测。

1.2.3 小鼠 BMSCs 的成骨诱导分化鉴定 取 P3 代细胞,以 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板上,正常培养 1 d后,诱导组加入成骨诱导培养液进行诱导分化,对照组加入等量 BMSCs 完全培养液,每 3 d 换液 1 次,成骨诱导 21 d 后进行茜素红染色。

1.2.4 G418 对 BMSCs 的毒性实验 收集对数生长期的第 3 代 BMSCs,以 2×10^5 个/孔的密度种植于 24 孔板,24 h 后加入不同浓度梯度(0、50、100、200、300、400、600、800 μg/mL)的 G418 筛选,每 4 d 换液 1 次,逐日观察细胞死亡情况;14 d 后去掉培养基,观察残留细胞数目,以细胞全部死亡的最低 G418 浓度为最佳筛选浓度。

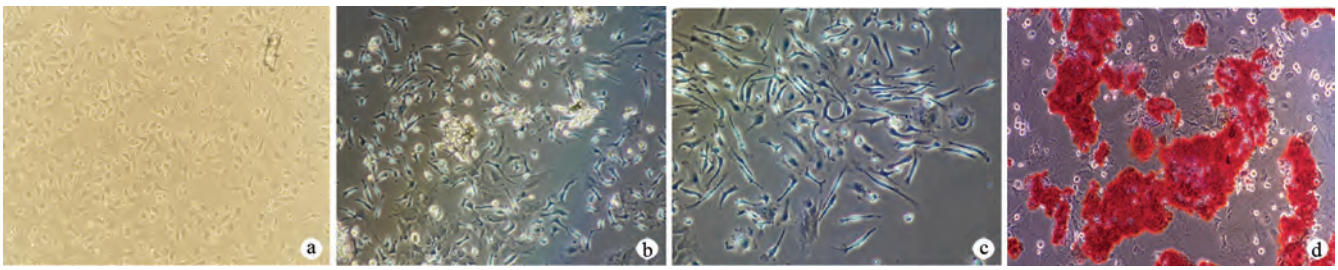
1.2.5 Pax6 慢病毒感染 BMSCs 及鉴定 选取对数生长期的第 3 代 BMSCs,病毒原液用 PBS 稀释 10 倍,均匀感染细胞,空载体病毒作对照。用含有 200 μg/mL G418(上一步实验结果)进行筛选 7 d 后,将细胞传至 96 孔板继续筛选 21 d,倒置荧光显微镜下挑选荧光强度较亮的细胞进行扩增,100 μg/mL G418 维持培养。通过细胞免疫荧光染色及 Western blot 技术检测 Pax6 蛋白的表达情况。

1.2.6 Pax6 阳性细胞检测 收集筛选过的 Pax6/BMSCs,2 000 r/min 离心 5 min,0.01%甲醛/PBS 固定 15 min,2 000 r/min 离心 5 min,PBS 洗 2 遍,TrionX-100 破膜 15 min,2% BSA 重悬细胞,调整细胞量约 10^6 个/管,加入兔多克隆 Pax6 一抗,混匀,冰上孵育 45 min,PBS 洗 2 遍,去掉一抗,2% BSA 100 μL 重悬后,加入 APC 山羊抗兔荧光二抗避光冰上孵育30 min,去除二抗,PBS 重悬,混匀后上机检测。

2 结果

2.1 小鼠 BMSCs 体外培养的形态学观察及鉴定

采用全骨髓贴壁法成功分离培养出了 BMSCs。原代细胞刚接种时呈圆形漂浮于培养基中,24 ~48 h 贴壁,贴壁细胞呈不规则形;1 周左右细胞呈集落样生长,形态逐渐变为长梭形(图 1a)。传代培养:P1 代细胞 4 ~5 d 后长满 80% ~90%,呈成纤维细胞样生长,杂细胞数量较多(图 1b);而 P3 代细胞处于生长旺盛时期,细胞呈梭形或多角形,胞浆丰富,胞核明显,呈典型漩涡状生长(图 1c)。BMSC 成骨诱导液诱导21 d后茜素红染色鉴定。茜素红染色可见大量橘红色矿化结节,表明细胞可向成骨细胞方向分化(图 1d)。



a:P0 原代培养 3 d;b:传代培养 P1 代细胞;c:传代培养 P3 代细胞;d:成骨诱导 21 d 茜素红染色

图 1 小鼠 BMSCs 培养光镜图(×200)

2.2 小鼠 BMSCs 表面分子的表达

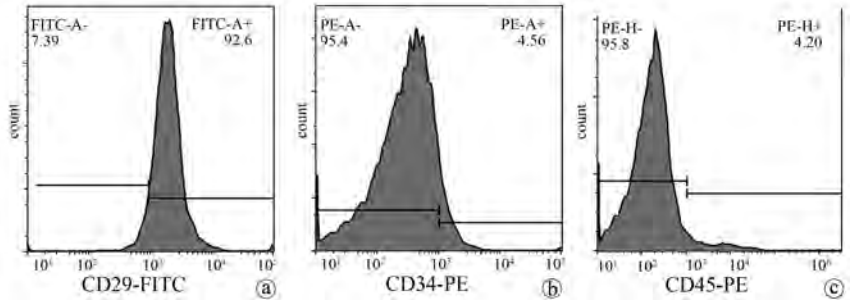
流式细胞仪检测原代分离纯化所得的 P3 代细胞表面抗原,结果显示:细胞表达 92.6% CD29,阴性表达 CD34 和 CD45,表达率为 4% 左右(图 2)。

2.3 免疫荧光染色检测 Pax6 在 BMSCs 的表达

经 G418 筛选后收集细胞株,免疫荧光染色显示:2 组细胞胞质内均见 GFP 绿色荧光蛋白的表达,Pax6/BMSCs 组可见 Pax6 表达,阳性产物表达于细胞核,红色荧光,而对照组未见红色荧光出现(图 3)。

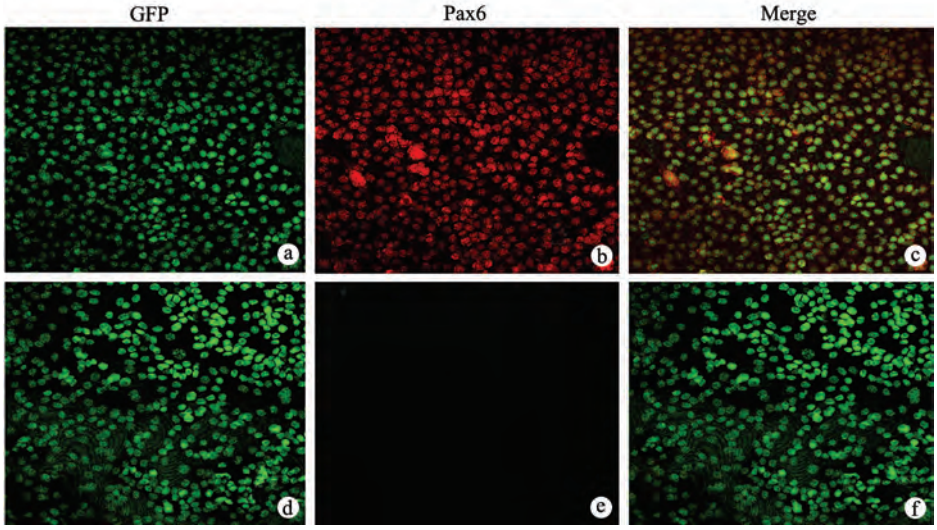
2.4 RT-PCR 检测 Pax6 在 BMSCs 的表达

Pax6/BMSCs 组可见明显 Pax6 条带,大小约 1 269 bp,而对照组细胞株未见到 Pax6 条带(图 4)。



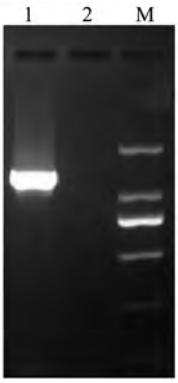
a:CD29;b:CD34;c:CD45

图 2 小鼠 BMSCs 流式细胞术表面分子检测图



a、b、c:Pax6/BMSCs 细胞株;d、e、f:对照组细胞株

图 3 免疫荧光检测 Pax6/BMSCs 细胞株中 Pax6 的表达(×400)

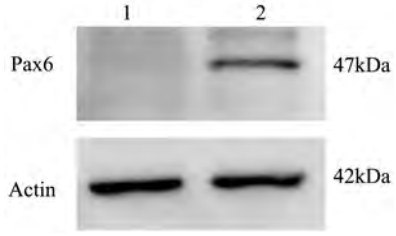


1:Pax6/BMSCs 细胞株 PCR 扩增产物;2:对照组细胞株 PCR 扩增产物;M:markerD 2 000,从上至下条带大小分别是 2 000 bp、1 000 bp、750 bp、500 bp、250 bp

图 4 Pax6/BMSCs 细胞株中 Pax6 基因的表达

2.5 Western blot 检测 Pax6 在 BMSCs 的表达

分别收集 Pax6/BMSCs 组和对照组的蛋白,检测 BMSCs 内 Pax6 蛋白表达情况,Pax6/BMSCs 组可在 47 kDa处见到明显的 Pax6 条带,对照组未见 Pax6 蛋白条带(图 5)。

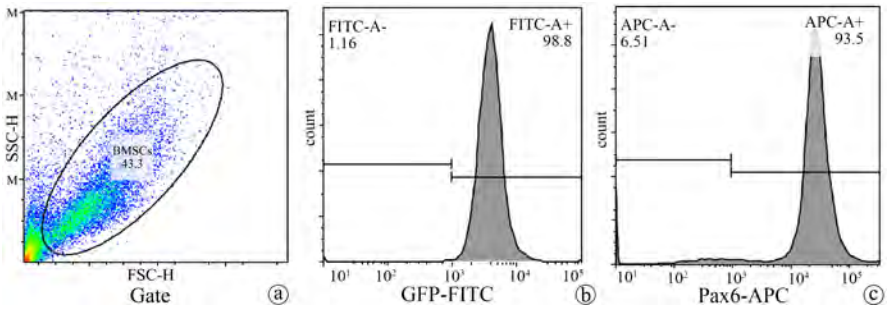


1:对照组细胞株蛋白;2:Pax6/BMSCs 细胞株蛋白

图 5 Pax6/BMSCs 细胞株中 Pax6 基因的表达

2.6 Pax6/BMSCs 细胞株阳性细胞率检测

流式细胞仪检测 G418 筛选后的 Pax6/BMSCs 细胞株 Pax6 阳性率,结果显示:GFP 和 Pax6 阳性率可达 90% 左右(图 6)。



a:圈门;b:GFP;c:Pax6

图 6 流式细胞术分析 Pax6/BMSCs 细胞株中 Pax6 的阳性率

3 讨论

近年来随着组织工程技术的发展,干细胞在角膜损伤修复方面的研究不断深入。BMSCs 是位于骨髓基质中的一种成体干细胞,可广泛存在于体内各组织中,特别是在骨髓中含量较高。关于 BMSCs 的鉴定目前主要有:①细胞成纤维样细胞形态,黏附贴壁生长;②不表达造血表面标志 CD14、CD34、CD45,缺乏共刺激分子 CD40、CD80,表达 CD106、CD29 和 CD90 等[11];③能诱导分化成为各种不同的细胞类型,包括成骨细胞、脂肪细胞以及软骨细胞[12]。鉴于 BMSCs 的以上特性,本实验采用全骨髓贴壁法分离培养小鼠 BMSCs,原代培养 1 周后可见大量密集分布梭形、多角形的贴壁细胞,连续传代培养细胞形态不发生明显变化,纯度提高,经流式细胞术检测 P3 代细胞显示,BMSCs 高表达 CD29,阴性表达 CD45 和 CD34,且体外能诱导向成骨方向分化,与文献报道一致[13]。

稳定细胞株建立的基本原理是将外源 DNA 克隆到具有某种抗性的载体上,载体被转染到宿主细胞并整合到宿主染色体中,用载体中所含的抗性标志进行筛选。G418 是稳定转染最常用的抗性筛选试剂之一,能够通过干扰核糖体的功能阻断细胞的蛋白合成[14]。当转染的载体中携带的抗 G418 的抗性基因表达时,细胞获得对 G418 抗性而不死亡,从而区别基因转染是否成功[15]。由于不同真核细胞对 G418 敏感度不同,所以在筛选细胞株之前,本研究首先检测 G418 对 BMSCs 的毒性作用,设置 0 ~ 800 μg/mL 等 8 个级别的 G418 浓度,连续培养 14 d 后,最终确定出 200 μg/mL 是细胞全部死亡的最低浓度。因此,在进行 Pax6/BMSCs 细胞株筛选时选用 200 μg/mL,维持筛选浓度的一半即 100 μg/mL,筛选 1 ~ 2 代后可得到稳定细胞株。为确定细胞株的准确性,本研究采用免疫荧光染色检测细胞内 Pax6 及 GFP 表达, Western blot 检测细胞株内 Pax6 蛋白表达,RT-PCR 检测细胞株内 Pax6 mRNA 表达情况。以上结果均表明 Pax6 成功转染入 BMSCs 并成功表达。

BMSCs 可诱导分化为上皮细胞,并对眼表损伤修复具有一定的治疗作用[16-17]。细胞的增殖分化在分子水平受多种基因的精确调节,任何特定细胞发育形成,都是细胞内部因素和外部微环境共同作用的结果。在组织发育中,Pax6 能与多种因子结合,直接或间接地调控多种其他转录因子、蛋白、激素等靶标,从而调节多种生命活动的进行,广泛参与细胞增殖迁移分化和黏附等生命活动。

综上所述,本实验成功地将外源基因 Pax6 导入 BMSCs 中,并通过荧光和抗性双筛成功建立 Pax6/BMSCs,为下一步 Pax6/BMSCs 定向分化为 LSCs 样细胞及探讨可能的分子作用机制提供了细胞来源,更为干细胞来源的 LSCs 移植治疗角膜疾病奠定了基础。

[参考文献]

[1] Qu L,Yang X,Wang X,et al. Reconstruction of corneal epithelium with cryopreserved corneal limbal stem cells in a rabbit model[J]. Vet J,2010,75(11):1607 - 1616. doi:10.1016/j.tvjl.2007.10.009.

[2] Schwab IR,Reyes M,Isseroff RR. Successful transplantation of bioengineered tissue replacements in patients with ocular surface disease[J]. Cornea,2000,19(4):421 - 426. doi:10.1016/s0002 - 9394(00)00747 - 9.

[3] Menzel-Severing J,Kruse FE,Schlötzer-Schrehardt U. Stem cell-based therapy for corneal epithelial reconstruction:present and future[J]. Can J Ophthalmol,2013,48(1):13 - 21. doi:10.1016/j.jcjo.2012.11.009.

[4] Ordonez P,Girolamo ND. Limbal epithelial stem cells:role of the niche microenvironment[J]. Stem Cells,2012,30(2):100 - 107. doi:10.1002/stem.794.

[5] Yoon JJ,Ismail S,Sherwin T. Limbal stem cells:central concepts of corneal epithelial homeostasis[J]. World J Stem Cells,2014,6(4):391 - 403. doi:10.4252/wjsc.v6.i4.391.

doi:10.11659/jjssx.04E019050

·基础研究·

甘草酸对切口愈合模型大鼠促进切口愈合及防止瘢痕形成效果的研究

陈志勇,李栋梁,余雪丰,刘姗姗,吴 萍,黄洁清 (涪陵中心医院烧伤整形科,重庆 408099)

[摘 要] **目的** 研究甘草酸促进胶原合成对切口愈合模型大鼠瘢痕形成及切口愈合的效果。**方法** 选择50只SD健康大鼠,随机分为空白对照组、模型组、低剂量组、中剂量组和高剂量组,每组10只。模型组、低剂量组、中剂量组、高剂量组均建立切口愈合模型,30 min后对低剂量组、中剂量组、高剂量组大鼠分别静脉注射10 mg/kg、15 mg/kg、30 mg/kg甘草酸,术后3 d、7 d、14 d观察各组大鼠变化。进行组织切片、HE染色,观察大鼠病理组织学变化,检测创面组织中Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原、VEGF、bFGF、EGF mRNA表达量及Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原、PTEN/AKT/VEGF信号通路蛋白表达量,计算愈合瘢痕面积、创面愈合率及愈合时间,并进行组间比较。**结果** 术后3 d、7 d、14 d低剂量组、中剂量组、高剂量组大鼠创面组织中Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原、VEGF、bFGF、EGF mRNA及Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原、VEGFR2、p-AKT蛋白表达量均高于模型组,PTEN蛋白表达量低于模型组,差异具有统计学意义($P<0.05$);术后3 d、7 d、14 d中剂量组、高剂量组大鼠创面组织中Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原、VEGF、bFGF、EGF mRNA及Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原、VEGFR2、p-AKT蛋白表达量均高于低剂量组,PTEN蛋白表达量低于低剂量组,差异具有统计学意义($P<0.05$);术后3 d、7 d、14 d高剂量组大鼠创面组织中Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原、VEGF、bFGF、EGF mRNA及Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原、VEGFR2、p-AKT蛋白表达量均高于中剂量组,PTEN蛋白表达量均低于中剂量组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。术后3 d、7 d、14 d低剂量组、中剂量组、高剂量组大鼠愈合瘢痕面积、创面愈合率均高于模型组大鼠,创面愈合时间短于模型组,差异具有统计学意义($P<0.05$);术后3 d、7 d、14 d中剂量组、高剂量组大鼠愈合瘢痕面积、创面愈合率均高于低剂量组,创面愈合时间短于低剂量组,差异具有统计学意义($P<0.05$);术后3 d、7 d、14 d高剂量组大鼠愈合瘢痕面积、创面愈合率均高于中剂量组,创面愈合时间短于中剂量组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 甘草酸通过作用于PTEN/AKT/VEGF信号通路,减轻切口创面炎性浸润,促进胶原合成、创面愈合,防止瘢痕形成,且呈剂量依赖。

[关键词] 甘草酸;胶原合成;切口愈合;瘢痕形成

[中图分类号] R62 [文献标识码] A [收稿日期] 2019-04-09

[基金项目] 重庆市涪陵区科技计划项目(FLKJ,2016ABB1067)

[通信作者] 黄洁清,E-mail:czy1002008@163.com

[6] Baksh D,Yao R,Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow[J]. Stem Cells,2007,25(6):1384-1392. doi:10.1634/stemcells.2006-0709.

[7] Frohman EM,Racke MK,Raine CS. Multiple sclerosis-the plaque and its pathogenesis[J]. N Engl J Med,2006,354(9):942-955. doi:10.1056/NEJMra052130.

[8] Laroye C,Gibot S,Reppel L,et al. Mesenchymal stromal/stem cells:a new treatment for sepsis and septic shock? [J]. Stem Cells,2017,35(12):2331-2339. doi:10.1002/stem.2695.

[9] Ouyang H,Xue Y,Lin Y,et al. WNT7A and PAX6 define corneal epithelium homeostasis and pathogenesis[J]. Nature,2014,511(7509):358-361. doi:10.1038/nature13465.

[10] Graw J. Genetic aspects of embryonic eye development in vertebrates[J]. Dev Genet,1996,18(3):181-197. doi:10.1002/(SICI)1520-6408(1996)18:33.0.CO;2-5.

[11] Rishali G,Longmei Z,Takele T,et al. Human embryonic stem cell derived mesenchymal stem cells:an alternative mesenchymal stem cell source for regenerative medicine therapy[J]. Regen Med,2014,9(4):453-465. doi:10.2217/rme.14.13.

[12] Nardi NB,da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells:isolation,in vitro expansion and characterization[J]. Handb Exp Pharmacol,2006,174:249-282. doi:10.1007/3-540-31265-X_11.

[13] 候天勇,罗 飞,许建中. 山羊骨髓间充质干细胞的分离培养与鉴定[J]. 局解手术学杂志,2008,17(6):376-378. doi:10.3969/j.issn.1672-5042.2008.06.003.

[14] 王红均,张其彬,伍 莉,等. H5N1型禽流感NS1基因在HEK293细胞中的表达及稳定细胞系的构建[J]. 中国兽医学报,2018,38(11):2125-2130. doi:10.16303/j.cnki.1005-4545.2018.11.16.

[15] Jimenez A,Davies J. Expression of a transposable antibiotic resistance element in Saccharomyces[J]. Nature,1980,287(5785):869-871. doi:10.1038/287869a0.

[16] Tzameret A,Sher I,Belkin M,et al. Epiretinal transplantation of human bone marrow mesenchymal stem cells rescues retinal and vision function in a rat model of retinal degeneration[J]. Stem Cell Res,2015,15(2):387-394. doi:10.1016/j.scr.2015.08.007.

[17] Lan Y,Kodati S,Lee HS,et al. Kinetics and function of mesenchymal stem cells in corneal injury[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2012,53(7):3638-3644. doi:10.1167/iovs.11-9311.

(编辑:刘 艺)