

TGF- β_1 基因真核表达载体的构建及在猪脐静脉内皮细胞中的表达

王文秀, 邓文, 张彦明*, 代晨, 熊奎州, 谢林红, 温元鹏

(西北农林科技大学动物医学院, 杨凌 712100)

摘要: 应用 RT-PCR 技术从猪外周血单个核细胞扩增转化生长因子 β_1 (Transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1) 全基因, 构建含有 TGF- β_1 基因及 EGFP 报告基因的真核表达质粒 pEGFP-C1-TGF- β_1 。采用脂质体法转染体外培养的猪脐静脉内皮细胞(SUVECs)后, 通过直接荧光观察 pEGFP-C1-TGF- β_1 融合蛋白在细胞中的分布定位, 并通过 RT-PCR、间接免疫荧光方法检测 TGF- β_1 基因在 SUVECs 中的表达。结果在转染后 1 周观察到绿色荧光, RT-PCR、间接免疫荧光法检测 TGF- β_1 表达均为阳性。本研究成功构建了含有绿色荧光蛋白基因的真核表达载体 pEGFP-C1-TGF- β_1 , 且 TGF- β_1 基因在 SUVECs 中获得表达。

关键词: 脐静脉内皮细胞; 转化生长因子 β_1 (TGF- β_1); 转染

中图分类号: S813.3; Q786

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)06-0832-05

Construction of Eukaryotic Expression Plasmid of TGF- β_1 Gene and Its Expression in Swine Umbilical Vein Endothelial Cells

WANG Wen-xiu, DENG Wen, ZHANG Yan-ming*, DAI Chen, XIONG Kui-zhou,

XIE Lin-hong, WEN Yuan-peng

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: In this study, transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) full length cDNA was cloned from swine peripheral blood mononuclear cells by RT-PCR, the eukaryotic expression plasmid of TGF- β_1 gene containing green fluorescent protein (GFP) report gene was constructed. The recombinant plasmid was transfected by lipofectin to prepared swine umbilical vein vascular endothelial cells(SUVECs). The fluorescence expression was directly detected with fluorescence microscope, and the expression of TGF- β_1 were tested by RT-PCR and indirect immunofluorescence assay (IFA), respectively. One week after transfection, green fluorescent can be seen by fluorescent microscope; RT-PCR and indirect immunofluorescence assay showed that the expression of TGF- β_1 are positive. The results indicated the successful construction of the eukaryotic expression plasmid pEGFP-C1-TGF- β_1 , and showed that TGF- β_1 gene was expressed efficiently in transfected SUVECs.

Key words: umbilical vein vascular endothelial cells; transforming growth factor- β_1 ; transfection

转化生长因子- β (Transforming growth factor- β , TGF- β) 是由血小板、单核细胞、巨噬细胞、淋巴细胞等生成的一类相关蛋白超家族成员, 包括哺乳动

物的 3 种 TGF- β 异构体 (TGF- β_1 、TGF- β_2 、TGF- β_3)、活化素、抑制素和骨形成蛋白等。TGF- β_1 是一种多功能调节因子, 可调节细胞的增殖、凋亡、细胞

收稿日期: 2007-07-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(30471290)

作者简介: 王文秀(1978-), 女, 新疆伊宁人, 博士生, 主要从事分子病原学与免疫学研究

* 通讯作者: 张彦明, 陕西南郑人, 教授, 博士生导师, 主要从事分子病原学与免疫学研究, E-mail: ylzhangym@sohu.com

外基质合成代谢和胚胎系的分化以及向成熟细胞的转化等过程。TGF- β_1 能够抑制大动脉内皮细胞的增殖,同时还能在体外促进这些细胞向表达 α -SMA 的间充质细胞转化,在内皮-平滑肌细胞转分化中具有重要作用^[1-4]。在基因治疗和组织工程技术日益发展的今天,对 TGF- β_1 功能的研究具有非常重要的意义。

本研究将 TGF- β_1 全基因克隆到带有绿色荧光蛋白报告基因的真核表达质粒 pEGFP-C1 中,通过脂质体法成功地将含有 TGF- β_1 基因的真核质粒转入 SUVECs,通过荧光显微镜观察绿色荧光蛋白的表达,初步确定目的基因的表达。并通过 RT-PCR 和间接免疫荧光试验检测到 TGF- β_1 在 SUVECs 中的转录和表达。为进一步深入研究转化生长因子 TGF- β_1 基因对 SUVECs 转分化效应及组织工程血管损伤修复方面的应用打下基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、细胞及主要试剂

含有绿色荧光蛋白的真核表达质粒 pEGFP-C1、大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存;限制性内切酶 *EcoR* I、*Bam*H I、*T*₄DNA 连接酶以及 PCR 反应试剂、胶回收试剂盒以及 DNA Marker DL2000 等购自大连宝生物工程有限公司;脂质体 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司;兔抗猪 TGF- β_1 多克隆抗体、SP 试剂盒和 DAB 显色试剂盒购自福州迈新公司,DMEM 和胎牛血清购自 Gibco 公司;其它试剂为国产或进口分析纯试剂。

1.2 引物设计与合成

根据 GenBank 中已发表的猪 TGF- β_1 基因参考序列(登录号为 NM_214015)设计 1 对特异性引物,并根据 pEGFP-C1 质粒上的多克隆酶切位点在上下游引物 P1、P2 中分别设置 *EcoR* I、*Bam*H I 酶切位点,P1: 5'-CGGAATTCATGCCGCCTTCGGG-GCTGCG-3'; P2: 5'-ATGGATCCTCAGCTGCA-CTTGACAGGAAC-3',引物由上海生工生物技术有限公司合成。

1.3 TGF- β_1 基因的 PCR 扩增、克隆及序列测定

采用 Trizol 试剂提取猪外周血单个核细胞总 RNA,使用 Oligo dT 引物合成 cDNA,以其为模板,用引物 P1、P2 和高保真 DNA 聚合酶按照常规体系扩增 TGF- β_1 基因,程序为 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 62 °C 1 min, 72 °C 1 min, 33 个循环; 72 °C 延

伸 10 min。经电泳分析后纯化回收 PCR 产物并送至上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.4 TGF- β_1 重组真核表达质粒的构建

pEGFP-C1 质粒和 TGF- β_1 基因分别用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Bam*H I 酶切,并回收目的片段,用 *T*₄DNA 连接酶于 16 °C 连接 6 h,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,用含卡那霉素(100 mg/L)的 LB 培养基筛选,挑取单菌落增殖培养,用碱裂解法提取质粒,用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 进行双酶切鉴定,将阳性质粒送至上海生工生物工程技术有限公司进行序列测定。片段的回收纯化、连接转化及酶切均按照常规操作^[5]。

1.5 猪脐静脉内皮细胞的培养

无菌采集新生猪脐带,置于含双抗的无菌 PBS 液中。在超净工作台中取出脐带,于 75% 酒精中浸泡 3 min 左右。分离出脐静脉血管用 PBS 反复冲洗至无血迹,静脉腔内注入 1 g/L 胶原酶,两端用无菌棉线结扎后,于 37 °C 温箱消化约 5 min,用培养液冲洗血管内壁 2~3 次,将收集的细胞悬液 1 000 r/min 离心 10 min,弃上清,在沉淀中加入含有 15% 胎牛血清的 M199 培养液,吹打混匀后接种到培养皿中,置 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养,待内皮细胞铺满 80% 时,加入 0.25% 胰酶消化,按 1:2 传代。

1.6 重组质粒转染 SUVECs 及直接荧光观察

用 TIANGEN 公司 HighPure 高纯度质粒大提试剂盒提取重组质粒。取第 3 代细胞按照 2×10^4 个/mL 密度接种到 24 孔板,细胞生长到汇合率达 70% ~ 80% 时,按照 Invitrogen 公司说明书将重组质粒 pEGFP-C1-TGF- β_1 转染 SUVECs。细胞于转染前 6 h 换成无血清培养基,转染后 12 h 更换完全培养基,48 h 后用 G418 筛选,筛选浓度为 500 μ g/mL,维持浓度为 300 μ g/mL,在荧光显微镜下直接观察绿色荧光蛋白在 SUVECs 中的表达。

1.7 RT-PCR 检测外源性 TGF- β_1 mRNA 的表达

在转染后,按照 Trizol 试剂盒说明提取 RNA,采用 RT-PCR 方法检测 TGF- β_1 mRNA 的表达。根据猪 TGF- β_1 全基因设计特异性检测引物,P3: 5'-GAGCCAGAGGCGGACTA-3', P4: 5'-GGCA-CTGAGGCGAAAA-3',预期扩增片段 399 bp;并设计内参 β actin 引物,P5: 5'-ACTCTGGGGAT-GGGGTCA-3', P6: 5'-CTCGTTGCCGATGGT-GAT-3',预期扩增片段为 299 bp。

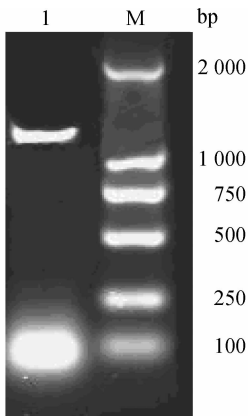
1.8 间接免疫荧光法检测 TGF- β_1 的表达

将转染后 4 周和未转染的 SUVEC 用间接免疫荧光法检测 TGF- β_1 的表达。细胞以 1.0×10^4 /mL 的密度接种于多聚赖氨酸包被的爬片上,培养至牢固贴壁,取出爬片,4% 多聚甲醛固定 20 min,山羊血清封闭 20 min,吸去封闭液,加兔抗人 TGF- β_1 抗体(1:100,北京中杉公司)于 4℃ 过夜, PBS 洗 3 次,加 TRITC 标记羊抗兔 IgG(1:200,美国 Sigma 公司),室温孵育 1 h;PBS 洗 3 次,荧光显微镜观察,拍照。阴性对照以 PBS 代替一抗,其余步骤同上。

2 结果与分析

2.1 TGF- β_1 基因的扩增、克隆及序列测定

利用 RT-PCR 方法从猪外周血中提取总 RNA,用特异性引物进行扩增,获得了约为 1 200 bp 的条带,与目的基因大小相符(图 1)。测序结果证实,获得了完整的 TGF- β_1 基因,并在基因两侧含有正确的酶切位点。



1. TGF- β_1 基因扩增产物;M. DL2000 分子量标准
1. PCR product of TGF- β_1 ; M. DL2000 DNA marker

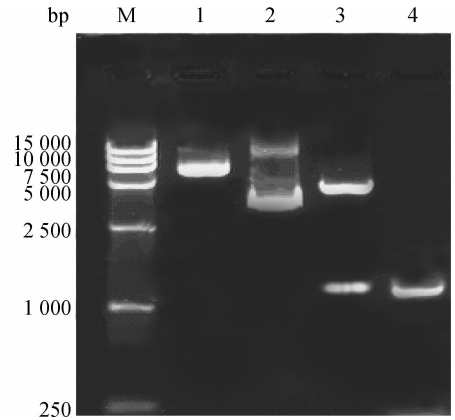
图 1 TGF- β_1 PCR 扩增产物电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis of the PCR products of TGF- β_1

2.2 重组真核表达质粒 pEGFP-C1-TGF- β_1 的鉴定

将提取的质粒作为模板,以引物 P1、P2 进行扩增,并将质粒用 *EcoR* I 和 *Bam*H I 进行双酶切后,用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,结果 PCR 扩增产物与酶切小片段大小相同,与理论预期结果完全一致(图 2)。对 PCR、酶切鉴定阳性的克隆测序,并与已知基因参考序列相比较,结果表明插入的目的基

因完全正确。



M. DNA 分子量标准;1. 重组表达质粒 pEGFP-C1-TGF- β_1 ;2. pEGFP-C1 质粒;3. *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切 pEGFP-C1-TGF- β_1 ;4. TGF- β_1 PCR 扩增产物

M. DNA marker;1. Recombinant plasmid pEGFP-C1-TGF- β_1 ;2. Plasmid pEGFP-C1;3. pEGFP-C1-TGF- β_1 digested by *EcoR* I 和 *Bam*H I;4. PCR product of TGF- β_1 gene

图 2 重组质粒 PCR 及酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid by PCR and restriction digestion

2.3 荧光检测 TGF- β_1 的表达

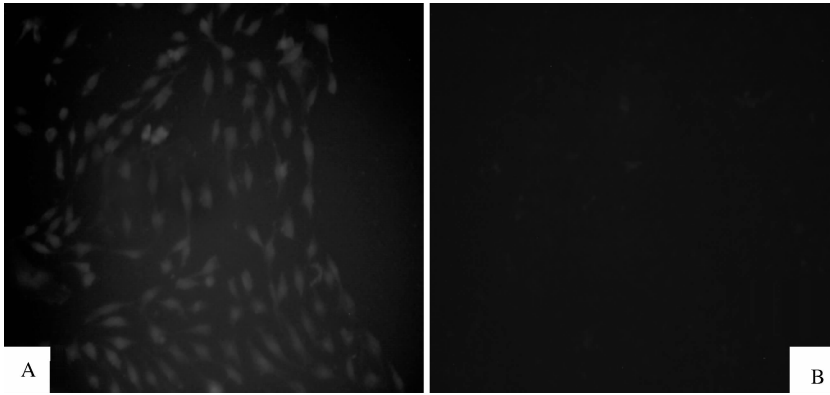
直接荧光显微镜下观察重组质粒转染的 SUVEC 以及未转染 SUVEC 荧光表达情况,转染 SUVEC 1 周后可观察到绿色荧光分布(图 3A),未转染的对照细胞未见荧光(图 3B);间接免疫荧光检测 TGF- β_1 ,于荧光显微镜下观察可见表达 TGF- β_1 的阳性细胞染上红色荧光(图 4A),而阴性对照未见荧光(图 4B)。

2.4 RT-PCR 检测外源性 TGF- β_1 mRNA 的表达

SUVEC 转染重组质粒后,提取总 RNA,用检测引物 P3、P4 扩增 TGF- β_1 基因,引物 P5 和 P6 扩增内参 β actin,结果扩增出与预期的 TGF- β_1 和 β actin 大小一致的片段,分别为 399 和 299 bp(图 5)。

3 讨论

研究发现,胚胎血管内皮细胞可分化成具有平滑肌特征的细胞^[6-7],而且成熟个体的血管内皮细胞同样具有向平滑肌样细胞分化的潜能^[8-10],提示肌化细胞可能来源于血管内皮中具有再分化潜能的前体细胞。研究表明,TGF- β_1 是一种重要的多功能细胞调节因子,在内皮-平滑肌细胞转分化中 TGF- β_1

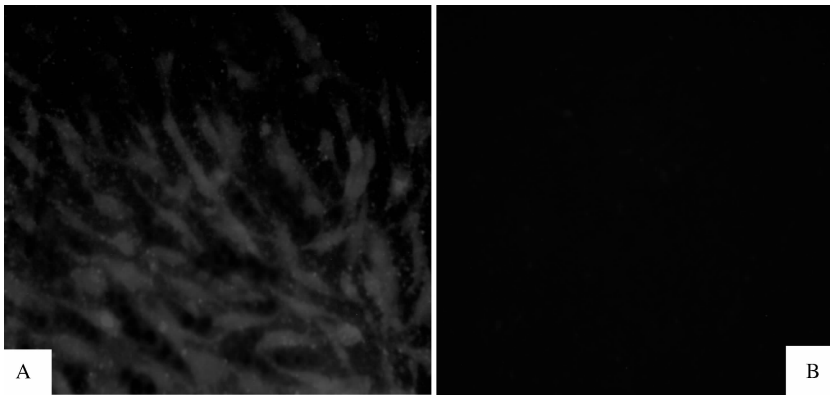


A. 转染细胞;B. 未转染对照

A. Transfected SUVECs;B. Untransfected SUVECs

图 3 转染细胞绿色荧光

Fig. 3 Green fluorescence of transfected SUVECs



A. 转染 SUVECs 的 IFA 检测结果;B. 阴性对照

A. Transfected SUVECs;B. Negative control

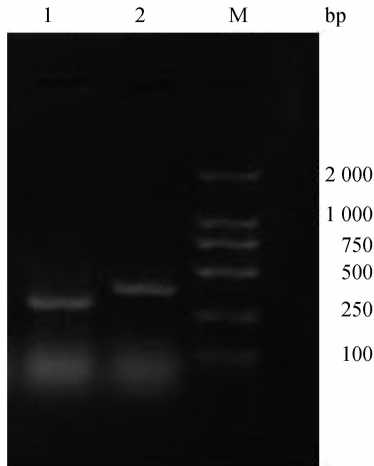
图 4 TGF- β_1 间接免疫荧光检测结果

Fig. 4 Detection of the expression of TGF- β_1 by IFA

发挥了重要调节作用^[3,4],且在体外培养的血管内皮细胞中加入 TGF- β_1 已成功诱导其向平滑肌样细胞分化^[8-9,11],因此研究人员将 TGF- β_1 视为治疗平滑肌损伤修复的新方向。在细胞中添加适当的细胞因子可以对其生长及分化起到调控作用,但外源性细胞因子容易降解、半衰期短,不能长期发挥作用。将 TGF- β_1 基因通过转基因技术转染到 SUVECs 内并获得有效表达,则能够产生内源性细胞因子,通过自分泌和旁分泌方式对靶细胞产生持续作用。有利于进一步研究 TGF- β_1 对 SUVECs 的生物学效应。

本试验中构建了带有 TGF- β_1 基因的真核表达载体 pEGFP-C1-TGF- β_1 ,利用脂质体转染技术将 TGF- β_1 基因导入猪脐静脉内皮细胞中,希望将这种转染的 SUVECs 作为种子细胞,为血管组织工程提

供种子细胞来源,用于平滑肌细胞的损伤修复。pEGFP-C1-TGF- β_1 除了目的基因之外还含有加强型绿色荧光蛋白(EGFP)。EGFP 是一种优化的突变型绿色荧光蛋白(GFP),分子量较小,对细胞无毒性、稳定、无污染。能在异源细胞内表达后自发产生荧光,不需要显色底物且可活体观察,携带 GFP 的融合蛋白既具有 GFP 的绿色荧光,又能保持靶蛋白的生理功能,不干扰标记蛋白的功能和定位,因此较传统的报告基因如 LacZ、碱性磷酸酶等具有无可比拟的优势,已广泛应用于基因调控中的启动子分析、转基因、融合蛋白的亚细胞定位、以及细胞分化结局研究等领域,成为一种非常重要的遗传编码报告标签,是当前研究活体细胞中基因表达和蛋白质分布的最好手段,适合在哺乳动物细胞中表达^[12]。



M. DL2000 分子量标准; 1. β -actin; 2. TGF- β_1
M. DNA marker DL2000; 1. β -actin; 2. PCR products of TGF- β_1

图 5 TGF- β_1 扩增产物电泳结果

Fig. 5 Electrophoresis of the PCR products of TGF- β_1

pEGFP-C1 可表达与绿色荧光蛋白 C 端相连的融合蛋白, 便于观察目的蛋白的表达及定位。笔者将重组质粒转染 SUVECs 后, 通过 RT-PCR、直接荧光观察以及细胞间接免疫荧光检测, 证实转基因 SUVEC 在 RNA 水平和蛋白水平均有 TGF- β_1 的表达, 表明构建的真核表达载体 pEGFP-C1-TGF- β_1 已成功转染 SUVECs。为进一步研究 TGF- β_1 的生物学功能及对内皮细胞分化的诱导作用, 找到一种能应用于临床修复平滑肌损伤的方法提供一种新的技术手段, 对血管组织工程及基因治疗技术在临床中的应用具有深远意义。

参考文献:

- [1] SHIMIZU K, SUGIYAMA S, AIKAWA M, et al. Host bone-marrow cells are a source of donor intimal smooth muscle-like cells in the murine aortic transplant arteriopathy[J]. Nat Med, 2001, 7(2): 738-741.
- [2] MARCHETTI S, GIMOND C, ILJIN K, et al. Endothelial cells genetically selected from differentiating mouse embryonic stem cells incorporate at sites of neovascularization *in vivo*[J]. J Cell Sci, 2002, 115(4): 2 075-2 085.
- [3] MASSZI A, LINGZHI F, ROSIVAL L, et al. Integrity of cell-cell contacts is a crucial regulator of TGF-beta 1-induced epithelial-to-myofibroblast transition; role for TGF-beta catenin[J]. Am J Pathol, 2004, 165(6): 1 955-1 967.
- [4] ARCINIEGAS E, SUTTON A B, ALLEN T D, et al. Transforming growth factor β_1 promotes the differentiation of endothelial cells into smooth muscle-like cells *in vitro*[J]. J Cell Sci, 1992, 103(5): 521-529.
- [5] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫, 侯云德, 等译. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992.
- [6] YAMASHITA J, ITOH H, HIRASHIMA M, et al. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors [J]. Nature, 2000, 408: 92-96.
- [7] HALL S M, HISLOP A A, PIERCE C M, et al. Prenatal origins of human intrapulmonary arteries: formation and smooth muscle maturation[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000, 23: 194-203.
- [8] ISHISAKI A, HAYASHI H, LI A J, et al. Human umbilical vein endothelium-derived cells retain potential to differentiate into smooth muscle-like cells[J]. J Biol Chem, 2003, 278 : 1 303-1 309.
- [9] FRID M G, KALE V A, STENMARK K R. Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelium-mesenchymal transdifferentiation; *in vitro* analysis [J]. Circ Res, 2002, 90: 1 189-1 196.
- [10] ARCINIEGAS E, NAVES C Y, CARRILLO L M, et al. Endothelial-mesenchymal transition occurs during embryonic pulmonary artery development [J]. Endothelium, 2005, 12: 193-200.
- [11] DEISSLER H, DEISSLER H, LANG G K, et al. TGF-beta induces transdifferentiation of iBREC to alphaSMA-expressing cells[J]. Int J Mol Med, 2006, 18(4): 577-582.
- [12] GILBERT L, TOIVOLA J, LEHTOMAKI E, et al. Assembly of fluorescent chimeric virus-like particles of canine parvovirus in insect cells[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 313: 878-887.