DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.03.010
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)03-0205-04

论著

APP695和绿色荧光蛋白在PC12细胞中的共表达及对细胞的影响

吴 旋,徐海伟,黎海蒂,赵邦云,熊加祥,曹 娟 (第三军医大学基础医学部生理学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 构建绿色荧光蛋白和瑞典突变型APP695共表达载体,将重组质粒转染PC12细胞获得高表达APP的PC12细胞克隆。观察基因转染后PC12细胞的细胞周期、超微结构和β淀粉样蛋白的分泌情况。方法 激光共聚焦显微镜挑选高表达绿色荧光蛋白的PC12细胞克隆。放射免疫方法测定β淀粉样蛋白,流式细胞仪检测细胞周期,电镜观察细胞超微结构。结果 瑞典突变型APP转染能使PC12细胞体积增大,形态变长,微绒毛增多,分泌Aβ增多,细胞周期中G_0和G_1期细胞比例增多。结论 绿色荧光蛋白和瑞典突变型APP695共表达载体转染的PC12细胞可作为AD发病机制和治疗研究的细胞模型。

关键词:PC12细胞;阿尔茨海默病;绿色荧光蛋白;超微结构;细胞周期
中图法分类号:Q813.1;R394-33;R394.3 文献标识码:A

Coexpression of APP695 and EGFP in PC12 cell and the effect on the cell

WU Xuan, XU Hai-wei, LI Hai-di, ZHAO Bang-yun, XIONG Jia-xiang, CAO Juan (Department of Physiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To construct an eukaryotic expression vector carrying human mutant APP695(SW) and enhanced green fluorescence protein(EGFP) and to transfect the PC12 cells. **Methods** Eukaryotic expression vector was transfected into PC12 cell by liposome-mediated method. The APP-overexpressed clones were selected by the magnitude of green fluorescence protein under laser scanning confocal microscope. The concentration of Aβ was measured by radioimmunoassay. Ultrastructural changes and cell cycle were observed by electron microscopy and flow cytometry. **Results** It was found that the transfection of PC12 cells with APP695 gene induced the increased secretion of Aβ and the increase of resembled microvilli morphologically. More proportion of transfected cells was found in G_0-G_1 phase compared with untransfected PC12 cells. **Conclusion** PC12 cells transfected with human mutant APP695(SW) gene can be used as the cellular model for the studies of the pathogenesis and therapy in Alzheimer disease(AD).

Key words: PC12 cell; Alzheimer disease; green fluorescence protein; ultrastructure; cell cycle

淀粉样前体蛋白(Amyloid precursor protein, APP)是一种广泛存在于全身组织细胞上,并具有膜受体蛋白样结构的跨膜糖蛋白。分子量约(110~135)×10^3。目前许多证据表明,APP基因的点突变、代谢异常及过表达所引起的β淀粉样蛋白(β amyloid protein, Aβ)聚集,是阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)发病的重要原因之一[1]。但到目前为止,尚缺乏良好的动物及细胞模型用来阐明APP在AD发病中的作用以及药物和治疗因素对AD的治疗效果。

目前发现有5种APP基因突变导致AD发生,其中瑞典家系的突变[2]是位于670和671位密码子发生并列突变,即两个碱基对发生改变(G→T, A→C),从而导致第670位的赖氨酸残基被天门冬氨酸置换,第671位的蛋氨酸残基被亮氨酸替代。这些突变改变了APP的分解过程,造成Aβ(1~42或短些)产生过剩[3]。本研究旨在利用分子生物学及细胞生物学技术建立过量表达瑞典突变型APP695的细胞系,并探讨突变型APP基因的产物对类神经细胞PC12细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株、细胞系 pIRES2-EGFP质粒为Clontech公司产品,pcDNA3.1/APP质粒由美国Pittsburgh大学的Perez RG博士惠赠,大肠杆菌JM109由本校烧伤研究所易绍萱博士惠赠,PC12细胞由第三军医大学预防医学系劳动卫生学教研室提供。

1.1.2 试剂盒、酶、分子生物学试剂 质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶片段回收试剂盒、PCR片段回收试剂盒、DNA快速连接试剂盒均购自Boehringer Mannheim;限制性内切酶*Hind* Ⅲ, *Xba* Ⅰ, *Nhe* Ⅰ, *Sal* Ⅰ, *Bam* HⅠ和Klenow酶为New England公司产品;*Xho* Ⅰ为Boehringer Mannheim公司产品;其它常规试

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:2002-12-16

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

剂为国产分析纯或 B. M、Flula 等进口分装；脂质体 Lipofectin (Boehringer Mannheim)；G418 式购自 GIBCO；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分装并标记。

1.2 载体构建

将 pIRES2-EGFP 和 pcDNA3.1/APP 分别用 *Xho* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ进行酶切，然后均用 dNTP 与大肠杆菌 DNA 聚合酶 Klenow 片段进行填平，再用 *Nhe* Ⅰ进行第二次酶切，将电泳回收 pIRES2-EGFP 载体片段和 APP 目的片段进行连接，形成重组子，见图 1、2。

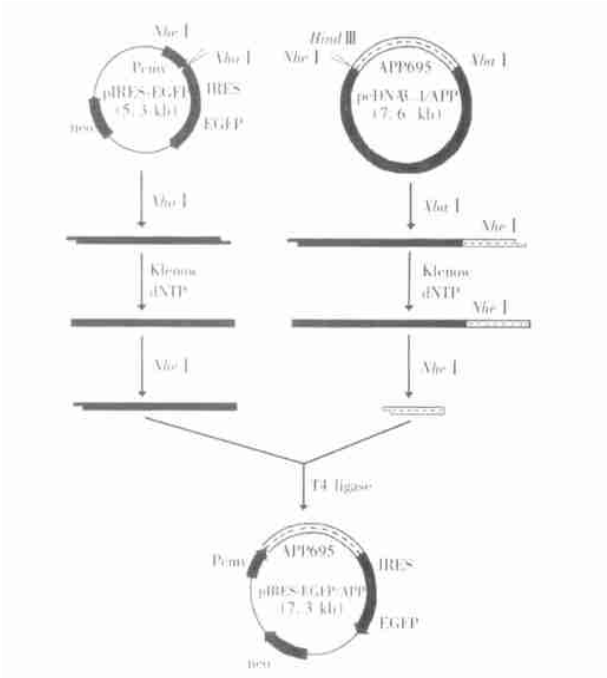
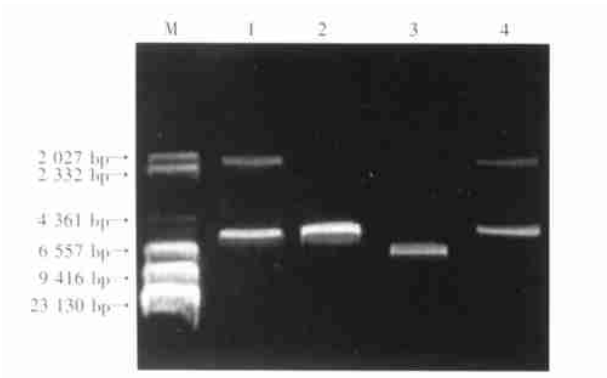


图 1 瑞典突变型 **APP695** 和绿色荧光蛋白共表达载体构建

Fig 1 Construction of recombinant vector of human mutant APP695 (Sweden) and green fluenscence protein



M: λDNA/*Hind* ⅢMarker; 1: pcDNA3.1/APP digested by *Nhe* Ⅰ and *Xba* Ⅰ; 2: pIRES2-EGFP digested by *Nhe* Ⅰ and *Xho* Ⅰ; 3: Recombinant vector pIRES2-EGFP/APP digested by *Nhe* Ⅰ; 4: Recombinant vector pIRES2-EGFP/APP digested by *Nhe* Ⅰ and *Sal* Ⅰ

图 2 瑞典突变型 **APP695** 和绿色荧光蛋白共表达载体构建及酶切鉴定

Fig 2 Construction of recombinant vector of human mutant APP695 (Sweden) and green fluenscence protein and its identification by restriction endonuclease

1.3 细胞培养和转染

PC12 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 1640 培养基中，于 37℃，5% CO_2，饱和湿度下培养，胰酶/EDTA 消化传代。用 Lipofectin Reagent 进行重组体的转染，用 G418 进行抗性克隆的筛选。

1.4 激光共聚焦方法检测转染的绿色荧光蛋白的表达

于观察前 1 d 将细胞传代移至底壁放有盖玻片的 6 孔板中，待细胞贴壁后取出，直接在激光共聚焦显微镜 480 nm 波长下观察。

1.5 淀粉样蛋白的放免测定

参考β-AP 放免测试盒说明书进行。

1.6 流式细胞仪检测细胞周期

消化贴壁细胞，清洗细胞后加入含 1% RNA 酶的碘化丙啶 (Propidium iodide, PI) 染色液 1 ml，置 4℃染色 30 min，上机检测。

1.7 电镜观察

消化贴壁细胞，1 000 r/min 离心 10 min，3% 戊二醛固定，4℃保存。1% 锇酸后固定，乙醇脱水，Epon618 包埋，超薄切片，柠檬酸铅染色，JEM-2000 透射电镜下观察。

1.8 统计学分析

采用 SPSS (Ver 10.0) 统计分析软件中的 t 检验和 χ^2 检验。

2 结果

2.1 EGFP 和 APP 重组子转染 PC12 细胞及 G418 抗性克隆的筛选

用 Lipofectin 包裹 EGFP 和 APP 重组子后对 PC12 细胞进行转染，用 500 μg/ml 浓度的 G418 进行抗性克隆的筛选，扩增抗性克隆。

2.2 转染细胞绿色荧光蛋白的检测及高表达克隆的筛选

在 11 个 PC12 细胞的 G418 抗性克隆中，激光共聚焦显微镜下可见到强弱不等的绿色荧光，见图 3，A、D 荧光亮度高，细胞轮廓清楚，突起明显，B、E 荧光稍弱，细胞轮廓不清，C、F 荧光更弱。以细胞克隆 A 进行以后实验。

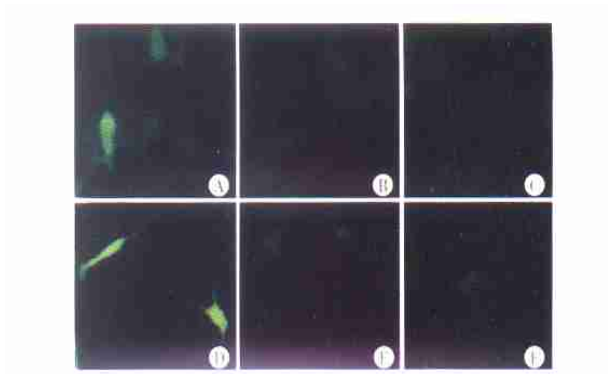


图 3 **pIRES2-EGFP/APP** 转染 **PC12** 细胞的激光共聚焦扫描 (× 100)

Fig 3 Confocal laser scanning microscope picture of PC12 cell transfected with pIRES2-EGFP/APP recombinant vector (× 100)

2.3 瑞典突变型 APP695 基因转染对细胞 Aβ 的影响

在相同的细胞密度和培养条件 (1640＋3% FCS) 下培养 PC12 和转染后 3 代的 PC12/APP 细胞，培养 48 h 后，培养液中

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

Aβ 的含量由 4.37±0.85 增高到 5.89±1.23 ($P<0.05$), 提示瑞典突变型 APP 基因的转入使细胞在一定时间内分泌 Aβ 明显增加。

2.4　瑞典突变型 APP695 基因转染和对 PC12 细胞周期的影响

FCM 检测转染了瑞典突变型 APP695 表达载体的 PC12 细胞, 显示基因转染后 G_0-G_1 细胞明显增多, S 和 G_2-M 期的细胞明显减少。细胞增殖指数降低, 见表 1。

2.5　瑞典突变型 APP695 基因转染对 PC12 细胞超微结构的影响

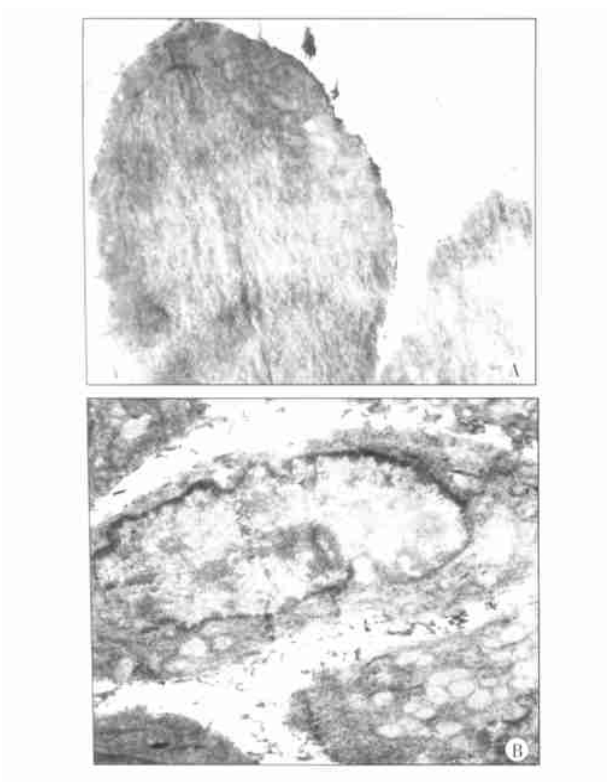
PC12 细胞在透射电镜下观察为卵圆形, 核略偏位, 胞浆丰富, 核浆比为 1/2～2/3。有较多的细长微绒毛, 见图 4。转入 APP 基因的 PC12 细胞体积增大, 形态变长, 微绒毛明显增多。胞核扭曲凹陷, 核浆比增大, 约 2/3～5/6。

表 1　**APP695** 基因转染后 **PC12** 细胞的细胞周期

Tab 1　Cell cycle of PC12 cell after being transfected with APP695

	Cell cycle (%)			PI(%)
	G_0-G_1	S	G2-M	
PC12	49.86	29.94	20.20	50.14
PC12/vector	49.30	31.02	19.68	50.70
PC12/APP	74.18	17.70	8.12	25.82

PI: proliferation index of cell, PI=(S+G_2-M)/(G_0-G_1+S+G_2-M)



A: Ultrastructure of the untransfected PC12 cell (TEM×4 000); B: Ultrastructure of the PC12 cell transfected with APP695(TEM×5 000)

图 4　**PC12** 细胞超微结构

Fig 4　Ultrastructure of the PC12 cell

3　讨论

在 pIRES2-EGFP 载体结构上, 通过一个 IRES 位点将多克隆位点和 EGFP 的基因连接在一起, 就使我们构建时插入的 APP695 cDNA 与 EGFP 转录在一条 mRNA 上, 而在翻译时翻译成两个蛋白。这样的结构使 EGFP 可以定性、定量地报告 APP 蛋白的表达情况。便于我们在下一步的细胞转染过程中, 鉴定转染阳性克隆, 并通过绿色荧光蛋白表达的情况随时定量 APP 的表达。

本实验将瑞典突变型 APP695 cDNA 转入 PC12 细胞导致培养液中 Aβ 增高。Aβ 产生的增多一方面与 APP 表达增多有关, 更重要的另一方面是与突变导致 APP 分解过程改变有关。在 Cai[3] 的实验中比较了突变型 APP、野生型 APP 和空载体转染的神经母细胞瘤 M17 细胞中 APP 和 Aβ 生成情况, 结果显示: 在野生型 APP 转染细胞中全长 APP 产生比突变型 APP 转染细胞高 3.3 倍的情况下, 突变型 APP 转染细胞的培养液中 Aβ 的生成为野生型的 6 倍。因此引起培养液中 Aβ 增高的更主要原因是突变导致的 APP 异常分解。

瑞典突变型 APP 基因转染 PC12 使细胞体积增大, 形态变长, 细胞表面微绒毛增多。这些特点与 Maestre[4] 报道的野生型 APP 转染 PC12 细胞的结果相似。Maestre 的免疫电镜还显示, 基因转染后细胞膜上有大量 Aβ 表达。APP 是一种半衰期短的膜蛋白, 它的分解代谢大多发生在细胞膜及其附近, 以前有大量报道微绒毛在 Aβ 分泌中的作用[5,6], PC12 细胞电镜结构的改变与 APP 合成增多, Aβ 释放到细胞外增多有关。

我们在 PC12 细胞中转入瑞典突变型 APP695 的基因导致了 G_0-G_1 期细胞比例增多, S 和 G_2-M 期细胞比例减少, 增殖指数由 50.14%下降为 25.82%, 文献[7～9] 报道 AD 病人脑中有多种细胞周期蛋白表达, 包括细胞周期蛋白 B、D 和 E(CyclinB, D, E), 细胞周期素依赖性激酶 cdk4 以及 cdc2(Cell division cycle)。Giovanni 等[10] 证实 Aβ 处理培养的神经元对细胞周期蛋白 D1 没有影响, 但是能提高 cdk4/6 活性。在细胞周期中存在一些控制点, 包括 G_1/S、G_2/M 以及有丝分裂期的退出阶段等。其中以 G_1/S 限制点尤为重要, 细胞增殖周期是由不同的 cdk 在 G_1/S、G_2/M 两限制点进行自控性调节。Aβ 引起神经元 cdk4/6 活性增高有利于细胞通过 G_1/S 限制点, 细胞进一步出现凋亡。因此 APP695 的基因转染导致 PC12 细胞 G_0-G_1 期细胞比例增高可能与有丝分裂期的退出有关, 也不排除其它未知因素导致 G_1/S 限制点通过障碍的可能。

我们利用转基因方法制备的 AD 细胞模型可用于

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

APP异常代谢途径的研究、AD发病分子和细胞水平的机制研究、药物筛选及药物的作用机制研究。在以往的研究中，APP转基因细胞得到了广泛的应用，如Wolozin等[11]利用野生型和突变型APP转染的PC12细胞观察到突变型APP转染细胞在撤去NGF后细胞凋亡明显高于野生型APP转染细胞。

参考文献：

[1] Hendriks L, Van-Broeckhoven C. A beta A4 amyloid precursor protein gene and Alzheimer's disease[J]. Eur J Biochem, 1996, 237(1): 6—15.

[2] Mullan M, Crawford F, Axelman K, *et al*. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid [J]. Nature Genet, 1992, 1(2): 345—347.

[3] Cai X D, Golde T E, Younkin S G. Release of excess amyloid β protein from a mutant amyloid β protein precursor[J]. Science, 1993, 259(2): 514—516.

[4] Maestre G E, Tate B, Majocha R E, *et al*. Cell surface extensions associated woth overexpression of Alzheimer β/A4 amyloid[J]. Brain Res, 1992, 599(1): 64—72.

[5] Gustafsson M K S, Wikgren M C. Release of neurosecretory material by protrusions of bounding membranes extending through the axolemma in Diphyllobothrium (Cestoda)[J]. Cell Tissue Res, 1981, 220(2): 473—479.

[6] Scharrer B, Wurzelman S. Protrusions of bounding membranes of neurosecretory granules[J]. Cell Tissue Res, 1977, 184(1): 79—85.

[7] Busser J, Geldmacher D S, Herrup K. Ectopic cell cycle proteins predict the sites of neuronal cell death in Alzheimer's disease brain[J]. J Neurosci, 1998, 18(8): 2801—2807.

[8] McShea A, Harris P L, Webster K R, *et al*. Abnormal expression of the cell cycle regulators P16 and CDK4 in Alzheimer's disease[J]. Am J Pathol, 1997, 150(6): 1933—1939.

[9] Vincent I, Jicha G, Rosado M, *et al*. Aberrant expression of mitotic cdc2/cyclin B1 kinase in degenerating neurons of Alzheimer's disease brain[J]. J Neurosci, 1997, 17(10): 3588—3598.

[10] Giovanni A, Wirtz-Brugger F, Keramaris E, *et al*. Involvement of cell cycle elements, Cyclin-dependent kinases, pRb, and E2F-DP, in B-amyloid-induced neuronal death[J]. J Biol Chem, 1999, 274((27): 19011—19016.

[11] Wolozin B, Iwasaki K, Vito P, *et al*. Participation of presenilin 2 in apoptosis: enhanced basal activity conferred by an Alzheimer mutation[J]. Science, 1996, 274(5293): 1710—1713.

（编辑 郭建秀）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2003)03-0208-01

青年人胃癌70例临床分析

Clinical analysis of 70 cases of gastric carcinoma in young patients

熊 会，杨建民，胡 忠 （第三军医大学附属西南医院全军消化专科中心，重庆 400038）

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一，一般发生于40～60岁的中老年人，但近年文献报道青年人胃癌的发病率有上升趋势，由于其临床表现隐匿，且无特异性，易于误诊、误治，预后多不理想。本研究统计分析我院近10来年收治的70例青年人胃癌的临床特征，以期提高对本病的认识和早期诊断率。

1 临床资料

1.1 一般资料

70例患者均为我院1988年1月至1999年12月收治的住院患者，其中男性32例，女性38例，男女之比为1∶1.18；年龄20～35岁，其中20～25岁8例(11.4%)，26～30岁18例(25.5%)，31～35岁44例(63.1%)。

1.2 临床表现

主要症状有上腹痛及上腹不适(61例，87.14%)、消瘦(39例，55.7%)、恶心呕吐(26例，37.1%)、呕血黑便(19例，27%)及返酸(19例，27%)、腹胀(18例，25.5%)。主要体征有腹部包块(28例，40%)、贫血(22例，31.4%)、腹水(17例，24.3%)及左锁骨上淋巴结肿大(9例，12.8%)。少见的临床表现有吞咽困难或咽下不畅(6例，8.6%)、Krukenberg瘤(4例，5.7%)、黄疸(2例，2.85%)及骨痛(1例，1.43%)。

1.3 病理特点

早期胃癌7例(10%)，均为ⅡC型；进展期胃癌63例(90%)，以溃疡型为主。肿瘤位于胃窦30例(47.9%)，胃体13例(18.6%)，胃角11例(15.7%)，胃底及贲门8例(11.4%)，胃体及胃窦4例(5.7%)，全胃4例(皮革胃，5.7%)。组织学类型：低分化腺癌28例(40%)，印戒细胞癌18例(25.7%)，管状及乳头状腺癌14例(20%)，粘液腺癌8例(8.9%)，平滑肌肉瘤及类癌各1例(1.4%)。

1.4 诊治情况

胃镜检查64例，确诊51例(79.7%)，疑诊9例(14%)，漏误诊4例(2.4%)；钡餐检查14例，确诊8例(57.1%)。手术治

（下转215页）

作者简介：熊 会(1971－)，女，重庆市潼南县人，医师，主要从事消化内镜诊断与治疗方面的研究，现在重庆市潼南县中医院胃镜室，潼南 402660。电话：(023)44564659

收稿日期：2002-01-16；修回日期：2002-03-20

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