

文章编号: 1005-8982(2014)M20141976-CZL

重组质粒 pEGFP-N1-apoJ 的构建及 在大鼠骨髓间充质干细胞中的表达*

周冲¹, 刘学良¹, 郑晓梅², 刘亮¹

(1. 四川医科大学附属第一医院 神经外科, 成都 四川 646000; 2. 四川医科大学
附属第一医院 神经内科, 成都 四川 646000)

摘要:目的 体外构建重组质粒 pEGFP-N1-apoJ, 转染大鼠骨髓间充质干细胞, 并检测其在大鼠骨髓间充质干细胞中的表达。方法 通过脂质体介导重组质粒 pEGFP-N1-apoJ 转染大鼠骨髓间充质干细胞, 确定转染效率, 并通过 Real-time PCR、免疫细胞化学法、Western blot 法检测载脂蛋白-J(apoJ)的表达。结果 增强型绿色荧光蛋白在大鼠骨髓间充质干细胞中瞬时转染效率达 35%。转染后 Real-time PCR、免疫细胞化学法和 Western blot 法检测证实重组质粒 pEGFP-N1-apoJ 在大鼠骨髓间充质干细胞中的表达。结论 重组质粒 pEGFP-N1-apoJ 成功转染大鼠骨髓间充质干细胞, 并在大鼠骨髓间充质干细胞中得到表达, 有助于应用 apoJ 行基因治疗, 为进一步研究 apoJ 作为新的脑出血治疗措施奠定实验基础。

关键词: 载脂蛋白-J(apoJ); 重组质粒; 基因转染; 骨髓间充质干细胞

中图分类号: R

文献标识码:

Construction of recombinant plasmid pEGFP-N1-apoJ and its expression in rat bone marrow mesenchymal stem cells in vitro*

Chong ZHOU¹, Xue-liang LIU¹, Xiao-mei ZHEN², Liang LIU¹

(1. Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital of Sichuan Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, P.R. China; 2. Department of Neurology, Affiliated Hospital of Sichuan Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, P.R. China)

Abstract: 【Objective】 To construct recombinant plasmid pEGFP-N1-apoJ, transfect rat bone marrow mesenchymal stem cells, and detect its expression in rat bone marrow mesenchymal stem cells(MSCs) in vitro. 【Methods】 Rat bone marrow MSCs were transiently transfected with the recombinant plasmid pEGFP-N1-apoJ and transfection efficiency of the Green Fluorescent Protein (GFP) was determined. Real-time PCR, Western Blot and immunocytochemistry analysis were also performed to detect the expression of apoJ in rat bone marrow MSCs. 【Results】 Transient transfection efficiency can reach 35%. After transfection, transcription of apoJ was detected in MSCs and expression of apoJ protein was also verified. 【Conclusion】 Recombinant plasmid pEGFP-N1-apoJ was successfully constructed, transfected into rat bone marrow MSCs and expressed in rat bone marrow MSCs. This procedure may be helpful to the application of apoJ for gene therapy and provide the experimental basis for the further study of apoJ as a new treatment of cerebral hemorrhage.

Key words: apolipoproteinJ (apoJ, clusterin); recombinant plasmid; cell transfection; bone marrow mesenchymal stem cells

收稿日期: 2014-11-26

* 基金项目: 四川省卫生厅课题基金(No: 110597)

[通信作者] 刘亮, E-mail: liulst@163.com; Tel: 15348216516

(图 3/4/5/6 因为图中有注释, 已经让作者发原图至 XDYX99 邮箱)

载脂蛋白 -J (apolipoprotein J, apoJ, 又称 clusterin) 是一种几乎所有类型的细胞都能分泌的多功能糖蛋白。在血浆中 apoJ 与高密度脂蛋白(补充英文全称, HDL) 相关, 尤其与含有 ApoAI 和胆固醇转移蛋白活性的 HDL 亚型联系最密切。在损伤组织中, 载脂蛋白 -J 基因表达升高, 是一种退化或损伤组织中基因转录上行调节的蛋白, 参与组织损伤的修复。相关研究表明, 补体系统介入脑出血后的神经元死亡, 而 apoJ 作为一个明确的补体调节因子, 通过抑制脑出血后的补体激活阻止补体介导的神经元死亡, 使 apoJ 作为新的脑出血的治疗措施成为可能。本研究旨在建立 apoJ 基因的体外真核细胞表达系统, 为进一步研究高表达 apoJ 基因的骨髓间充质干细胞移植治疗脑出血疾病奠定实验基础。

1 材料与方 法

1.1 主要材料及试剂

实验动物: 清洁级(SD)大鼠, 体重 80 ~ 100 g, 由四川医科大学动物中心提供。

试剂: α -MEM 培养基; 胎牛血清(Gibco 公司), 脂质体 Lipofectamin™ 2000(Invitrogen 公司), 兔抗鼠 apoJ 抗体(Bioworld Technology 公司), 上下游引物(上海生物工程有限公司), 总 RNA 提取试剂盒, SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(Solaria 公司), 兔抗鼠 apoJ 抗体(Proteintech 公司), Anti-GAPDH, 二抗 - 羊抗兔 IgG (Bios 公司), 10 ~ 170 kD 电泳蛋白彩色预 Marker(Thermo 公司), ECL 发光液(Millipore 公司), 重组质粒 pEGFP-N1-apoJ 和空质粒 pEGFP-N1 由上海生工完成并提供。

1.2 大鼠骨髓间充质干细胞的培养

大鼠骨髓间充质干细胞细胞株由四川医科大学附属第一医院中心实验室赠送, 采用贴壁培养法。

1.3 脂质体介导重组质粒 pEGFP-N1-apoJ 和空质粒 pEGFP-N1 瞬时转染大鼠骨髓间充质干细胞

胰蛋白酶消化第 3 代大鼠骨髓间充质干细胞, 以 $5 \sim 6 \times 10^6$ 接种于 6 孔板中, 细胞接种到 6 孔板融合达 90% 以上时即可进行转染, 转染前 1 天换液。转染前将 6 孔板中的细胞用无血清培养基冲洗 2 遍, 加入 2 ml 无血清培养基。转染实验分为 A 组、B 组和 C 组, A 组为实验组, 用质脂体 Lipofectamine™ 2000 进行 pEGFP-N1-apoJ 转染; B 组为实验对照组, 转染空质粒 pEGFP-N1; C 组为空白对照组, 加入等量质脂体, 其他步骤均相同。各组所用脂质体

相等, A 组所用重组质粒 pEGFP-N1-apoJ 的量与 B 组所用空质粒 pEGFP-N1 的量相等。转染后在 37℃、5% 二氧化碳的培养箱中培养 6 h, 6 h 后更换含有血清无双抗的全培养基继续培养。转染 24 h 后, 于荧光显微镜下观察荧光表达情况, 并利用流式细胞仪分别测定转染后 1 d、2 d、3 d 和 5 d 时的表达效率。

1.4 重组质粒 pEGFP-N1-apoJ 携带的目的基因 apoJ 在大鼠骨髓间充质干细胞中表达的检测

采用 Real-time PCR 法检测重组质粒 pEGFP-N1-apoJ 携带的目的基因 apoJ 在大鼠骨髓间充质干细胞中的表达, 转染 72 h 后, 分别收集 A 组、B 组和 C 组细胞, 一步法提取各组细胞总 RNA, 行逆转录, 用先前设计的上下游引物(见附表), 通过 Real-time PCR 法检测 apoJ 基因的表达, 并行各组 PCR 产物 2% 琼脂糖凝胶电泳分析。Real-time PCR 条件为: Stage 1: 预变性 95℃、30 s, 1 个循环, Stage 2: PCR 反应 95℃、5 s, 58℃、34 s, 共 40 个循环。

附表 apoJ 及 GAPDH mRNA 的引物序列

目的基因	引物序列	片段长度 /bp
apoJ	5'-TGTGGCACTGCTGCTGACCT-3'	129
	5'-TGGACGGCGTTCTGAATCTC-3'	
GAPDH	5'-CCTCAAGATTGTCAGCAAT-3'	140
	5'-CCATCCACAGTCTTCTGAGT-3'	

1.5 免疫细胞化学法检测 apoJ 蛋白的表达

转染 72 h 后, 取出 3 组细胞爬片。经 4% 多聚甲醛固定, 用 3% H₂O₂ 处理, 滴加 5% BSA, 37℃ 孵育 20 min, 去血清, 滴加兔抗鼠 apoJ 抗体(1 : 100), 4℃ 过夜。加二抗, 37℃ 孵育 30 min; 上述各操作步骤之间均用 PBS 振荡洗涤。最后用 DAB 显色, 常规脱水、封片, 显微镜下观察。

1.6 利用 Western blot 法检测 apoJ 蛋白的表达

转染 72 h 后, 分别收集 3 组细胞, 行贴壁细胞蛋白提取。利用 Western blot 法进行检测 apoJ 蛋白的表达, 制胶, 上样行 SDS-PAGE 蛋白电泳, 转膜, 封闭, 孵兔抗鼠 apoJ 一抗(1 : 1 000) 4℃ 过夜, 孵山羊抗兔二抗 1 h, 暗室内曝光, 显影、定影。

2 结果

2.1 大鼠骨髓间充质干细胞的形态学观察

光学显微镜下观察, 大鼠骨髓间充质干细胞未贴壁时为圆形单核细胞, 折光性强。12 ~ 24 h 后开始

贴壁,贴壁后形态发生改变,变为多角形和扁平形。培养 10~14 d 培养板孔内即可达 90% 融合,形态变为长梭形为主(见图 1)。第 5~6 代后细胞形态趋于稳定相同,挤压成束状,漩涡状,细胞胞浆丰富,核大,核仁也较明显。

2.2 脂质体介导质粒对大鼠骨髓间充质干细胞瞬时转染

经脂质体 Lipofectamine™ 2000 介导转染 24 h 后,由于脂质体本身的细胞毒性,造成 3 组细胞均出现少量呈悬浮状的絮状物,经换液去除这些死细胞后未再发生上述现象。转染 24 h 后在荧光显微镜下观察,A 组和 B 组均有较多的细胞出现绿色荧光,C 组细胞未见荧光。绿色荧光多见于折光性强、处于分裂期的细胞;绿色荧光强弱不均,提示基因转入的拷贝数略有差异。至转染后 72 h 绿色荧光最明显(见图 2),以后无明显改变,5 d 以后绿色荧光呈逐渐下降趋势。利用流式细胞仪测定 EGFP 在第 1、2、3、5 天对骨髓间充质干细胞的转染效率分别为 28.60%、31.67%、34.62% 和 15.32%。

2.3 重组质粒 pEGFP-N1-apoJ 携带的目的基因 apoJ 在大鼠骨髓间充质干细胞中的表达

转染 72 h 后,经 Real-time PCR 扩增后,3 组细胞均有不同程度的 apoJ mRNA 表达,但 A 组细胞 apoJ mRNA 表达量明显高于其他两组,提示 A 组细胞除细胞本身内源性 apoJ 基因表达外,同时存在 pEGFP-N1-apoJ 携带的外源性目的基因 apoJ 表达(见图 3)。Real-time PCR 扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳分析,A 组、B 组和 C 组细胞均在 129 bp 处有一特异性扩增条带,提示均有 apoJ 基因转录,应用 Ea-gle Eye II 型图像分析处理系统对电泳带进行扫描,根据各条带光密度值,计算各组 apoJ mRNA 表达的相对水平,结果提示 A 组细胞 apoJ mRNA 表达水平明显高于其他两组(见图 4)。

2.4 转染后 3 组细胞经免疫细胞化学法检测 apoJ 蛋白的表达

转染 72 h 后,3 组细胞爬片经免疫细胞化学法检测,A 组阳性细胞率明显高于其他两组。提示 A 组细胞转染外源性目的基因 apoJ 后,外源性目的基因 apoJ 得到高效的转录和翻译(见图 5)。

2.5 转染后 3 组细胞经 Western blot 法检测 apoJ 蛋白的表达

转染 72 h 后,3 组细胞利用 Western blot 进行检测 apoJ 蛋白的表达,A 组细胞可见 apoJ 蛋白大量

表达,B、C 组细胞见 apoJ 蛋白微量表达,利用 quantity one 软件进行条带灰度值分析,结果表明 A 组细胞 apoJ 蛋白表达量明显高于 B、C 组细胞。提示 A 组细胞转染外源性目的基因 apoJ 后,外源性目的基因 apoJ 得到高效的转录和翻译(见图 6)。

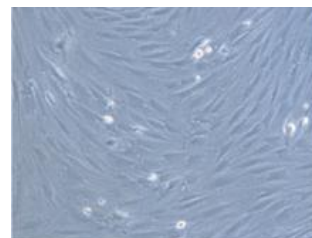
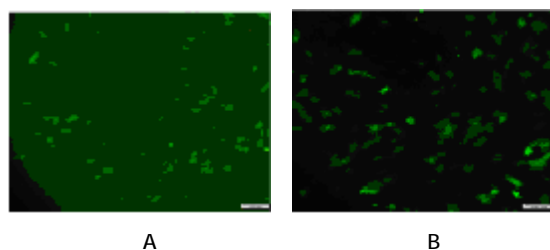
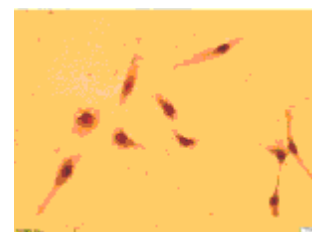


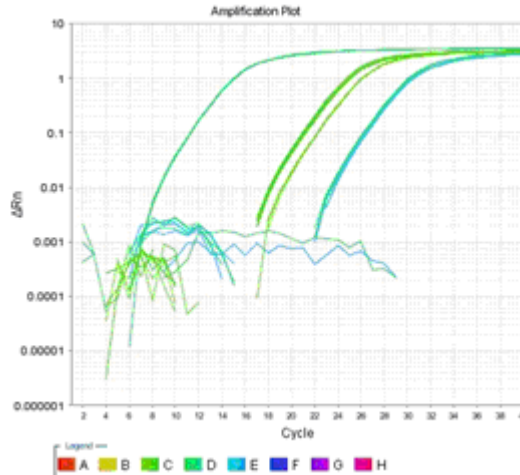
图 1 MSCs 原代培养 10~14 d (×100)



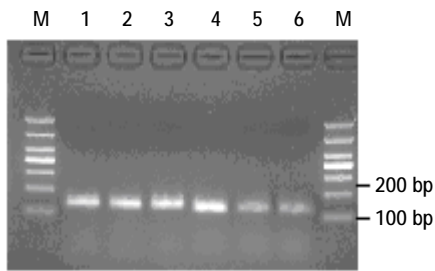
A: MSCs 转染 pEGFP-N1-apoJ 72 h; B: MSCs 转染 pEGFP-N1 72 h
图 2 转染 72 h 时荧光显微镜观察 (×100)



MSCs 转染 pEGFP-N1-apoJ 72 h
图 5 MSCs 转染 p-EGFP-N1-apoJ
72 h 细胞免疫组织化学 (×400)

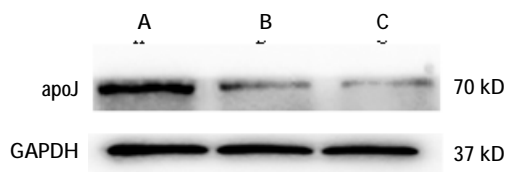


C: GAPDH; D: A 组; E: B、C 组
图 3 转染 72 h 时 Real-time PCR



1-3: GAPDH; 4: A 组; 5: B 组; 6: C 组; M: DL 1 000 DNA Marker (1 000 bp, 700 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, 100 bp)

图 4 转染 72 h 时 Real-time PCR 扩增产物电泳



A: 转染 pEGFP-N1-apoJ 质粒转染组; B: 空转染 pEGFP-N1 质粒转染组; C: 空白对照组

图 6 Western Blot 检测转染 72 h 时 apoJ 的表达

3 讨论

载脂蛋白 -J (apolipoprotein J, apoJ, 又称 Clusterin) 是一种杂二聚体糖蛋白, 由两个亚单位 α 和 β 链组成, 相对分子质量为 70000。广泛分布于各种组织和体液中[1-3], 人 apoJ mRNA 在脑组织中浓度最高, 依次分别为睾丸、卵巢、肝、心和肺, 在脾、乳腺和膀胱中含量最少。apoJ 在多种神经系统疾病中均有高表达[4], 在神经系统疾病中的作用日益受到重视。相关研究表明[5-6], apoJ 具有抑制细胞凋亡、参与补体调节抑制炎症反应、参与脂质代谢等多种生理功能。补体激活引起的炎症反应和细胞凋亡在脑出血后继发性损伤中的作用日益受到重视[7], 炎症反应和细胞凋亡是脑出血疾病重要的病理生理机制, 抑制炎症反应和细胞凋亡成为治疗脑出血的新方法^[8]。有关 apoJ 保护神经细胞的具体机制目前尚未明确, CALERO 等^[9]的研究表明: 脑损伤后 apoJ 浓度上调是对神经元的一种保护反应, 主要有 4 种机制: ① apoJ 可作为反凋亡信号; ② 抑制补体形成膜攻击复合物, 从而抑制炎症; ③ apoJ 具有抗氧化作用; ④ 和部分炎症相关蛋白结合, 抑制这些蛋白导致的炎症反应。apoJ 与阿尔茨海默病、前列腺癌和乳腺癌的相关研究报道较多, 而与脑血管疾病的研究报道不多。相关研究表明, apoJ 还具有促进神经元分化和营养神经元的作用^[10], 亦有利于神经元的可塑性^[11]。

MSCs 最早是由 FRIEDENSTEIN 等^[12]从骨髓中分离培养出来, 是一种具有多向分化潜能的原始细胞, 在特定环境下可分化为所在组织的表型细胞。骨髓间充质干细胞可分化为多种细胞, 如骨细胞、肌腱细胞、脂肪细胞、神经细胞和神经胶质细胞^[13-14]。KOPEN 等^[15]首次报道将骨髓间充质干细胞注入新生鼠侧脑室可以分化为神经元和神经胶质细胞。有关研究表明骨髓间充质干细胞可以诱导分化为特征类型和有功能的神经元^[16-18], 并且通过独立的调节机制完成向神经元分化^[19]。骨髓间充质干细胞有类似神经干细胞的多向分化潜能, 但又有其他干细胞没有的特性, 使其成为干细胞移植治疗中枢神经系统损伤的理想细胞供体和转基因的细胞载体^[20-22]。干细胞移植治疗中枢神经系统损伤, 使损伤轴突再生、突触重建和恢复部分功能成为可能, 骨髓间充质干细胞除了具有干细胞的一般特性外, 还具有取材方便、不涉及伦理问题、易于外源基因转染及稳定表达、免疫原性弱、可进行自体移植等优点, 被认为是一种细胞替代治疗及基因治疗的理想靶细胞^[23]。另外, 有研究表明骨髓间充质干细胞可分泌多种细胞因子, 发挥抗凋亡、抗炎, 促进脑损伤组织内源性修复等作用^[24-25]。

THAMBISSETTY 等^[26]研究提示 apoJ 具有保护神经元的作用, 本研究通过构建重组质粒 pEGFP-N1-apoJ 转染大鼠骨髓间充质干细胞, 尝试建立 apoJ 基因修饰的骨髓间充质干细胞体系, 为后续进一步研究 apoJ 的作用机制及进一步为临床基因工程干细胞移植治疗脑出血提供一定的理论基础。本研究通过脂质体介导 pEGFP-N1-apoJ 对大鼠骨髓间充质干细胞进行转染, 经实时定量 PCR、免疫细胞化学及 Western Blot 检测, apoJ 在骨髓间充质干细胞中得以转录和翻译, 说明携带外源性载脂蛋白 -J 基因的骨髓间充质干细胞构建成功。基于上述原因, 采用表达外源性 apoJ 的骨髓间充质干细胞移植治疗脑出血, 可以产生双重作用: 一方面, 外源性携带载脂蛋白 -J 基因骨髓间充质干细胞能分化为神经元和神经胶质细胞, 以补充脑出血后脑损伤丢失的细胞, 在结构上修复和重建神经环路; 另一方面, 携载体脂蛋白 -J 基因骨髓间充质干细胞分泌高水平的 apoJ 可以改善脑出血部位及周围组织的微环境, 并通过多种途径抑制炎症反应及神经细胞凋亡, 促进受损神经元和神经胶质细胞的功能恢复。本研究提示携外

源性载脂蛋白 -J 基因骨髓间充质干细胞体外培养构建成功,并且外源性目的基因 apoJ 得到高水平表达,为进一步开展携载脂蛋白 -J 基因骨髓间充质干细胞移植治疗脑出血的实验提供一定的实验基础和理论依据,希望能够成为新的脑出血疾病治疗措施。

参 考 文 献:

- [1] TROUGAKOS IP, SO A, JANSEN B. et al. Silencing expression of the clusterin/ apolipoprotein J gene in human cancer cells using small interfering RNA induces spontaneous apoptosis, reduced growth ability, and cell sensitization to genotoxic and oxidative stress[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(5): 1834-1842.
- [2] PUCCI S, BONANNO E, PICHIORRI F, et al. Modulation of different clusterin isoforms in human colon tumorigenesis [J]. *Oncogene*, 2004, 23(13): 2298-2304.
- [3] GLEAVE M, MIYAKE H. Use of antisense oligonucleotides targeting the cyto-protective gene, clusterin, to enhance androgen and chemo-sensitivity in prostate cancer[J]. *World J Urol*, 2005, 23(1): 38-46.
- [4] ELLIOTT DA, WEICKERT CS, GARNER B. Apolipoproteins in the brain: implications for neurological and psychiatric disorders [J]. *Clin Lipidol*, 2010, 51(4): 555-573.
- [5] SUBRAMANIAN C, JARZEMBOWSKI J A, HALSEY S M, et al. CLU blocks HDAC-mediated killing of neuroblastoma[J]. *Tumour Biol*, 2011, 32(2): 285-291.
- [6] YU J T, TAN L. The role of clusterin in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis, and therapy[J]. *Mol Neurobiol*, 2012, 45(2): 314-326.
- [7] ARONOWSKI J, HALL CE. New horizons for Primary intracerebral hemorrhage treatment: experience from Preclinical studies[J]. *Neurol Res*, 2005, 27(3): 268-269.
- [8] 周志强, 赵立波, 王凤英, 等. rh EPO 抑制大鼠脑出血后炎症反应与增强 LIVIN 的表达[J]. *重庆医学*, 2009, 38(9): 1067-1070.
- [9] CALERO M, ROSTAGNO A, MATSUBARA E, et al. Apolipoprotein J (clusterin) and Alzheimer's disease[J]. *Microsc Res Tech*, 2000, 50(4): 305-315.
- [10] CORDERO LO, SCOTT SA, MASLEN SL, et al. Clusterin secreted by astrocytes enhances neuronal differentiation from human neural precursor cells [J]. *Cell Death Differ*, 2011, 18(5): 907-913.
- [11] WICHER G, FEX SA, VELSECCHI I, et al. Extracellular clusterin promotes neuronal network complexity in vitro[J]. *Neuroreport*, 2008, 19(15): 1487-1491.
- [12] FRIEDENSTEIN AJ, PETRAKOVA KV, KUROLESOVA AB, et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues[J]. *Transplantation*, 1968, 6(2): 230-247.
- [13] VAWDA R, FEHLINGS MG. Mesenchymal cells in the treatment of spinal cord injury: current & future perspectives [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2013, 8(1): 25-38.
- [14] 李盛华, 郭平德, 王文晶. 中药诱导骨髓间充质干细胞向神经样细胞分化的研究进展[J]. *中国骨伤*, 2010, 23(3): 233-234.
- [15] KOPEN GC, PROCKOP DJ, PHINNEY DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains[J]. *J Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(19): 10711-10716.
- [16] LI TY, SHU C, WANG CH, et al. Plasticity of rat bone marrow-derived 5-hydroxytryptamine-sensitive neurons: dedifferentiation and redifferentiation[J]. *Cell Biol Int*, 2004, 28(11): 801-807.
- [17] GUO L, YIN F, MENG HQ, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells into dopaminergic neuron-like cells in vitro[J]. *Biomed Environ Sci*, 2005, 18(1): 36-42.
- [18] CHO KJ, TRZASKA KA, GRECO SJ, et al. Neurous derived from human mesenchymal stem cells show synaptic transmission and can be induced to produce the neurotransmitter substance P by interlenkin-1alpha[J]. *Stem Cells*, 2005, 23(3): 383-391.
- [19] SUON S, JIN H, DONALDSON AE, et al. Transient differentiation of adult human bone marrow cells into neuron-like cells in culture: development of morphological and biochemical traits is mediated by different molecular mechanisms[J]. *Stem Cells Dev*, 2004, 13(6): 625-635.
- [20] VAQUERO J, ZURITA M, OYA SEL. Cell therapy using bone marrow stromal cells in chronic paraplegic rats: systemic or local administration[J]. *Neurosci Lett*, 2006, 398: 129-134.
- [21] KIM BG, HWANG DH, LEE SI, et al. Stem cell-based cell therapy for spinal cord injury[J]. *Cell Transplant*, 2007, 16(4): 355-364.
- [22] PARR AM, KULBATSKI I, TATOR CH. Transplantation of adult rat spinal cord stem / progenitor cells for spinal cord injury[J]. *J Neurotrauma*, 2007, 24(5): 835-845.
- [23] RITFELD GJ, NANNOE TEWARIE RD, VAJN K, et al. Bone marrow stromal cell mediated tissue sparing enhances functional repair after spinal cord contusion in adult rats[J]. *Cell transplant*, 2012, 21(7): 1561-1575.
- [24] 庄淑波, 刘毅, 陈克明, 等. 大鼠骨髓间充质干细胞体外分离、纯化和培养适宜条件的筛选[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(20): 3886-3891.
- [25] 鹿寒冰, 董瑞国, 李晓宾, 等. 大鼠实验性脑梗死后 AQP4 表达与 MRI 变化的相关性研究[J]. *卒中与神经疾病*, 2011, 18(6): 348-352.
- [26] THAMBISETTY M, AN Y, KINSEY A, et al. Plasma clusterin concentration is associated with longitudinal brain atrophy in mild cognitive impairment[J]. *Neuroimage*, 2012, 59(1): 212-217.