

β1整合素-绿色荧光蛋白融合基因在角膜上皮细胞的功能性表达

王又冬,张劲松

(中国医科大学附属第四医院眼科,辽宁沈阳110005)

[摘要] 目的:将β1整合素-绿色荧光蛋白(GFP)融合基因转染兔角膜上皮细胞并检测其对各细胞外基质蛋白的黏附能力。方法:构建β1整合素-GFP融合基因真核细胞重组表达质粒,并将其转染至兔角膜上皮细胞。利用RT-PCR、Western印迹和荧光显微镜观察融合基因表达,同时检测转染细胞的增殖情况以及对各细胞外基质蛋白的黏附能力。结果:成功将β1整合素-GFP融合基因转染兔角膜上皮细胞并使其过表达;转染β1整合素对角膜上皮细胞增殖无明显影响,但使细胞对各细胞外基质蛋白的黏附能力明显增高。结论:建立了功能性β1整合素-GFP过表达的角膜上皮细胞模型,为研究β1整合素基因在角膜上皮细胞的功能及角膜细胞移植奠定基础。

[关键词] 角膜上皮细胞;β1整合素;绿色荧光蛋白;基因转染

[中图分类号] R799.65 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-4646(2007)05-0523-03

Transfection and characterization of β1-integrin-green fluorescent protein fusion gene in rabbit corneal epithelial cells

WANG You-dong, ZHANG Jin-song

(Department of Ophthalmology, The Fourth Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110005, China)

[Abstract] **Objective:** To transfect rabbit corneal epithelial (RCE) cells with β1-integrin-green fluorescent protein (GFP) fusion gene, and to detect the adhesive ability of transfected cells to extracellular matrix (ECM) protein. **Methods:** Eukaryotic expression vector encoding β1-integrin-GFP fusion DNA was constructed and transfected into RCE cells. The expressions of β1-integrin-GFP fusion gene was detected by reverse transcription polymerase chain reaction and Western blotting and observed under fluorescence microscope. The proliferation and the adhesive ability to extracellular matrix of RCE cells were determined. **Results:** The β1-integrin-GFP fusion gene was transfected into RCE cells successfully and overexpressed. The transfection had no effect on the proliferation of RCE cells, but it significantly promoted the adhesive ability to ECM protein. **Conclusion:** The functional RCE cells overexpressing β1-integrin-GFP fusion protein are established, and they can be used for the further biological study of the β1-integrin gene in RCE cells.

[Key words] corneal epithelial cells; β1-integrin; green fluorescent protein; gene transfection

利用培养的角膜上皮细胞行角膜移植是治疗角膜表面疾患的新尝试。β1整合素(β1-integrin)家族是与上皮细胞存活最为密切的相关因素之一^[1]。作者运用分子生物学手段构建β1整合素-绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)融合基因真核细胞重组表达质粒 pEGFP-N1/GFβ1,将其转染至角膜上皮细胞使β1整合素过表达,同时对角膜上皮细胞的增殖以及与各细胞外基质蛋白黏附能力进行了检测,为研究β1整合素基因的功能及角膜细胞移植奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和材料 细胞培养液采用 HamsF12 和 DMEM 的混和液(1:1),其中加有 10%胎牛血

清, 100 U/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素、0.02 mg/ml 谷氨酰胺, pH 值 7.2~7.4。

1.2 兔角膜上皮细胞的培养 体质量 2.5~3.0 kg 的成年荷兰家兔,无菌取出眼球,分离出仅含上皮层及基质层的角膜,胰蛋白酶中 4℃消化过夜。次日用刮刀轻柔刮取角膜上皮,加入含 10%胎牛血清的培养液 2 ml 轻轻吹打,使细胞均匀分散,接种于 24 孔或 6 孔培养板,置于 37℃,5%CO₂ 孵箱内培养。细胞增殖实验时,用培养液调整细胞浓度为 4×10⁵/ml,待用。

1.3 β1整合素-GFP融合基因重组表达质粒的构建 质粒 pBJ-1,由 Dr. Y. TAKADA (Scripps Research Institute, La Jolla, CA) 提供,其中含全长编码序列的β1整合素 cDNA。缺少终止密码子的全长β1整合素 cDNA 序列由 PCR 扩增获得,两端分别插入 BamH I 和 Xho I 酶切位点,组装入质粒 pT7Blue vector (Novagen, Madison, WI) 形成 pT7GFβ1,用 DNA 自动测序仪测定β1整合素 cDNA 序列。用 BamH I 和 Xho I 酶切 pT7GFβ1,回收 2.4 kb 片段,并将其

[基金项目] 教育部留学回国人员科研启动基金资助项目(教外司留[2005]383号)

[作者简介] 王又冬(1972-),女,副研究员,博士。

E-mail: wyoudong@mail.cmu.edu.cn

连接入 pEGFP-N1 vector (Clontech, Palo Alto, CA) 的相同酶切位点获得 $\beta 1$ 整合素-GFP 融合质粒 pEGFP-N1/GFP $\beta 1$, 酶切鉴定。以上实验在前期工作中已经完成。

1.4 基因转染 将 2~4 代细胞接种于培养板中至细胞达 80% 的融合, 采用 Lipofectamine (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD) 基因转染技术, 分别将 pEGFP-N1/GFP $\beta 1$ 表达载体及 pEGFP-N1 空载体转染细胞。 $\beta 1$ 整合素表达质粒转染细胞和空载体转染细胞分别命名为 $\beta 1$ 和空载体(Mock)。

1.5 RT-PCR 法检测转染细胞中转染基因的 mRNA 表达 细胞总 RNA 的提取采用 ISOGEN 总 RNA 提取试剂盒 (Nippon Gene, Tokyo, Japan)。电泳鉴定 RNA 质量并在 A260 nm 测其浓度。引物序列: *GFP*: sense 5'-GCAAGCTGACCCTGAAGTTCATC-3', anti-sense 5'-GGATCTTGAAATTCACCTTGATGC-3', 384 bp。 $\beta 1$ 整合素: sense 5'-AGAATCCAGAGTGTCC-CACTGG-3', antisense 5'-TTCCCTCATACTTCGGATTGA-3', 238 bp。 *GAPDH*: sense 5'-ACGCATTTGGTCG-TATTGGG-3', antisense 5'-TGATTTTGGAGGGATCTCGC-3', 231 bp。以正义 $\beta 1$ 整合素和反义 *GFP* 为引物来检测 $\beta 1$ 整合素-GFP 融合基因的表达情况, 产物长度 785 bp。按第一链合成试剂盒说明进行逆转录 (Takara, Kyoto, Japan)。PCR 扩增条件: 变性 95 °C 1 min, 退火 55 °C 1 min, 延伸 72 °C 1 min, 循环 30 次。PCR 产物以 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 用溴化乙锭染色后长波紫外灯下观测照相。

1.6 荧光显微镜观察融合基因表达 将 1×10^5 个角膜上皮细胞接种于 35 mm 培养皿中, 用 $\beta 1$ 整合素-GFP 融合基因表达质粒或空载体表达质粒分别转染细胞, 在紫外线激发波波长为 488 nm 处观察 GFP 在细胞内的表达。

1.7 Western 印迹检测 转染后 48 h 收集角膜上皮细胞, PBS 洗后离心弃上清, 适当体积裂解缓冲液重悬细胞, 超声裂解细胞 45 s, 4 °C 15 000 r/min 离心 20 min, 收集上清-70 °C 保存。BCA 定量试剂盒测定蛋白浓度。取等量蛋白泳道上样, 经 10% SDS-PAGE 电泳, 电转移至 PVDF 膜。封闭缓冲液封闭, 加入 1 : 500 抗 $\beta 1$ 整合素抗体 (美国 Cell Signaling 公司) 4 °C 孵育过夜。1 : 2000 稀释的酶标二抗室温孵育 1 h, TBS 洗净后, 增强化学发光剂显色, 观察。

1.8 WST-1 细胞增殖实验 将 RCE 细胞以 1×10^4 /孔接种于 24 孔板, 每孔 0.5 ml。24 h 后用 $\beta 1$ 整合

素-GFP 融合基因表达质粒或空载体表达质粒分别转染细胞, 每种浓度平行 4 孔, 并设立空白对照。分别于 24, 48, 72, 96, 120 h, 每孔加 50 μ l WST-1 (日本 TAKARA 公司), 37 °C 继续孵育 4 h。用 CS-9300PC 型酶标仪, 在 450 nm 波长测定吸光度。

1.9 细胞黏附实验 层黏连蛋白 (laminin, LN)、纤维黏连蛋白 (fibronectin, FN) 和 IV 型胶原蛋白 (collagen IV) 包被的 24 孔培养板购自 BD Biosciences 公司 (Bedford, MA)。对照组以 1% BSA 包被培养板。37 °C 1 mg/ml BSA 封闭各孔板 1 h 后, 将 $\beta 1$ 整合素-GFP 融合基因表达质粒或空载体表达质粒转染细胞按 5×10^4 个细胞 (500 μ l) 孔将细胞加入包被不同基质的 24 孔板, 5% CO₂ 培养箱内于 37 °C 孵育 1 h。PBS 漂洗 3 次移去悬浮细胞, 黏附细胞数经 WST-1 细胞增殖试剂盒测定吸光度进行评估。

1.10 统计学分析 各组数据差异显著性检验采用 *t* 检验和方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著意义。

2 结果

2.1 $\beta 1$ 整合素-GFP 融合基因在角膜上皮细胞中的表达 图 1 显示了空载体 (Mock) 及两次代表性 $\beta 1$ 整合素-GFP 融合基因转染角膜上皮细胞 ($\beta 1$ -1 和 $\beta 1$ -2) 的 RT-PCR 结果。结果表明 $\beta 1$ 整合素-GFP 融合基因已成功地转入角膜上皮细胞中并在 mRNA 水平有表达。此外, $\beta 1$ 整合素-GFP 融合基因转染细胞的 $\beta 1$ 整合素 mRNA 表达水平明显上调。

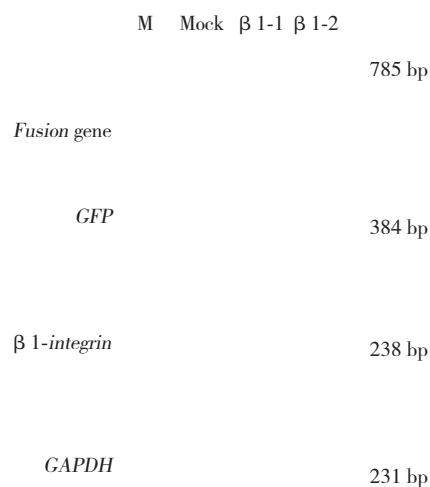
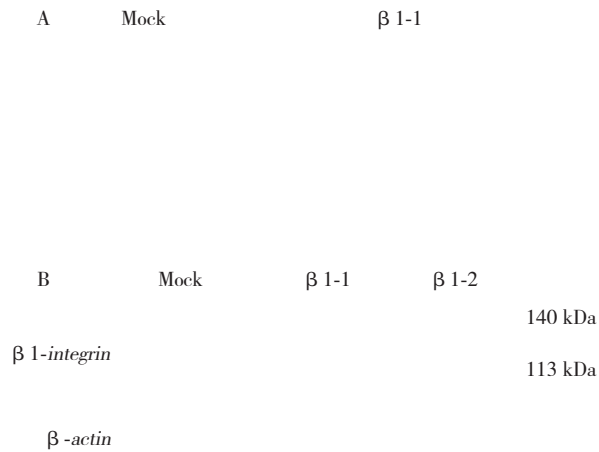


图 1 转染细胞转基因表达的 RT-PCR 结果

Fig.1 The expression of transgene in transfected cells detected by RT-PCR

2.2 $\beta 1$ 整合素-GFP 融合基因在角膜上皮细胞中的表达 在转染空载体的角膜上皮细胞中, 荧光均匀地分布于整个细胞, 仅有 GFP 表达。转染 $\beta 1$ 整合

素-GFP 融合基因的细胞中,GFP 绿色荧光集中在细胞膜及细胞膜附近的细胞质内,符合正常 $\beta 1$ 整合素的定位分布(图 2A)。140 kDa 大小条带(代表 $\beta 1$ 整合素-GFP 融合蛋白大小)和 113 kDa 大小条带(代表 $\beta 1$ 整合素蛋白大小)出现在 $\beta 1$ 整合素-GFP 转染的角膜上皮细胞中,而空载体转染细胞仅在 113- kDa 处出现 $\beta 1$ 整合素条带,表明 $\beta 1$ 整合素-GFP 融合蛋白已在角膜上皮细胞中融合表达。



A: 荧光显微镜; B: Western 印迹

图 2 转染细胞 GFP 和 $\beta 1$ 整合素的蛋白表达

Fig.2 The protein expression of GFP and $\beta 1$ -integrin in transfected cells

2.3 $\beta 1$ 整合素-GFP 融合基因转染对角膜上皮细胞体外增殖的影响 利用双因素方差分析空载体及两次代表性 $\beta 1$ 整合素-GFP 融合基因转染细胞的生长曲线,差异无统计学意义,表明至少 5 d 以内各细胞的生长速度无明显差异。

2.4 $\beta 1$ 整合素-GFP 融合基因转染对角膜上皮细胞体外黏附能力的影响 与空载体转染细胞相比, $\beta 1$ 整合素-GFP 融合基因转染细胞对各基质蛋白的黏附能力明显增高($P < 0.01$),而各细胞在 1% BSA 上的黏附情况则无显著差别。

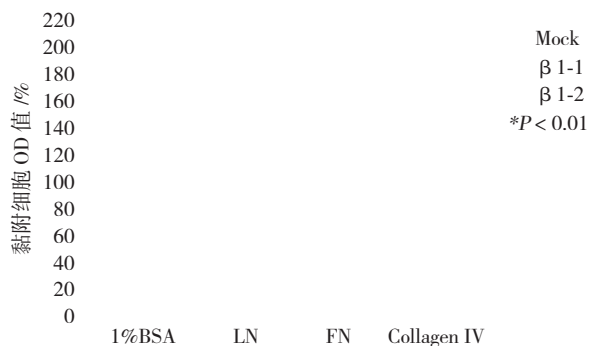


图 4 转染细胞对各细胞外基质蛋白的黏附作用

Fig.4 The adhesive ability of transfected cells to ECM proteins

3 讨论

$\beta 1$ 整合素家族是介导细胞外基质信号最主要的细胞表面受体,与细胞的增殖、分化、伸展和迁移密切相关^[2]。我们将 $\beta 1$ 整合素-GFP 融合基因转染至角膜上皮细胞使 $\beta 1$ 整合素过表达,明显增加了角膜上皮细胞与细胞外基质蛋白的黏附力。而细胞黏附是细胞移行和运动的前提,因此,在提高体外角膜上皮细胞存活措施中, $\beta 1$ 整合素的过表达应是不可缺少的重要因素之一。

作为一种理想的分子探针,GFP 已成为在细胞水平上分析蛋白质功能和动力学的重要荧光标记物。本实验 $\beta 1$ 整合素-GFP 融合基因在角膜上皮细胞中得到很高的表达,荧光显微镜观察表明 $\beta 1$ 整合素-GFP 融合蛋白表达后定位转运到细胞膜周围,与正常 $\beta 1$ 整合素表达位置完全一致。RT-PCR 及 Western 结果也进一步证实了转染细胞中有 $\beta 1$ 整合素外源基因的插入及过表达。这为今后观察活细胞实时定位,蛋白表达在细胞中的分布和转运提供了理想的细胞模型。 $\beta 1$ 整合素的功能性转染被细胞黏附实验所证实,与空载体转染细胞相比, $\beta 1$ 整合素-GFP 融合基因转染细胞对细胞外基质 LN、FN 和 IV 型胶原蛋白的黏附能力明显增高,提示细胞中过表达的 $\beta 1$ 整合素蛋白具有一定的生物学功能。尽管有报道 $\beta 1$ 整合素与一定细胞型细胞的增殖有关^[3],但通过对转染细胞生长曲线的研究发现, $\beta 1$ 整合素转染后角膜上皮细胞的生长速度至少 5 d 内无明显增加,说明 $\beta 1$ 整合素的过表达短期内并不影响角膜上皮细胞的增殖情况,而排除 $\beta 1$ 整合素对细胞增殖的影响将更有利于进行对 $\beta 1$ 整合素其他功能的研究。

现有资料表明, $\beta 1$ 整合素在角膜损伤后角膜上皮细胞中的表达逐渐上调,创伤愈合后减少,提示 $\beta 1$ 家族整合素中介的细胞外基质信号对角膜上皮细胞的修复具有重要的作用^[4]。本研究建立了 $\beta 1$ 整合素过表达的角膜上皮细胞模型,并观察了转入的 $\beta 1$ 整合素-GFP 融合基因在细胞内的表达、定位及功能,为进一步进行体外、体内研究 $\beta 1$ 整合素在角膜上皮细胞的作用奠定基础。

参考文献:

[1] PAJOOHESH-GANJI A, PAL-GHOSH S, SIMMENS SJ, et al. Integrins in slow-cycling corneal epithelial cells at the limbus in the mouse[J]. Stem Cells, 2006, 24(4): 1075-1086.

(下转第 528 页)