

一种人硫氧还蛋白基因修饰肝细胞的制备

李 华, 汪根树, 张 剑, 姜 楠, 贾昌昌, 杨 扬, 陈规划
(中山大学附属第三医院肝脏移植中心, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】制备出一种人硫氧还蛋白(hTrx)基因修饰的肝细胞。【方法】逆转录聚合酶链反应法扩增出 hTrx cDNA,应用重组逆转录病毒制备 hTrx 基因修饰大鼠肝细胞。白蛋白免疫组化 SABC 法进行肝细胞活性鉴定,MTT 比色试验进行抗氧化应激能力检测。【结果】克隆出 hTrx 开放阅读框 cDNA 并制备出重组逆转录病毒,感染真核细胞后可分泌融合表达的 hTrx 并具有生物学活性。制备出 hTrx 基因修饰大鼠肝细胞,免疫组化 SABC 法显示肝细胞功能正常,MTT 比色法检测具有较强的抗氧化应激能力($P < 0.05$),并可有效增殖。【结论】成功制备出一种具有较强抗氧化应激的 hTrx 基因修饰肝细胞。

关键词: 肝细胞; 人硫氧还蛋白; 基因修饰

中图分类号: R363 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2010)04-0572-05

Preparation of Human Thioredoxin Gene-modified Hepatocytes

LI Hua, WANG Gen-shu, ZHANG Jian, JIANG Nan, JIA Chang-chang YANG Yang, CHEN Gui-hua
(Liver Transplantation Center, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objective】 To prepare the human thioredoxin (hTrx) gene-modified hepatocytes. 【Methods】 hTrx cDNA was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), recombinant retrovirus was applied to primary cultured rat hepatocyte for infection to generate hTrx gene-modified rat hepatocytes, whose viability and antioxidative capacity were examined with albumin-immunohistochemical staining and MTT assay, respectively. 【Results】 The hTrx open reading frames cDNA was cloned and assembled with recombinant retrovirus, then eukaryotic cells infected by this virus were capable of expressing bioactive hTrx in the form of fusion proteins. Immunohistochemistry demonstrated normal function of the hTrx gene-modified hepatocytes, which possessed strong antioxidative capacity as shown by MTT assay and could be proliferated effectively. 【Conclusion】 The hTrx gene-modified hepatocyte with more stronger antioxidative capacity is prepared.

Key words: hepatocyte; human thioredoxin; gene modification

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2010,31(4):572-576]

人硫氧还蛋白(human thioredoxin, hTrx)是目前已知 Trx 中活性最好的蛋白,由 Trx 构成的氧化还原系统广泛存在于组织细胞中,具有清除自由基和维持体内稳定的氧化还原状态的重要作用,对缺血再灌注损伤有明确的保护作用。Trx 也可通过对转录因子如 NF- κ B 等的调节作用,促进细胞的增殖及抑制细胞的凋亡等^[1-2]。研究发现 Trx 对肝细胞生存生长具有明显的促进作用^[3],同时其抗氧化和凋亡抑制作用,因此可在肝细胞移植和生物人工肝细胞保存方面发挥重要作用。但

能否持久地促进肝细胞的增殖,减少凋亡和氧化应激成为 Trx 应用的关键。本实验成功进行了 hTrx 基因修饰肝细胞的制备,修饰后的肝细胞表现出较强的抗氧化应激能力,可缓解细胞损伤等。

1 材料和方法

1.1 hTrx cDNA 基因克隆

根据 GenBank 中 hTrx cDNA 序列(J04026)设计引物,引入 *Bgl* II、*Bam*H I 酶切位点,并加入对

收稿日期: 2009-04-29

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(2009CB522404);国家自然科学基金(30772135)

作者简介: 李华,博士,副主任医师,E-mail:lihua100@yeah.net

框序列 TT (不含终止子 TAA)。引物:正向 5'-GCAGATCTATGGTGAAGCAGATCGAGAG-3',反向 5'-GCCGATCCTTGACTAATTCATTAATGGTGGCTT C-3'。异硫氰酸胍一步法从 143(TK-)人骨肉瘤细胞中提取模板 RNA。应用锚定引物 oligo(dT) 15 逆转录合成 cDNA 第一条链,聚合酶链反应(PCR)扩增 hTrx cDNA 基因,插入载体质粒 pGEM-T Easy 构建重组质粒 pGEM/hTrx,并进行基因序列测定。质粒的制备、纯化、酶切、连接及转化按常规方法进行。

1.2 含 hTrx 基因的重组逆转录病毒载体的构建

大量制备逆转录病毒载体 pLEGFP-N1 (购自 Clontech 公司),将其和 pGEM/hTrx 分别行 *Bgl* II、*Bam*H I 联合酶切、回收、连接。筛选鉴定含 hTrx 基因的重组质粒 pLEGFP/hTrx。

1.3 重组逆转录病毒的制备

运用磷酸钙共沉淀转染法进行重组逆转录病毒的制备。取 pLEGFP/hTrx,电泳定量约 1 g/L。加入 2.5 mol/L CaCl₂,加至复苏的 PA317 细胞(胚胎成纤维细胞)表面,可见细密沉淀钙粒形成。37 °C 下 CO₂ 培养箱内培养 8 h,加入含 100 mL/L 小牛血清的 DMEM 培养液,置 37 °C 培养箱内 72 h。2.5 g/L 胰酶消化后按 1:3 传代,质量浓度为 400 μg/mL 的 G418(一种氨基糖苷类抗生素)筛选高表达细胞株。14 d 时有多个抗性克隆形成,细胞克隆单瓶培养至抗性细胞形成单层,消化传代后,加入 DMEM 培养液(不含 G418)培养;收集细胞上清液进行病毒浓缩纯化。加入预冷饱和硫酸铵,透析纯化浓缩,经 0.22 μm 微孔滤膜除菌处理。

1.4 重组逆转录病毒滴度测定

复苏 NIH3T3 细胞(小鼠胚胎成纤维样细胞),铺满培养瓶后,2.5 g/L 胰酶消化,培养接种于 24 孔培养板。将制备的多组病毒液均相应作 10⁴、10⁵ 和 10⁶ 倍稀释接种在细胞表面;37 °C,5%体积分数 CO₂ 条件下培养 72 h,荧光显微镜下观察每孔含荧光的细胞数,计算病毒滴度,选择最高滴度的病毒液为实验用重组病毒。重组质粒含 EGFP,与目的基因表达的蛋白融合,荧光显微镜下显现绿色荧光,较好地反映重组逆转录病毒的形成情况及感染活性。

1.5 重组逆转录病毒感染细胞后 hTrx 表达和活性测定

用胰岛素还原实验进行重组逆转录病毒感染

细胞后 hTrx 表达和活性测定。取重组逆转录病毒液,接种于 NIH3T3 细胞表面。37 °C,5%体积分数 CO₂ 条件培养后取上清液,取不同体积(25 μL、50 μL、100 μL)上述标本,加入实验用 Buffer,30 °C 反应,检测波长为 650 nm 时的吸光度。另取空质粒 pLEGFP-N1、DMEM 培养基制备对照组,本实验前期制备的 hTrx 作为标准品阳性对照(1 μmol/L,2.5 μmol/L,10 μmol/L)^[2]。比较各组酶反应速度(某一浓度的酶在达到最大吸光度值时与所用最小时间之间的比值,用以反映该酶反应的活性)。

1.6 hTrx 基因修饰大鼠肝细胞的制备

原代 SD 大鼠肝细胞的培养方法同前所述^[2]。将分离的大鼠肝细胞按 1 × 10⁶ 细胞/mL 接种于涂有多聚赖氨酸培养瓶中,加入含 100 mL/L 小牛血清 DMEM 培养基培养,加入重组逆转录病毒原液及 8 μg/mL polybrene(凝聚胺)作用 3 h;重复感染一次,继续培养 48 h,至培养肝细胞 80% 成片,以 400 μg/mL G418 筛选肝细胞抗性克隆并生长稳定成片,荧光显微镜下观察肝细胞中荧光蛋白表达情况。空质粒 pLEGFP-N1 制备的逆转录病毒制备对照组肝细胞。

1.7 hTrx 基因修饰大鼠肝细胞活性鉴定

白蛋白免疫组化 SABC 法进行肝细胞活性鉴定。将制备的病毒感染肝细胞以 2.5 g/L 胰酶消化后接种于盖玻片上,37 °C,5%体积分数 CO₂ 培养 4 h 使细胞贴壁紧密,丙酮固定。一抗兔抗鼠白蛋白单克隆抗体(1:200),二抗生物素化 HRP-山羊抗兔单克隆抗体 IgG(1:4000)。DAB 显色,以细胞浆内出现棕黄色颗粒为阳性染色。正常大鼠原代培养肝细胞作为阳性对照。

1.8 hTrx 基因修饰大鼠肝细胞抗氧化应激能力检测

MTT 比色试验进行抗氧化应激能力检测。将肝细胞(hTrx 基因修饰大鼠肝细胞、空质粒 pLEGFP-N1 转染病毒感染肝细胞及正常大鼠肝细胞)制成单细胞悬液,以每孔 100 μL,细胞数 10⁴ 接种于 96 孔培养板上,培养至细胞 80% 成片,加入实验浓度为 200 μmol/L H₂O₂ 作用 12 h、24 h 和 48 h,每孔加入新鲜配制的 MTT(5.0 g · L⁻¹) 25 μL 作用 4 h,待出现蓝色结晶后,加入二甲基亚砜(DMSO) 150 μL,震荡使其溶解,570 nm 波长下测定各组不同时间吸光度值,绘制生

长曲线。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件包处理,组间均数比较采用单因素方差分析,率的比较为 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 克隆基因的序列

克隆上的 hTrx 开放阅读框 cDNA 基因序列为 315 bp(含起始子 ATG、不含终止子 TAA),推导氨基酸数 104 个(不含起始子 ATG 编码的 Met)。另外可见 *Bgl* II、*Bam*H I 识别位点及对框碱基 TT。与已知序列比对 2 个碱基发生改变:第 117 位 C→G、第 221 位 C→T,这可能由于模板来源不同所致,其它碱基完全一致。推导的氨基酸序列,第 39 位 Asn→Lys,第 74 位 Thr→Met,存在活性位点保守序列—Trp—Cys³²—Gly—Pro—Cys³⁵—Lys—,以及其外侧 3 个半胱氨酸 Cys 残基 Cys⁶²,Cys⁶⁹ 和 Cys⁷³。

2.2 pLEGFP/hTrx 的筛选

重组质粒经 *Bam*H I 单酶切后,1%琼脂糖凝胶电泳见 7 172 bp 处有一光亮带;*Bgl* II、*Bam*H I 双酶切后在 323 bp、6 849 bp 处各有一光亮带,与理论值完全一致,确定为 pLEGFP/hTrx 重组载体质粒(图 1)。

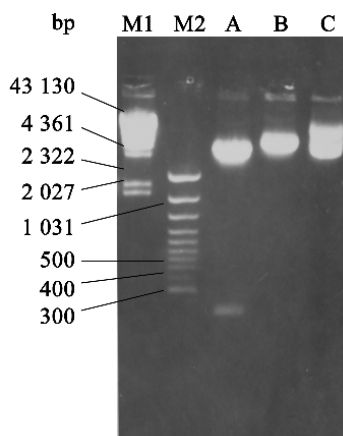


图 1 重组载体质粒 pLEGFP/hTrx 酶切鉴定图谱

Fig.1 Restriction endonuclease digestion of the recombinant plasmid pLEGFP/hTrx

A: Products by *Bgl* II and *Bam*H I digestion; B: Products by *Bam*H I digestion; C: Plasmid without digestion; M1: λ DNA digested with *Hind* III; M2: PCR marker

2.3 重组逆转录病毒滴度

本实验最高病毒滴度为 2.80×10^6 感染数/mL,选择该组进行扩增生产重组逆转录病毒,进行后续实验。

2.4 重组逆转录病毒感染细胞后 hTrx 表达和活性

重组病毒组、空质粒病毒组及无病毒组之间酶反应活性的比较见表 1,可见在各个反应剂量重组病毒组酶反应速度均远高于空质粒病毒组和无病毒组 ($P = 0.02$),显示有较高的酶反应活性,并有一定的剂量依赖性。该结果与标准品组实验结果相似。提示本实验制备的重组病毒感染真核细胞后,细胞可分泌融合表达的 hTrx 并具有硫氧还蛋白生物学活性。

表 1 胰岛素还原实验测定 hTrx 活性

Table 1 Insulin reduction assay of the testing hTrx activity expressed by NIH3T3 cells with recombinant retrovirus infection $D(650 \text{ nm})$

Group	Reaction dose		
	25 μ L	50 μ L	100 μ L
hTrx-virus group	0.040	0.125	0.220
Empty-virus group	0.002 ¹⁾	0.008 ¹⁾	0.008 ¹⁾
Non-virus group	0.007 ¹⁾	0.008 ¹⁾	0.009 ¹⁾
<i>F</i>	7.096	13.601	33.207
<i>P</i>	0.007	0.000	0.000

1) $P < 0.05$ vs. hTrx-virus group

2.5 hTrx 基因修饰大鼠肝细胞的制备和活性

实验制备的 hTrx 基因修饰大鼠肝细胞有 EGFP 绿色荧光蛋白表达。免疫组化 SABC 法检测可见细胞浆内出现棕黄色颗粒的阳性染色,表明 hTrx 基因修饰大鼠肝细胞可分泌表达白蛋白,细胞功能正常(图 2)。

2.6 hTrx 基因修饰大鼠肝细胞抗氧化应激能力

hTrx 作为一种抗氧化剂,具有较强的抗氧化应激能力。打击实验中,MTT 比色法检测在 12 h 和 24 h 时,hTrx 基因修饰组与空病毒组、正常肝细胞组 $D(650 \text{ nm})$ 值比较有统计学意义 ($P = 0.02$),48 h 时差异有明显统计学差异 ($P = 0.003$),而后两组在任何时间段差异均无统计学意义 ($P = 0.31$,表 1)。显示出 hTrx 基因修饰大鼠肝细胞具有较强的抗氧化应激能力,并可有效增殖,表明 hTrx 具有明确的肝细胞保护作用。各组生长曲线之间的比较见图 3。

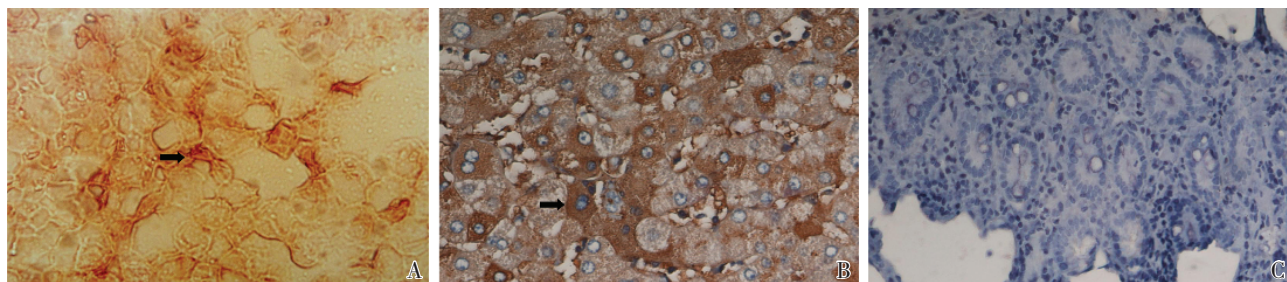


图2 免疫组化法检测 hTrx 基因修饰大鼠肝细胞白蛋白表达

Fig.2 Immunohistochemistry for albumin expression in hTrx gene-modified rat hepatocytes

A: albumin expression in hTrx gene-modified rat hepatocytes; B: albumin expression in normal human hepatocytes; C: there is no albumin expression in normal human intestinal cells; $\times 400$

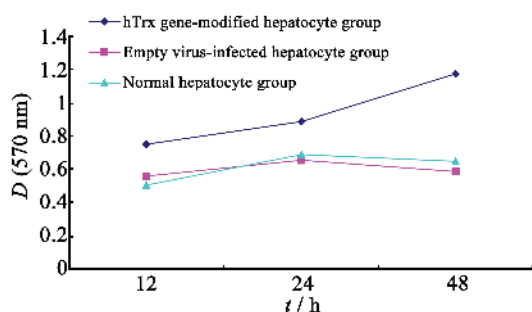


图3 不同大鼠肝细胞抗氧化能力比较

Fig.3 MTT colorimetric assay for detecting the antioxidative capacity of rat hepatocytes after recombinant retrovirus infection

3 讨论

肝细胞移植技术已具有较为完备的实验及理论基础,可以治疗多种肝相关疾病,但尚有许多问题有待进一步解决,包括增殖、免疫、营养等。成熟肝细胞为终末分化细胞,分裂增殖能力较差,也不能冷冻保存,移植后增殖缓慢及增殖能力受限。由于移植肝细胞数量的限制以及很难得到满意的增殖,肝功能支持的时间及受损肝实质的替代的程度不甚理想,有研究显示其替代作用一般不超过受体肝脏功能的1%,提高移植肝细胞的增殖指数、防止过多凋亡及氧化应激成为需要重点解决的关键问题之一^[4]。促进干细胞向成熟肝细胞定向转化的研究尚需完善^[4],对成熟肝细胞的改造仍有现实的意义。

hTrx 在细胞生存和生长中具有极重要的作用,它的生物学功能包括促进细胞 DNA 和蛋白质合成、生长因子样作用、抗氧化作用、转录因子调节以及凋亡抑制作用等。我们前期制备出具有生

物学活性的 rhTrx 对原代培养肝细胞的生存生长也显示出具有促进作用^[3]。外源性 hTrx 在体内实验中局部应用较难进入细胞内部,很快代谢使其作用不够持久^[6]。本实验将目的基因导入离体肝细胞,从而达到在体内长期表达的目的。

目前已有多个实验对肝细胞进行体外基因修饰,主要在于增强移植肝细胞的增殖与功能,降低移植后的排斥反应和逆转肝纤维化等。在提高增殖方面,有研究将外源性基因片段整合入肝细胞 DNA 中,成为所谓“永生化细胞”,并能够加以人为控制^[7-8];敲除与抑制细胞增殖密切相关基因的小鼠肝细胞,移植后细胞增殖数量明显增加^[9];将血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、Bcl-2、肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)等基因导入供体肝细胞后移植,肝细胞的存活和再生增加,抗凋亡能力明显增强^[10-13]。本实验制备出 hTrx 基因修饰肝细胞表现出较强的抗氧化应激能力,可缓解细胞损伤并可有效增殖,也进一步表明 hTrx 具有明确的肝细胞保护和促进增殖作用。这种 hTrx 基因修饰肝细胞可在肝细胞移植和生物人工肝细胞保存方面发挥重要作用。

参考文献:

- [1] Kondo N, Nakamura H, Masutani H, et al. Redox regulation of human thioredoxin network [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2006, 8(9-10): 1881-1890.
- [2] Powis G, Montfort WR. Properties and biological activities of thioredoxins [J]. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2001, 30(8): 421-455.
- [3] 李华,汪根树,陈规划,等. 重组人硫氧还蛋白对原代培养肝细胞的影响 [J]. *中华普通外科杂志*, 2005, 20(12): 803-806.

- [4] Weber A, Groyer-Picard MT, Franco D. Hepatocyte transplantation in animal models [J]. *Liver Transpl*, 2009, 15(1): 7-14.
- [5] Kakinuma S, Nakauchi H, Watanabe M. Hepatic stem/progenitor cells and stem-cell transplantation for the treatment of liver disease [J]. *Gastroenterol*, 2009, 44(3): 167-172.
- [6] Tao L, Gao E, Hu A, et al. Thioredoxin reduces post-ischemic myocardial apoptosis by reducing oxidative/nitrative stress [J]. *Br J Pharmacol*, 2006, 149(3): 311-318.
- [7] Tsuruga Y, Kiyono T, Matsushita M, et al. Establishment of immortalized human hepatocytes by introduction of HPV16 E6/E7 and hTERT as cell sources for liver cell-based therapy [J]. *Cell Transplant*, 2008, 17(9): 1083-1094.
- [8] Totsugawa T, Yong C, Rivas-Carrillo JD, et al. Survival of liver failure pigs by transplantation of reversibly immortalized human hepatocytes with Tamoxifen-mediated self-recombination [J]. *Hepatology*, 2007, 47(1): 74-82.
- [9] Seppen J, Filali EE, Elferink RO. Small animal models of hepatocyte transplantation [J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 481(8): 75-82.
- [10] Kosone T, Takagi H, Horiguchi N, et al. Transforming growth factor-alpha accelerates hepatocyte repopulation after hepatocyte transplantation [J]. *Gastroenterol Hepatol*, 2008, 23(2): 260-266.
- [11] Wang X, Mani P, Sarkar DP, et al. Ex vivo gene transfer into hepatocytes [J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 481(9): 117-140.
- [12] Song E, Chen J, Antus B, et al. Adenovirus-mediated Bcl-2 gene transfer inhibits apoptosis and promotes survival of allogeneic transplanted hepatocytes [J]. *Surgery*, 2001, 130(3): 502-511.

(编辑 孙慧兰)

(上接第 571 页 from page 571)

- 清除术的临床观察 [J]. *中华风湿病学杂志*, 2009, 13(3): 192-194.
- [4] Huber LC, Distler O, Tarnier I, et al. Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2006, 45(6): 669-675.
- [5] Ohki E, Suzuki M, Aoe T, et al. Expression of histamine H4 receptor in synovial cells from rheumatoid arthritic patients [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(11): 2217-2220.
- [6] Brühl H, Mack M, Niedermeier M, et al. Functional expression of the chemokine receptor CCR7 on fibroblast-like synoviocytes [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2008, 47(12): 1771-1774.
- [7] Smith MD, Baeten D, Ulfgren AK, et al. Standardisation of synovial tissue infiltrate analysis: how far have we come? How much further do we need to go? [J]. *Ann Rheum Dis*, 2006, 65(1): 93-100.
- [8] Fan T, Wang D, Zhao J, et al. Establishment and characterization of a novel untransfected corneal endothelial cell line from New Zealand white rabbits [J]. *Mol Vis*, 2009, 15: 1070-1078.
- [9] Ebrahimi M, Hassan ZM, Hadjati J, et al. Immediate Exposure to TNF-alpha Activate Dendritic Cells Derived from Non-Purified Cord Blood Mononuclear Cells [J]. *Iran J Immunol*, 2009, 6(3): 107-118.
- [10] Fujikawa Y, Shingu M, Torisu T, et al. Interleukin-1 receptor antagonist production in cultured synovial cells from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 1995, 54(4): 318-320.
- [11] 蒋建平, 朱志刚, 易朝辉, 等. 人关节滑膜 A 型和 B 型细胞的纯化分离和体外培养 [J]. *解放军医学杂志*, 2001, 26(5): 387-388.
- [12] Rosengren S, Boyle DL, Firestein GS. Acquisition, culture, and phenotyping of synovial fibroblasts [J]. *Methods Mol Med*, 2007, 135: 365-375.
- [13] Edwards JC, Leigh RD, Cambridge G. Expression of molecules involved in B lymphocyte survival and differentiation by synovial fibroblasts [J]. *Clin Exp Immunol*, 1997, 108(3): 407-414.
- [14] Steenvoorden MM, Tolboom TC, van der Pluijm G, et al. Transition of healthy to diseased synovial tissue in rheumatoid arthritis is associated with gain of mesenchymal/fibrotic characteristics [J]. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8(6): R165.
- [15] Bartok B, Firestein GS. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis [J]. *Immunol Rev*, 2010, 233(1): 233-255.
- [16] Zvaifler NJ. Relevance of the stroma and epithelial-mesenchymal transition (EMT) for the rheumatic diseases [J]. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8(3): 210.

(编辑 孙慧兰)