

载脂蛋白-J 质粒转染大鼠 BMSCs 及其在靶细胞中的表达^{*}刘学良,彭建华,周 冲,徐 斌,秦兴虎,刘 亮[△]
(西南医科大学附属医院神经外科,四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 对比 pEGFP-N1-apoJ 质粒在不同 DNA 浓度条件下转染骨髓间充质干细胞的转染率,并测定载脂蛋白-J 的表达情况。**方法** 0.8、1.2、1.6、2.0 μg pEGFP-N1-apoJ 质粒分别在脂质体的介导下转染大鼠骨髓间充质干细胞,并在荧光显微镜下观察,确定 24、48、72 h 时转染率,筛选出能获得最高转染率的质粒的量。设置 pEGFP-N1-apoJ 质粒组、空 pEGFP-N1 质粒组、空白对照组,用蛋白免疫印迹法检测载脂蛋白-J 在 24、48、72 h 3 个时间点的表达情况。**结果** 4 个不同质粒浓度组转染率分别为:(16.7 $\pm$ 1.0)%、(19.7 $\pm$ 1.4)%、(30.1 $\pm$ 3.6)%、(21.7 $\pm$ 5.5)%,比较 4 个组间转染效率差异有统计学意义($P<0.05$),且 1.6 μg pEGFP-N1-apoJ 质粒组转率最高。通过蛋白免疫印迹法检测后,3 个目的蛋白灰度值与内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)灰度值相比较,蛋白质相对表达水平为:pEGFP-N1-apoJ 质粒组 1.91 $\pm$ 0.12,空 pEGFP-N1 质粒组 0.56 $\pm$ 0.11,空白对照组 0.57 $\pm$ 0.17,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 质粒 pEGFP-N1-apoJ 可在脂质体的介导下转染入大鼠骨髓间充质干细胞,携带载脂蛋白-J 基因的靶细胞可表达载脂蛋白-J。

[关键词] 载脂蛋白类;间质干细胞;载脂蛋白-J;重组质粒;骨髓间充质干细胞;转染;蛋白免疫印迹法**[中图分类号]** Q782**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)14-1942-03The expression of Apo-J plasmid of target cells in rat bone marrow mesenchymal stem after transfection^{*}Liu Xueliang, Peng Jianhua, Zhou Chong, Xu Bin, Qin Xinghu, Liu Liang[△]

(Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To compare the transfection efficiency of BMSCs transfected with pEGFP-N1-apoJ plasmid in different DNA concentration, and the expression of Apo-J was determined. **Methods** The pEGFP-N1-apoJ plasmid was transfected into BMSCs by Liposome which the quality respective is 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 μg respectively, and we observed by fluorescence microscope, determined the transfection efficiency at 24, 48, 72 h, and screened out the amount of plasmid that could get the highest transfection efficiency. Then we set pEGFP-N1-apoJ plasmid group, empty pEGFP-N1 plasmid group, blank control group. The expression of Apo-J at 3 time points was detected by Western blot. **Results** The transfection efficiency of 4 different plasmid concentration groups were: (16.7 $\pm$ 1.0)%, (19.7 $\pm$ 1.4)%, (30.1 $\pm$ 3.6)%, (21.7 $\pm$ 5.5)%. There was significant difference in transfection efficiency among 4 groups ($P<0.05$). And the transfection rate of the 1.6 μg pEGFP-N1-apoJ plasmid group was the highest. After the detection by Western blot, the relative expression level of protein was as follow: pEGFP-N1-apoJ plasmid group 1.91 $\pm$ 0.12, empty pEGFP-N1 plasmid group 0.56 $\pm$ 0.11, blank control group 0.57 $\pm$ 0.17, the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Plasmid pEGFP-N1-apoJ might be transfected into rat BMSCs by liposome. The target cells carrying the Apo-J gene can express Apo-J.

[Key words] apolipoproteins; mesenchymal stem cells; apolipoprotein-J; recombinant plasmid; BMSCs; transfection; Western blot

载脂蛋白 J(ApoJ)是一种新型糖蛋白,它是一种分子量为 70×10^3 的二聚体蛋白质,广泛分布于人体各种组织,以脑含量最多。相关研究显示 ApoJ 在多种神经系统疾病中均有高表达^[1]。ApoJ 功能广泛,在神经系统方面对神经元有保护作用,有利于神经元的可塑性等生理过程^[2]。细胞转染技术是采用某种方法和途径将外源分子如 DNA、RNA 等导入特定的细胞,并表达目的基因,产生特定功能的蛋白质分子。本实验在于不同量质粒 pEGFP-N1-apoJ 转染大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs),并检测 ApoJ 的表达情况,以获得高转染效率,筛选转基因细胞。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 大鼠 BMSCs 和质粒 大鼠 BMSCs,由泸州医学院附属医院医学实验中心赠送。含绿色荧光蛋白基因质粒 pEGFP-N1-apoJ 及空质粒 pEGFP-N1,由吉凯基因有限公司提供。

1.1.2 主要试剂 脂质体 LipofectaminTM 2000(碧云天) α -

MEM 培养基,胎牛血清(Gibson 公司);高效 RIPA 组织/细胞裂解液(solaria);一抗-兔抗鼠 ApoJ 抗体-Clustering Antibody (Proteintech);3-磷酸甘油醛脱氢酶(anti-GAPDH)(Proteintech);二抗-羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG)(Proteintech);十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)凝胶制备试剂盒(solaria);电泳蛋白彩色预染 Marker(thermo);电化学发光(ECL)发光液(Millipore)。

1.2 方法

1.2.1 细胞的复苏、传代及培养 细胞株从液氮中取出后迅速复苏,接种于 25 cm^2 培养瓶,采用全骨髓贴壁培养法培养^[3]。待骨髓间充质干细胞(BMSCs)生长至 80%~90%融合度时,按 1:2 进行传代培养。

1.2.2 脂质体介导不同质量的质粒 pEGFP-N1-apoJ 转染大鼠 BMSCs 细胞接种到 6 孔板融合达 90%左右时即可进行转染,转染前 1 d 换液。转染前用无血清培养基冲洗细胞 2 遍。准备好灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管,分别将 0.8、1.2、1.6、2.0

μg pEGFP-N1-apoJ 质粒用 α-MEM 培养基稀释至 200 μL(每管都标为①),混合均匀。方法同上,将 3.0 μL Lipofectamin™ 2000 用 α-MEM 培养基稀释至 200 μL(每管都标为②),室温条件下孵育 5 min。将①号管与②号管中培养基均匀混合,使总体积为 400 μL,混合物在室温条件下孵育 20 min。转染分为 4 组(按前文质粒浓度分别为 A1、A2、A3、A4 组),每组 6 孔,将含不同 pEGFP-N1-apoJ 质粒量的转染复合物分别加入到相对应的孔中转染(并在 6 孔板上做好标记);将转染处理过后的细胞置于 37 ℃,5%CO₂ 的培养箱中培养,培养 5~6 h 后更换无双抗含有血清的培养基培养。

1.2.3 测定转染效率 转染 24、48、72 h 后将细胞置于荧光显微镜下观察,观察细胞中绿色荧光蛋白表达,在 10 个细胞分别均匀分布的视野下用 100 倍镜观察,该孔细胞转染效率为 10 个视野转染阳性细胞数之和除以细胞总数之和的值。

1.2.4 脂质体介导质粒转染大鼠 BMSCs 转染分为 a 组、b 组和 c 组(每组 6 孔),a 组转染质粒 pEGFP-N1-apoJ(加入质粒的量与 1.2.2 实验中转染效率最高组相同);b 组为对照,转染空质粒 pEGFP-N1(所用空质粒的量与 a 组所用质粒的量相同);c 组为空白对照,加入等量的脂质体。余下步骤与 1.2.2 中均相同。分别在 24、48、72 h 时间点将各组细胞置于荧光显微镜下观察。

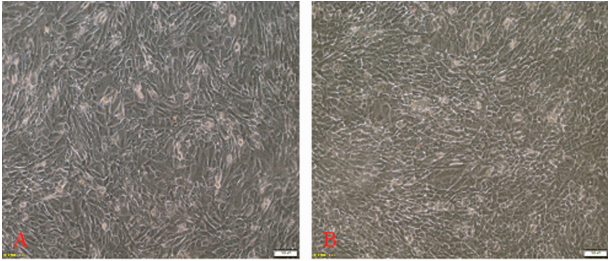
1.2.5 蛋白质的提取及蛋白免疫印迹法检测 ApoJ 的表达 分别在转染 24、48、72 h 3 个时间点,采用标准裂解法^[3]提取蛋白。然后,应用 Western blot 对 Apo-J 进行检测:检测蛋白浓度,制胶;上样分别加入 Marker,A 组、B 组和 C 组的蛋白提取物,行 SDS-PAGE 蛋白电泳;室温封闭 1 h;免抗鼠 ApoJ 抗体

一抗(1:1 000)4 ℃ 孵育过夜,羊抗兔 IgG 二抗(1:1 500)室温孵育 2 h,曝光,显影,拍照。内参为甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)。根据实验结果重复实验,计算机 Quantity-one 软件分析灰度值,以目的片段的灰度值与相应 GAPDH 灰度值的比作为两者蛋白质的相对水平。

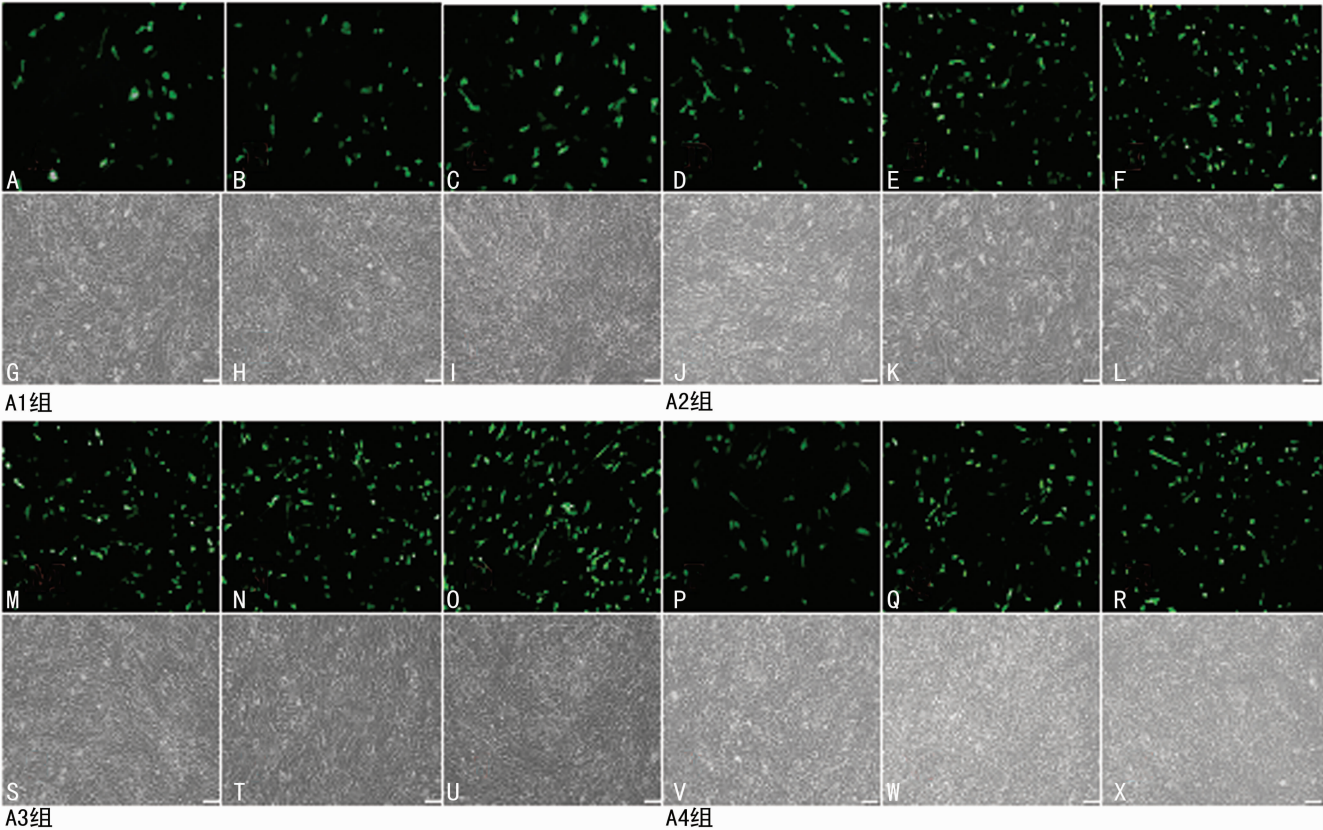
1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,组间比较采用完全随机设计资料的方差分析(One Way Anova),检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠 BMSCs 的形态学观察 将细胞置于光学显微镜下 100 倍观察,大鼠 BMSCs 贴壁生长,形态为多角形和扁平形。细胞复苏后培养 4~6 d 可达 90% 左右融合,形态变为长梭形。第 3~4 代后细胞形态挤压成束状,细胞胞质丰富,核大,核仁明显,细胞形态相对稳定,见图 1。



A:4~6 d;B:3~4 代。
图 1 大鼠 BMSCs(×50)



A~F、M~R:荧光显微镜观察转染的 BMSCs 细胞;G~L、S~X:可见光下观察转染的 BMSCs 细胞。A、G、D、J、M、S、P、V:转染 24 h 后的观察结果;B、H、E、K、N、T、Q、W:转染 48 h 后的观察结果;C、I、F、L、O、U、R、X:转染 72 h 后的观察结果。

图 2 绿色荧光蛋白在大鼠 BMSCs 中的表达(×100)

2.2 转染后绿色荧光蛋白的观察及转染效率的测定 在适宜 条件下培养转染细胞,并在 24、48、72 h 时间点将细胞置于荧

光显微镜 100 倍下观察各组荧光蛋白的表达情况,各组间表达绿色荧光蛋白的阳性细胞在数量上存在着差异(图 2)。3.0 L Lipofectamin™ 2000 脂质体分别与 0.8、1.2 和 1.6 μg pGFP-N1-apoJ 质粒混合作用转染后,表达绿色荧光蛋白的阳性细胞数逐渐增多,脂质体与 1.6 μg pEGFP-N1-apoJ 质粒转染后绿色荧光蛋白表达最多,分别在 3 个时间段获得最高的转染效率 27.8%、28.2%、34.3%。当参与转染的 pGFP-N1-apoJ 质粒量增加到 2.0 μg 时,表达阳性细胞的数没有提高,表现出降低的趋势(图 3)。不同质粒浓度组间的转染效率不全相同,分别为 A1 组[(16.7±1.0)%]、A2 组[(19.7±1.4)%]、A3 组[(30.1±3.6)%]、A4 组[(21.7±5.5)%],差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 最佳浓度重组质粒及空质粒转染大鼠 BMSCs 后观察
采用 3.0 μL 脂质体与 1.6 μg 的重组质粒及空质粒配制成复合物进行转染后分别在 24、48、72 h 后在荧光显微镜下观察各

组细胞荧光的表达情况,见图 4。

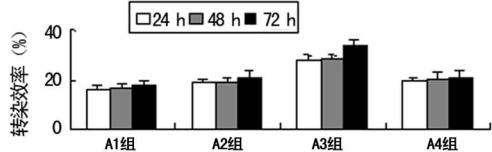
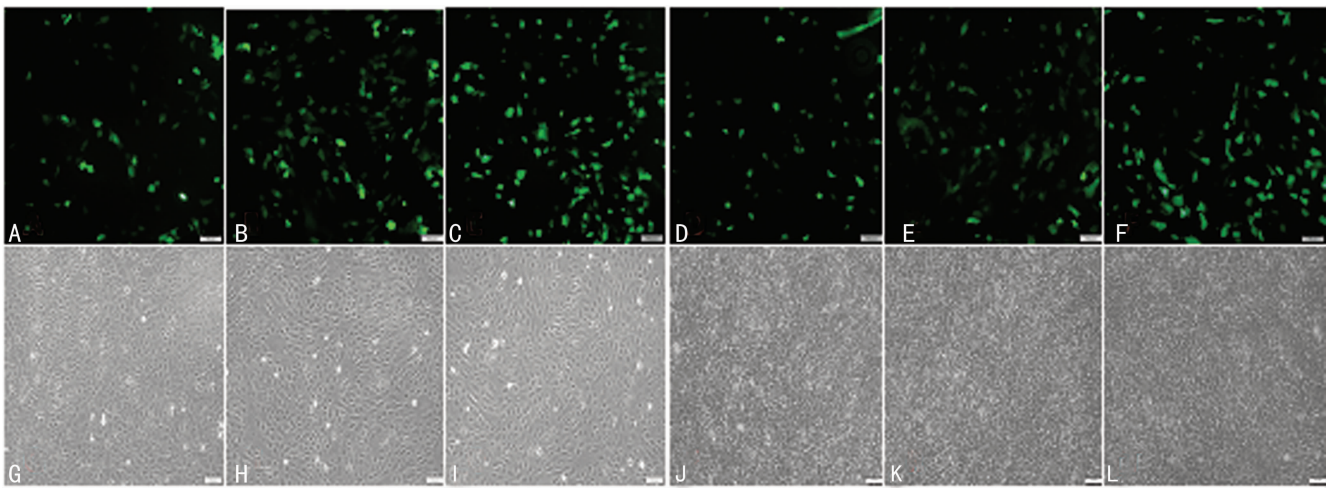


图 3 质粒转染大鼠 BMSCs 的转染效率

2.4 ApoJ 表达情况分析 Western blot 法检测到在 24、48、72 h 3 个时间点, a 组在相对分子质量 70×10^3 处可见大量 ApoJ 表达, b 组及 c 组见微量 ApoJ 表达, 差异有统计学意义($F=215.646, P<0.05$); 各组蛋白质相对表达水平分别为: a 组 1.91 ± 0.12 、b 组 0.56 ± 0.11 、c 组 0.57 ± 0.17 , 差异有统计学意义($P<0.05$), 见图 5~7。



A~F: 荧光显微镜观察转染的 BMSCs 细胞; G~L: 可见光下观察转染的 BMSCs 细胞; A、G、D、J: 转染 24 h 后的观察结果; B、H、E、K: 转染 48 h 后的观察结果; C、I、F、L: 转染 72 h 后的观察结果。

图 4 最佳浓度质粒及空质粒转染大鼠 BMSCs, 绿色荧光融合蛋白的表达 ($\times 100$)

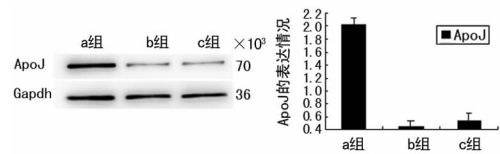


图 5 Western blot 检测转染 24 h 后 ApoJ 表达

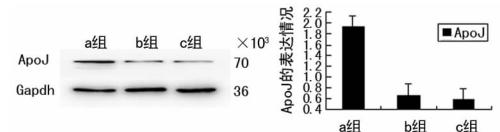


图 6 Western blot 检测转染 48 h 后 ApoJ 表达

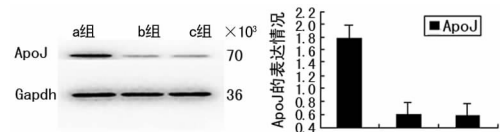


图 7 Western blot 检测转染 72 h 后 ApoJ 表达

3 讨 论

BMSCs 在骨髓组织中含最为丰富, 它作为干细胞具有多向分化的潜能^[4-5]。BMSCs 具有易获得、低免疫原性等特性, 在良好的培养条件下可以诱导分化为特定类型和有功能的神经元并且通过独立的调节机制完成向神经元分化^[6-9], 以及

容易被外源基因转染并能相对稳定表达目的蛋白, 所以它可以被作为一种良好介质应用于基因及细胞治疗等方面^[10-11]。脂质体水相内核是由磷脂双层构的^[12-13], 脂质体介导的转染具有以下优点^[14]。操作简单、安全性高, 能够感染分裂细胞也能感染非分裂细胞, 携带外源基因大小不受限制等特点。基于这些优势脂质体被选为基因转染的载体。

该实验证明携带相关基因的质粒能够在脂质体的介导下对大鼠 BMSCs 能进行转染。通过该实验可以发现影响脂质体转染因素主要有质粒的浓度、脂质体浓度、孵育时间等, 其中质粒浓度尤为关键。探索并优化转染条件后发现, 质粒浓度过低时, 转染效率低, 而浓度过高时, 转染效率反而降低。当质粒浓度低时, 脂质体不能充分有效的携带质粒进行转染, 故转染效率低; 当质粒浓度过高时, 容易增加细胞毒性导致细胞死亡, 转染效率也低^[15]。合适的质粒和脂质体比例下, 脂质体可高效的介导外源性质粒基因转染 BMSCs。与此同时本实验说明 BMSCs 成功地与携带 Apo-J 外源性基因的质粒结合后能有效的表达目的蛋白。为进一步探索携带脂蛋白-J 基因 BMSCs 的后续基因工程相关实验奠定了基础。

参考文献

[1] Elliott DA, Weickert CS, Garner B. Apolipoproteins in the brain: implications for neurological and psychiatric disorders [J]. Clin Lipidol, 2010, 5(4): 555-573. (下转第 1947 页)

育必不可少,这需提高医务人员主动教育的积极性,逐渐消除人群中对宫颈癌不正确的观念和偏见。结合细胞学初筛手段,HPV 筛查可以对不同级别的细胞学结果予以有效分流,从而发现宫颈癌高危人群,对高危人群的定期检测及适当的干预,可预防宫颈癌及癌前病变的发生。

参考文献

- [1] Torre LA, Bray Siegel RL, Ferlay J, et al. Global cancer statistic,2012[J]. CA Cancer J Clin,2015,65(2):87-108.
- [2] Guan P, Howell-Jones R, Li N, et al. Human papilloma-virus(HPV) types in 115,789 HPV-positive women: a meta-analysis from cervical infection to cancer[J]. Int J Cancer,2012,131(10):2349-2359.
- [3] 张靖,高波,康赞,等. 中国女性宫颈人乳头瘤病毒感染型别分布区域性特征的 Meta 分析[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2014,34(12):913-920.
- [4] Howell-Jones R, Bailey A, Beddows S, et al. Multi-site study of HPV type-specific prevalence in women with cervical cancer, intraepithelial neoplasia and normal cytology, in England[J]. Br J Cancer,2010,103(2):209-216.
- [5] Monsonego J, Cox JT, Behrens C, et al. Prevalence of high-risk human papilloma virus genotypes and associated risk of cervical precancerous lesions in a large US screening population; data from the Athena trial[J]. Gynecol Oncol,2015,137(1):47-54.
- [6] Ajiro M, Zheng ZM. Oncogenes and RNA splicing of human tumor viruses[J]. Emerg Microbes Infect, 2014, 3: e63.
- [7] De Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, et al. Worldwide

prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis[J]. Lancet Infect Dis,2007,7(7):453-459.

- [8] 鄢春晖,陈林,袁蔓莉,等. 重庆地区 12 196 例妇科门诊患者 HPV 亚型感染情况分析[J]. 重庆医学,2014,43(35):4746-4748.
- [9] Carozzi F, Ronco G, Gillio-Tos A, et al. Concurrent infections with multiple human papillomavirus(HPV) types in the New Technologies for Cervical Cancer (NTCC) screening study[J]. Eur J Cancer, 2012, 48(11): 1633-1637.
- [10] Dickson EL, Vogel RI, Bliss RL, et al. Multiple-type HPV infections: a cross-sectional analysis of the prevalence of specific types in 309,000 women referred for HPV testing at the time of cervical cytology[J]. Int J Gynecol Cancer,2013,23(7):1295-1302.
- [11] Dickson EL, Vogel RI, Geller MA, et al. Cervical cytology and multiple type HPV infection; a study of 8 182 women ages 31-65[J]. Gynecol Oncol,2014,133(3):405-408.
- [12] Chaturvedi AK, Katki HA, Hildesheim A, et al. Human papillomavirus infection with multiple types: pattern of coinfection and risk of cervical disease[J]. J Infect Dis, 2011,203(7):910-920.
- [13] Thomas CJ, Stoler MH, Catherine MB, et al. The Athena human papillomavirus study: design, methods, and baseline results[J]. Am J Obstet Gynecol,2012,206(46):e1-11.

(收稿日期:2015-11-08 修回日期:2016-01-28)

(上接第 1944 页)

- [2] Wicher G, Fex-Svenningsen A, Velsecchi IA, et al. Extracellular cluster in promotes neuronal network complexity in vitro[J]. Neuroreport,2008,19(15):1487-1491.
- [3] 袁斌,马樱,闫铭,等. 大鼠骨髓基质干细胞的改良培养方法及 Hoechst 体外标记研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2011,27(1):61-63.
- [4] Tsai CC, Chen YJ, Yew TL, et al. Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST[J]. Blood,2011,117(2):459-469.
- [5] Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays[J]. Cell Stem Cell, 2008,2(4):313-319.
- [6] Phinney DG. Biochemical heterogeneity of mesenchymal stem cell populations: clues to their therapeutic efficacy[J]. Cell Cycle,2007,6(23):2884-2889.
- [7] Rydén M, Dicker A, Götherström C, et al. Functional characterization of human mesenchymal stem cell-derived adipocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun,2003,311(2):391-397.
- [8] Yan H, Yu C. Repair of full-thickness cartilage defects with cells of different origin in a rabbit model[J]. Arthroscopy,2007,23(2):178-187.
- [9] Munoz JR, Stoutenger BR, Robinson AP, et al. Human

stem/progenitor cells from bone marrow promote neurogenesis of endogenous neural stem cells in the hippocampus of mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(50):18171-18176.

- [10] Dawn B, Bolli R. Adult bone marrow-derived cells: regenerative potential, plasticity, and tissue commitment[J]. Basic Res Cardiol,2005,100(6):494-503.
- [11] Mcfarlin K, Gao X, Liu YB, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells accelerate wound healing in the rat[J]. Wound Repair Regen,2006,14(4):471-478.
- [12] Karra D, Dahm R. Transfection techniques for neuronal cells[J]. J Neurosci,2010,30:6171-6177.
- [13] Williams DJ, Puhl HL, Ikeda SR. A simple, highly efficient method for heterologous expression in mammalian primar neurons using cationic lipid-mediated mRNA transfection[J]. Front Neurosci,2010,4:181.
- [14] Obata Y, Ciofani G, Raffa V, et al. Evaluation of cationic liposomes composed of an amino acid-based lipid for neuronal transfection[J]. Nanomedicine,2010,6(1):70-77.
- [15] Zhang S, Zhi D, Huang L. Lipid-based vectors for siRNA delivery[J]. J Drug Target,2012,20(9):724-735.

(收稿日期:2015-11-15 修回日期:2016-01-31)