

文章编号:1000-5404(2005)21-2125-03

论著

促血小板生成素基因转染小鼠骨髓基质细胞体外表达的实验研究

赵咏梅¹, 刘林¹, 姜鹏², 陈幸华¹, 孔佩艳¹

(¹ 第三军医大学新桥医院血液内科, 重庆 400037; ² 兰州军区乌鲁木齐总医院呼吸内科, 乌鲁木齐 830000)

提要: 目的 探讨促血小板生成素(thrombopoietin, TPO)基因修饰的小鼠骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)体外表达TPO的变化特点。方法 以脂质体介导法将TPO cDNA真核表达质粒转染BMSCs, RT-PCR方法检测TPO mRNA的表达, 免疫组化法及Western blot测定TPO蛋白的表达。结果 转染TPO基因的BMSCs其TPO mRNA及TPO蛋白表达量明显高于空载体组($P < 0.01$)及未转染组($P < 0.01$)。结论 阳离子脂质体能有效介导TPO cDNA真核表达质粒转染BMSCs, 且转染后BMSCs中TPO mRNA及TPO蛋白的表达显著上调。

关键词: TPO cDNA; 骨髓基质细胞; 转染; 基因治疗

中图法分类号: R322.81; R392.11; R394.2

文献标识码: A

Expression of thrombopoietin *in vitro* after transfected into mouse bone marrow stromal cells

ZHAO Yong-mei¹, LIU Lin¹, JIANG Peng², CHEN Xing-hua¹, KONG Pei-yan¹ (¹Department of Hematology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, ²Department of , Urumqi General Hospital of Lanzhou Military Command Area, Urumqi 830000, China)

Abstract: Objective To investigate the changes of thrombopoietin (TPO) expression in mouse bone marrow stromal cells (BMSCs) *in vitro* after TPO gene transfection. Methods The bone marrow stromal cells of Balb/C mice aged 6 to 8 weeks were isolated and randomly divided into control group, pcDNA3.1 vector group and TPO transfection group. After TPO cDNA eukaryotic expressing vector encapsulated lipofectamine™ 2000 was transfected into BMSCs for 72 h, the expression of TPO mRNA and TPO protein in BMSCs were detected by RT-PCR and immunohistochemistry, Western blotting. Results The expressions of TPO mRNA and TPO protein in TPO gene transfected BMSCs were significantly enhanced as compared to pcDNA3.1 vector group and normal control BMSCs (all $P < 0.01$). Conclusion TPO cDNA eukaryotic expression vector could be transfected into BMSCs efficiently by lipofectamine™ 2000, and the expressions of TPO mRNA and TPO protein were up-regulated in TPO gene transfected BMSCs.

Key words: TPO cDNA; bone marrow stromal cells; transfection; gene therapy

促血小板生成素(thrombopoietin, TPO)是体内调节血小板生成的首要调节因子,而且具有显著的早期造血调控作用,与其他造血生长因子如促红细胞生成素(EPO)、粒系集落刺激因子(G-CSF)、干细胞因子(SCF)及IL-3等有相加或协同作用,共同促进红系和粒系祖细胞增殖^[1,2]。自1987年Anklesaria等^[3]首次采用逆转录病毒载体成功地将Neo R基因转染到小鼠骨髓基质细胞(bone marrow stromal cells, BMSCs)以

来,人们不断尝试在体外将造血生长因子、细胞因子等基因转染BMSCs,然后再回输体内。本实验采用携带外源基因TPO cDNA的真核表达载体转染BMSCs,观察TPO在mRNA及蛋白水平的表达,为基因修饰的BMSCs联合造血干细胞移植在临床方面的应用提供实验理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 L-DMEM培养基(美国Gibco公司); Lipofectamine 2000(美国Invitrogen公司);胎牛血清及马血清(美国Hyclone公司);Tripure Isolation Reagent(mRNA提取试剂:美国R&D公司);RT-PCR试剂盒(RNA PCR Kit AMV Ver3.0:日本TaKaRa公司);含小鼠TPO cDNA编码区的质粒pZGmpl-1081(美国ATCC, No: 69566);山羊抗TPO单克隆抗体IgG与山羊

基金项目:第三军医大学校管基金资助项目(2002D078)

Supported by the Scientific Research Foundation of Third Military Medical University (2002D078)

作者简介:赵咏梅(1971-),女,陕西省长安县人,硕士研究生,主治医师,主要从事造血干细胞移植机制方面的研究。电话:(023)60854037,
E-mail:zymjip@21cn.com

通讯作者:刘林,电话:(023)68755609

收稿日期:2005-05-08;修回日期:2005-08-05

抗 GAPDH 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司);二抗生物素标记兔抗羊 IgG、三抗辣根酶标记链霉卵白素工作液、DAB 显色剂(北京中山生物技术有限公司)。Western blot 检测试剂盒(美国 Cell signaling Technology 公司);免疫印迹化学发光试剂(ECL;上海普飞生物技术有限公司)。

1.1.2 仪器 PTC-200 型 PCR 扩增仪(美国 Applied Biosystem 公司);Lambda Bio-20 紫外分光光度计(美国 P-E 公司);凝胶密度扫描系统(美国 UVP 公司);CMIAS 真彩色病理图像分析系统(北京航天大学与空军总院共同研制);电泳-电转移系统(Mini PROTEAN System;美国 Bio-RAD 公司)。

1.1.3 实验动物 6~8 周龄健康 BALB/c 小鼠购于第三军医大学实验动物中心,体质量 18~22 g,雌雄不限。

1.2 方法

1.2.1 小鼠 BMSCs 的分离及培养 参考文献[4]方法。用随机数字表将细胞按完全随机的原则分为正常对照组,pcDNA3.1 空载体转染组和 TPO 转染组。

1.2.2 扩增、纯化质粒 pZGmpl-1081 将质粒 pZGmpl-1081 转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,在含氨苄青霉素-X-gal/IPTG 的 LB 琼脂培养基的平皿上,37℃培养 14 h。挑选白色单菌落,接种于 3 ml LB 培养基(含 60 μ g/ml 氨苄青霉素)的试管中,于 37℃振荡过夜。收集菌液,柱离心法提取并纯化质粒。

1.2.3 脂质体法转染小鼠 BMSCs 按 Lipofectamine 2000 说明书操作。

1.2.4 RT-PCR 法检测小鼠 BMSCs TPO mRNA 的表达 收获转染 pZGmpl-1081(转染后 72 h)、pcDNA3.1 空载体(转染后 72 h)及正常小鼠 BMSCs,用 Tripure 常规一步法抽提细胞总 RNA,并按 RT-PCR 试剂盒说明配置反应体系,在 PCR 仪中进行反应。PCR 引物分别为:TPO 正义:5'-GGTGGACTTCCTC-CTTCTCC-3',反义:5'-TCGCTAGCTGCTGTGATGAA-3'(合成长度 405 bp)。GAPDH 正义:5'-CCATGGAGAAGGCTGGGG-3',反义:5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3'(合成长度 195 bp)。PCR 反应循环参数为:94℃变性 5 min → 94℃变性 30 s → 57℃退火 30 s → 72℃延伸 50 s 的热循环,共 35 次。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳分析。

1.2.5 免疫组化染色法测定小鼠 BMSCs TPO 蛋白的表达

采用 S-P 法,严格按照试剂盒说明书操作:将正常小鼠 BMSCs 及转染 TPO cDNA 的 BMSCs 细胞爬片用冰丙酮固定 10 min,3% H₂O₂ 孵育 5 min,以消除内源性过氧化酶活性。蒸馏水冲洗,PBS 浸泡 5 min;在细胞玻片上加 5%~10% 山羊血清,置室温下 10 min;倾去血清加特异性一抗工作液,湿盒中 4℃过夜。第 2 天 PBS 充分冲洗,滴加 1:100 生物素标记二抗,湿盒中 37℃下放置 30 min;PBS 冲洗 3 次,加 1:100 辣根过氧化酶标记的链霉卵白素,置湿盒中 37℃下 30 min;PBS 冲洗,新配制的 DAB 液显色。自来水充分冲洗后,递度乙醇脱水,二甲苯透明,光学树脂封片,显微镜下观察。阳性对照采用自身对照;阴性对照采用 PBS 取代第一抗体,其余步骤及试剂不变。阳性结果判断以细胞内出现棕黄色颗粒为阳性。图像分析采用全自动图像分析仪在 200 倍视野下,于每张细胞片的上、下、左、右和中间随机选 5 个视野,测量 100 个细胞内棕黄色阳性颗粒的平均光密度值。

1.2.6 Western blot 检测小鼠 BMSCs TPO 蛋白的表达 ①蛋白提取和定量 分别往正常对照组,pcDNA3.1 空载体转染组(转染后 72 h)及 TPO 转染组(转染后 72 h)每个 250 ml 培养瓶各加入 2 ml 冰冷的细胞裂解液,收集细胞裂解液至 EP 管中,1 500 × g 4℃离心 10 min,取上清用紫外分光光度计进行蛋白定量。②SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE):根据目的蛋白分子质量大小选择 8% 的分离胶和 3% 的浓缩胶进行 SDS-PAGE。电泳后用 R250 考马斯亮蓝染色,脱色液脱色,用凝胶成像系统扫描并观察结果。③Western blot 用半干电转仪按说明书将蛋白转移至 PVDF 膜,0.02% 的氨基黑中快速染色,漂洗 PVDF 膜,加封闭液封闭 90 min。然后加入以 1:1 000 封闭液稀释的一抗,4℃过夜。含 0.05% Tween20 的 TBS 洗膜 5 min × 3。室温下与结合有 HRP 的二抗孵育 90 min。二抗用封闭液稀释至 1:1 000。含 0.05% Tween20 的 TBS 洗膜 5 min × 3,再用 TBS 洗膜 5 min。将膜置 ECL 中显色,直至显出清晰条带。结果用凝胶成像系统扫描存盘。

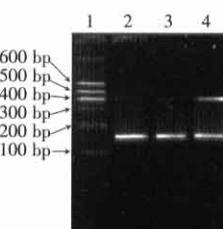
1.3 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 医学统计软件包进行 *t* 检验和单因素方差分析。

2 结果

2.1 半定量 RT-PCR 结果

RT-PCR 后,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,在 405 bp 处各组均显示出 TPO 阳性电泳带(图 1)。TPO 与 GAPDH(195 bp) mRNA 的光密度比值间比较,正常对照组为(0.17 ± 0.01)、pcDNA3.1 空载体转染组为(0.18 ± 0.02)、TPO 转染组为(0.62 ± 0.04),正常对照组与 TPO 转染组两组间差异显著($t = 102.51; P < 0.01$);正常对照组与 pcDNA3.1 空载体转染组两组间无显著性差异($t = 1.75; P > 0.05$)。



1: DNA Marker; 2: Normal control; 3: pcDNA3.1; 4: TPO cDNA

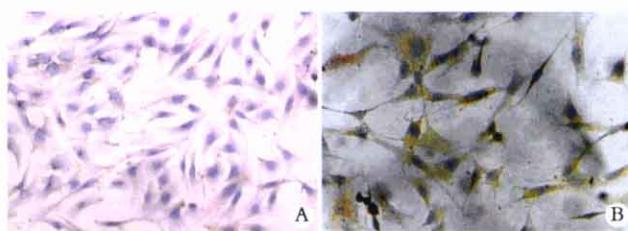
图 1 小鼠骨髓基质细胞 TPO mRNA 的表达

Fig 1 Expression of TPO mRNA in mouse BMSCs

2.2 免疫组化结果

免疫组化普通镜检发现 TPO cDNA 转染后的 BMSCs 中 TPO 在其胞浆内表达呈棕黄色颗粒状物质,随抗体孵育时间的延长而染色逐渐加深。胞核未见表达或偶见表达。正常对照组及 pcDNA3.1 空载体转染组 BMSCs 阳性细胞数明显减少(图 2)。图像分析显示,TPO 转染组 TPO 光密度值为(0.57 ± 0.03),正常对照组为(0.19 ± 0.01),pcDNA3.1 空载体转染组为(0.20 ± 0.02),TPO 转染组是正常对照组的 3.06 倍,两组间差异显著($t = 34.57, P < 0.01$)。pcDNA3.1 空载体转染组与

正常对照组间无显著性差异($t = 0.95$, $P > 0.05$)。



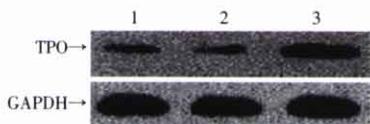
A: Normal; B: At 72 h after TPO transfection

图2 正常组及转染TPO cDNA组小鼠BMSCs TPO蛋白的表达(S-P×200)

Fig 2 Expression of TPO protein in mouse BMSCs (S-P×200)

2.3 Western blot结果

TPO蛋白表达(TPO/GAPDH IOD比值)在正常对照组为 (0.30 ± 0.04) ,pcDNA3.1空载体转染组为 (0.28 ± 0.04) ,TPO转染组为 (0.74 ± 0.06) 。TPO转染组与正常对照组、TPO转染组与pcDNA3.1空载体组相比差异均显著(分别为 $t = 16.96$, $P < 0.01$; $t = 17.64$, $P < 0.01$),3组间差异显著($F = 233.44$, $P < 0.01$)(图3)。



1: Normal control; 2: pcDNA3.1; 3: TPO cDNA

图3 小鼠骨髓基质细胞TPO蛋白的表达
Fig 3 Expression of TPO protein in mouse BMSCs

3 讨论

对于大剂量化疗及造血干细胞移植后引起的血小板减少,临幊上依赖输注血小板悬液,但长期输注血小板有可能带来许多严重副作用,如:体内产生血小板抗体、乙型、丙型肝炎、甚至AIDS。长期以来人们一直在寻找促进血小板快速恢复的方法,早在1958年,Kelemen就提出TPO的概念,认为TPO是调节血小板生成的一种激素样因子,随后几十年来研究者发现TPO在体内外均具有刺激巨核细胞增殖、促进血小板生成作用。1994年De Sauvage等^[5]克隆出TPO蛋白,并阐明了其cDNA结构和氨基酸序列。最近的研究表明,TPO在巨核细胞分化过程中还介导GP6转录的脱甲基化作用^[6]。Kirito等^[7]研究发现,从TPO(-/-)小鼠分离纯化的sca-1(+)/c-kit(+)/Gr-1(-)骨髓细胞,其血管内皮生长因子(VEGF)的含量明显减少,而给予TPO后原始造血细胞VEGF的表达明显升高。如今人们开始尝试将TPO用于基因治疗以促进血小板生成。而骨髓基质细胞是造血微环境的主要成分,易体外培养和扩增,外源基因的表达可持续较长的时

间,并且其代谢活力高,有利于重组蛋白的分泌,是基因治疗理想的靶细胞之一。

本实验通过体外将携带外源基因TPO cDNA的真核表达载体转染BMSCs,系统地探讨TPO在转录水平及蛋白水平表达的变化,结果表明转染空载体组及未转染的正常BMSCs组其TPO mRNA的表达量很弱,这与文献[8]所报道的TPO主要由肝脏实质细胞、窦状隙内皮细胞以及肾近曲小管上皮细胞分泌,骨髓基质细胞有少量分泌一致,但转染TPO基因组其TPO mRNA的表达量明显增加,并有统计学意义。免疫组化结果显示,TPO基因组BMSCs中TPO阳性表达产物较正常BMSCs组及空载体组有显著差异。对此我们进一步进行蛋白定量检测,Western blot结果表明:TPO转染组与control组、TPO转染组与空载体组相比差异均显著,即TPO基因转染BMSCs后,BMSCs分泌的TPO蛋白量明显增多。因此我们推测若将TPO基因修饰的BMSCs回输体内,血液循环中的TPO水平可能会上升,作用于靶器官从而发挥其生理作用,促进血小板生成、参与造血调控。这对于进一步进行动物实验、研究TPO基因修饰的BMSCs回输经致死剂量照射小鼠在促进血小板早期恢复、造血早期重建方面具有重要的理论和临床意义。

参考文献:

- [1] Drachman J G. Role of thrombopoietin in hematopoietic stem cell and progenitor regulation [J]. Curr Opin Hematol, 2000, 7(3):183-190.
- [2] Fujiwara T, Harigae H, Kameoka J, et al. A case of familial thrombocytosis: possible role of altered thrombopoietin production [J]. Am J Hematol, 2004, 76(4):395-397.
- [3] Anklesaria P, Sakakeeny M A, Klassen V, et al. Expression of a selectable gene transferred by a retroviral vector to hematopoietic stem cells and stromal cells in murine continuous bone marrow cultures [J]. Exp Hematol, 1987, 15(2):195-202.
- [4] 孔佩艳,郭朝华,常诚,等. CD34抗原在小鼠造血基质细胞的表达及其意义[J].重庆医学,2002,31(1):19-21.
- [5] De Sauvage F J, Hass P E, Spencer S D, et al. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand [J]. Nature, 1994, 369(6481):533-538.
- [6] Kanaji S, Kanaji T, Jacquelain B, et al. Thrombopoietin initiates demethylation-mediated transcription of GP6 during megakaryocyte differentiation [J]. Blood, 2005, 105(10):3888-3892.
- [7] Kirito K, Fox N, Komatsu N, et al. Thrombopoietin enhances expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in primitive hematopoietic cells through induction of HIF-1alpha [J]. Blood, 2005, 105(11):4258-4263.
- [8] Sungaran R, Markovic B, Chong B H. Localization and regulation of thrombopoietin mRNA expression in human kidney, liver, bone marrow, and spleen using in situ hybridization [J]. Blood, 1997, 89(1):101-107.