

文章编号:1005-6947(2006)12-0917-03

· 基础研究 ·

# PcDNA3.1/hTM 质粒对真核细胞转染表达的实验研究

乔正荣, 俞慎林, 戴毅, 郭颖

(重庆市第八人民医院 血管外科, 重庆 400015)

**摘要:** **目的** 探讨含有人血栓调节蛋白(hTM)基因的真核表达质粒 pcDNA3.1/hTM 转染脐静脉内皮细胞(HUVECs)的抗凝效应。**方法** 由阳离子脂质体介导将 pcDNA3.1/hTM 质粒转入内皮细胞中,以 RT-PCR 法检测 hTmRNA 的表达;免疫组化法检测 hTM 分子的表达。**结果** 转染重组质粒的 HUVECs 表达的 hTmRNA 约为载体质粒组及未转染组的 1.7 倍。免疫组化显示有平均 10% 的 HUVECs 获得转染,阳性细胞较阴性细胞 hTM 的表达强度有明显提高。**结论** pcDNA3.1/hTM 质粒能被导入 HUVECs 中表达,而且外源性 hTM 分子具有完全的抗凝生物学活性。

**关键词:** PcDNA3.1/hTM 质粒;真核细胞;基因表达;转染;血栓形成/治疗

**中图分类号:** R654.3; R34-33

**文献标识码:** A

## A study of endothelial cells modified by pcDNA3.1/hTM

QIAO Zheng-rong, YU Shen-lin, DAI Yi, GUO Ying

(Department of Vascular Surgery of Chongqing 8th People's Hospital, Chongqing 400015, China)

**Abstract:** **Objective** To identify the anticoagulation effect of pcDNA3.1 transfected exogenous human thrombomodulin molecule (hTM) on umbilical vein endothelial cells (HUVECs). **Methods** The pcDNA3.1/hTM plasmid was transduced into HUVECs by cationic liposome. Expression of hTmRNA and hTM protein was detected by RT-PCR and immunohistochemistry, respectively. **Results** The expression of hTmRNA in HUVECs transduced with pcDNA3.1/hTM was 1.7 times higher than cells without transfected PcDNA3.1/hTM. Immunohistochemical examination showed about 10% cell transfected with PcDNA3.1/hTM and high-level hTM protein was detected on positive cells. **Conclusions** The pcDNA3.1/hTM plasmid could be transfected into endothelial cells by cationic liposome and the exogenous hTM protein had complete anticoagulation biological activity.

**Key words:** PcDNA3.1/hTM plasmid; Eukaryotic Cells; Gene Expression; Transfection; Thrombosis/ther

**CLC number:** R654.3; R34-33

**Document code:** A

由于真核细胞在长期的进化过程中已建立了一套完整的防御机制以防止外源性基因对其遗传性状的改变,使绝大多数外源性基因难于对细胞产生影响。细胞膜是其中非常重要的屏障结构。但是,利用脂质体可以和细胞膜相融合的特性,用脂质体包裹外源基因后对真核细胞进行转染,即可使

外源基因进入细胞的可能性大大增加。本课题的前期工作<sup>[1]</sup>完成了 PcDNA3.1/hTM 质粒的构建,但它是否能顺利进入真核细胞胞内并顺利表达仍亟待证实。本研究借助阳离子体介导 PcDNA3.1/hTM 质粒对原代培养的脐静脉内皮细胞(HUVECs)进行转染。从基因水平和蛋白水平检测转染后 hTM 的表达,以期为进一步的体内实验提供理论依据。

**基金项目:**重庆市自然科学基金资助项目(CSTC,2005BB5032)。

**收稿日期:**2005-12-28; **修订日期:**2006-05-29。

**作者简介:**乔正荣,男,重庆人,重庆市第八人民医院教授,博士,主要从事血管疾病基础与临床方面的研究。

**通讯作者:**乔正荣 E-mail:qiaozhengrong@hotmail.com。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和仪器包括

RPMI1640 培养基(GIBCO 公司),hTM 鼠抗人单抗(Neomaker 公司),单价阳离子脂质体 lipofectin(in-

vitrogen), 逆转录酶(M-MLV), RNA 酶抑制剂(RNasin)(北方同正公司), RNA 提取试剂(Trizol)(sangon 公司), VIII 因子相关抗原鼠抗人单抗(工作液)、异硫氰酸荧光素标记山羊抗鼠二抗(北京中山公司), 免疫组织化学试剂盒(SP 法), DAB 显色试剂盒(北京中山公司), Olympus 倒置显微镜及其照相系统(日本), CO<sub>2</sub> 培养箱(Sheldon 公司)。

## 1.2 方法

1.2.1 聚乙二醇法抽提纯化质粒 pcDNA3.1/hTM 质粒经测序鉴定后, 对 pcDNA3.1/hTM 和 pcDNA3.1(+)/neo 质粒进行大量抽提纯化, 备以后转染时实验用。

1.2.2 原代 HUVECs 的分离、培养、鉴定 取健康产妇剖宫产术后胎儿脐带 15~20 cm, 放入 4℃ 抗生素生理盐水中保存。剪去脐带两端的损伤, 从两端脐静脉中各插入 0.5 cm 口径的导管结扎固定。注入 5~10 mL 经 37℃ 预温的混合消化酶(含 0.1% I 型胶原酶和 0.25% 的胰酶, 按 1:3 混合), 置于 37℃ 中孵育, 不超过 15 min。收集消化液, 并用 RPMI1640 培养基冲洗静脉管腔, 冲洗液一并收集入 20 mL 离心管中。室温离心, 800g, 5 min。去上清液, 加入 RPMI1640 全营养培养基(含 15% 胎牛血清、50 U/mL FGF 及 100 U/mL 普通肝 Mm L-谷氨酰胺) 5 mL, 重新悬浮细胞并将细胞转入 25 mL 的塑料培养瓶中。37℃, 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中静置培养。取 5~6 代血管内皮细胞用于转染。HUVECs 的鉴定: 用光学显微镜观察鉴定; 在倒置显微镜下观察培养的 HUVECs, 与文献描述相对照。

1.2.3 pcDNA3.1/hTM 质粒对脐静脉内皮细胞的转染 当 HUVECs 传至第 5~6 代时, 经 0.25% 胰酶消化后, 吹打脱壁, 计数。制成  $2.5 \times 10^6$  /mL 细胞悬液。取无菌六孔培养板, 每孔接种  $2.5 \times 10^5$  个细胞, 培养 24 h, 细胞融合至 50%~60% 用于转染。根据预实验确定用于转染的质粒与脂质体的比例为 1:4。每个培养孔取质粒 4.5 μg 加入 200 μL 无血清、抗生素的 RPMI1640 培养基混合均匀, 室温放置 10 min。每个培养孔取 lipfectin 18 μL 加入 200 μL 无血清、无抗生素的 RPMI1640 培养基中混合均匀, 室温放置 30~45 min; 将质粒与 lipfectin 轻轻混合均匀, 室温放置 15 min, 以形成包裹复合物。将质粒~脂质体复合物吸入培养板中混合均匀, 另外加入新鲜的无血清、无抗生素的 RPMI1640 培养基 1.5 mL, 在 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 24 h; 换用含全营养培养基继续培养 72 h, 用于检测。再分为转染 pcDNA3.1/hTM 质粒(重组质粒)组、pcDNA3.1(+)/neo 质粒(载体质粒)组和未转

染组。每组 12 孔。未转染组用磷酸缓冲液(PBS)代替质粒进行操作, 其余步骤同上。均用于逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)和免疫组化检测的各孔。行免疫组化的孔预先放置 2.0 cm × 2.0 cm 的无菌盖玻片。

1.2.4 RT-PCR 分析 hTM mRNA 在各组 HUVECs 中的表达 内皮细胞在转染后 96 h 用于检测。内皮细胞中总 RNA 的提取, 依次加入 PCR 反应所需的各种试剂, 用 752 紫外分光光度计 RNA 溶液的 OD260 和 OD280 值, OD260/OD280 = 1.75。cDNA 第一链的合成: 95℃ 预变性 5 min → 94℃ 变性 1 min, 64℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min 30; 30 个循环 → 72℃ 补充延伸 8 min。反应产物即为 cDNA 第一链。PCR 反应扩增 hTM 片段。依次加入所需的各种试剂, 进行 PCR 反应。用 1% 琼脂糖凝胶电泳, Bio-Rad 凝胶成像仪成像。用 Bio-Rad Quantity 定量分析软件对条带进行定量分析, 以确定 hTM 基因的表达水平。

1.2.5 免疫组化检测 hTM 在各组 HUVECs 上的表达 内皮细胞转染 96 h 后用于检测。95% 乙醇固定 30 min, PBS 清洗 2 次, 分别滴加 3% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 10% 山羊封闭血清, 小鼠抗人 TM 单抗, 生物素化标记的山羊抗小鼠二抗, 辣根过氧化物酶-链霉卵白素, PBS 冲洗。DAB 显色 0.5~1.0 min, 自来水终止反应。苏木素复染约 45~60 min, 盐酸-乙醇分色约 10 min, 自来水终止反应; 干燥、脱水、二甲苯透明、中性树胶封片。光学显微镜下观察结果。以位于细胞膜的肉眼可见明显的棕黄色为阳性。每张玻片在 20 × 20 倍显微镜下随机选取 5 个视野照相, 计数照片下细胞总数和阳性细胞数, 计算各组的阳性率。

## 2 结果

### 2.1 各组 HUVECs 中 hTM mRNA 表达

RT-PCR 法检测在重组质粒转染组、载体质粒转染组和未转染组内皮细胞中均有 hTM mRNA 表达。经 Quantity 条带分析系统测定 3 组 IOD 分别为: 67958.67, 39760.17 和 40382.67, 各组间差异具有显著性 ( $F = 212.92$ ,  $P < 0.01$ ) (图 1, 表 1)。

### 2.2 免疫组化检测各组 HUVECs 中 hTM 蛋白的表达

hTM 在未转染组和载体质粒组中仅有很微弱的表达, 不能被记为阳性, 两组间差异无显著性。重组质粒组表达强度明显增强, 阳性细胞增多(图 2)。由于在未转染组中几乎未见阳性细胞, 故认为 TM 阳性率即为质粒的转染率, 约 10% (表 2)。

图1 HUVECs 各组的 RT-PCR 的结果

表1 hTMmRNA 在不同 HUVECs 中的表达 ( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

序号	分组	hTMmRNA IOD
I	转染重组质粒	67958.67 ± 4402.15 <sup>1)</sup>
II	载体质粒	39760.17 ± 1140.52 <sup>2)</sup>
III	未转染	40382.67 ± 1115.22

注: 1)与II,III组比较,  $P < 0.01$ ; 2)与III组比较,  $P > 0.05$

### 3 讨论

TM 是蛋白 C (PC) 系统中最重要 的调控因素。TM 分子中包含 6 个重复的 EGF 结构,其中后 2 个 EGF 是凝血酶的结合位点,第 4 个 EGF 重复结构则与 PC 的激活有关。凝血酶与 TM 在内皮细胞表面进行 1:1 的结合,形成复合物后凝血酶酶解纤维蛋白原和激活血小板的能力立即丧失,但对 PC 的激活能力却增加 1 000 ~ 2 000 倍。凝血酶即由促凝分子转化成为抗凝分子<sup>[2]</sup>。蛋白 C 系统由于受 TM - 凝血酶复合物的调节而带有明显的自限性,即与 PC 的抗凝血酶产生多少呈正相关。这种抗凝方式不会导致出血倾向等副作用<sup>[3]</sup>。

据报道,每个内皮细胞上约而有 43 000 ~ 53 000 个 TM 分子<sup>[4]</sup>。但测定方法均是以培养的内皮细胞为实验对象,结果能否反映出 TM 在体内的实际表达情况值得怀疑。因为有研究表明 TM 的表达受凝血酶的调控<sup>[5]</sup>。体内、外凝血酶水平的差异即可导致表达 TM 的水平出现很大的波动。本研究也发现多次传代培养的 HUVECs 中 TM 表达水平极低,估计与失去凝血酶的刺激有关。

由于 hTM 抗凝方式的特殊性,它只能表达在血管内皮细胞腔面上才能产生抗凝效果,所以血管内皮细胞几乎是 hTM 基因转染惟一可用的工程细胞。本实验发现:pcDNA3.1/hTM 重组质粒对 HUVECs 有较好的转染,mRNA 表达水平较其他对照组上升了约 70%;同时免疫组化也显示有 10% 左

图2 HUVECs pcDNA3.1/hTM 质粒转染组的 hTM 阳性细胞 (免疫组化 × 200)

表2 各组中 hTM 阳性细胞的阳性率比较

序号	分组	细胞总数	阳性细胞数	阳性率 (%)
I	重组质粒	17129	1653	9.6 <sup>1)</sup>
II	载体质粒	16527	1	0.01 <sup>2)</sup>
III	未转染	17305	3	0.02

注: 1)与II,III组比较,  $P < 0.01$ ; 2)与III组比较,  $P > 0.05$

右的内皮细胞被转染,转染细胞上 hTM 的表达强度也较对照组明显提高。同样,表达的 hTM 分子也位于细胞膜上。本结果证明这种重组质粒对工程细胞转染的可能性。

本课题前期研究所构建的带 hTM 基因的真核表达质粒<sup>[1]</sup>在本实验中被导入到 HUVECs 获得了较高表达。转染效率达到 10% 左右。说明 pcDNA3.1/hTM 重组质粒能对内皮细胞进行转染并表达外源性 TM 蛋白。为血栓性疾病的基因治疗提供理论依据。

#### 参考文献:

- [1] 戴毅,乔正荣,时德. 人血栓调节蛋白基因真核表达质粒的构建[J]. 重庆医学,2003,32(10):1356-1358.
- [2] Dittman WA, Majerus PW. Structure and function of thrombomodulin: A natural anticoagulant [J]. Blood, 1990, 75(6): 329-336.
- [3] Suzuki M, Mohri M, Yamamoto S. In vitro anticoagulant properties of a minimum functional fragment of human thrombomodulin and in vivo demonstration of its benefit as an anticoagulant in extracorporeal circulation using a monkey model [J]. ThrombHaemost, 1998, 79(2): 417-422.
- [4] 周泉生,赵益明,白霞,等. 血管内皮细胞膜血栓调节蛋白放射免疫测定法的建立[J]. 中华血液学杂志,1991,12(9):489-490.
- [5] Dittman WA, Kumada T, Majerus PW, et al. Transcription of thrombomodulin mRNA in mouse hemangioma cells is increased by cycloheximide and thrombin [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86(18): 7179-7182.