

[文章编号] 1007-3949(2008)16-02-0097-04

• 实验研究 •

胱抑素 C 基因真核表达载体的构建及在转染的人主动脉平滑肌细胞中的表达

王 群, 鹿庆华, 蒋卫东, 杜贻萌, 王 欣, 郝 琳, 董兆强, 徐冬玲, 盛 林

(山东大学第二医院心内科, 山东省济南市 250033)

[关键词] 病理学与病理生理学; 血管平滑肌细胞; 胱抑素 C 基因; 克隆; 表达载体

[摘要] 目的 克隆人胱抑素 C 基因及构建胱抑素 C 基因真核表达载体并研究其在人血管平滑肌细胞中的表达。方法 培养人脐静脉内皮细胞系, 并从中提取总 RNA, 采用逆转录聚合酶链反应扩增胱抑素 C 基因, 构建其真核表达载体, 双酶切及聚合酶链反应鉴定阳性克隆, 转染人血管平滑肌细胞, 逆转录聚合酶链反应及 Western blot 法检测其表达情况。结果 成功克隆人胱抑素 C 基因及构建其真核表达载体, 转染后成功高表达。结论 克隆人胱抑素 C 基因及构建其真核表达载体成功, 转染人血管平滑肌细胞获得其高表达。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Construction and Expression of Eukaryotic Expression Vector Containing Gene Cystatin C

WANG Qun, LU Qing-Hua, JIANG Wei-Dong, DU Yi-Meng, WANG Xin, HAO Lin, DONG Zhao-Qiang, XU Dong-Ling, and SHENG Lin

(Department of Cardiovascular Disease, the Second Hospital of Shandong University, Jinan 250033, China)

[KEY WORDS] Vascular Smooth Muscle Cell; Cystatin C Gene; Clone; Expression Vector

[ABSTRACT] **Aim** To clone human Cystatin C gene and construct its eukaryotic expression vector to observe the expression in the human vascular smooth muscle cells (VSMC). **Methods** Cystatin C gene was obtained from human endothelial cells by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Molecular cloning technique was used to construct this kind of eukaryotic expression vector. pCDNA3.1-Cystatin C was identified by restriction enzyme and PCR. Using liposome-mediated transfection, the eukaryotic expression vector pCDNA3.1-Cystatin C was transfected into human VSMC and proved by RT-PCR and Western blot. **Results** The eukaryotic expression vector pCDNA3.1-Cystatin C was constructed correctly and was highly expressed in human VSMC. **Conclusion** Cystatin C was cloned successfully, its eukaryotic expression vector was constructed correctly and was expressed highly in human VSMC.

胱抑素 C (Cystatin C, CysC) 作为半胱氨酸蛋白酶强效的内源性抑制剂, 参与机体许多生理和病理过程^[1]。近年来的研究发现, 胱抑素 C 在动脉粥样硬化、动脉瘤以及经皮冠状动脉腔内成形术 (percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA) 后再狭窄等疾病的病理过程中可能发挥重要调控作用, 而这些疾病发生发展与血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 的生物学活性以及血管重构密切相关^[2]。本实验构建了 pCDNA3.1-胱抑素 C 基因真核表达载体, 转染人 VSMC 并分析其表达, 为进一步研究胱抑素 C 在血管重塑过程中的生物学特性打下了基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

DMEM 培养基、Ham's F12K 培养基和胎牛血清购自美国 GIBCOBRL 公司, 胰酶及 DMSO 购自美国 Sigma 公司, 限制性核酸内切酶 BamH I 和 Xba I 购自美国 Takara 生物工程有限公司, RNA 提取试剂和逆转录试剂盒购自 Invitrogen 公司, 质粒小量提取试剂盒、质粒大量提取试剂盒及胶回收试剂盒购自 Omega 公司, 人脐静脉内皮细胞购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。羊抗人胱抑素 C 多克隆抗体、内参 β -actin 一抗及相关二抗购自美国 Santa Cruz 公司。马抗羊二抗购自北京中山试剂公司。pCDNA 3.1 真核表达载体由山东大学生物化学实验室提供。

1.2 人脐静脉内皮细胞系的培养

人脐静脉内皮细胞系 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 的培养采用 Ham's F12K 培养基,

[收稿日期] 2007-10-22 [修回日期] 2008-01-08

[基金项目] 山东省自然科学基金 (Y2005C12); 山东省中医管理局资助项目 (2005-043)

[作者简介] 王群, 硕士研究生, 主治医师, E-mail 为 wqwinter@126.com。通讯作者鹿庆华, 硕士, 主任医师, 研究方向为临床冠状动脉介入治疗及术后狭窄基础与临床干预的研究, E-mail 为 lqzhy@163.com。蒋卫东, 博士, 副主任医师。

其中含有 2 mmol/L L-谷氨酰胺, 1.5 g/L 碳酸氢钠, 0.1 g/L 磷脂酸, 0.3 g/L ECGS, 10% 胎牛血清。培养条件为 5% CO₂, 37 °C。细胞活化后培养于多聚赖氨酸 (poly-D-lysine, PDL) 处理过的培养皿中, 培养 2~3 天后, 用含 0.02% EDTA 的胰酶 (0.5 mg/L) 消化, 使细胞不再贴壁, 轻轻吹打, 然后均匀地分配到两个培养皿中。重复此操作, 直到细胞数量达到需要。所有实验中, 细胞都先在由 PDL 处理过的培养皿中培养 18~24 h 后再进行实验。

1.3 人血管平滑肌细胞的培养与鉴定

实验取材于水囊引产胎儿, 胎龄为 18±2 周, 健康, 性别不限, 取材前均取得当事人同意并签字。胎儿经水囊引产后 1 h 内在无菌条件、显微解剖镜下仔细解剖出主动脉段。将解剖出的各组织段置于 4 °C DMEM 培养基中, 于引产后 24 h 内进行原代细胞培养, 即将组织段置于 4 °C DMEM 培养基中洗涤凝血后, 在显微解剖镜下剥除血管和动脉导管的外膜, 纵形剪开管腔, 内膜面向上, 用锐利的刀片刮去内膜, 4 °C DMEM 培养基漂洗 3 次后, 将组织块剪成 0.5~1 mm³ 大小, 将修剪的小组织块用吸管吸入无菌试管内, 用 4 °C DMEM 培养基反复清洗直至液体变为清亮, 用吸管将组织块按 4~5 块/cm² 的种植密度均匀种植于直径 60 mm 培养皿的中央为 24 mm×48 mm 的狭长区域, 然后用 24 mm×48 mm 消毒盖玻片小心盖在组织块上并轻压组织块, 将含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基 (内含 100 ku/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素, 由 NaHCO₃ 和 HEPES 调 pH 值为 7.2) 滴加在盖玻片上, 使培养基由盖玻片上流至培养皿中, 液体量以刚没过盖玻片为宜, 静止培养, 直至在各自组织块周围细胞生长融合形成单层, 进入传代培养。当培养皿中的细胞在各自组织块周围生长融合形成单层时, 吸除培养基, PBS 洗涤后加入 0.1% 胰酶约 3 mL, 在倒置显微镜下观察, 至伸展的细胞有立体感或稍变圆, 立即终止胰酶的消化, 清洗后加入含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基进行吹打, 长在盖玻片上的细胞可立即进行实验或胰酶消化后吹打入培养皿中, 将消化吹打下来的 VSMC 继续培养, 当其在整个培养皿中密度约为 80 % 时, 按常规方法进行 1:2 传代培养。•-actin 免疫组织化学染色法行细胞鉴定, 倒置相差显微镜照相。

1.4 总 RNA 的提取及胱抑素 C 基因的扩增

将以上培养好的 HUVEC 从六孔细胞培养板 (细胞浓度为 5×10⁸ 个/L) 中培养基吸出后, PBS 清洗细胞三次, 每次约 5 min; 吸净 PBS 后, 每孔中加入 1 mL Trizol, 静置 10 min 后, 收集细胞于微量离心管中, 置

于冰上 10 min, 加入 200 μL 氯仿, 在振荡器上振荡几秒钟, 4 °C 12 000 r/min 离心 10 min; 将上清吸出, 放入装有 500 μL 异丙醇的微量离心管, 上下颠倒均匀, 沉淀 10 min; 4 °C 12 000 r/min 离心后得 RNA 沉淀; 将 RNA 溶于 DEPC 水中, 测定其含量后, 进行逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)。取 2 μL RNA 做逆转录, 得单链 cDNA; 根据 GenBank 数据库中人胱抑素 C 基因序列, 设计一对引物, 上游引物为 5'-TTT GGA TCC CGC AGC GGG TCC TCT CTA TG-3', 下游引物为 5'-GGG TCT AGA ACC TCC TGC AAT AAA ATA GT-3', 在上、下游引物的 5' 端分别引入 BamH iv 和 Xba iv 酶切位点, 建立如下反应体系: cDNA 1 μL, 上、下游引物各 1 μL, 10×PCR 缓冲液 2 μL, 1 μL MgCl₂, 2 μL dNTP, 0.5 μL Taq 聚合酶, ddH₂O 11.5 μL。反应条件为: 95 °C 预变性 120 s, 94 °C 变性 40 s → 52 °C 退火 40 s → 72 °C 延伸 60 s, 共 30 个循环, 最后于 72 °C 延伸 600 s, 产物放于 -20 °C 冰箱中冻存。同时, 冻存液送至上海生工测序, 测序结果正确。

1.5 胱抑素 C 真核表达质粒 pCDNA3.1-胱抑素 C 的构建

按前述实验方法从人 HUVEC 细胞株中提取 RNA, RT-PCR 法扩增获得含 BamH iv 和 Xba iv 双酶切位点的胱抑素 C 全基因序列; 将获得的 DNA 于 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳分离, 胶回收所需的胱抑素 C 全基因序列; 将胱抑素 C 全基因序列连接至 Simple T 载体上, 热激转化入感受态大肠杆菌中, 然后将大肠杆菌涂板于含 X-Gal、IPTG 和氨苄青霉素的 LB 固体培养基上, 37 °C 培养过夜后, 形成单菌落, 挑取白色菌落于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中 37 °C、250 r/min 培养 6~8 h 后, 提取质粒; 将提取获得的质粒进行 PCR 鉴定, 确定为阳性克隆后, 酶切质粒; 将酶切获得的 DNA 于 1.0% 的琼脂糖凝胶中电泳分离后, 胶回收所需的胱抑素 C 全基因序列备用; 将 pCDNA3.1 表达载体热激转化入感受态大肠杆菌, 培养后提取质粒, 利用 BamH iv 和 Xba iv 双酶切质粒后, 于 1.0% 的琼脂糖凝胶中电泳分离 DNA, 胶回收所需的载体片段; 将胱抑素 C 全基因序列和载体片段利用 T₄ 连接酶连接, 体系为胱抑素 C 全基因序列 9 μL, 载体片段 3 μL, T₄ 连接酶 2 μL, 连接缓冲液 2 μL, dd H₂O 4 μL; 16 °C 连接过夜; 将连接获得的质粒热激转化入感受态大肠杆菌, 培养后提取质粒, 利用 PCR 及 BamH iv 和 Xba iv 双酶切鉴定获得阳性克隆; 将构建好的胱抑素 C 真核表达质粒 pCDNA3.1-胱抑素 C 于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基

中 37℃、250 r/min 培养后, 利用质粒大量抽提试剂盒获取转染用的质粒。

1.6 pCDNA3.1-胱抑素 C 转染人血管平滑肌细胞

将 pCDNA3.1-胱抑素 C 1 μg 与 6 μL Lipofect Amine2000 和 100 μL DMEM 在微量离心管中放置 30 min, 将混合物加入已吸去培养基的人 VSMC 培养板中, 再加入 800 μL 无氨变的 DMEM 培养约 7 h 后, 换完全培养基分别培养细胞 12 h、24 h 和 48 h, 提取 RNA 及蛋白质, 利用 RT-PCR 及 Western blot 法检测转染细胞中胱抑素 C 的表达。

1.7 表达产物的逆转录聚合酶链反应检测

利用 Trizol 提取总 RNA。首先在含 RNA 的 DEPC 水中加入 oligo dT 1 μL, 70℃退火 6 min; 然后将产物置于冰上 2 min 后, 加入 4 μL 5× 反应缓冲液, 1 μL RNase 抑制剂, 2 μL 10 mmol/L dNTP 和 1 μL 逆转录酶后在 37℃下反应 1 h, 72℃下反应 10 min 得单链 cDNA; 将 RT 所得的 cDNA 进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为 94℃变性 40 s → 52℃退火 40 s → 72℃延伸 60 s, 循环数为 30 个, 72℃再延伸 600 s, 终止反应。1.5% 琼脂糖凝胶电泳显示 PCR 产物。

1.8 表达产物的 Western blot 检测

将成功转染 pCDNA3.1-胱抑素 C 的 VSMC 裂解, 蛋白上清按 Bradford 法确定溶液的蛋白质含量后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 对蛋白质样品进行分离后, 将蛋白质条带电转移至硝酸纤维素膜上, TBST 洗膜, 5% 的脱脂牛奶封闭, 加入羊抗人胱抑素 C 多克隆抗体 (1:1 000 稀释) 37℃振荡 2~3 h, TBST 洗膜, 加入马抗羊二抗 (1:5 000 稀释) 37℃振荡杂交 1 h, PBS 洗膜后化学发光法曝光并分析结果。

2 结果

2.1 人血管平滑肌细胞的培养及鉴定

倒置相差显微镜下, 7 天左右组织块周围细胞融合呈峰谷状 (图 1A)。细胞进行传代培养后, 可见 99% 培养的细胞呈 α-actin 免疫组织化学染色阳性反应 (棕黄色, 图 1B), 证明所培养的细胞为 VSMC。

2.2 重组质粒 pCDNA3.1-胱抑素 C 酶切及聚合酶链反应鉴定结果

选择重组的克隆提取质粒, 经 BamH I 和 Xba I 双酶切鉴定切出目的基因片段, 电泳结果 (图 2) 表明, 胱抑素 C 基因与载体 pCDNA3.1 已成功连接。利用 PCR 鉴定技术证明在 pCDNA3.1-胱抑素 C 重组质粒上存在胱抑素 C 特异片段的表达, 表明胱抑素 C 与真核表达质粒 pCDNA3.1 重组成功 (图 2)。

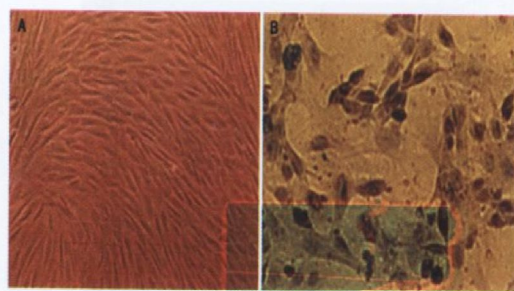


图 1. 人血管平滑肌细胞的培养结果 (×100) 及 α-actin 免疫组织化学鉴定 (×400)

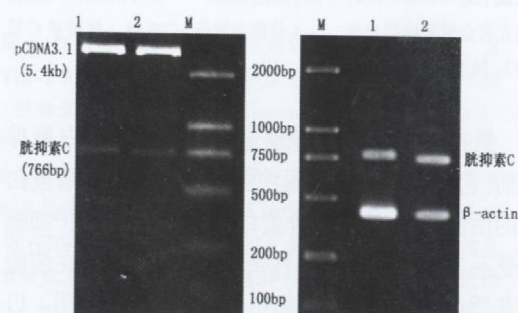


图 2. pCDNA3.1-胱抑素 C 质粒酶切 (左) 及聚合酶链反应 (右) 鉴定结果 M 为相对分子质量, 1 和 2 为 pCDNA3.1-胱抑素 C 质粒。

2.3 表达胱抑素 C 的人血管平滑肌细胞的逆转录聚合酶链反应鉴定结果

RT-PCR 结果表明, 在脂质体的帮助下, 重组质粒 pCDNA3.1-胱抑素 C 进入人 VSMC 中并在瞬时转染 12、24 及 48 h 后均在 mRNA 水平表达上升, 同时在 24 h 时表达效率最高 (图 3)。

2.4 表达胱抑素 C 的人血管平滑肌细胞的 Western blot 鉴定结果

Western blot 结果证明, 重组质粒 pCDNA3.1-胱抑素 C 进入人 VSMC 中并在瞬时转染 12、24 及 48 h 后在蛋白质水平表达也同样上升, 在 24 h 时表达效率最高 (图 3)。

3 讨论

胱抑素 C 是一种低分子量非糖基化蛋白质, 相对分子质量为 13.4 kDa, 能在所有有核细胞中持续、恒定地转录和表达, 并且广泛分布在人的体液中。人类编码胱抑素 C 的基因位于第 20 号染色体上, 大约为 4.3 kb, 包含 3 个外显子, 2 个内含子, 其 mRNA 的表达无明显组织特异性。

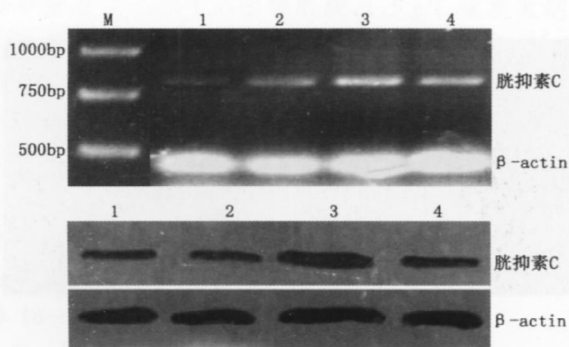


图3. 表达胱抑素 C 的人平滑肌细胞逆转录聚合酶链反应 (上图) 及 Western blot (下图) 鉴定结果 M 为相对分子质量, 1 为正常血管平滑肌细胞, 2~4 分别为转染 pCDNA3.1-胱抑素 C 质粒 12、24 和 48 h。

胱抑素 C 作为一种确定的半胱氨酸蛋白酶抑制剂, 它的一个重要生理功能是调节半胱氨酸蛋白酶的活性, 参与细胞内外蛋白水解的调控, 保护细胞免受不当内源性或外源性蛋白酶水解, 并且在细胞外基质合成与降解的平衡中发挥重要调控作用。以往研究发现胱抑素 C 参与肿瘤的浸润性生长及转移^[3]、炎症的发生与发展^[4] 以及脑血管疾病^[5,6] 等过程。而近来的研究发现, 胱抑素 C 还与动脉粥样硬化^[7,8]、动脉瘤^[9] 以及 PTCA 术后再狭窄^[10] 等疾病的发生发展密切相关。为进一步探讨胱抑素 C 基因的生物学特性、探索可能的信号通路以及为以后的基因治疗奠定基础, 克隆胱抑素 C 基因并构建胱抑素 C 表达载体以及获得活性胱抑素 C 蛋白是非常重要的。

本实验在遵循引物设计原则的基础上, 根据 GenBank 收录的人胱抑素 C 基因核苷酸序列 (NM-000099), 设计一对胱抑素 C 基因的特异引物, 并分别在上下游引入了限制性内切酶 BamH I 和 Xba I 酶切位点, 因而使 PCR 扩增出的胱抑素 C 基因序列两端分别含有 BamH I 和 Xba I 酶的识别序列, 同时非病毒型表达载体 pCDNA3.1 的多克隆位点中存在 BamH I 和 Xba I 酶切位点, 从而使外源性 DNA 片段经双酶切后产生的末端完全匹配, 为成功构建真核表达载体 pCDNA3.1-胱抑素 C 奠定了基础。

转染是将外源 DNA 或 RNA 导入细胞的过程。由于 VSMC 与动脉粥样硬化、动脉瘤以及 PTCA 术后再狭窄等疾病的发生发展密切相关, 本实验选择

VSMC 作为转染细胞。哺乳动物常规的转染方法有两种: 瞬时转染和稳定转染。瞬时转染可在 2~3 天内通过收集被转染的细胞进行基因表达分析。脂质体介导的基因转染方法已在多种基因治疗实验中成功应用, 是目前基因治疗临床研究方案中应用较多的基因传递方法。本实验通过脂质体将胱抑素 C 基因瞬时转染人 VSMC, 观察到细胞在转染 24 h 时基因表达效率最高, 提示人 VSMC 在转染后 24 h 表达胱抑素 C 能力最强, 可为以后进一步探讨胱抑素 C 在人 VSMC 中的生物学特性提供最佳研究时间。

胱抑素 C 作为既存在于细胞内又存在于细胞外的强效的内源性半胱氨酸蛋白酶抑制剂, 不仅在细胞外基质分解与合成过程中发挥非常重要的调控作用, 对周围细胞的影响亦不容忽视。本实验成功克隆了胱抑素 C 基因并构建 pCDNA3.1-胱抑素 C 真核表达载体, 同时研究了胱抑素 C 基因在 VSMC 中的表达, 为进一步探讨胱抑素 C 基因的生物学特性以及以后的基因治疗奠定了基础。

[参考文献]

- [1] B-kenkamp A, Herget-Rosenthal S, B-kenkamp R. Cystatin C, kidney function and cardiovascular disease [J]. *Pediatr Nephrol*, 2006, **21** (9): 1 223-230.
- [2] Sukhova GK, Wang B, Libby P, et al. Cystatin C deficiency increases elastic lamina degradation and aortic dilatation in apolipoprotein E-null mice [J]. *Circ Res*, 2005, **96** (3): 368-375.
- [3] Wang B, Sun J, Kitamoto S, et al. Cathepsin S controls angiogenesis and tumor growth via matrix-derived angiogenic factors [J]. *J Biol Chem*, 2006, **281** (9): 6 020-029.
- [4] Mangge H, Iehmann P, Tanil H, et al. Cystatin C: an early indicator for incipient renal disease in rheumatoid arthritis [J]. *Clin Chim Acta*, 2000, **300** (122): 1 951-953.
- [5] Gresser O, Weber E, Hellwig A, et al. Immunocompetent astrocytes and microglia display major differences in the processing of the invariant chain and in the expression of active cathepsin L and cathepsin S [J]. *Eur J Immunol*, 2001, **31** (6): 1 813-824.
- [6] Cathcart HM, Huang R, Lanham JS, et al. Cystatin C as a risk factor for Alzheimer disease [J]. *Neurology*, 2005, **64** (4): 755-757.
- [7] Bengtsson E, To F, Hakansson K, et al. Lack of the cysteine protease inhibitor cystatin C promotes atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Bio*, 2005, **25** (10): 2 151-156.
- [8] Jornsjo S, Wuttge DM, Sirsjo A, et al. Differential expression of cysteine and aspartic proteases during progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Am J Pathol*, 2002, **161** (3): 939-945.
- [9] Abdu-Hussien H, Soekhoe RG, Weber E, et al. Collagen degradation in the abdominal aneurysm: a conspiracy of matrix metalloproteinase and cysteine collagenases [J]. *Am J Pathol*, 2007, **170** (3): 809-817.
- [10] Burns-Kurtis CL, Olzinski AR, Needle S, et al. Cathepsin S expression is up-regulated following balloon angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, **62** (3): 610-620.

(此文编辑 许雪梅)