

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.06.003

文章编号: 1005-8982(2017)06-0010-07

## 人干细胞白血病基因重组慢病毒载体的构建 及其在 Cajal 样间质细胞中的表达\*

于建超,王江平,李应龙,钱彪,倪钊,王新敏,李强,王勤章  
(石河子大学医学院附属第一医院 泌尿外科,新疆 石河子 832000)

**摘要: 目的** 构建含人干细胞白血病(SCL)基因的重组慢病毒载体,并转染体外培养的Cajal样间质细胞(ICC),为进一步利用慢病毒表达载体行体内实验奠定基础。**方法** 通过聚合酶链反应(PCR)将人SCL基质粒内的遗传物质扩增,与慢病毒载体质粒GV287-EGFP结合,构建重组质粒GV287-EGFP/SCL,通过Western blot检测及基因测序对阳性克隆进行鉴定,并测定病毒滴度。体外分离、培养及鉴定ICC,重组慢病毒载体以感染复数(MOI)值为0.5、1.0、5.0、10.0、50.0和100.0时,分别转染ICC,通过激光共聚焦显微镜观察,计算不同MOI值的转染效果,确定最佳MOI值。重组慢病毒载体以最佳MOI值感染ICC作为实验组,以空载体转染的ICQ(空载体组)及未转染的ICQ(空白组)作为对照,通过逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测SCL基因在ICC中的表达。**结果** 经Western blot检测及基因测序鉴定SCL重组慢病毒表达载体构建成功,并成功转染ICC,激光共聚焦显微镜下可观察到强绿色荧光。MOI为10时转染效果最佳,转染效率>85%;RT-PCR结果表明,实验组SCL基因的表达量高于空载体组和空白组。**结论** 成功制备人SCL基因重组慢病毒载体,并能高效转染ICC,介导SCL基因在ICC中表达。

**关键词:** 干细胞白血病基因;慢病毒载体;转染;Cajal样间质细胞

**中图分类号:** R587.2

**文献标识码:** A

## Construction of recombinant human stem cell leukemia gene lentiviral vector and its expression in Cajal-like interstitial cells\*

Jian-chao Yu, Jiang-ping Wang, Ying-long Li, Biao Qian, Zhao Ni,  
Xin-min Wang, Qiang Li, Qin-zhang Wang  
(Department of Urology, the First Affiliated Hospital of Medical College,  
Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000, China)

**Abstract: Objective** To construct recombinant lentiviral vectors containing human stem cell leukemia (SCL) gene and to observe its ability in transfecting Cajal-like interstitial cells and mediating SCL gene expression. **Methods** The SCL gene was amplified from plasmid with SCL gene by PCR, connected to the shuttle plasmid GV287-EGFP to construct GV287-SCL, the obtained replication-defective recombinant lentiviral GV287-SCL was propagated in 293T cells according to the steps of Invitrogen Lipofectamine 2000. The recombinant lentiviral GV287-SCL was purified and titrated by dilution technique. The transfected Cajal-like interstitial cells were cultured *in vitro*, the distribution and efficiency of recombinant lentiviral mediated SCL were observed by the expression of green fluorescence protein (GFP) under the fluorescent microscope. RT-PCR were used to measure the expression of SCL mRNA in the transfected Cajal-like interstitial cells. **Results** Western blot and gene sequencing confirmed that the SCL gene was successfully inserted into the lentiviral vector, and SCL recombinant lentiviral vector was successfully transfected into Cajal-like interstitial

收稿日期:2015-09-14

\* 基金项目:国家自然科学基金 No.81360120

[通信作者] 王勤章, E-mail: wqz1969@sina.com

cells. The adenovirus had a high transfection efficiency of up to 85% when MOI was 10. RT-PCR showed the expression of *SCL* mRNA in the Cajal interstitial cells of the experimental group was lower than that of the vector group and the blank group. **Conclusions** The recombinant lentiviral vector containing human *SCL* gene has been successfully constructed by homogenous recombination in bacteria, and it has a high transfection efficiency and can mediate expression of *SCL* gene in Cajal-like interstitial cells.

**Keywords:** stem cell leukemia gene; lentiviral vector; transfection; Cajal-like interstitial cell

糖尿病膀胱异常病症 (diabetic cystopathy, DCP) 属于糖尿病末期出现频率最高的并发症,其在糖尿病患者中的发病率可达 19%~84%<sup>[1-4]</sup>,严重影响患者的生活质量,其病因复杂,截止目前尚未完全阐明糖尿病膀胱异常病症的发病机制<sup>[5-9]</sup>。近年研究发现,在人类、豚鼠等很多动物的膀胱逼尿肌中存在着一种与胃肠道 Cajal 样间质细胞 (interstitial cells of Cajal, ICC) 形态特殊的特殊细胞,称为膀胱 ICC<sup>[6-7]</sup>。近年来研究发现,DCP 膀胱中,ICC 数量明显减少,与其他 ICC、逼尿肌细胞及神经末梢之间的缝隙连接均显著减少,并伴随细胞内超微结构的改变;体外模拟高糖环境培养豚鼠膀胱 ICC 发现,该细胞不仅发生形态改变,而且细胞自发兴奋功能下降<sup>[8]</sup>。上述研究结果表明,高糖环境所导致的膀胱 ICC 数量减少、起搏功能降低是 DCP 的发病机制之一。高糖环境引起 *c-kit* mRNA 和 *c-kit* 蛋白表达下降是导致 ICC 数量减少,形态和功能损害的主要原因。因此如果能恢复和增强高糖环境下受损的 *c-kit* 表达,则有可能促进膀胱 ICC 增殖,重塑高糖环境下受损的 ICC 表型,恢复 ICC 形态和起搏功能,促进膀胱功能恢复,从而达到治疗 DCP 的目的。

研究证实,*c-kit* 基因转录调控区存在干细胞白血病基因 (stem cell leukemia, *SCL*) 结合位点,*SCL* 主要是通过作用于 *c-kit* 基因启动子,调节 *c-kit* 表达来发挥其“生存基因”的功能,而 *SCL* 过表达则可使 *c-kit* 表达升高,并对干细胞因子 (stem cell factor, SCF) 反应性恢复正常<sup>[9]</sup>,可见 *SCL* 在 *c-kit* 的表达调控中发挥重要作用,通过过表达 *SCL* 基因,上调 *c-kit* 表达来逆转。基因治疗是在 DNA 或 RNA 水平上人为地将某些外源性的基因导入相应的靶细胞,从而获得表达,继而产生特定的生物学效应以达到治疗的目的。本实验通过构建 *SCL* 基因过表达慢病毒载体,转染 ICC,通过导入外源性 *SCL* 基因可以实现对 ICC 细胞 *c-kit* 表达的上调,促进 ICC 表型恢复,具有抑制和逆转 ICC 损害,治疗糖尿病膀胱异常病症的可能。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

成年豚鼠 4 只,雌雄不限,体重 250~400 g,由新疆医科大学动物实验中心提供。

### 1.2 主要试剂与仪器

慢病毒载体及包装系统 (含 GV287-EGFP 表达载体、p-Helper 1.0 和 p-Helper 2.0 3 个质粒) 购自上海吉凯基因化学技术有限公司,感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、293T 细胞与载体购自上海吉凯基因化学技术有限公司,改良伊格尔培养基 (dulbecco's modified eagle medium, DMEM) 胎牛血清转染试剂盒 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司,质粒提取试剂盒、凝胶回收试剂盒、DNA 片段提纯试剂盒与 DNA 提取试剂盒购自日本 Qiagen 生物研究中心,逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂盒购自立陶宛 Fermentas 公司,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 蛋白电泳仪、蛋白转膜仪购自南京天能生物研究公司。

### 1.3 人 *SCL* 基因重组慢病毒载体的构建、鉴定及测序

聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增人 *SCL* 基因,引物由上海吉凯基因化学技术有限公司设计并合成。正向引物:5'-GAGGATCCCCGGGTACCGGTCGCCACCATGACCGAGCGGCCGCCGAG-3;反向引物:5'-TCACCATGGTGGCGACCGGCCGAGGGCCGGCTCCATC-3。反应条件:94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 10 min。琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。将含人 *SCL* 基因的 PCR 扩增因子进行提纯,通过 In-Fusion 转换酶的催化可以把靶基因的 PCR 产物与 GV287-EGFP 线性化载体进行结合。提取含有人 *SCL* 基因 GV287-EGFP 质粒阳性克隆菌落 PCR 模板上的交换转化产物长出菌,加入 10  $\mu$ l 培养基并混匀,用 1  $\mu$ l 设置模板,通过 PCR 反应实现基因扩增,正

向引物:5- GGTATAAGAGGCGCGACCAG-3;反向引物:5- CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG-3。反应条件:94℃变性 30 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,共 30 个循环,72℃继续延伸 6 min。琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物,设阴性对照[双蒸水 (distillation-distillation H<sub>2</sub>O, ddH<sub>2</sub>O)],阴性对照 (空载自连对照)及阳性对照[甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)],并对阳性克隆进行测序,测序结果与 GenBank 数据库进行比对。

#### 1.4 人 SCL 基因重组慢病毒载体的包装及滴度测定

以 293T 细胞为包装细胞,制备编码慢病毒的重组病毒质粒及其两种辅助包装原件载体质粒,3种质粒分别进行高纯度无内毒素抽提,按 Lipofectamine 2000 转染试剂盒使用说明书,共转染 293T 细胞,转染 8 h 后更换为完全培养基,培养 48 h,收集含人 SCL 基因慢病毒载体的细胞上清液,对其浓缩后得到高滴度的含人 SCL 基因慢病毒载体浓缩液,用荧光法在 293T 细胞中测定病毒滴度。

#### 1.5 豚鼠膀胱 ICC 体外培养及鉴定

**1.5.1 体外分离、培养 ICC** 随机选取实验动物,用 10%水合氯醛将其麻醉,无菌环境中剖开腹部获得膀胱组织,剔除膀胱壁内黏膜,将膀胱剪碎至 1 mm<sup>3</sup>大小的碎块,在 1.0 mg/ml 胰蛋白酶中,室温下消化 15 min,加入 DMEM 培养基 (内含 1.0 mg/ml V 型胶原酶,青霉素 100 u/ml,链霉素 100 g/ml),37℃、5%二氧化碳 CO<sub>2</sub> 温箱内消化 90 min。超净台下将消化好的絮状液进行无菌过滤,1 500 r/min,离心 5 min。过滤上清液并丢弃,然后用 1%磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 液进行漂洗、反复离心,共 3 次。充分吹打单细胞悬浮液后进行接种处理,将其接种至 6 孔培养皿中,加入内含 10%胎牛血清液,1%双抗 (青霉素 100 u/ml 链霉素 100 g/ml) 的低糖 DMEM 培养基,37℃、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱内培养。

**1.5.2 ICC 的鉴定** 细胞接种 24 h 后,可以看到 ICC 大部分贴壁生长,但平滑肌细胞未发生该现象,因此需要培养基去除未贴壁细胞,已出现贴壁的 ICC 待 72 h 后可以通过 ICC 特异性标记物 c-kit 抗体做免疫荧光标记鉴定。具体流程为:将细胞爬片拿出,放置于 1% PBS 溶液中进行漂洗,重复 3 次,共 15 min。在室温条件下,用纯度 100%丙酮进行固定处理,15 min,待进行风干后放置于 1% PBS 溶液中进行漂洗,重复 3 次,共 15 min。0.03%双氧水 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液将内

源性过氧化物酶进行密封处理约 0.5 h。1% PBS 漂洗 3 次,5 min/次。1%胎牛血清白蛋白开展孵化实验,共 0.5 h。慢慢吸取孵化液,与经过 1% PBS 稀释的第一抗体融合 (大鼠抗小鼠的单克隆 KIT 抗体,1:100,上海百赛生物技术有限公司) 1 μl,湿盒内室温孵育 2 h 后用 1% PBS 漂洗 3 次,5 min/次。与经过异硫氰酸荧光素标记的荧光第二抗体融合 (兔抗大鼠二抗,1:100,美国 Sigma 公司) 避光孵育 60 min。1% PBS 漂洗 3 次,5 min/次。在盖玻片上添加 50%甘油溶液,将其封置在载玻片中,利用激光聚焦显微镜进行观察。

#### 1.6 人 SCL 基因重组慢病毒载体转染豚鼠膀胱 ICC

参照慢病毒转染手册 (由上海吉凯基因化学技术有限公司提供),设置不同感染复数 (multiplicities of infection, MOI) (0.5、1.0、5.0、10.0、50.0、100.0), ICC 中加入 5×10<sup>8</sup> TU/ml 含人 SCL 基因慢病毒载体,同时加入 10 μg/ml 聚凝胺,置于温箱中,培养 8~12 h 后,在显微镜下观察各 MOI 下的细胞状态,弃去培养基,加入新鲜配制的完全培养基,继续培养 48 h 后,在激光共聚焦显微镜下观察 ICC 生长状态并计算转染效率,转染效率=[表达绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 的细胞数/总细胞]×100%,确定最佳 MOI 值。

将 ICC 分为空白组、空载体组与实验组。其中空白组加入 1% PBS,空载体组加入空白慢病毒,实验组按最佳 MOI 加入含人 SCL 基因慢病毒载体,同时加入 10 μg/ml 聚凝胺。培养 24 h 后用移液器吸去培养基,1% PBS 漂洗 2 次,加入 1 ml 新鲜配制的含 10% FBS 的 DMEM 培养液继续培养。分别在转染 2、3 和 5 d 时,采用激光共聚焦显微镜,沿单孔板垂直于水平连续视野 (约 0.77 mm<sup>2</sup>/视野),连续观测 20 个视野 (×200),通过观察 GFP 表达强度来确定转染效果。

#### 1.7 重组慢病毒 GV-287-SCL 介导的 SCL 基因在豚鼠膀胱中的表达

参照慢病毒载体作用时间,各经过感染 2、3 和 5 d 后,提取实验组 (最佳 MOI 感染)、空载体组及空白组细胞总 RNA,加各组细胞总 RNA,加入人 SCL 基因引物,按逆转录试剂盒说明书操作流程进行 RT-PCR 反应。PCR 扩增正反向引物和反应指数与上述一致。反应结束后行电泳、凝胶成像及灰度分

析,检测各组 ICC 中 SCL mRNA 表达。

### 1.8 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,多组间比较用单因素方差分析,组间两两比较用 SNK-*q* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 人 SCL 基因扩增的 PCR 产物

在目的基因 SCL 进行扩增,扩增产物行琼脂糖凝胶电泳实验,电泳结果示,PCR 扩增产物的长度为 1 036 bp,与目的基因相关片段中的 SCL-DNA 长度相同。见图 1。

### 2.2 重组质粒 GV287-EGFP/SCL

**2.2.1 重组质粒 GV287-EGFP/SCL 阳性克隆** 抽选 8 个转化子,通过 SCL 引物对其行 PCR 反应,用 1.5%琼脂糖凝胶电泳进行鉴定,实验结果表明,阳性转化子通过扩增后,都形成 503 bp 的条带,其大小与目的片段人 SCL cDNA 相当,表明 8 个转化子均接入目的基因,而阴性转化子得到 192 bp 的条带。见图 2。

**2.2.2 重组质粒 GV287-EGFP/SCL 阳性克隆测序** 测序结果显示,目的基因 SCL 成功插入到 GV287-EGFP,将其基因排序进行对比,与 GenBank 信息库里的人 SCL mRNA 完全一致。

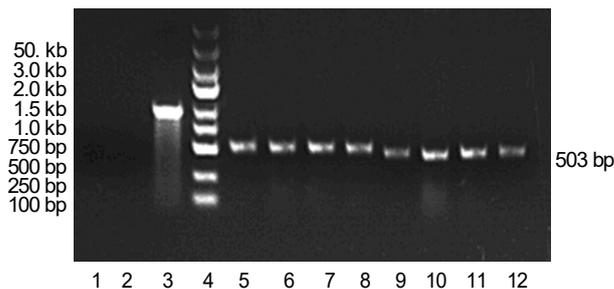
### 2.3 重组慢病毒载体

设置不同剂量的重组慢病毒载体做转染实验,了解该重组介质对 293T 细胞的感染情况。转染 293T 细胞 24 h 后,倒置显微镜下观察 GFP 成功表达。目的基因融合蛋白大小为 39 kD,经 Western blot 检测,可以观察到 48 kD 附近有特征条带,其大小和

目的基因融合蛋白相比较偏大。实验结果表明,该质粒用 FLAG 抗体检测到目的条带偏大,蛋白可能存在某种修饰,过表达较好。因此可以看出 GV-287-SCL 重组慢病毒表达载体可以有效地介导 SCL 基因蛋白表达。见图 3、4。

### 2.4 含人 SCL 基因重组慢病毒载体滴度

对重组慢病毒颗粒进行反复感染、外扩和提纯,



1: 阴性对照 (ddH<sub>2</sub>O); 2: 阴性对照 (空载体组); 3: 阳性对照 (GAPDH); 4: Marker; 5~12: SCL-1~8 号转化子

图 2 含人 SCL 基因的 GV287-EGFP 阳性克隆琼脂糖凝胶电泳图

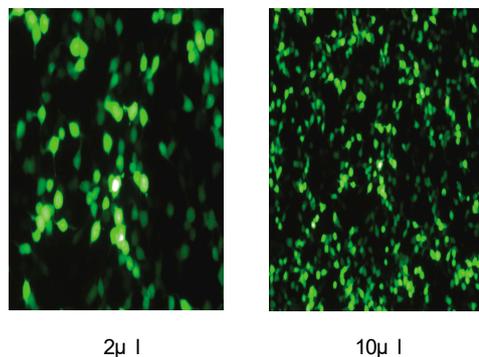
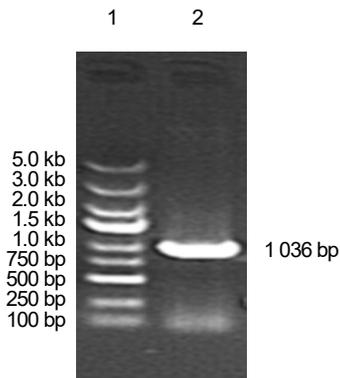
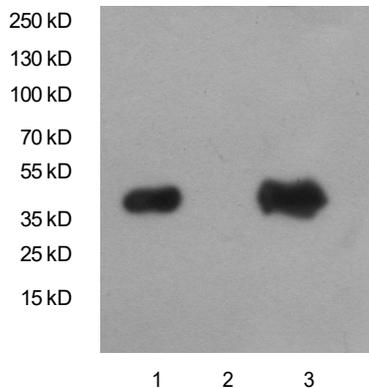


图 3 不同剂量慢病毒原液感染 293T 细胞 24 h 后荧光蛋白的表达 (×100)



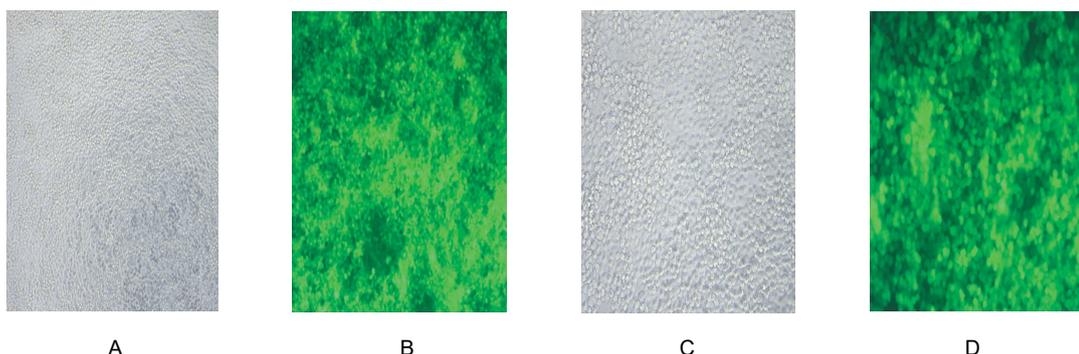
1: Marker; 2: PCR 产物

图 1 人 SCL 基因 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图



1: WB 标准品 SURVIVIN-3FLAG-GFR 分子大小 48 kD; 2: 293T 细胞; 3: 目的基因质粒转染 293T 细胞样品

图 4 重组慢病毒 GV287-SCL 感染 293T 细胞后的蛋白表达



A: 第 5 天明视野; B: 第 5 天荧光视野; C: 第 7 天明视野; D: 第 7 天荧光视野

图 5 重组慢病毒 GV287-SCL 滴度 ( × 100)

用荧光法检测并计算病毒滴度,算出病毒滴度为  $5 \times 10^8$  TU/m。见图 5。

### 2.5 豚鼠 ICC

细胞接种 24 h 后,可见一些梭形细胞,其两侧有显著外凸分支,细胞核较大,细胞质中存在一些黑色糖原粒子,其外型规则,且大部分贴壁生长。上述细胞继续培养 72 h 后,ICC 特异性标记物 c-kit 抗体做免疫荧光鉴定试验,激光共聚焦显微镜观察发现 ICC 特异性受体 c-kit 受体表达成功,证实培养的细胞为 ICC。见图 6~8。

### 2.6 重组慢病毒转染 ICC 后 GFP 的表达

含人 SCL 基因重组慢病毒载体转染 ICC 后 48 h,激光共聚焦显微镜观察可见强绿色荧光。经计算,MOI 值为 0.5、1.0、5.0、10.0、50.0 和 100.0 时,转染效率分别为 (  $35.42 \pm 0.12$  ) %、(  $58.04 \pm 2.28$  ) %、(  $74.47 \pm 3.22$  ) %、(  $85.62 \pm 0.33$  ) %、(  $90.39 \pm 0.67$  ) % 和 (  $90.77 \pm 0.40$  ) %。MOI 值  $\geq 10$  时,转染效率  $>85\%$ ,与 MOI 值  $<10$  时的转染效率比较,差异有统计学意义 (  $P=0.000$  )。观察各组细胞生长状态,当 MOI 值  $\leq 10$  时,细胞生长状态较好,无细胞死亡,当 MOI 值  $\geq 50$

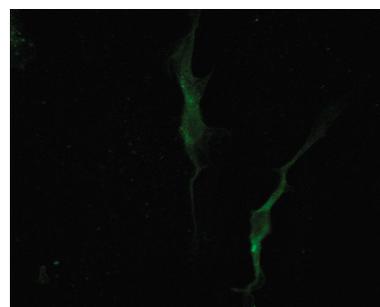


图 7 酪氨酸蛋白激酶 c-kit 受体免疫荧光鉴定豚鼠 ICC 细胞 ( × 200)

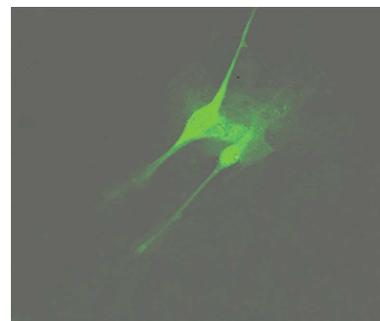
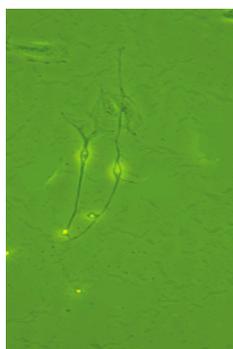


图 8 含人 SCL 基因重组慢病毒载体转染 ICC 48 h 后,激光共聚焦显微镜下的豚鼠 ICC 细胞 ( × 200)



细胞接种后第 2 天,倒置显微镜下可见梭形胞体,细胞两极有两个突起的细胞贴壁

图 6 培养的豚鼠 ICC 细胞 ( × 200)

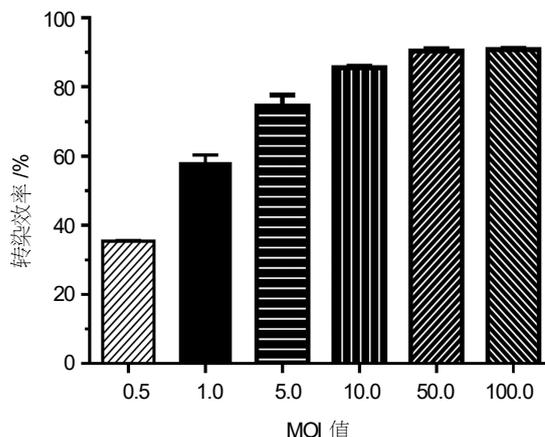
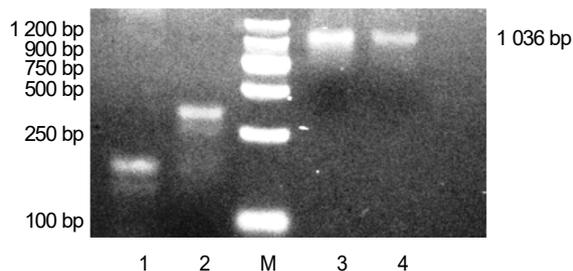


图 9 不同 MOI 下转染效率比较

时,虽然转染效率较高,但可见部分细胞死亡,细胞活性降低。结合各 MOI 值的转染效率及细胞活性,可确定最佳 MOI 值为 10.0。见图 9。

### 2.7 重组慢病毒转染 ICC 后 SCL mRNA 的表达

RT-PCR 结果表明,实验组中扩增产物长度与目的片段长度 (1 036 bp) 一致,但是空白组和空载体组都没有基因表达,表明构建 SCL 基因成功导入 ICC。见图 10。



M: Marker; 1: 阴性对照组; 2: 阳性对照组 (GAPDH); 3, 4: 实验组

图 10 SCL mRNA 的表达

## 3 讨论

近年研究发现,膀胱 ICC 可能引起膀胱逼尿肌出现一系列自发性收缩,该收缩现象完全受到 ICC 的调节,认为膀胱真正的起搏细胞为 ICC<sup>[10-11]</sup>。而在糖尿病病变膀胱中,ICC 的数量和分布异常,导致膀胱功能受损,进而促进 DCP 形成。ICC 表面存在特异性酪氨酸激酶受体 *c-kit* 及其配体 SCF,两者结合后激活 SCF/*c-kit* 信号通道,并维持 ICC 的表型及生理功能。*c-kit* 基因转录调控区存在 SCL 结合位点,SCL 主要是通过作用于 *c-kit* 基因启动子,调节 *c-kit* 表达来发挥其“生存基因”的功能,其对 SCF 依赖型细胞和 CD34<sup>+</sup> 细胞的生存具有重要的调控作用,可强烈上调造血细胞、多种干细胞,以及其他多种 CD34<sup>+</sup> 细胞表达 *c-kit*。CD34<sup>+</sup> 的 TL-1 细胞转染反义 SCLcDNA 后 *c-kit* 表达明显降低,并对 SCF 失去反应性,而 SCL 过表达则可使 *c-kit* 表达升高,并对 SCF 反应性恢复正常<sup>[12]</sup>。可见 SCL 在 *c-kit* 表达调控中发挥重要作用,通过过表达 SCL 基因上调 *c-kit* 表达来逆转 DCP 膀胱中 ICC 形态和功能损害具有可靠的理论基础。

基因治疗是在 DNA 或 RNA 水平上,人为地将某些外源性的基因导入相应的靶细胞,从而获得表达继而产生特定的生物学效应,以达到治疗的目的。通过导入外源性 SCL 基因可以实现对 ICC 细胞 *c-kit* 表达的上调,促进 ICC 表型恢复,具有抑制和逆转

ICC 损害、治疗糖尿病膀胱的可能。本实验前期研究以腺病毒载体系统构建人 SCL 基因重组腺病毒载体,将 SCL 基因转染入体外高糖环境下培养的 ICC,成功地上调 *c-kit* 基因和蛋白表达,显著地改善 ICC 的形态,减少功能损害<sup>[13]</sup>。

目前为止,以 *c-kit* 为作用靶点,在机体水平探索逆转高糖环境导致的 ICC 损害,重塑 ICC 形态和功能,治疗在体 DCP 逼尿肌功能异常的相关研究尚属空白。SCL 基因转染能否重塑 DCP 中 ICC 的表型,逆转其形态、功能损害,并改善在体膀胱的储、排尿功能,将为临床治疗 DCP 提供可靠的依据。随着基因治疗的不断发展,慢病毒属于一个常规介质,可以有效且针对性地对分裂或非分裂细胞实现感染,成功的把外源基因导入寄主细胞的细胞核上,可以体现出周期长、特性稳固、表达显著等特点,能够用来开展体内外实验<sup>[14-15]</sup>。本研究采用 3 质粒包装系统构建含人 SCL 基因的慢病毒载体,该操作方法相对简单,产物纯化度,重组率都相对较高<sup>[16]</sup>。本实验采用 GFP 作为标记蛋白,为实验提供特异稳定、高效的标记。PCR 反应克隆定向正确,基因全长测序完全正确,说明 SCL 已定向克隆至慢病毒载体质粒中。包装生产的病毒经荧光法滴度测定,滴度达到  $5 \times 10^8$  TU/mL,符合实验要求。

研究发现,慢病毒转染效果与 MOI 值密切相关。慢病毒载体具有一定的细胞毒性,过高的 MOI 值可导致部分细胞死亡<sup>[17]</sup>,因此适当的 MOI 值很重要。本实验通过检测不同 MOI 值慢病毒转染后 ICC 的生长状态及 GFP 表达情况,MOI 值为 10 时,GFP 表达达高峰,转染效果最佳,是最佳 MOI 值。继续提高 MOI 值并不能有效增加转染效率,过高 MOI 值反而导致部分细胞死亡,引起转染效率降低。感染 2 d 即可见绿色荧光表达,说明目的基因已整合至 ICC 基因组中,荧光表达在第 3 天时达高峰,第 5 天时开始减弱,体现慢病毒载体系统具有转染效率高、目的基因表达时间长的优点。RT-PCR 反应表明,SCL 基因已成功转染至 ICC 中,并随细胞基因组的分裂而分裂。慢病毒转染细胞的转染率 >85%,验证慢病毒载体的高转染效率,也反映出 ICC 易被转染的特点。通过 RT-PCR 反应,发现 SCL 基因在 ICC 细胞内有表达。笔者推测,采取原代培养 ICC,由于其细胞生命周期约为 7 d,根据其生长、衰老规律,在提取原代细胞培养后第 2 天进行转染,第 4 天进行观察并提取细胞总 RNA,可以观察到较高的转染效率,并检测到 SCL

的表达。

综上所述,本实验成功构建含人 *SCL* 基因慢病毒载体,并成功转染体外培养的 ICC,获得较高转染效率,并能介导 *SCL* 基因在 ICC 中的表达,为继续研究该基因体内转染实验提供可靠的实验工具,更重要的是其有望用于 DCP 的基因治疗。

#### 参 考 文 献:

- [1] XU Y, WANG L, HE J, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults[J]. *JAMA*, 2013, 310(9): 948-959.
- [2] LIU G, DANESHGARI F. Diabetic bladder dysfunction[J]. *Chin Med J*, 2014, 127(7): 1357-1364.
- [3] OBERBACH A, JEHMLICH N, SCHLICHTING N, et al. Molecular fingerprint of high fat diet induced urinary bladder metabolic dysfunction in a rat model[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6), DOI: 10.1371/journal.pone.0066636.
- [4] LI Y, SUN Y, ZHANG Z, et al. Cannabinoid receptors 1 and 2 are associated with bladder dysfunction in an experimental diabetic rat model[J]. *BJU Int*, 2013, 112(2): E140-E150.
- [5] LEIRIA L O, MÓNICA F Z, CARVALHO F D, et al. Functional, morphological and molecular characterization of bladder dysfunction in streptozotocin-induced diabetic mice: evidence of a role for L-type voltage-operated  $Ca^{2+}$  channels[J]. *Br J Pharmacol*, 2011, 163(6): 1276-1288.
- [6] BRIGGS BOEDTKJER D, RUMESSEN J, BAANDRUP U, et al. Identification of interstitial Cajal-like cells in the human thoracic duct[J]. *Cells Tissues Organs*, 2013, 197(2): 145-148.
- [7] WANG J P, DING G F, WANG Q Z. Interstitial cells of Cajal mediate excitatory sympathetic neurotransmission in guinea pig prostate[J]. *Cell Tissue Res*, 2013, 352(3): 479-486.
- [8] 徐礼臻,王勤章,韩涛.高糖环境对豚鼠膀胱 Cajal 样间质细胞内向电流的影响[J].*山东医药*, 2011, 51(34): 25-26.
- [9] KART Y, KARAKUS O Z, ATEŞ O, et al. Altered expression of interstitial cells of Cajal in primary obstructive megaureter[J]. *J Pediatr Urol*, 2013, 9(6 Pt B): 1028-1031.
- [10] 尹焯,杨金瑞.膀胱间质细胞与膀胱病理生理[J].*中南大学学报(医学版)*, 2014, 39(6): 644-648.
- [11] 张永革,何晓伟,张伟,等.逼尿肌反射亢进大鼠膀胱 ICC 细胞兴奋性变化及意义[J].*临床泌尿外科杂志*, 2015, 25(2): 168-171.
- [12] LI F, ZHANG L, LI C, et al. Adenovirus-mediated stem cell leukemia gene transfer induces rescue of interstitial cells of Cajal in ICC-loss mice[J]. *Int J Colorectal Dis*, 2010, 25(5): 557-566.
- [13] 周建民,丁国富,王勤章,等.应用 AdMax 载体系统构建 *SCL* 基因重组腺病毒表达载体[J].*中国现代医学杂志*, 2011, 21(17): 1949-1952.
- [14] KUBO S, KATAOKA M, TATENNO C, et al. In vivo stable transduction of humanized liver tissue in chimeric mice via high-capacity adenovirus-lentivirus hybrid vector[J]. *Hum Gene Ther*, 2010, 21(1): 40-50.
- [15] RUSU M C, POP F, HOSTIUC S, et al. Extrahepatic and intrahepatic human portal interstitial Cajal cells[J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2011, 294(8): 1382-1392.
- [16] KUBO S, KATAOKA M, TATENNO C, et al. In vivo stable transduction of humanized liver tissue in chimeric mice via high-capacity adenovirus-lentivirus hybrid vector[J]. *Hum Gene Ther*, 2010, 21(1): 40-50.
- [17] WANG X, MANI P, SARKAR D P, et al. Ex vivo gene transfer cytes[J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 481: 117-140.

(童颖丹 编辑)