

文章编号:1000-5404(2013)09-0837-04

论著

慢病毒转染人角质形成细胞高表达核纤层蛋白 B1

李睿夫,彭代智,钱卫,王丽华,何斌,刘小玲,舒文婷,刘潇,周新,刘敬 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室)

[摘要] **目的** 通过对慢病毒载体稳定转染人角质形成细胞(HaCaT)株和未转染 HaCaT 细胞进行比较蛋白组学分析,找出其差异表达蛋白,寻找基因修饰组织工程表皮种子细胞生长特性改变的原因和可能存在的成瘤性安全隐患。**方法** 选择慢病毒载体稳定转染后生长特性发生明显改变的转染株细胞,采用二维电泳技术对该转染株和未转染株的总蛋白进行分离和比较,找出差异表达蛋白点,再进行串联质谱鉴定。从鉴定得到的差异蛋白中选择可能与细胞生长特性改变和肿瘤生成相关的核纤层蛋白 B1(lamin B1)采用 Western blot 和实时荧光定量 PCR 技术(qPCR)对其表达差异进行验证。**结果** 与未转染株比较,转染株在二维电泳中存在 11 个差异表达蛋白点,质谱从其中鉴定出 7 个蛋白质。选取其中与细胞增殖和凋亡相关的核纤层蛋白 B1 通过 WB 和 qPCR 证实其在转染株中蛋白和转录水平均存在明显的高表达。**结论** 慢病毒载体稳定转染株 HaCaT 细胞株相对未转染株核纤层蛋白 B1 高表达。这种高表达可能与转染株细胞生长特性改变和潜在的成瘤性隐患相关。

[关键词] 人角质形成细胞;慢病毒;蛋白组学;核纤层蛋白 B1

[中图分类号] R322.991; R394.33; R394.3 **[文献标志码]** A

Over-expression of lamin B1 in human immortal keratinocyte through lentiviral vector

Li Ruifu, Peng Daizhi, Qian Wei, Wang Lihua, He Bin, Liu Xiaoling, Shu Wenting, Liu Xiao, Zhou Xin, Liu Jing (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 40038, China)

[Abstract] **Objective** To determine the differences of human immortal keratinocyte line HaCaT with or without lentivirus-mediated CCL20 over-expression by proteomic analysis in order to investigate the cause of altered growth characteristics and potential threat of tumorigenicity in the seed cells for gene-modified tissue engineering. **Methods** Lentiviral vector (pHSE-CCL20-shRNA-GFP)-infected HaCaT cells with significant changes in growth characteristics and uninfected HaCaT cells were chosen as experimental and control cells, respectively. The differentially expressed proteins between them were revealed by two-dimensional electrophoresis, and these obtained proteins were further identified by LC-MS-MS. Lamin B1, which is closely related to tumorigenicity, cell growth and cell cycle, was picked out from these proteins and its differential expressions at protein and mRNA levels were validated by Western blotting and quantitative PCR (qPCR). **Results** Between these 2 cell lines, there were 11 differentially expressed proteins found by two-dimensional electrophoresis, and 7 proteins including lamin B1 identified from them by LC-MS-MS. Furthermore, increased expression of lamin B1 protein in lentiviral vector-infected HaCaT cells was proved by Western blotting as well as its mRNA expression by qPCR analysis. **Conclusion** An over-expression of lamin B1 protein is seen in lentiviral vector-infected human immortal keratinocyte, which may be correlated with altered growth characteristics of lentiviral vector-infected keratinocyte.

[Key words] human keratinocyte; lentiviral vector; proteomics; lamin B1

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81071575) and the Class I Spontaneous Project of State Key Laboratory (SKLZZ200904). Corresponding author: Peng Daizhi, Tel: 86-23-68754226, E-mail: dzpengpub@126.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81071575);国家重点实验室自主研究课题 I 类(SKLZZ200904)

[通信作者] 彭代智,电话:(023)68754226, E-mail: dzpengpub@126.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130308.1536.006.html>(2013-03-08)

病毒载体整合造成的癌基因激活和成瘤性改变一直是病毒载体介导的基因疗法可能产生的并发症中最为严重而致命的一种^[1-2]。我们在利用 CCL20 基因特异性 shRNA 重组慢病毒载体感染人永生角质形成细胞 (HaCaT), 以制造并筛选低免疫排斥反应的转基因组织工程皮肤种子细胞的过程中^[3], 发现其中多株转染细胞的生长曲线和细胞周期特性发生了明显改变^[4]。考虑到 CCL20 作为诱导免疫细胞的趋化因子, 其生物学作用明确; 无论是从机制上还是既往的体外研究报道, 都不存在影响细胞生长特性的可能^[5]。因此这一表型改变很可能是由慢病毒载体在 HaCaT 细胞基因组的整合造成的。为了寻找造成慢病毒载体转染 HaCaT 细胞株生长特性改变的原因, 筛查组织工程种子细胞可能存在的成瘤性安全隐患, 我们采用二维电泳技术观察转染株和未转染 HaCaT 细胞之间的差异蛋白表达, 并进行质谱鉴定。从中选取可能的关键分子核纤层蛋白 B1 (lamin B1), 通过 Western blot 和 qPCR 技术验证其表达水平。

1 材料与amp;方法

1.1 细胞系及其来源

在之前的研究中, 我们使用 CaCl₂ 法将 pHSER-CCL20-shRNA-GFP 载体转染 293FT 细胞包装出慢病毒颗粒, 以之转染 HaCaT 细胞。在 G418 压力下筛选出慢病毒转染的 HaCaT 细胞克隆。再从中筛选出 CCL20 基因表达稳定抑制的 5 个克隆^[3]。测量其生长曲线和细胞周期发现较未转染细胞具有较大改变^[4], 挑选其中生长曲线和细胞周期改变明显的第 IV 株作为实验细胞。

1.2 细胞培养

未转染 HaCaT 细胞和转染细胞株都采用 RPMI1640 培养基 (SH30809.01B, HyClone, 不含硝酸钙, 含 2.05 mmol/L 左旋谷氨酰胺), 于 5% CO₂、37 °C 恒温孵箱培养。

1.3 二维电泳

当细胞生长至 80% 融合度时, PBS 冲洗 3 遍后无菌细胞刮刮取贴壁细胞, 计数。调整细胞总数为 5 × 10⁷ 个后 3 000 r/min 离心 5 min 后去上清。向细胞压积中直接加入裂解液 { 尿素 7 mol/L; 硫脲 2 mol/L; 3-[(3-胆固醇氨丙基) 二甲氨基]-1-丙磺酸 (CHAPS) 4% (质量体积分数); DTT 65 mmol/L; Bio-Lyte 0.2% (质量体积分数); 溴酚蓝 0.001% (质量体积分数); 溶于去离子水中}, 冰上超声破碎 15 min 后离心。上清超滤柱 (Amicon® Ultra-0.5, Millipore) 离心 3 遍除盐浓缩。提取得到的总蛋白以 Bradford 法 (Invitrogen) 定量, 调节对照组和实验组上样量都为 1.5 mg 总蛋白, 溶于 700 μL 裂解液中。加入到放有 IPG 胶条 (ReadyStrip™ IPG Strips, pH 3-10 NL, Bio-rad) 的聚焦盘中, 50 V 恒压主动水化 12 h 后进行等电聚焦, 线性升压除盐, 聚焦条件为 60 000 V 时。聚焦结束后将胶条进行平衡, 然后分别转移到 10% SDS-PAGE 胶上, 低熔点琼脂糖 (161-3112, Bio-rad) 封胶后 Tri-甘氨酸电泳缓冲液 [Tris 25 mmol/L, glycine

192 mmol/L, SDS 0.1% (质量体积分数), pH 8.3] 体系中进行第二向电泳。5 mA 低电流下浓缩样品进入 SDS-PAGE 凝胶后 30 mA 恒流电泳, 直到溴酚蓝迁移至凝胶下端时结束电泳。取胶, 固定液 [无水乙醇 40% (体积分数); 冰醋酸 10% (体积分数)] 洗涤 30 min, 考马斯亮蓝染液染色 12 h。脱色液 [无水乙醇 10% (体积分数); 冰醋酸 7.5% (体积分数)] 脱色后 GS800 calibrated densitometer 凝胶扫描仪 (Bio-rad) 扫描凝胶获取图像。

1.4 图像分析

利用 PDQUEST 8.0.1 (Bio-rad) 对采集到的二维电泳凝胶灰度图像进行图像分析。以未转染 HaCaT 细胞凝胶作为对照组, 以转染细胞株电泳凝胶作为实验组。每组做 3 次生物学重复电泳, 共 6 张凝胶进行匹配。自动选择主胶, 将在 3 张以上的凝胶中出现的匹配点添加进入主胶。以局部回归模型作为标准化参数。匹配完成后以光密度值差异满足 *t* 检验, 差异可信区间为 95% 作为分析组筛选参数。筛选出差异表达的蛋白点。

1.5 质谱鉴定

对照差异蛋白点图像数据, 用切胶刀将蛋白点取下。原位酶解后送液质联用质谱分析 (HPLC-CHIP-MS/MS ION TRAP 6330, Agilent)。

1.6 蛋白印迹检测

选择质谱鉴定结果中的核纤层蛋白 B1 进行验证。以 HaCaT 细胞全蛋白作为对照组, 转染株细胞全蛋白作为实验组, 上样量均为 15 μg。采用 NuPAGE 4% ~ 12% Bis-tris Gel (NP0321, Invitrogen) 预制胶进行 SDS-PAGE 电泳。XCell II® Blot Module Kit (EI0002, Invitrogen) 湿转组件湿转 80 min 至 PVDF 膜上。酪蛋白封闭液封闭 30 min, 一抗孵育过夜 (12 h), 一抗采用 Anti-lamin B1 (ab16048, Rabbit polyclonal, Abcam), 以 Anti-GAPDH (ab9485, Rabbit polyclonal, Abcam) 作为内参抗体。洗膜后二抗孵育 40 min, 显色液 (上述封闭液、二抗、洗涤缓冲液以及显色液皆来自 WesternBreezeChemiluminescent Western Blot Immunodetection Kit, WB7106, Invitrogen) 显色 5 min 后 XRS 凝胶成像仪 (Bio-rad ChemiDoc® XRS) 下采集图像。

1.7 实时荧光定量 PCR

采用 E. Z. N. A.® Total RNA Kit I (R6834, OMEGA) 试剂盒分别提取未转染 HaCaT 细胞和转染细胞株的总 RNA。取 1 μg 总 RNA 作为模板, 采用 M-MLV 逆转录酶 (28025-013, Invitrogen) 进行逆转录。得到的 cDNA 采用 SYBR® Select Master Mix (472903, Invitrogen) 系统进行实时荧光定量 PCR, 以核纤层蛋白 B1 作为待测基因, GAPDH 为内参。cDNA 模板用量 100 ng, 引物如表 1 所示^[6-7]。每个目的基因设 4 个重复孔。数据通过 Sequence detection software 1.4 (Applied Biosystems) 进行处理, 按照公式 $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算出转染株细胞中核纤层蛋白 B1 转录本含量相对于未转染细胞的倍数。

表 1 实时荧光定量 PCR 所用引物

基因	寡核苷酸序列 (5' - 3')	产物长度	索引号
LaminB1	上游: AAAAGACAACCTCTCGTCGCAT	256 bp	NM_005573.3
	下游: CCGCTTTCCTCTAGTTGTACG		
GAPDH	上游: GGGGAAGGTGAAGCTCGGACTC	101 bp	NM_002046.4
	下游: TCGCTCTGGAAGATGGTGATG		

表2 差异蛋白点的质谱鉴定结果

编号	独特肽段	MS/MS 搜索得分	% AA 覆盖率	相对含量	蛋白名称	索引号(UniProtKB)
1704	6	115	18	2.57	Lamin B1	P20700
2605	29	520.69	44	2.62	Lamin B2	Q03252
3509	19	316.48	40	8.33	PDIA3 Protein disulfide-isomerase A3 precursor	P30101
4605	4	67.47	10	3.85	PRPF19 Pre-mRNA-processing factor 19	Q9UMS4
6501	6	109.19	17	4.85	NUP54 Isoform 2 of Nucleoporin p54	E7EUM5
8303	4	69.5	15	0.35	ALDOA 45 kDa protein	IPI00796333 (NCBI)
6805	15	272.93	25	0.33	EEF2 Elongation factor 2	P13639

相对含量为慢病毒载体转染细胞与未转染细胞平均 OD 值的比值;SSP 为凝胶上匹配蛋白点的索引序号

表3 实时荧光定量 PCR 结果

样本	Lamin B1 CT	GAPDH CT	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	归一化后的 Lamin B1 相对含量 (转染株比上 HaCaT) $2^{-\Delta\Delta Ct}$
转染株	26.851 ± 0.23	19.286 ± 0.23	7.565 ± 0.19	-1.951 ± 0.19	3.867(2.802 - 5.337)
HaCaT	28.412 ± 0.12	18.896 ± 0.15	9.516 ± 0.109	0	1(0.831 - 1.203)

1.8 统计学分析

二维电泳凝胶的差异蛋白分析采用 PDQUEST 8.0.1 软件进行,匹配完成后以光密度值差异满足 *t* 检验,差异可信区间为 95% 作为分析组筛选参数。筛选出差异表达的蛋白点 ($P < 0.05$)。其余统计学分析皆采用 SPSS 10.0 进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 转染株细胞的蛋白组学改变

对二维电泳凝胶(图1)进行分析后,共筛选出差异蛋白点 11 个,采用串联质谱鉴定,成功鉴定出蛋白 7 个(表2)。

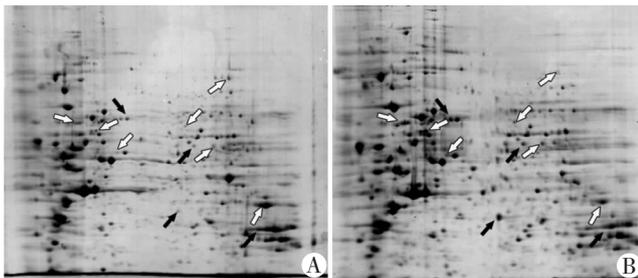
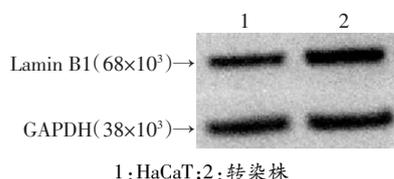


图1 转染株和未转染株细胞全蛋白二维电泳凝胶结果
 白点,↑为未能鉴定出的差异蛋白点
 A:未转染细胞;B:转染细胞株

图1 转染株和未转染株细胞全蛋白二维电泳凝胶结果

2.2 转染细胞株的核纤层蛋白 B1 蛋白表达

在鉴定出的 5 种高表达差异蛋白中,我们选择核纤层蛋白 B1 作为转染细胞株生长特性发生改变的潜在关键分子进行了蛋白印迹实验以验证二维电泳结果的可靠性。结果显示,核纤层蛋白 B1 蛋白水平在转染株细胞中显著上调 [(1.41 ± 0.34) vs (0.95 ± 0.17)] ($P = 0.038$),与二维电泳结果相符合(图2)。



1:HaCaT;2:转染株

图2 Western blot 检测 Lamin B1 蛋白在转染株和未转染株中的表达

2.3 实时荧光定量 PCR

为了进一步验证核纤层蛋白 B1 的差异表达情况。我们采用实时荧光定量 PCR 对转染株细胞和 HaCaT 细胞的核纤层蛋白 B1 编码基因的 mRNA 含量进行了比较。结果显示核纤层蛋白 B1 在转染株细胞中表达显著上调 [(3.87 ± 1.06) vs (1.00 ± 0.16) $P < 0.01$],趋势与之前蛋白含量结果相一致(表3)。

3 讨论

基因疗法中使用病毒载体进行转染操作带来的成瘤性隐患一直是该疗法安全性的潜在威胁。例如曾有文献报道采用逆转录病毒基因疗法治疗 X 染色体相关性重度免疫缺陷病的过程中,逆转录病毒 DNA 意外插入癌基因附近,造成患者发生白血病的病例^[2]。同理,对于表皮细胞,有研究显示,人乳头瘤病毒(HPV)等病毒 DNA 在良性疣、癌前病变、鳞状细胞癌和基底细胞癌患者病灶细胞中的检出率分别为 90.9%、60.4%、59.7% 和 27.8%,而在健康人对照组中仅为 4.7%,病毒 DNA 的插入在皮肤肿瘤的产生中扮演着重要角色^[8]。因此,使用重组慢病毒载体转染人角质形成细胞得到的皮肤组织工程种子细胞也可能存在成瘤性的风险^[9]。我们在之前的研究中已经观察到在体外培养中转染株细胞的生长特性与未转染 HaCaT 细胞相比存在着改变,这种改变不能用 CCL20 基因的敲低来解释^[5],很可能是慢病毒载体对细胞基因组的插入造成的。无论是生长特性的改变,还是成瘤性的产生。这些表型上的改变必然体现在细胞的蛋白层面。差异蛋白组学技术已广泛应用于肿瘤研究^[10],无论是对于筛查可靠敏感的肿瘤标志物还是寻找肿瘤发生的关键蛋白都有着独特的优势^[11]。因此,我们选择慢病毒转染后发生生长特性改变的转染株 HaCaT 细胞株和未转染细胞株进行差异蛋白组学分析,以期找

出改变转染株细胞生长特性的关键因子,筛查种子细胞可能存在的成瘤性隐患。

在对差异蛋白组学分析鉴定出的7种差异表达蛋白(表1)进行文献分析后,我们对其中的核纤层蛋白B1蛋白产生了兴趣。核纤层蛋白B1作为核被膜的主要成分,维持细胞核的完整性,为转录的顺利进行提供支架^[8,12],其生物学功能与细胞增殖关系密切^[12],其表达增高往往预示着细胞增殖活跃,很可能是转染细胞株生长特性发生改变的重要原因。同时,在肝癌、宫颈癌等多种肿瘤组织中核纤层蛋白B1的表达都有着明显的上调,而且与肿瘤预后也有着密切的相关性^[13-15],其高表达很可能预示着潜在的成瘤性隐患。而CCL20作为趋化因子,在离体培养和非炎症应激状态下无已知的生物学活性^[5],不可能对核纤层蛋白B1的表达产生影响。我们进一步对核纤层蛋白B1的表达情况通过Western blot和qPCR进行验证后,证实lamin B1在慢病毒载体稳定转染HaCaT细胞株中不仅在蛋白质水平呈高表达,而且mRNA转录也显著增强。可见其表达改变在转录层面已经发生,这也间接支持这种表达差异很可能是由慢病毒载体对细胞基因组的插入造成的。我们有理由认为,病毒DNA的插入直接或间接的造成了核纤层蛋白B1的高表达,这种高表达与细胞生长特性的改变有着密切关系,同时预示着转染株细胞可能有着潜在的成瘤性隐患。

尽管我们已经证实核纤层蛋白B1在该转染株细胞中相对未转染HaCaT细胞表达上调,且这种高表达在mRNA和蛋白层面都存在。但这一现象也给我们带来了新的疑问。首先,核纤层蛋白B1虽然在众多研究中被视为潜在的肿瘤标志物,与细胞增殖高度相关。但其作为细胞重要的结构蛋白,本身并非癌基因或原癌基因。其高表达往往提示细胞增殖活跃,并不能证实该转染株细胞一定具有成瘤性。其次,病毒载体DNA插入造成核纤层蛋白B1的表达改变的具体机制尚不明确。病毒DNA可能插入了核纤层蛋白B1编码基因本身,使得其表达产生改变;也可能插入其调控序列^[16],或者其插入造成了核纤层蛋白B1上游因子的表达改变,最终间接引起了核纤层蛋白B1表达的继发性改变。

为了进一步探索病毒载体插入导致核纤层蛋白B1高表达的具体机制,我们将对转染株细胞病毒DNA的整合位点进行分析,同时采用ITRAQ等更高通量的比较蛋白组学技术和表达谱芯片等差异表达谱分析技术对转染株细胞的基因改变进行更为全面的分析,希望能够找出病毒DNA插入与核纤层蛋白B1表

达改变之间的具体关系,更全面的了解病毒载体转染对该种子细胞造成的影响,验证其安全性,为通过慢病毒载体设计安全可靠的组织工程种子细胞提供指导。

参考文献:

- [1] Wang G P, Berry C C, Malani N, *et al.* Dynamics of gene-modified progenitor cells analyzed by tracking retroviral integration sites in a human SCID-X1 gene therapy trial[J]. *Blood*, 2010, 115(22): 4356-4366.
- [2] Kaiser J. Gene therapy. Seeking the cause of induced leukemias in X-SCID trial[J]. *Science*, 2003, 299(5606): 495.
- [3] 王丽华, 彭代智, 刘敬, 等. CCL20基因敲低型组织工程皮肤种子细胞的克隆筛选及其干扰效果[J]. *中华外科杂志*, 2010, 47(8): 621-624.
- [4] 何斌, 彭代智, 何升东, 等. CCL20基因敲低型人永生角质形成细胞克隆的体外生长特性观察[J]. *细胞生物学杂志*, 2009, 31(6): 863-866.
- [5] 岳海岭, 彭代智. CCL20的结构与功能[J]. *免疫学杂志*, 2004, 20(3): S100-S102.
- [6] Constantinescu D, Gray H L, Sammak P J, *et al.* Lamin A/C expression is a marker of mouse and human embryonic stem cell differentiation[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(1): 177-185.
- [7] Pfefferle A D, Warner L R, Wang C W, *et al.* Comparative expression analysis of the phosphocreatine circuit in extant primates: Implications for human brain evolution[J]. *J Hum Evol*, 2011, 60(2): 205-212.
- [8] Iftner A, Klug S J, Garbe C, *et al.* The prevalence of human papillomavirus genotypes in nonmelanoma skin cancers of nonimmunosuppressed individuals identifies high-risk genital types as possible risk factors[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(21): 7515-7519.
- [9] Pfister H. Chapter 8: Human papillomavirus and skin cancer[J]. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2003(31): 52-56.
- [10] Swami M. Proteomics: A discovery strategy for novel cancer biomarkers[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(9): 597.
- [11] Kuramitsu Y, Nakamura K. Proteomic analysis of cancer tissues: shedding light on carcinogenesis and possible biomarkers[J]. *Proteomics*, 2006, 6(20): 5650-5661.
- [12] David R. Nucleoskeleton: Uncovering roles for lamin B[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(1): 3.
- [13] Chow K H, Factor R E, Ullman K S. The nuclear envelope environment and its cancer connections[J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(3): 196-209.
- [14] Sun S, Xu M Z, Poon R T, *et al.* Circulating Lamin B1 (LMNB1) biomarker detects early stages of liver cancer in patients[J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(1): 70-78.
- [15] Butin-Israeli V, Adam S A, Goldman A E, *et al.* Nuclear lamin functions and disease[J]. *Trends Genet*, 2012, 28(9): 464-471.
- [16] Feitelson M A, Lee J. Hepatitis B virus integration, fragile sites, and hepatocarcinogenesis[J]. *Cancer Lett*, 2007, 252(2): 157-170.

(收稿: 2012-12-15; 修回: 2013-02-06)

(编辑 汪勤俭)