DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.19.027
第25卷第19期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 19
1748 2003年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)19-1748-03

hTERT基因转染对人胚胎成纤维细胞表型的影响

梁光萍,罗向东,杨宗城,陈 建,苏踊跃,刘月明 (第三军医大学附属西南医院全军烧伤研究所,创伤复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨外源性人端粒酶蛋白催化亚单位(hTERT)基因转染人胚胎成纤维细胞(hEFs)后细胞是否存在恶性表型。方法 应用脂质体法将pIRES2-EGFP-hTERT正义重组质粒及pIRES2-EGFP空载质粒分别导入原代培养hEFs,Western blot分别检测hTERT mRNA和蛋白质的表达。采用染色体核型分析、裸鼠皮下致瘤性实验、DNA倍体实验分析转染细胞是否存在恶性表型。结果 原代培养hEFs中存在较弱水平的hTERT基因mRNA及蛋白质表达,但外源性hTERT基因转染的胚胎成纤维细胞hTERT mRNA及蛋白表达显著增加。hTERT转染后细胞染色体仍为23对,且均为正常二倍体细胞;裸鼠皮下不具有成瘤的能力。结论 外源性hTERT基因转染的胎儿成纤维细胞不具有恶性表型。

关键词:人端粒酶蛋白催化亚单位;人胚胎成纤维细胞;恶性表型
中图法分类号:R329.2;R394.2 文献标识码:A

Effects of hTERT gene transfection on the phenotypes of human embryonic fibroblasts

LIANG Guang-ping, LUO Xiang-dong, YANG Zong-cheng, CHEN jian, SU Yong-yue, LIU Yue-ming (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To explore the effects of exogenous human telomerase reverse transcriptase (hTERT) on the phenotypes of human embryonic fibroblasts (hEFs). **Methods** Sense recombinant plasmid pIRES2-EGFP-hTERT and empty vector plasmid pIRES2-EGFP were transfected into primary cultured hEFs by lipofectin reagent. Then hTERT expression and protein expression were analyzed respectively by Western blotting. Tumorigenecity in nude mice was analyzed and chromosome karyotype and cell DNA ploidy analyses were performed in the transfected and untransfected cells. **Results** Low level of hTERT expression was found in the primary cultured hEFs. Exogenous hTERT expression of hEFs increased significantly after hTERT transfection. Moreover, there were still 46 chromosomes in hTERT-transfected hEFs without abnormal DNA ploidy. No tumorigenecity was found in the nude mice. **Conclusion** There are no malignant phenotypes in hTERT-transfected hEFs.

Key words: hTERT; human embryonic fibroblast; malignant phenotype

皮肤组织工程作为组织工程研究中的一个热点,是将可降解的生物支架材料与具有永生化能力的种子细胞一起培养,从而形成类似正常人皮肤结构的活体组织的工程技术。其中,获得具有永生化能力的种子细胞是其能否顺利实施的关键[1]。在正常体细胞中重建端粒酶活性,可使细胞寿命得到延长,但其在肿瘤细胞中的过量表达又使得癌细胞得以无限增殖[2]。本研究采用人端粒酶催化亚单位(hTERT)转染的人胚胎成纤维细胞(hEF)作为模型,探讨了外源性hTERT基因对hEF表型的影响,以期为端粒酶转染的成纤维细胞应用于皮肤组织工程奠定基础。

1 材料和方法

1.1 pIRES2-EGFP-hTERT正义荧光真核表达载体的构建、正常人胚胎成纤维细胞的培养及hTERT基因转染

具体步骤见文献[3]。

1.2 Western blot检测转染hEFs外源性hTERT蛋白表达

当正常hEFs、hEF-hTERT及hEF-EGFP达90%融合时,以M-PER™(Pierce Company)蛋白提取液分别处理细胞,收集细胞总蛋白,BCA法定量后经SDS-PAGE,电转膜,免疫抗体反应,最后化学增强发光法(ECL)显带。

1.3 染色体核型分析

取达到对数生长期的hEF-hTERT细胞一瓶,加入秋水仙素,37 ℃孵育2 h,收集细胞,低渗处理,甲醇/冰醋酸(3∶1)预固定5 min,离心沉淀再固定,最后制成单细胞悬液滴于预冷的载玻片上,Giemsa染色10~15 min,光学显微镜下观察。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30000072)
作者简介:梁光萍(1974-),女,重庆市人,硕士,主管技师,主要从事细胞增殖与衰老方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)68754149-8082
通信作者:罗向东,电话:(023)68754316
收稿日期:2003-08-11;修回日期:2003-08-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.4　流式细胞仪检测 DNA 倍体

消化 hEFs、hEF-EGFP、hEF-hTERT 细胞各一瓶并计数, 使细胞数达到 1×10^6/ml, 经 70% 乙醇固定, PI 染色, 上机检测 DNA 倍体。

1.5　裸鼠皮下致瘤性实验

裸鼠 6 只, 雌雄兼用, 随机分为 3 组, 每组 2 只, 饲养在 SPF (Specific pathogen free) 条件下, 各组裸鼠左侧背部皮下接种 $HepG_2$ 肝癌细胞株作为对照, 右侧皮下接种同样数量的 hEF-hTERT, hEF-EGFP 和 hEF 细胞。每隔 7 d 观察肿瘤形成情况并测量大小, 连续观察 8 周。

2　结果

2.1　pIRES2-EGFP-hTERT 正义重组载体及 pIRES2-EGFP 空载 hEFs 细胞内转染及鉴定

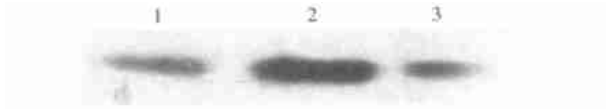
采用 Lipofectin 将 hTERT 正义重组质粒及空载质粒转染至原代 hEFs 中, 经高浓度 G418 筛选 3 周后形成克隆, 挑取重组质粒及空载质粒克隆各一个, 扩增后分别命名为 hEF-hTERT 和 hEF-EGFP。Western blot 检测发现, hEFs 和 hEF-hTERT、hEF-EGFP 中均有 hTERT 蛋白质表达, 但 hEF-hTERT 细胞中 hTERT 蛋白表达明显高于 hEF-EGFP 和 hEFs, 见图 1。

2.2　染色体核型分析

hEF-hTERT 细胞体外经长期传代后, 染色体数目为 46 条, 与正常体细胞染色体数目相同, 见图 2。

2.3　流式细胞仪检测细胞 DNA 倍体

转染细胞和未转染细胞中均未发现 DNA 异倍体, 见图 3。



1: hEFs; 2: hEF-hTERT; 3: hEF-EGFP;

图 1　外源性 **hTERT** 在 **hEFs** 细胞中的表达

Fig 1　Expression of exogenous hTERT in hEFs

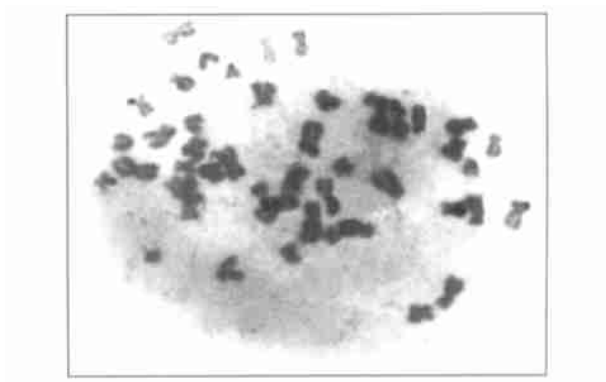
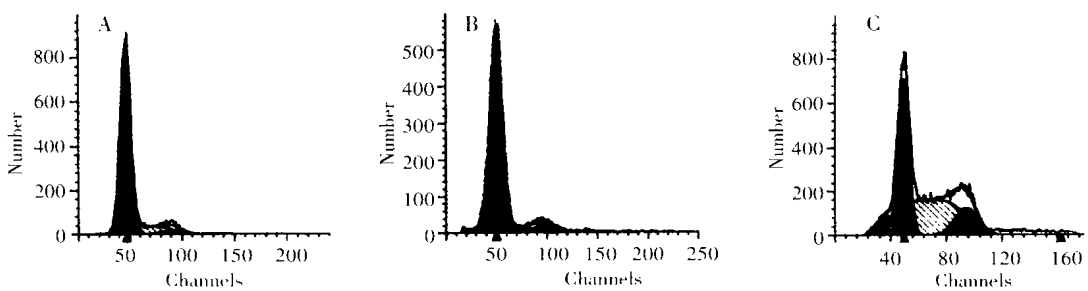


图 2　**hEF-hTERT** 细胞染色体核型分析

Fig 2　Analysis of chromosome karyotype of hEF-hTERT

2.4　裸鼠皮下致瘤性实验

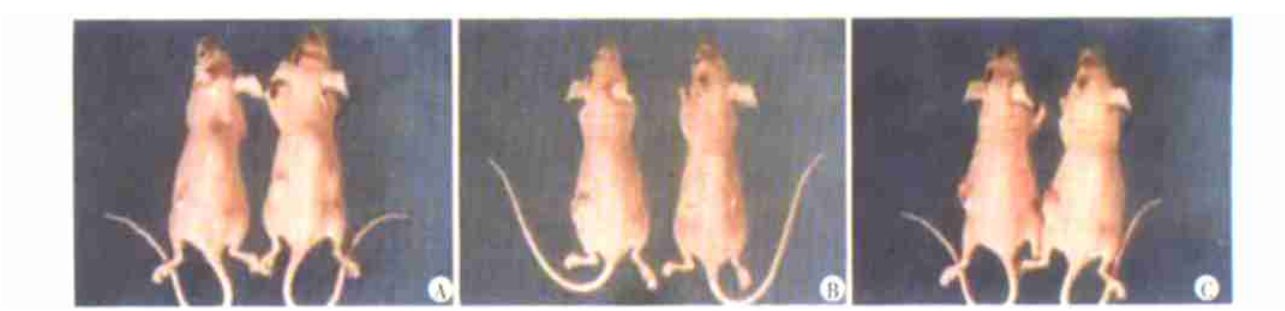
在接种 4×10^6/只的情况下, 8 周后, 裸鼠注射 $HepG_2$ 细胞左侧均长出肿瘤, 成瘤率为 100%, 而注射 hEF、hEF-EGFP、hEF-hTERT 细胞裸鼠右侧皮下成瘤率为 0, 见图 4。



A: hEF; B: hEF-EGFP; C: hEF-hTERT

图 3　**hTERT** 基因转染对 **hEFs** 细胞 **DNA** 倍体的影响

Fig 3　Effects of hTERT gene on DNA ploidy of hEFs



A ~ C: $HepG_2$ cell; Right: A: hEFs; B: hEF-EGFP; C: hEF-hTERT

图 4　裸鼠皮下致瘤性实验

Fig 4　Subcutaneous tumorigenesis experiment in nude mice

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 讨论

端粒酶是近年来组织工程和肿瘤研究中的热点。它能以自身 RNA 为模板，合成端粒重复序列加至新合成的 DNA 链末端，从而防止染色体末端丢失及解决末端复制难题。在端粒酶的三个亚单位中，hTERT 是端粒酶活性的限速成分[5,6]。由于绝大多数正常体细胞中无 hTERT 表达，因而这些细胞无端粒酶活性，细胞随有丝分裂不断缩短，最后衰老死亡。目前已有研究表明，在正常体细胞中重建端粒酶活性，可延缓细胞衰老，但其过量表达则是引起肿瘤细胞无限增殖的一个重要因素[7]。因此研究外源性 hTERT 基因转染是否会导致人正常体细胞发生潜在的恶性变对其在组织工程中的应用显得极为重要。为此，我们选择了作为真皮主要成分之一的成纤维细胞为模型，将 hTERT 真核表达载体与空载体分别导入原代培养的 hEFs，并就转染 hEFs 是否具有恶性表型进行了初步研究。

通过 Western blot 检测，我们发现原代培养的 hEFs 中即存在 hTERT 的翻译，但外源性 hTERT 转染使培养的 hEFs 中 hTERT 蛋白表达显著增强。染色体核型分析显示，hTERT 转染细胞染色体数目仍为 46 条，与正常体细胞染色体数目一致。进一步以正常 hEFs 作为参照，经流式细胞术测定传至 75 代的转基因成纤维细胞 DNA 倍体，未发现任何异倍体细胞。裸鼠皮下接种实验中，所有裸鼠注射 HepG2 细胞一侧均长出实质性肿瘤包块，而注射 hEFs 及转染细胞的一侧未见任何结节或包块生成，提示由 hTERT 基因激活的端粒酶并不是使细胞无限增殖，肿瘤发生的一个必要条件，肿瘤形成同时还必须具有其它一些基因的改变，单纯往正常体细胞中导入 hTERT 基因并不能致细胞发生恶性变；相反，在正常体细胞中导入外源性 hTERT 基因，激活端粒酶，使端粒长度得以维持，从而可以减少因染色体端粒丢失而导致的基因不稳的机率。结合我们以往的研究结果[4]，hTERT 基因转染可是 hEFs 端粒酶活性明显增加，端粒长度延长，从而使 hEFs 体外培养时间延长。因此，可以认为 hTERT 转染的胎儿成纤维细胞不具有恶性表型，从而有可能成为组织工程中真皮的种子细胞。

参考文献：

[1] Shay J W, Wright W E. The use of telomerized cells for tissue engineering [J]. Nat Biotechnol, 2000, 18(1): 22—23.

[2] 杨仕明，房殿春，杨金亮，等. 反义 hTRT 转染对 SGC-7901 胃癌细胞株形态学的影响[J]. 第三军医大学学报，2001，23(9)：1034—1036.

[3] 梁光萍，罗向东，陈 渝，等. hTERT 荧光真核表达载体的构建和表达[J]. 第四军医大学学报，2003，24(13)：1221—1223.

[4] 梁光萍，罗向东，杨宗城. HTERT 基因转染对人胚胎成纤维细胞端粒长度、端粒酶活性及其亚单位的影响[J]. 解放军医学杂志，2003，28(8)：705—706.

[5] 杨仕明，房殿春，杨金亮，等. 胃癌组织端粒酶活性及其亚单位的检测[J]. 癌症，2001，20(1)：23—27.

[6] Suzuki K, Kashimura H, Ohkawa J, *et al*. Expression of human telomerase catalytic subunit gene in cancerous and precancerous gastric conditions[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2000, 15(7): 744—751.

[7] Yang S M, Fang D C, Luo Y H, *et al*. Alterations of telomerase activity and terminal restriction fragment in gastric cancer and its premalignant lesions[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2001, 16(8): 876—882.

（编辑 张 宁）

欢迎订阅《中国中西医结合肾病杂志》

《中国中西医结合肾病杂志》是中国中西医结合学会主办、中国科学技术协会主管、国内外公开发行的国家级学术期刊。本刊执行“中西医并重、促进中西医结合”方针，旨在报道我国中西医结合在肾病临床、科研、预防等方面的经验，介绍国内外有关肾病专业的进展，为提高中西医结合水平，继承和发扬我国传统的医药学，为促进我国医学科学现代化服务。

本刊辟有著名专家论坛、名医经验荟萃、实验论著、临床论著、短篇、病例报告、讲座与综述、专病专方、体会与交流、学术动态等栏目。杂志现发行面已覆盖全国各省、市、自治区，全国各医疗卫生单位内科、肾内科、儿科、妇产科、中医科、泌尿科等医务人员及相关的科研、教学人员均可参阅。

本刊为月刊，每期订价 8.00 元，全年 96.00 元，国际标准刊号：ISSN 1009—587X，国内统一刊号：CN 14—1277/R，邮发代号：22—26，全国各地邮政局均可预定，也可直接向编辑部办理邮购。

地 址：山西省太原市师范街 78 号（武警医院内） 邮 编：030006

电话（传真）：(0351)7965258 E-mail：yhkj@Public.ty.sx.cn

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net