

网络出版时间: 2017-3-21 13:44 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170321.1344.030.html>

c-met 慢病毒载体的构建及稳定转染骨髓间充质干细胞

王 坤¹, 朱甜甜¹, 李毓雯², 李 军³, 朱传龙³

摘要 构建肝细胞生长因子受体(c-met)慢病毒载体,并稳定转染骨髓间充质干细胞(BMSCs)。将c-met连接到慢病毒载体GV358上,重组获得慢病毒载体GV358-c-met。再将该重组体与病毒辅助质粒共转染293T细胞,包装生产慢病毒并测定其滴度为 2×10^8 TU/ml。将此慢病毒转染BMSCs,经嘌呤霉素筛药后,荧光显微镜下检测荧光阳性率达100%,且Western blot证实该细胞株表达c-met蛋白。成功构建了c-met慢病毒载体,并建立了稳定表达c-met的BMSCs。

关键词 骨髓间充质干细胞; c-met; 慢病毒载体

中图分类号 R 575.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)04-0597-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.04.030

肝细胞生长因子受体(cellular-mesenchymal to epithelial transition factor, c-met)基因是由 α 链和 β 链组成的异源二聚体,其编码的蛋白质是跨膜酪氨酸激酶受体(receptor tyrosine kinases, RTKs)超家族成员之一,具有自主磷酸化的活性^[1]。肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)为c-met的配体,其与受体c-met特异结合后,可诱导c-met构象发生改变,进而激活细胞内蛋白激酶结构域中的酪氨酸激酶(phosphotyrosine kinase, PTK)发生磷酸化,从而激活下游信号转导通路而发挥效应^[2]。在肝脏,HGF与c-met受体结合具有增加肝细胞再生和抑制肝细胞凋亡的功能。慢病毒表达载体具有高转染效率,目的基因可整合到宿主细胞基因组中,且长期表达。故该研究通过成功构建c-met基因慢病毒载体,以建立稳定表达c-met的骨髓间充质干细胞

(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSCs),为下一步研究该细胞株治疗肝衰竭的疗效及是否更好地归巢于肝脏及向肝细胞分化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料 4周龄SPF级SD雄性大鼠(南京医科大学医药实验动物中心);胎牛血清(美国Corning公司);DMEM低糖培养基(美国HyClone公司);大鼠淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品科技有限责任公司);慢病毒载体GV358、病毒包装辅助质粒(Helper1.0、Helper2.0)(上海吉凯公司);1 000 bp DNA Ladder Marker(加拿大Fermentas公司);250 bp DNA Ladder Marker(上海捷瑞公司);Plasmid抽提Kit(北京Promega公司);嘌呤霉素(美国Amresco公司);PCR仪(美国Applied Biosystems公司);positive clone测序(上海美季生物技术公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠BMSCs的提取与培养 选取4周龄SPF级SD雄性大鼠,80~100 g,依据施启鹏等^[3]提取细胞的方法,提取并培养BMSCs。依照Li et al^[4]的方法,将细胞培养到第3代,采用流式细胞仪技术进行鉴定。细胞培养到第5代用于转染。

1.2.2 大鼠c-met基因过表达慢病毒载体构建与鉴定 根据c-met基因序列,设计合成引物(P1: 5'-GAGGATCCCCGGTACCGGTCGCCACCATGAAGGC TCCCACCGGCTGGCACCTGG-3'; P2: 5'-TCCTTG-TAGTC CATACTGTGTTTCGCTTCGCCGTCATGTTGT CTTG-3') PCR扩增获取目的基因。利用限制性内切酶Age I酶切载体GV358(该载体元件顺序: Ubi-MCS-3FLAG-SV40-EGFP-IRES-puromycin),将获得的线性化载体和目的基因进行重组反应。重组产物直接进行转化,挑取转化后平板上的单克隆进行PCR鉴定及测序分析。鉴定体系相应电泳泳道安排如下:第1孔是加入双蒸水(ddH₂O)的空白对照,用于检测鉴定体系是否存在污染;第2孔是未插入目的基因的空载体GV358的阴性对照,用于证明扩

2016-12-26 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号:81271713); 吉利德肝病科学研究项目-亚洲

作者单位: ¹ 安徽医科大学附属省立医院感染科,合肥 230001

南京医科大学第一附属医院² 儿科、³ 感染科,南京 210029

作者简介: 王 坤,男,硕士研究生;

朱传龙,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: zhuel@njmu.edu.cn

增过程中无假阳性现象;第3孔是 GAPDH 基因的阳性对照,用于验证鉴定工作体系是否正常;第4孔为 Marker,第5~12孔均为挑取的 c-met 单克隆。

1.2.3 c-met 基因重组慢病毒包装、浓缩与纯化 将重组慢病毒质粒 GV358-c-met 与病毒包装辅助质粒(Helper1.0、Helper2.0)这3种质粒共转染 293T 细胞。根据转染后细胞状态,收集转染后 48 h(转染时即可为 0 h 计起)的 293T 细胞上清液离心 10 min,除去上清液中的细胞碎片;再将上清液进行过滤,滤液离心 2 h,收集离心管中底部沉淀,并加入病毒保存液冲悬,高速离心后,取上清液并分装。上述构建过程在 BSL-2 级别实验室完成,操作时在生物安全柜中进行,且注意防护。

1.2.4 c-met 重组慢病毒滴度测定 采用荧光法测定病毒滴度,测定前 1 天,使用 293T 细胞铺板;准备 7 个无菌的 EP 管,每管中加入 90 μl 无血清培养基,取待测定的病毒原液 10 μl 加入到第 1 管中,混匀后,从该管取 10 μl 加入到第 2 管中,继续相同的操作直到最后 1 个管;选取所需的细胞孔,加入稀释好的病毒溶液。4 d 后,观察荧光表达情况,荧光细胞数随稀释倍数的增加而减少,病毒滴度 = 荧光细胞数/病毒原液量,计算病毒滴度。

1.2.5 确定嘌呤霉素筛选浓度 取对数生长期的 BMSCs 接种于 6 孔板中,待各孔细胞长满后,梯度加入含嘌呤霉素的完全培养基 2 ml,各孔嘌呤霉素浓度分别为 0、6、7、8、9、10 μg/ml。每天对各孔细胞生长情况进行观察。4 d 可以杀死相应孔中全部细胞的嘌呤霉素最低浓度即为最终药物筛选浓度。

1.2.6 重组慢病毒载体转染 BMSCs 及转染后嘌呤霉素筛选 转染前 1 天,将细胞接种于 96 孔板中。当细胞融合度达到 30% 左右时,以感染复数(MOI = 100)进行转染。待感染后 12 h 换回常规培养基。转染 48 h 后,即可用荧光显微镜观察转染情况。转染 72 h 后,向各细胞培养基中加入嘌呤霉素,药物筛选周期为 1 周,筛选后的药物浓度维持在 1/5 筛选浓度,并在荧光显微镜下观察效果。

1.2.7 Western blot 法检测稳定转染细胞株 c-met 蛋白表达 采用上述相同方法构建 GFP 慢病毒载体,并转染 BMSCs,形成稳定表达 GFP 的 BMSCs。分别取相同细胞数的稳定转染 c-met 的 BMSCs 和稳定转染 GFP 的 BMSCs 的两组细胞行 Western blot 法检测。PBS 洗涤 2 次,再加入适量 1 × Lysis buffer

裂解细胞,得到的细胞裂解样品转移入 EP 管中,经离心及沸水中水浴后 -80 °C 保存备用。配 10% SDS-PAGE 凝胶,将样品进行电泳、转膜及用封闭液室温封闭,一抗孵育 2 h 后洗膜 3 次,二抗孵育 2 h 后洗膜 3 次,显色、曝光,成像分析。

2 结果

2.1 大鼠 BMSCs 的提取培养与鉴定 提取的细胞 1 d 后即可贴壁,第 3 天开始出现形变,第 7 天形成 MSC 簇,并逐渐向周边增殖扩大。生长成形的 BMSCs 形态均一,呈梭形、纺锤形,细胞排列紧密,呈旋涡状或扫帚状排列(图 1)。流式细胞仪检测第 3 代 BMSCs 表面标志物,结果显示其表面 CD29、CD90 表达均在 90% 以上,CD34、CD45 表达均低于 2%。从细胞提取到培养时的形态改变过程和流式检测结果显示该细胞为 BMSCs。

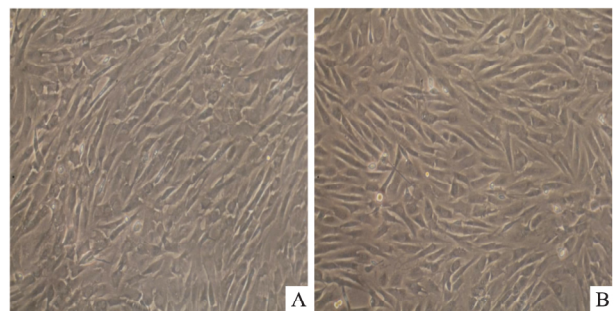


图 1 大鼠 BMSCs ×100
A: 原代细胞; B: 第 5 代细胞

2.2 大鼠 c-met 基因过表达慢病毒载体构建与鉴定 c-met 的获取与鉴定 PCR 扩增目的基因:产物经琼脂糖凝胶电泳显示扩增片段为 4 190 bp,与目的基因大小相符(图 2)。慢病毒重组载体 GV358-c-

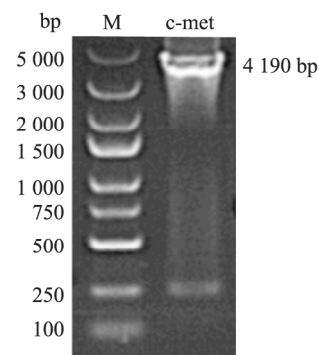


图 2 c-met 基因电泳图
M: Marker

met 的构建与鉴定: 构建的慢病毒重组载体 GV358-c-met 转化后行阳性克隆 PCR 鉴定(PCR 产物大小为 1 181 bp)及测序,结果一致,慢病毒重组载体构建成功(图 3)。

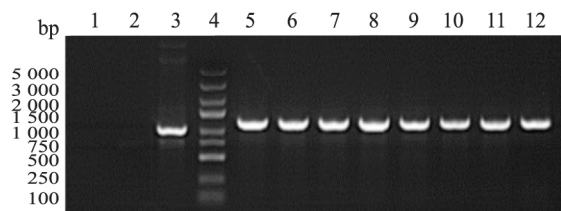


图 3 重组载体阳性克隆 PCR 鉴定

1: 空白对照(ddH₂O); 2: 阴性对照(空载自连对照组); 3: 阳性对照(GAPDH); 4: Marker; 5 ~ 12: c-met 挑取的 1 ~ 8 号单克隆

2.3 c-met 慢病毒转染 293T 细胞 转染后 72 h, 荧光显微镜下观察荧光阳性率可达 90% 以上,病毒滴度为 2×10^8 TU/ml(图 4)。

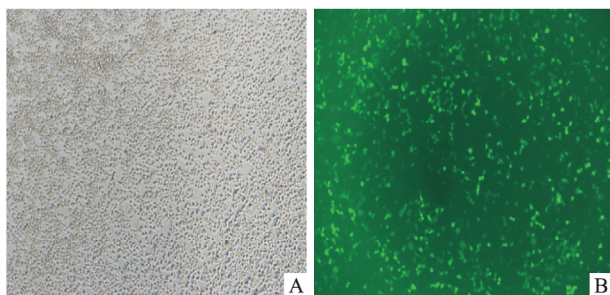


图 4 转染 72 h 后荧光显微镜下观察 GFP 荧光结果 $\times 100$

A: 白光视野; B: 荧光视野

2.4 显微镜下观察确定嘌呤霉素筛选药物浓度 BMSCs 经不同浓度嘌呤霉素筛选 4 d 后,药物浓度为 $9 \mu\text{g/ml}$ 时,即可杀死全部细胞,故最终确定嘌呤霉素筛选浓度为 $9 \mu\text{g/ml}$ (图 5)。

2.5 c-met 重组慢病毒载体转染 BMSCs 及转染后嘌呤霉素筛选 转染 48 h 后,荧光显微镜下观察可见荧光,GFP 阳性细胞占总细胞 10%(图 6)。转染 72 h 后,加入嘌呤霉素筛选,筛选 1 周后荧光显微镜下观察荧光,荧光阳性率达 100%(图 7),即形成稳定表达 c-met 基因的大鼠 BMSCs。

2.6 稳转细胞株中 c-met 蛋白的表达 Western blot 结果显示,稳定转染 c-met 基因的 BMSCs 组表达 c-met 蛋白,且表达量明显高于稳定转染 GFP 的 BMSCs 组(图 8)。

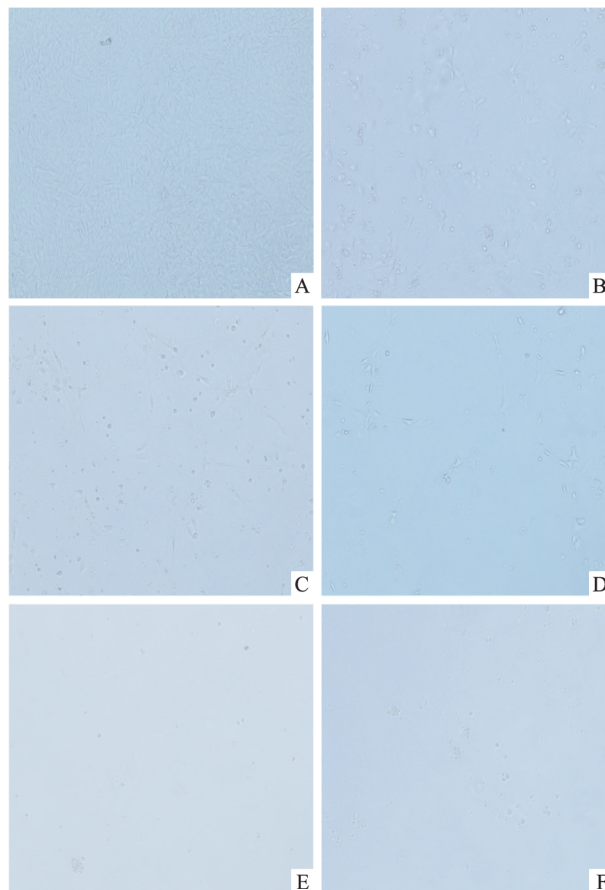


图 5 不同浓度嘌呤霉素筛选 4 d 后大鼠 BMSCs 结果 $\times 100$

A: $0 \mu\text{g/ml}$; B: $6 \mu\text{g/ml}$; C: $7 \mu\text{g/ml}$; D: $8 \mu\text{g/ml}$; E: $9 \mu\text{g/ml}$; F: $10 \mu\text{g/ml}$

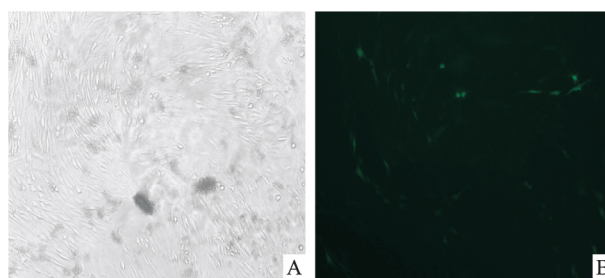


图 6 细胞转染 48 h 后荧光显微镜观察 GFP 荧光 $\times 100$

A: 白光视野; B: 荧光视野

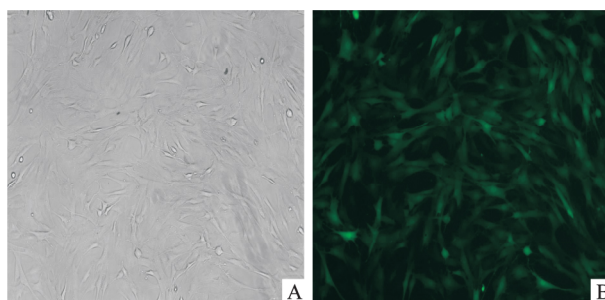


图 7 细胞筛药 1 周后荧光显微镜观察 GFP 荧光 $\times 100$

A: 白光视野; B: 荧光视野

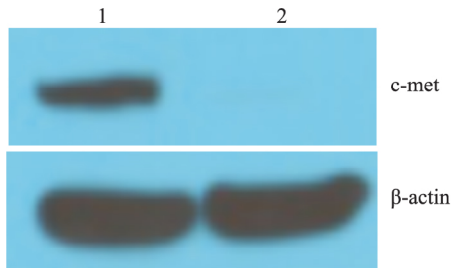


图8 Western blot 法检测 c-met 蛋白表达
1: 稳定转染 c-met 的 BMSCs; 2: 稳定转染 GFP 的 BMSCs

3 讨论

慢病毒载体是以人类免疫缺陷型病毒为基础发展起来的载体,其对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力,感染效率高,且基因可长期表达、安全性高,在基因治疗中应用前景广阔。因此,本实验选取慢病毒载体系统。构建 c-met 慢病毒载体,首先将 c-met 连接到慢病毒表达质粒 GV358 上,接着将该重组质粒与辅助质粒共转染 293T 细胞进行病毒包装,以获得高滴度慢病毒转染 BMSCs。该慢病毒载体选取 GV358 载体,该载体含 2 个启动子 SV40 和 IRES,且紧接 2 个启动子后分别是 EGFP 和 puromycin,此种改进使该慢病毒载体转染入 BMSCs 后,EGFP 和 puromycin 能更高地表达,有利于后续转染效率的观察和嘌呤霉素药物筛选细胞。肝衰竭是由多种原因引起的肝细胞亚大片或大片坏死,致使其功能严重受损一种临床症候群^[5]。该病病情凶险、进展迅速、病死率高,是严重威胁人类健康的疾病之一。在我国,乙型肝炎病毒感染是引起肝衰竭的主要原因^[6]。目前,肝移植是该病最有效的治疗方法,但因各方面条件的缺乏而受到限制。因此,寻找一种新的方式治疗肝衰竭至关重要。BMSCs 是一种能自我复制和具有多向分化潜能的非造血干细胞,且易于分离,增殖能力强。在适宜的信号刺激下可以向不同组织类型细胞分化,易于进行外源性基因的转染和其蛋白的表达^[7]。Cai et al^[8] 研究发现,移植 BMSCs 可显著改善肝衰竭患者的肝功能。但目前大部分研究^[9] 结果提示经移植 BMSCs 治疗的肝衰竭患者肝功能只在短期内均可以获得明显改善,但其远期生存率并无明显改善。造成的原因可能是 BMSCs 回输后归巢于肝脏细胞数过少,以及其归巢的细胞分化再生能力差。研究^[10] 显示,HGF/c-met 受体通路与 BMSCs 归巢密切相关,且影响 BMSCs 向类肝细胞分化及调节肝细胞的再生功能。朱传龙等^[11] 研究发现,在制造的大鼠肝衰竭模型

中,大鼠血清 HGF 水平较正常有所升高,但 c-met 蛋白的表达水平却明显降低。这表明肝衰竭患者肝细胞再生障碍与肝细胞 c-met 基因表达水平下降、HGF/c-met 通路受损有关。因此,c-met 基因可作为 BMSCs 治疗肝衰竭的一种新的目标基因,为以后肝衰竭的治疗提供新的更有效的治疗方式^[10]。本实验以 BMSCs 作为 c-met 基因转染的载体,以建立稳定表达 c-met 基因的 BMSCs,为下一步研究该细胞株治疗肝衰竭时的疗效及是否更好地归巢于肝脏及向肝细胞分化,以及以后是否可作为治疗肝衰竭患者的一种新的、更有效的治疗方案奠定了基础。

参考文献

- [1] Gherardi E, Birchmeier W, Birchmeier C, et al. Targeting MET in cancer: rationale and progress [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(2): 89-103.
- [2] Lim Y C, Han J H, Kang H J, et al. Overexpression of c-Met promotes invasion and metastasis of small oral tongue carcinoma [J]. *Oral Oncol*, 2012, 48(11): 1114-9.
- [3] 施启鹏, 郭圆圆, 周 晗, 等. 间充质干细胞移植后抑制肝星状细胞活化减轻肝纤维化 [J]. *南京医科大学学报*, 2015, 35(7): 981-7.
- [4] Li D, Fan J, He X, et al. Therapeutic effect comparison of hepatocyte-like cells and bone marrow mesenchymal stem cells in acute liver failure of rats [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(1): 11-24.
- [5] 崇雨田, 黄明星. 肝衰竭内科治疗思路 [J]. *临床内科杂志*, 2014, 31(8): 516-8.
- [6] 中华医学会感染病学分会肝衰竭和人工肝学组, 中华医学会肝病学会重型肝病与人工肝学组. 肝衰竭诊治指南 [J]. *实用肝脏病杂志*, 2013, 16(3): 210-3.
- [7] Miao Z C, Gao H. Effect of transplantation of BMP-2-induced bone marrow mesenchymal stem cells on myocardial infarction of rats after reperfusion [J]. *Med J Chin PLA*, 2014, 39(8): 601-8.
- [8] Cai Y, Zou Z, Liu L, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells inhibits hepatocyte apoptosis after acute liver injury [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(1): 107-16.
- [9] Peng L, Xie D Y, Lin B L, et al. Autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in liver failure patients caused by hepatitis B: Short-term and long-term outcomes [J]. *Hepatology*, 2011, 54(3): 820-8.
- [10] Zhu C, Li Y, Li W, et al. Gene transfer of c-met confers protection against D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced acute liver failure [J]. *Dig Dis Sci*, 2012, 57(4): 925-34.
- [11] 朱传龙, 李毓雯, 李文庭, 等. HGF 及其受体 c-met 在肝衰竭与部分肝切除模型中表达差异性研究 [J]. *实用肝脏病杂志*, 2011, 14(6): 401-3.

网络出版时间: 2017-3-21 13:44 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170321.1344.031.html>

IL-23 和 IL-17 在 OSAHS 患者外周血中的水平变化及意义

周 钦, 凌月福

摘要 探讨白介素(IL)-23 和 IL-17 在睡眠呼吸暂停低通气综合征(OSAHS)患者外周血中的水平变化及临床意义。通过 ELISA 法检测 OSAHS 患者与正常健康者血清及外周血单个核细胞(PBMCs)上清液中 IL-23、IL-17 的水平,检测经韩氏悬雍垂腭咽成形术(H-UPPP)治疗前后 OSAHS 患者血清中 IL-23、IL-17 含量的变化。OSAHS 患者血清及培养的 PBMCs 上清液中 IL-23 和 IL-17 的水平均高于对照组($P < 0.05$)。血清 IL-23 和 IL-17 水平随 OSAHS 严重程度增加而增高,血清和 PBMCs 上清液中 IL-23 与 IL-17 水平均呈正相关性($r_s = 0.644, P < 0.01; r_s = 0.251, P < 0.05$)。经 H-UPPP 术 2 个月后,患者血清 IL-23、IL-17 水平和呼吸紊乱指数均较治疗前有明显降低($P < 0.05$)。患者睡眠质量和夜间低氧有明显改善,最低血氧饱和度较治疗前显著升高($P < 0.05$)。IL-23 和 IL-17 可能在 OSAHS 的发病及预后中发挥着重要作用。

关键词 睡眠呼吸暂停低通气综合征; IL-23; IL-17

中图分类号 R 56

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)04-0601-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.04.031

阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征(obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome, OSAHS)是指睡眠中出现的上气道反复塌陷阻塞,伴睡眠紊乱、呼吸暂停、血氧降低、高碳酸血症、白天嗜睡、打鼾等症状,可导致心血管疾病^[1]等并发症,严重危害人们的健康。目前,OSAHS 的发病机制尚不十分清楚,既往研究^[2]显示相关炎症因子如 C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)、白介素(interleukin, IL)-6 等在 OSAHS 患者血清中均呈高表达。而近年来对 IL-23、IL-17 的系统性研究也越发深刻,但关于其在 OSAHS 疾病方面的研究仍少有涉足。该研究拟通过检测 OSAHS 患者血清中及外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)上清液中 IL-23 与 IL-17 的水平变化,以及经韩氏悬雍垂腭咽成形术(Han-uvulopalatopharyngoplasty, H-UPPP)治疗前后血清中 IL-23、IL-17 含量的变化,以期探讨 IL-23 和 IL-17 在 OSAHS 病理生理过程及临床中的

2016-12-12 接收

基金项目: 广西壮族自治区卫生厅科技研究计划课题(编号: Z2007221)

作者单位: 桂林医学院附属医院耳鼻喉头颈外科 桂林 541001

作者简介: 周 钦,男,硕士研究生;

凌月福,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: Lingyuefu@yahoo.com.cn

Construction of c-met lentiviral vector and stable transfected bone marrow mesenchymal stem cells

Wang Kun¹, Zhu Tiantian¹, Li Yuwen², et al

(¹Dept of Infectious Disease, Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001;

²Dept of Pediatrics, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029)

Abstract To construct cellular-mesenchymal to epithelial transition factor(c-met) lentiviral vector, then transfect it into bone marrow mesenchymal stem cells(BMSCs) stably. c-met was connected to the lentiviral vector GV358, and the lentiviral vector GV358-c-met was restructured. Then the recombinant and lentiviral helper plasmid were co-transfected into 293T cells to generate the target lentivirus which the titer was 2×10^8 TU/ml. After transfecting this lentiviral vector into BMSCs and screening by puromycin, the positive rate of fluorescence was 100% by fluorescence microscopy, and the expression of c-met protein was confirmed by Western blot. Therefore, we successfully constructed c-met lentiviral vector, and established the BMSCs with the characteristics of stable expression c-met protein.

Key words bone marrow mesenchymal stem cell; c-met; lentiviral vector