

慢病毒介导 ATP7B 基因转染对骨髓间充质干细胞在高铜环境中生存能力的影响

邵存华, 陈圣林, 董天赋, 成峰*

(南京医科大学第一附属医院肝脏移植中心, 江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:**探讨慢病毒转染 ATP7B 基因能否提高骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, MSCs)在高铜环境中的生存能力。**方法:**全骨髓贴壁法培养 Wilson 病模型 LEC 大鼠的 MSCs; 构建含有 ATP7B 基因的慢病毒载体 pWPT-ATP7B 及对照慢病毒载体 pWPT-GFP 并转染 MSCs, 获得表达 ATP7B 基因的 MSCs^{ATP7B} 细胞及对照组 MSCs^{GFP} 细胞。利用细胞免疫荧光、Real-time PCR、Western blot 长期监测 ATP7B 基因表达; 并以 HepG2 细胞系作为阳性对照, 利用 SRB 法监测给予不同浓度铜离子处理的干细胞增殖情况。**结果:**MSCs CD90、CD29 表达阳性, CD45、CD11b 表达阴性; 细胞免疫荧光、Western blot 及 RT-PCR 显示 MSCs^{ATP7B} 细胞的 ATP7B 基因能够长期稳定表达; SRB 结果显示, 高铜环境中 MSCs^{ATP7B} 细胞的生存能力显著高于 MSCs^{GFP} 细胞及 HepG2 ($P < 0.05$)。**结论:**ATP7B 基因修正的 LEC 大鼠 MSCs 可有效对抗铜蓄积损害, 为 Wilson 病的治疗提供可能的新方法。

[关键词] ATP7B; 骨髓间充质干细胞; Wilson 病; LEC 大鼠

[中图分类号] Q813

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)05-569-06

doi:10.7655/NYDXBNS20130502

The protective effect of overexpressed ATP7B in bone marrow-derived mesenchymal stem cells against copper toxicity

Shao Cunhua, Chen Shenglin, Dong Tianfu, Cheng Feng*

(Liver Transplantation Center, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of ATP7B overexpression for the survival of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) of LEC rat in presence of various copper concentrations *in vitro*. **Methods:** Bone marrow cells were isolated from the femurs of LEC rat by flushing with rat MSCs growth medium; the lentivirus package system carrying ATP7B/green fluorescent protein (GFP) gene was constructed, and MSCs were infected by the virus. The expression of ATP7B was measured by immunofluorescence, Western blot and Real-time PCR. The SRB assay was used to analyze the viability of MSCs and HepG2 in the presence of various copper concentrations. **Results:** We successfully built up LEC rat MSCs^{ATP7B} which can stably express high level of ATP7B *in vitro*. In the SRB assay, the viability of MSCs^{ATP7B} was significantly higher than that of either MSCs^{GFP} or HepG2 in the presence of high copper concentrations. **Conclusion:** MSCs of LEC rat rescued by ATP7B can effectively antagonize copper toxicity *in vitro*, and may represent a novel strategy for therapy of Wilson disease.

[Key words] ATP7B; bone marrow-derived mesenchymal stem cells; Wilson disease; LEC rat

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(5): 569-574]

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81070324); 省卫生厅重点项目(H201102); 卫生厅开放课题(ZX05200906); 省六大人才高峰项目(2009)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: docchengfeng@njmu.edu.cn

Wilson 病是一种常染色体隐性遗传病, 其致病基因位于 13q14.3^[1]。由于基因突变导致其编码的 P 型铜转运蛋白 ATP7B 功能缺失导致铜离子在肝、脑、肾等器官沉积, 表现为以肝脏、神经系统损害为主的多系统损害^[2]。目前对该病的治疗主要包括早期的铜离子螯合剂和终末期肝脏疾病的肝移植治

疗。但患者服药依从性、药物治疗疗效及不良反应和供肝短缺限制了传统治疗方法^[3-4]。

近年来,骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, MSCs)因其自我更新、多向分化和损伤组织定植能力等受到再生医学关注。研究证实 MSCs 可在体内及体外分化为肝脏细胞、神经细胞等多种成体细胞^[5-6]。在多种肝脏损伤模型中, MSCs 移植后早期通过分泌多种细胞因子及蛋白修复损伤肝脏,分化为肝细胞后发挥正常肝细胞功能^[7-8]。本研究利用含有 ATP7B 基因的慢病毒载体转染大鼠 MSCs,体外研究 MSCs 介导 ATP7B 基因治疗 Wilson 病的可能性。

1 材料和方法

1.1 材料

80~100 g 雌性 LEC (Long Evans Cinnamon) 大鼠(艾伯特爱因斯坦医学院 S. Gupta 教授提供)饲养于南京医科大学实验动物中心,12 h 明暗交替,室温 18~23℃。FBS、CuCl₂、青链霉素(美国 Gibco 公司),大鼠 MSCs 培养基(广州赛业生物),抗 GAPDH 抗体、抗 ATP7B 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司),抗鼠 CD45、CD29、CD90、CD11b 抗体(美国 eBioscience 公司),SRB 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(南京凯基生物),肝癌细胞株 HepG2 由卫生部活体肝移植重点实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 LEC 大鼠 MSCs 分离、培养及鉴定

10%水合氯醛腹腔注射麻醉,肝素化后,无菌环境下取胫骨和股骨,大鼠 MSCs 培养基反复冲洗骨髓腔,将骨髓细胞冲出后 200 目滤网过滤。1 × 10⁶ 个/ml 重悬于大鼠 MSCs 培养基,并接种于 10 cm 培养皿,24 h 首次换液,48 h 第 2 次换液,后每 2~3 d 换液 1 次,7~9 d 细胞近 80%融合时,1:3 传代。利用 MSCs 的贴壁特性,去除不贴壁细胞,以便捷、简单的方法纯化 MSCs。取 5~8 代生长状态良好的细胞 1 × 10⁶ 个,用山羊血清冰上封闭 30 min, PBS 清洗、重悬后 1 500 r/min 离心 5 min,加入抗鼠 CD45-FITC、抗鼠 CD29-PE、抗鼠 CD90-FE、抗鼠 CD11b-FITC 抗体,4℃避光孵育 30 min,流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司)测定 MSCs 表面抗原。

1.2.2 含有 ATP7B 基因慢病毒的包装制备和转染

将 pcDNA3.1-ATP7B (南京医科大学第一附属医院陆森教授惠赠)中长度约 4.5 kb 编码人 ATP7B 蛋白的 cDNA 亚克隆到 pWPT-GFP 中,获得 pWPT-

ATP7B 质粒。采用前述磷酸钙法转染^[9],将 pWPT-ATP7B 及 pWPT-GFP 分别与包装质粒 pCMV-8.91、pCMW-VSV-G 共转染 HEK293T 细胞,转染后 48 h 收取病毒上清。选取 5~8 代状态良好、50%~70%融合的 MSCs, PBS 冲洗后加入制备好的病毒液和 polybrene (8 μg/ml), 4 h 后补加等量完全培养基, 24 h 换液。72 h 后观察绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 表达情况, 获得 MSCs^{ATP7B}、MSCs^{GFP} 细胞。

1.2.3 细胞免疫荧光

按照文献^[10]的方法,取 MSCs^{ATP7B} 及 MSCs^{GFP} 细胞制作细胞爬片, PBS 洗 3 次, 以 -20℃ 预冷的甲醇固定 10 min, PBS 洗 3 次。含 0.5% Triton X-100 和 5% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 的 PBS 室温封闭 30 min, 再以抗 ATP7B 抗体 (1:50 稀释) 4℃ 孵育过夜, 充分洗涤, 加含 Rhodamine isothiocyanate (红色) 标记的兔抗鼠 IgG (1:100 稀释), 室温作用 1 h, 充分洗涤, 以正置荧光显微镜 (E600 Epi, 日本 Nikon 公司) 观察记录结果。

1.2.4 Real-time PCR

TRIzol 法提取 MSCs、MSCs^{ATP7B}、MSCs^{GFP} 及 HepG2 细胞的总 RNA, 逆转录得各种细胞 cDNA 文库。ATP7B 上游引物: 5'-GACCTTCTCTGTGCTGAT-3'、下游引物: 5'-GTCTGTCATAGCGTCACT-3', GAPDH 上游引物: 5'-CCATGTTTCGTCATGGGTGTGAACCA-3'、下游引物: 5'-GCCAGTAGAGGCAGGGATGATGTTTC-3'。Real-time PCR 应用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (日本 TaKaRa 公司) 试剂盒, 在 ABI PRISM[®] 7300 型荧光定量仪进行, 反应体系: SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (2×) 10 μl, 模板 2 μl, 上、下游引物各 0.5 μl, 灭菌蒸馏水 7 μl。反应条件: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 30 s, 循环 40 次。

1.2.5 Western blot

用 RIPA 裂解细胞, 提取总蛋白, BCA 法测定蛋白含量, 加入蛋白上样缓冲液后 100℃ 煮 5~10 min。6% SDS-PAGE 电泳分离蛋白。采用湿转法转膜, 5% BSA 室温封闭 1 h。一抗 4℃ 孵育过夜, TBS-T 摇床漂洗 3 次, 每次 10 min, 加 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h, TBS-T 漂洗后 ECL 显色。

1.2.6 测定 MSCs^{ATP7B}、MSCs^{GFP} 与 MSCs 生长曲线

取第 5~8 代状态良好的 MSCs、MSCs^{ATP7B} 和 MSCs^{GFP} 细胞, 在细胞生长到约 70%~80% 融合时, 以 1 × 10⁴ 个/孔接种于 24 孔板, 培养第 1~8 天每天定时消化 3 个复孔计数细胞量, 绘制细胞生长曲线。

1.2.7 SRB 法检测铜毒性试验

选用上述 MSCs、MSCs^{ATP7B}、MSCs^{GFP} 及对数生长期 HepG2 肝癌细胞以 1×10^4 个/孔密度接种于 96 孔板。第 2 天,细胞融合 80%~90%,加入含不同浓度 CuCl₂ 的大鼠 MSCs 培养基。对照组不添加 CuCl₂,实验组添加 CuCl₂,浓度分别是 0.05、0.25、0.50、0.75、1.00 mmol/L。每种细胞每个浓度设 4 个复孔。72 h 后弃去培养基,每孔加入 10%三氯乙酸固定液,4℃ 放置 40 min,灭菌蒸馏水冲洗后加入碘酞罗丹明 B 染液 100 μl/孔,室温染色 15 min,1%醋酸冲洗后,每孔加入 150 μl 10 mmol/L 非缓冲 Tris 碱液。酶标仪测定 540 nm 处吸光度值。细胞生存率以实验组吸光度值占对照组吸光度值的百分率表示。

1.3 统计学方法

采用 SPSS18.0 统计软件进行数据分析,所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。各组间采用方差分析进行比较,并以 LSD-*t* 检验对不同处理组间的数据进行两两比较, $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

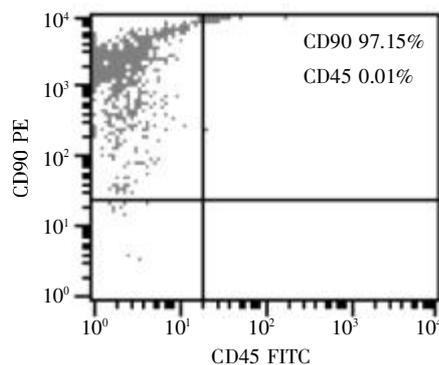


图 2 大鼠 MSCs 流式检测结果

Figure 2 Fluorescence-activated cell sorting analysis of rat MSCs

2 结果

2.1 大鼠 MSCs 培养与鉴定

全骨髓贴壁法培养,经贴壁筛选得到大鼠 MSCs 呈梭形,旋涡状生长(图 1)。多次传代后仍保持良好的形态及增殖能力。经流式细胞仪检测,其表面标志物 CD90、CD29 阳性,CD45、CD11b 阴性(图 2)。

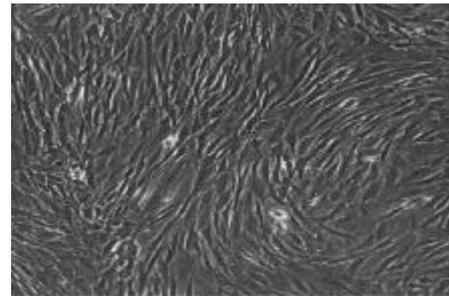
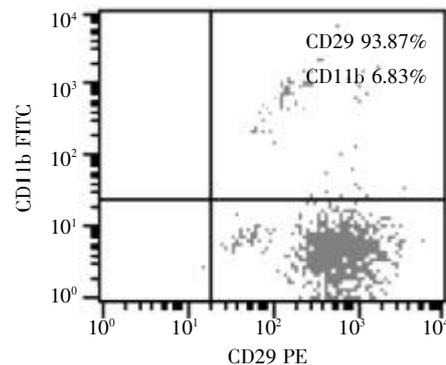


图 1 第 6 代 MSCs 的形态(x100)

Figure 1 The morphology of MSCs culture at passage 6 (x100)



2.2 大鼠 MSCs 慢病毒转染及免疫荧光

构建含有 ATP7B 质粒及对照空白质粒后,共转染 293T,获得含病毒上清。测定滴度后,感染 MSCs,并在荧光显微镜下观察感染效率(图 3)。获得 MSCs^{ATP7B}、MSCs^{GFP} 后,细胞免疫荧光检测 ATP7B 表达,结果显示 MSCs^{ATP7B} 阳性率大于 95%,MSCs^{GFP} 无免疫荧光(图 4)。

2.3 ATP7B 长期表达检测

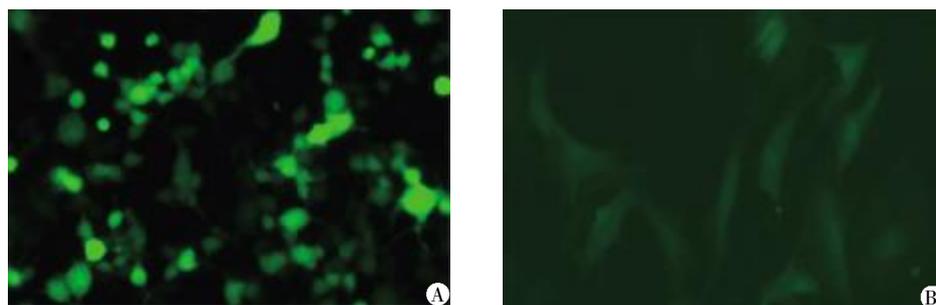
将各组 MSCs 连续传 20 代,每周提取蛋白及 RNA 检测 ATP7B 表达情况。结果显示 MSCs 及 MSCs^{GFP} 细胞有极低量的 ATP7B 表达,MSCs^{ATP7B} 细胞 ATP7B 表达量显著提高(图 5A、5B),且 MSCs^{ATP7B} 细胞不同时间 ATP7B 表达量变化无显著差异(图 5C)。

2.4 MSCs 生长曲线

细胞生长曲线显示(图 6),慢病毒转染对 MSCs 增殖无明显影响。各种细胞第 1~2 天处于潜伏期,第 3~6 天处于对数生长期,第 7 天后进入平台期。

2.5 MSCs 对抗铜毒性

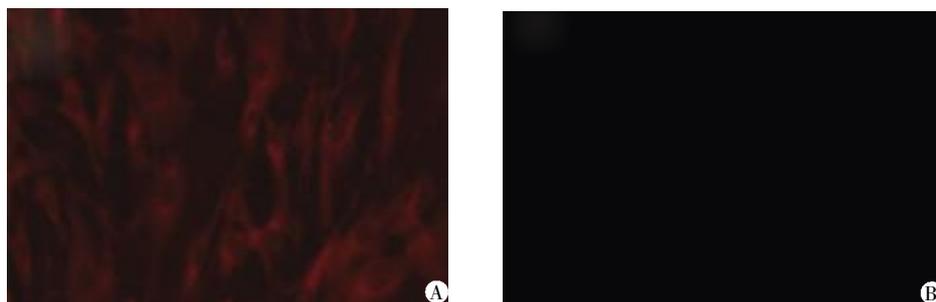
SRB 法检测各种细胞在不同铜离子浓度下的生存能力(图 7),设定对照组生存率为 100%,铜离子浓度小于 0.25 mmol/L 时,各种细胞生存率无明显差异;随铜离子浓度升高,MSCs^{ATP7B} 细胞生存率缓慢下降[(80 ± 16)%],其他各种细胞生存率显著下降;铜离子浓度达到 1.00 mmol/L,除 MSCs^{ATP7B} 保持较高生存率外,其余细胞生存率极低[(5 ± 4)%]。该结果表明,高表达 ATP7B 的 MSCs^{ATP7B} 能有效对抗铜毒性。



A: 含 pWPT-GFP 病毒共转染 HEK293T 细胞($\times 50$); B: 含 pWPT-GFP 病毒感染 MSCs($\times 100$)。

图3 病毒包装、感染效率测定

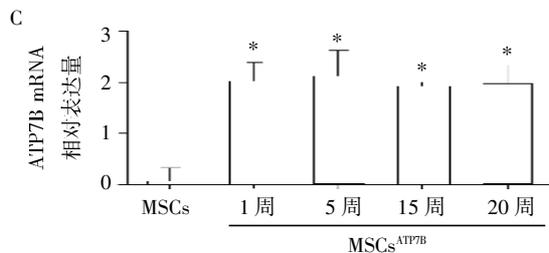
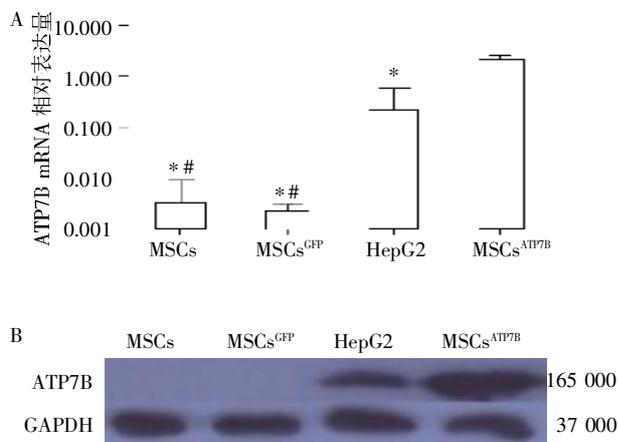
Figure 3 Production of lentivirus and the detection of infection efficiency



A: MSCs^{ATP7B}; B: MSCs^{GFP}。

图4 免疫荧光检测 MSCs 中的 ATP7B 表达($\times 100$)

Figure 4 Immunofluorescence of MSCs stained with ATP7B-specific antibody($\times 100$)



A: 各种细胞 ATP7B mRNA 的表达水平。与 MSCs^{ATP7B} 比较, $*P < 0.05$; 与 HepG2 比较, $^{\#}P < 0.05$ 。B: 各种细胞 ATP7B 蛋白表达水平。C: MSCs^{ATP7B} 细胞不同时间的 ATP7B mRNA 表达检测, 与 MSCs 比较, $*P < 0.05$ 。

图5 各种细胞 ATP7B 表达

Figure 5 The expression of ATP7B in each cell line

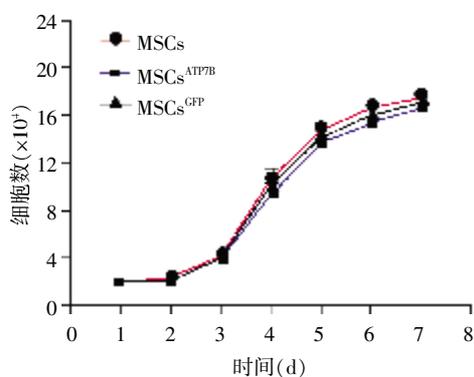
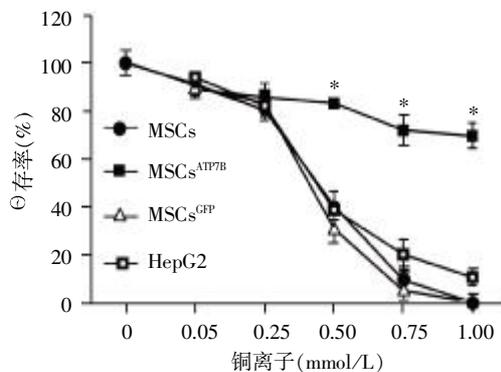


图6 MSCs 的细胞生长曲线

Figure 6 Growth curve of MSCs



MSCs^{ATP7B} 组与 HepG2、MSCs^{GFP}、MSCs 组比较, $*P < 0.05$ 。

图7 ATP7B 慢病毒转染显著提高 MSCs 生存率

Figure 7 Viability of MSCs is improved after ATP7B transduction