DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.03.012
第25卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 3
2003年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2003

文章编号:1000-5404(2003)03-0209-03

论著

AANAT基因工程化ES细胞减少APP高表达PC12细胞Aβ的分泌

吴 旋[1],徐海伟[1],黎海蒂[1],范晓棠[2],曹 娟[1],唐 军[1] (第三军医大学基础医学部:[1]生理学教研室;[2]神经生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 构建AANAT基因工程化的胚胎干细胞,并探讨其在阿尔茨海默氏病治疗中的可能作用。方法 将外源性neo基因转染人胚胎成纤维细胞,作为饲养层细胞用于ES细胞转基因后筛选及增殖过程的培养。将pBK-CMV/AANAT真核表达质粒转染小鼠胚胎干细胞,用RT-PCR方法筛选阳性细胞克隆,用此工程细胞的条件培养液培养APP过量表达的PC12细胞,观察β淀粉样蛋白分泌情况。结果 ①转入neo基因的人胚胎成纤维细胞能很好维持ES细胞的未分化状态。②AANAT基因工程细胞培养液能减少β淀粉样蛋白的分泌。③褪黑素能使PC12/APP细胞Aβ分泌明显减少。结论 首次构建AANAT基因工程化的胚胎干细胞,其减少Aβ分泌的作用可能在阿尔茨海默病的治疗中具有重要应用价值。

关键词:褪黑素;阿尔茨海默病;工程细胞;胚胎干细胞;小鼠
中图法分类号:R394.2;R745.7;R977.1 文献标识码:A

AANAT gene-engineered embryonic stem cells decrease the amyloid β secretion of APP-overexpressed PC12 cells

WU Xuan, XU Hai-wei, LI Hai-di, FAN Xiao-tang, CAO Juan, TANG Jun (Department of Physiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To construct the arylalkylamin N-acetyltransferase (AANAT) gene-engineered ES cells and study its possible effects on therapy of Alzheimer's disease. **Methods** Neomycin gene was transfected into human embryonic fibroblasts (HEF) by liposome-mediated method. Using this transfected HEF as feeder layer, ES cells were transfected with AANAT gene. The conditioned medium collected from AANAT gene-transfected ES cells was used to culture APP-overexpressed PC12 cells. Amyloid β was detected by radioimmunoassay. **Results** ①HEF transfected with neomycin gene could keep the undifferentiated condition of ES cells; ②The conditioned medium of AANAT gene-engineered ES cells could decrease Aβ secretion. ③Melatonin had the same effect on the decrease of Aβ secretion of APP-overexpressed PC12 cells. **Conclusion** AANAT gene-engineered ES cells have been constructed successfully. These cells can obviously decrease Aβ secretion of APP-overexpressed PC12 cells and may play an important role in the therapy of AD disease.

Key words: melatonin; Alzheimer disease; engineered cells; embryonic stem cells; mouse

β淀粉样蛋白(β amyloid peptide, Aβ)在神经细胞外的聚集和病程中后期的氧化应激,是阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)发病的重要原因和病理生理过程[1~3]。褪黑素是由松果体分泌的可通过血脑屏障的激素,既具有抗氧化作用(Antioxidant),又具有抗Aβ沉积作用(Antiamyloidogenic),而且还能通过多条途径对抗Aβ的作用[2]。大量实验提示褪黑素在AD的防治中具有重要作用,然而褪黑素的半衰期很短,需要特殊的给药方式。芳香基-烷基胺-N-乙酰基转移酶(Arylalkylamin N-Acetyltransferase, AANAT)是合成褪黑素的限速酶,若能将携带AANAT基因的来源于胚胎干细胞(Embryonic stem cell, ESc)的神经前体细胞移植入脑内,一方面利用褪黑素抗Aβ沉积和抗氧化作用,阻断AD的致病环节;另一方面利用ES细胞作为神经移植材料替代变性的神经元,可为AD病的治疗提供一条新线索。为此本实验将AANAT基因转入ES细胞,观察其条件培养液及褪黑素对β淀粉样前体蛋白(Amyloid precursor protein, APP)过量表达PC12细胞Aβ分泌的影响。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39900169, 30100087);全军"十五"青年基金资助项目(01Q099);重庆市应用基础基金资助项目(2001)
作者简介:吴 旋(1969-),女,四川省安岳县人,博士,讲师,主要从事胚胎干细胞的培养和定向诱导作用方面的研究,发表论文9篇。电话:(023)68752254
收稿日期:2002-10-08;修回日期:2002-12-13

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

1 材料与方法

1.1 材料

带neo基因的pUC19质粒由Harvard大学徐令博士惠赠，pBK-CMV/AANAT真核表达质粒为美国NIH Coon SL教授惠赠。ES细胞株MESPU13从北大生命科学部引进；人胚胎成纤维细胞(Human embryonic fibroblast, HEF)由中山医科大学附属第一医院生殖医学中心李晓红博士惠赠。过量表达APP的PC12细胞由本实验室制备。Neo引物序列：5′端TTCCTTGCGCAGCTGTGCTC，3′端CATTCGCCGCCAAGCTCTTC，PCR产物长度为：438bp。内参照磷酸甘油醛(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)的引物序列：5′端GTGATGCTGGTGCTGAGTATGTC，3′端CAGTCTTCTGAGTGGCAGTGATG，PCR产物长度为：265 bp。高糖型DMEM培养基、G418购自GIBCO公司；胎牛血清购自Hyclone公司；重组人白血病抑制因子(Leukemia inhibitory factor, LIF)为Pepro Tech公司产品；脂质体DOTAP购自Boehringer Mannheim公司。丝裂霉素为Sigma产品，β淀粉样蛋白放免药盒由解放军总医院科技开发中心放免所标记并分装。

1.2 小鼠ES细胞培养

HEF细胞用含10 μg/ml丝裂霉素-C处理后作为饲养层，ES细胞培养基为含15% FCS, 100 μmol/L β-巯基乙醇，1 000 U/ml LIF的DMEM。

1.3 过量表达β淀粉样蛋白的PC12细胞的培养

培养基采用RPMI1640, 10%胎牛血清，37℃，5% CO_2孵箱中培养。

1.4 G418抗性的饲养层细胞制备

参照Boehringer Mannheim公司DOTAP、G418产品说明书，采用脂质体介导的方法将带neo基因的pUC19质粒转入人胚胎成纤维细胞中。

1.5 AANAT工程细胞的制备

采用脂质体介导的方法将pBK-CMV/AANAT真核表达质粒转入ES细胞中。在整个转基因及筛选的过程中ES细胞都培养在转入了neo基因的HEF细胞饲养层上。

1.6 Aβ的放免测定

按照放免测试盒说明书，将缓冲液、标准液、抗血清、样品和^{125}I-β淀粉样蛋白加样后，混匀，每管加入分离剂500 μl，混匀后放置45 min，4℃ 4 000 r/min离心，10 min，去上清，在γ计数器上测定沉淀Bq数。^{125}I-β淀粉样蛋白的比放射活性为9.25×10^{13}Bq/g。

1.7 统计学分析

采用SPSS (Ver 10.0)统计分析软件中的t检验和双因素方差分析。

2 结果

2.1 G418抗性饲养层细胞的制备及对转基因ES细胞未分化状态的维持

用Lipofectin将pUC19/neo抗性基因转染HEF细胞，用600 μg/ml浓度的G418进行抗性克隆的筛选，扩增抗性克隆并用液氮保存。使用前复苏并按常规方法处理作为饲养层细胞[5]，其上生长的转基因ES细胞生长旺盛，见图1。G418抗性饲养层与LIF联合使用，能很好维持ES细胞的未分化状态。

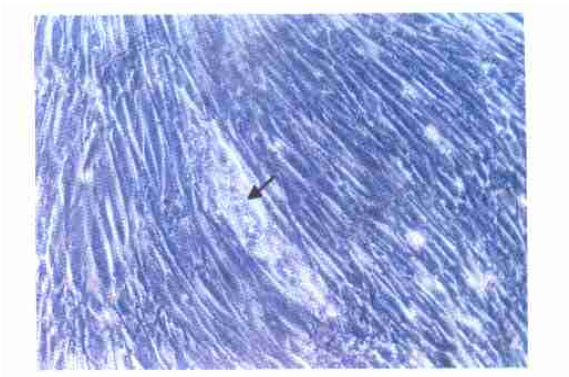
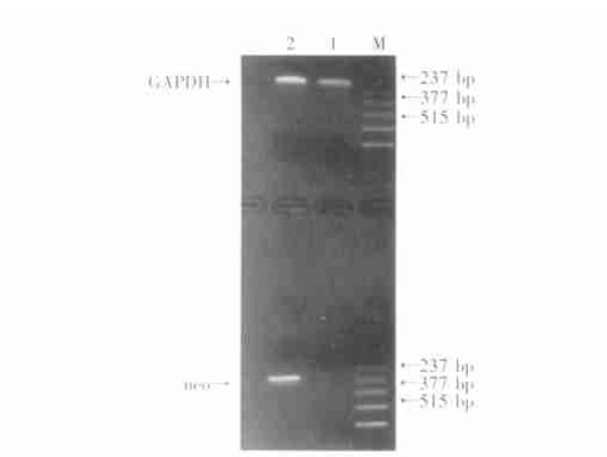


图1 pBK-CMV/AANAT转染小鼠ES细胞G418抗性克隆(→：AANAT阳性克隆)

Fig 1 G418-resistance ES cell clone transfected with pBK-CMV/AANAT vector(→: AANAT transfected ESc clone)

2.2 pBK-CMV/AANAT表达载体转染ES细胞

用Lipofectin对ES细胞进行转染，400 μg/ml浓度的G418进行抗性克隆的筛选，AANAT/ES细胞的转染率约为15%，扩增抗性克隆。RT-PCR方法检测发现转染细胞可见neo基因特异性扩增条带，大小为400 bp，而未转染细胞没有neo基因表达，见图2。



M: PCR Marker; 1: Control; 2: Transfected with pBK-CMV/AANAT

图2 pBK-CMV/AANAT转染ES细胞后neo基因检测

Fig 2 Neo gene expressed in the ES cells transfected with pBK-CMV/AANAT vector

2.3 AANAT基因工程细胞条件培养液能减少β淀粉样蛋白的分泌

收集ES细胞和AANAT/ES细胞条件培养液(含15%FCS)，用DMEM将其稀释为两种浓度。FCS浓度分别为5%和10%。然后用于PC12/APP细胞的培养。放免法测定培养24 h后的培

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

养液中 Aβ 的含量, 结果发现低稀释度 AANAT 基因工程细胞培养液(10% FCS)能减少β 淀粉样蛋白的分泌, 而高稀释度(5% FCS) 无此效果, 见表 1。

表 1　基因工程 ES 细胞条件培养液对 PC12/APP 细胞 Aβ 分泌的影响 ($\rho_{A\beta}$/pg·ml^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effect of conditioned medium from engineered ES cells on the Aβ secretion of PC12/APP cell($\rho_{A\beta}$/pg·ml^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

Group	Highly diluted CM	Lowly diluted CM
Control	6.57±1.55	10.164±2.148
CM of engineered ES cells	8.88±5.26	7.538±1.251 *

*: $P<0.05$ *vs* Control

2.4　褪黑素对β 淀粉样蛋白分泌的作用

收集经两个剂量褪黑素处理和对照孔在 3 个时间点的培养液, 放免法测定 Aβ 含量, 经双因素方差分析, 药物作用时间和剂量没有交互作用, 药物处理因素带来明显差异($P<0.05$), 褪黑素能使 PC12/APP 细胞 Aβ 分泌明显减少, 见表 2。

表 2　褪黑素对 PC12/APP 细胞 Aβ 分泌的影响($\rho_{A\beta}$/pg·ml^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effect of melatonin on the Aβ secretion of PC12/APP cell($\rho_{A\beta}$/pg·ml^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

Group	3 h	24 h	48 h
Control	5.58±0.01	5.02±0.33	5.89±0.72
Melatonin 0.002 57 mg/ml	5.84±0.73	4.79±0.95	6.46±0.30
Melatonin 0.003 86 mg/ml	5.47±0.11	4.08±0.09 *	4.54±0.40 *

*: $P<0.05$ *vs* Control

3　讨论

ES 细胞的培养需要饲养层维持其未分化状态并保持其旺盛的生长。在 ES 细胞转基因的筛选和扩增过程中, ES 细胞需要长时间在含 G418 的培养基中培养(多于 1 个月)。普通的饲养层细胞在 G418 中培养会死亡, 不能用于 ES 细胞的转基因过程, 因此用于 ES 细胞转基因过程的饲养层细胞必须带有抗性基因(如 neo)。国外通常采用 neo 基因转基因小鼠的 MEF 细胞用于 ES 细胞转基因操作, 或者用转 neo 基因的小鼠成纤维细胞系 SNL 作饲养层。国内目前还没有成功制备 neo 基因的转基因小鼠的报道, 而 SNL 细胞对 ES 细胞培养的效果不如 MEF 细胞[4]。我们以往的实验结果显示[5] HEF 不但可以完全替代 MEF 用于小鼠 ES 细胞的培养, 而且具有避免污染、使用次数多的优点。HEF 使用代次多的特点决定了它可转入 neo 基因后再用于 ES 细胞的转基因过程。本实验采用脂质体法将带 neo 基因的 pUC19 质粒转入了 HEF 细胞, 筛选了一株能在 600 μg/ml G418 中生长的 HEF 细胞。并用这一株细胞作饲养层, 成功地进行了 ES 细胞的转基因操作。

褪黑素是松果体分泌的惟一激素, 它具有多种生理功能, 褪黑素与 AD 的关系成为近年研究的热点。多项研究结果提示褪黑素水平下降是 AD 的一个重要病因[6~8]。褪黑素不但通过自由基清除和抗氧化作用发挥神经保护作用, 还能够降低 Aβ 的产生, 而 Aβ 的沉积是目前较公认的 AD 的病因。Aβ 的β 折叠及淀粉样纤维结构是 Aβ 发挥神经毒性及免遭蛋白酶降解的关键, 褪黑素可以和 Aβ1~42 和 Aβ1~40 作用, 抑制β 折叠及淀粉样纤维的形成[9]。褪黑素还可对抗 Aβ 对细胞的毒性损害[10]。所以褪黑素可以作为治疗 AD 的新药。外源性的褪黑素在血清中的半衰期仅为 0.5~5.6 min, 我们将褪黑素限速酶 AANAT 基因转入 ES 细胞, 来源于 AANAT 基因工程化的 ES 细胞的神经前体细胞如果移植到 AD 易损脑区, 将在局部持续地提供褪黑素, 起到防治 AD 的作用。

总之, 我们的实验结果不但观察到褪黑素能对抗突变型 APP 基因转染引起的 PC12 细胞 Aβ 分泌增多, 也表明 AANAT 基因工程化 ES 细胞的条件培养液具有同样的作用, 提示了褪黑素及 AANAT 基因工程化 ES 细胞对 AD 的治疗作用。

参考文献:

[1] Selkoe D J. Alzheimer's disease: genotypes, phenotype, and treatments [J]. Science, 1997, 275(31): 630-631.

[2] Pappolla M A, Chyan Y J, Poeggeler B, *et al*. An assessment of the antioxidant and the antiamyloidogenic properties of melatonin: implications for Alzheimer's disease[J]. J Neural Transm, 2000, 107(1): 23-31.

[3] Butterfield D A, Yatin S M, Varadarajan S, *et al*. Amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress, neurotoxicity, and Alzheimer's disease [J]. Methods Enzymol, 1999, 309(3): 746-768.

[4] 邱观婷, 黄　冰, 唐仕波, 等. 探讨保持胚胎干细胞全能性的体外培养条件[J]. 中山医科大学学报, 2000, 21(2): 100-103.

[5] Wu X, Li H D, Li S N, *et al*. Development of neural precursor cells from mouse embryonic stem cells[J]. J Medical Colleges of PLA, 2001, 16(4): 274-277.

[6] Maurizi C P. Dementia-the failure of hippoampal plasticity and dreams. Is there a preventative role for melatonin[J]. Med Hypotheses, 1987, 24(1): 59-68.

[7] Dori D, Casale G, Solerte S B, *et al*. Chrono-neuroendocrinological aspects of physiological aging and senile dementia [J]. Chronobiologia, 1994, 21(1-2): 121-126.

[8] Mishima K, Okawa M, Hishikawa Y, *et al*. Morning bright light therapy for sleep and behavior disorders in elderly patients with dementia[J]. Acta Psychiatr Scand, 1994, 89(1): 1-7.

[9] Pappolla M, Bozner P, Soto C, *et al*. Inhibition of Alzheimer beta-fibrillogenesis by melatonin[J]. J Biolo Chem, 1998, 273(13): 7185-7188.

[10] Bachurin S, Oxenkrug G, Lermontova N, *et al*. N-acetylserotonin, melatonin and their derivatives improve cognition and protect against beta-amyloid-induced neurotoxicity[J]. Ann N Y Acad Sci, 1999, 890(1): 155-166

(编辑　郭建秀)

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