

小鼠胚胎干细胞源表皮样细胞 β_1 整合素的表达与序列分析张仁礼¹, 高劲松², 李海标¹

(1. 中山大学中山医学院组织胚胎学教研室; 2. 达安基因诊断中心, 广州 510080)

摘要: 【目的】研究小鼠胚胎干细胞源表皮样细胞分化过程中 β_1 整合素 (integrin β_1) 表达情况与序列分析, 为在分子水平上了解胚胎干细胞分化为表皮样干细胞时相关特异性蛋白表达量的变化打下基础。【方法】用双层培养板将小鼠胚胎干细胞与人羊膜共培养 4~5 d, 显微镜下观察其形态分化, 分别用免疫组化法和 Actin 内参照逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 定量检测 β_1 整合素蛋白和 mRNA 的表达情况, 并对 RT-PCR 产物进行测序, 对照组未加羊膜。【结果】与人羊膜共培养 4~5 d 后, ES 细胞分化为表皮细胞样的单层细胞, 细胞排列紧密, 呈多边形; 免疫组化结果显示诱导 4 d 后部分细胞呈 β_1 整合素阳性; RT-PCR 结果显示实验组 β_1 整合素 mRNA 有较强的表达; 对照组细胞形态各异, 不能形成细胞单层, 几乎不表达 β_1 整合素, 测序及同源性比对结果表明两条扩增序列分别与 β_1 整合素具有 100% 的同源性。【结论】小鼠 ES 细胞源表皮样细胞表达较高水平的 β_1 整合素, 而未加羊膜诱导的 ES 细胞几乎不表达 β_1 整合素。

关键词: 胚胎干细胞; 定向分化; 表皮细胞; 羊膜; 整合素; RT-PCR

中图分类号: R329.28

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2004)05-0417-04

Expression and Sequence Analysis of Integrin β_1 Gene mRNA in Embryonic Stem Cell Derived Epidermal Like CellsZHANG Ren-li¹, GAO Jun-song², LI Hai-biao¹

(1. Department of Histology and Embryology, Zhongshan Medical College;

2. Daan Genetic Diagnosis Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To research the expression and analyze the sequence of integrin β_1 gene in embryonic stem (ES) cells derived epidermal like cells, and to lay a base for analyzing the expression of relative protein in molecular level when ES cells differentiate into epidermal like cells. 【Methods】ES-BALB/c cells were cocultured with human amnion in transwells for 4-5 days. The morphological differentiation were observed under microscope, and the expression of integrin β_1 protein and mRNA were measured using immunohistochemistry and actin controlled reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) respectively. The sequence of RT-PCR products were analyzed and compared with the published sequence of integrin β_1 gene by BLAST. Cells in control were cultured alone without amnion. 【Results】After 4-5 days of coculture, ES cells differentiated into single layer of epidermal like cells, fitted tightly, with polyhedral in shape. Immunohistochemical results showed that part of the cells were integrin β_1 positive after 4d of induction. The RT-PCR assay showed that the cells after 4d of induction expressed high level of integrin β_1 mRNA, and the sequences of the RT-PCR products were 100% homologous to that of integrin β_1 . Cells in control group were diverse in morphological shapes, did not form epidermal like single layer, and expressed very low level of integrin β_1 . 【Conclusion】Mouse ES cell derived epidermal like cells express high level of integrin β_1 .

收稿日期: 2003-11-04

基金项目: 国家重点基础研究课题(9·73)基金资助项目(G1999054301-2)

作者简介: 张仁礼(1969-)男, 辽宁抚顺人, 医学博士; 李海标, 教授, 通讯作者. E-mail: lihb38@163.com

which is scarcely expressed in control group without amnion.

Key words : embryonic stem cell; committed differentiation; epidermal cells; amnion; integrin β_1 ; RT-PCR

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2004, 25(5): 417 - 420]

整合素是一类介导细胞与细胞外基质之间黏附的受体分子家族,由 α 和 β 两种亚单位构成的异二聚体糖蛋白^[1]。 β_1 整合素是表皮干细胞重要的标记物,表皮干细胞通过 β_1 整合素与基膜的细胞外基质结合对维持其干细胞特性起重要作用,当表皮干细胞定向分化为角质形成细胞时, β_1 整合素的表达逐渐下降,免疫组织化学的研究表明,位于基底层的表皮干细胞与瞬间放大细胞(transient amplifying cells, TA cells) β_1 整合素呈阳性表达,而有丝分裂后细胞和终末分化细胞几乎不表达 β_1 整合素^[2]。为了避免取材时细胞污染,我们采用双层板进行人羊膜与小鼠 ES 细胞共培养,我们先前的研究结果表明,位于双层板下层的 ES 细胞向表皮样细胞分化^[3]。本研究用内参照 RT-PCR 的方法检测双层板下层 ES 源表皮样细胞 β_1 整合素蛋白与 mRNA 表达情况,并对 RT-PCR 产物进行序列测定,以从分子水平上探讨 ES 细胞定向分化为表皮样干细胞时 β_1 整合素基因的表达变化情况,为研究 ES 细胞定向分化时基因表达的时空变化规律奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

ES-BALB/c 小鼠胚胎干细胞^[4],中山大学实验动物中心陈系古教授惠赠。滤膜孔径为 3 μm 的双层 6 孔培养板(Transwell)购于 Costar 公司。DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 小鼠白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)和胰蛋白酶均为 Gibco 公司产品,胎牛血清为杭州四季青生物工程材料有限公司产品,Hoechst33342 为 SIGMA 产品。MLV 逆转录酶和 *Taq* 酶为上海 Sangon 生物工程公司产品。RNA 酶抑制剂为华美公司产品。

1.2 ES 细胞的体外诱导

ES-BALB/c 小鼠胚胎干细胞解冻复苏后,加入 ES 细胞完全培养液(DMEM, 150 mL/L 胎牛血清, 0.1 mol/L β - 巯基乙醇, 0.1 mmol/L L- 谷氨酰胺, 10^6 IU/L 小鼠白血病抑制因子, 1% 的双抗)培

养, 24 h 换液, 48 h 传代。以 1.25 g/L 胰蛋白酶-EDTA 消化液消化,按 5×10^5 细胞/mL 接种于双层 6 孔培养板的下层,然后将制备好的羊膜^[3]置于双层培养板的上层,用无 LIF ESC 培养液培养。每隔 24 h 将培养液换掉一半。倒置显微镜下观察细胞生长及形态变化。

1.3 免疫组化检查

取体外诱导培养第 4 天的细胞,用 40 g/L 的多聚甲醛(pH 7.4)于 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 30 min,按免疫组化 SABC 法进行检测整合素 β_1 。第一抗体为小鼠抗整合素 β_1 (PharMingen 公司)。

1.4 细胞总 RNA 的抽提

培养 4 d 后,将细胞消化为细胞悬液,实验组与对照各取 10^7 个细胞,加入 1 mL Trizol 试剂,快速混匀,室温 5 min,加入 0.2 mL 氯仿振荡,室温 3 min,离心取上清,加 0.5 mL 异丙醇室温 10 min,离心去上清,加入 1 mL 体积分数 75% 的乙醇洗涤 RNA 沉淀,真空干燥后沉淀溶于 50 μL 无核酸酶的无菌水中。

1.5 引物设计、合成

采用 oligo 计算机软件设计引物。 β_1 整合素上游引物: 5'-tcctactggtcccagacac-3'; β_1 整合素下游引物: 5'-tcagtaatgttcataacttac-3'; β -actin 上游引物: 5'-ccgtgaaaagatgaccagca-3', β -actin 下游引物: 5'-acaatgctgtggtacgacc-3'。

1.6 cDNA 合成

在反应体积为 20 μL 逆转录管中,含 2 μg 提自总 RNA, 50 mmol/L Tris-Cl (pH 8.3), 40 mmol/L KCl, 7 mmol/L MgCl_2 , 1 mmol/L DTT, 0.01% BSA, 1 mmol/L dNTPs, 20 $\mu\text{mol/L}$ MLV 逆转录酶, 10 $\mu\text{mol/L}$ RNA 酶抑制剂,上下游引物各 15 pmol/L,在 PE2400 型扩增仪上作 37 $^{\circ}\text{C}$, 60 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 灭活逆转录酶,合成好的 cDNA 置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.7 内参照基因半定量 PCR

在 30 μL PCR 反应体积中,吸取逆转自 100 ng RNA 量的 cDNA, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl_2 , 200 $\mu\text{mol/L}$ dNTPs, 100 $\mu\text{g/mL}$ 明胶, integrin- β_1 上下游引物各

15 pmol/L,同时在反应管中加入 actin 上下游引物各 10 pmol/L, *Taq* 酶 1.5 U,反应条件为 93 °C 3 min 预变性,93 °C 30 s,55 °C 40 s,72 °C 45 s 作 30 个循环(PE2400 型扩增仪上进行)。反应完成后吸 10 μ L 在 20 g/L 琼脂糖凝胶中电泳,并在凝胶成像系统(英国 UVP 公司产品)中的 Grab-IT 软件采集凝胶图像,用 GelBase/GelBlot-Pro 软件进行半定量分析,即可算出 integrin- β_1 和相应泳道中 actin 的峰体积的比值。

1.8 常规 PCR

25 μ L PCR 反应体积中,含 5 \times PCR 反应液 5 μ L,上下游引物各 15 pmol/L, *Taq* 酶 1 U,100 ng RNA 逆转得到的 cDNA,在 PE2400 型检测扩增仪上进行扩增,反应条件为预变性 93 °C 3 min,然后 93 °C 35 s,55 °C 45 s,72 °C 1 min,32 个循环,最后 72 °C 延伸 7 min。

1.9 测序分析

将 PCR 产物与 T 载体连接,通过转化蓝白斑筛选获得阳性克隆,按 PE 公司 PRISM BigDye Terminator cycle sequencing kit 方法用下游引物 3D1 在 ABI 377 DNA sequencer 上进行自动测序。并将所得序列用 BLAST 进行基因序列对比。

2 结果

2.1 ES 细胞的培养

在含 LIF 的 ES 细胞培养液中,BALB/c ES 细胞生长旺盛,呈现巢式生长,集落大多呈圆形或椭圆形,边界光滑,细胞排列紧密,在相差显微镜下细胞边界不清(图 1)。

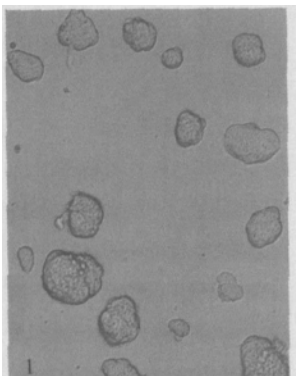


图 1 未分化的 ES-BALB/c 细胞

Fig. 1 Undifferentiated ES -BALB/c cells

2.2 诱导后的细胞形态学特征及免疫组化结果
培养 3 d 后,在双层培养板下层 ES 细胞形成

小面积的细胞单层,胞体增大,呈多边形,细胞边界清晰,随后细胞单层向外延伸,到第 4~5 天后,面积增大,可铺满整个瓶壁,细胞形态呈典型上皮样,细胞呈多边形,排列紧密,边界清晰(图 2)。对照组培养 3 d 后,大量细胞死亡,漂浮于培养液中,残留的细胞形态各异,大小不一,不形成单层。免疫组化结果显示诱导 4 d 后形成的单层上皮样细胞部分呈 β_1 整合素阳性,胞浆胞膜呈褐色(图 3),而对照组未见 β_1 整合素阳性细胞。

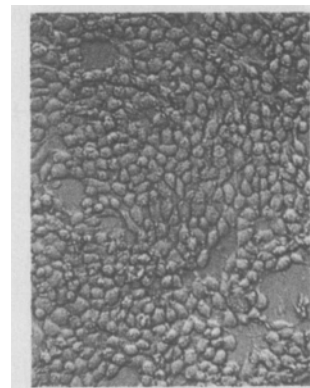


图 2 ES 细胞源的表皮样细胞

Fig. 2 Es cell derived epidermal like cells

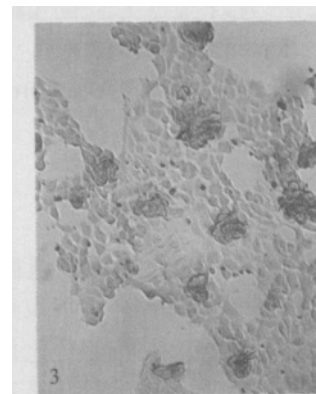


图 3 β_1 整合素免疫组化结果

Fig. 3 Immunohistochemical assay result

2.3 内参法半定量 RT-PCR 检测结果

与羊膜共培养 4 d 后的细胞, β_1 整合素(扩增片段为 185 bp)有较强的表达(图 4,表 1),而对照组的表达均较弱。将所测序结果(图 5)用 BLAST 进

表 1 integrin- β_1 基因的内参法 RT-PCR 检测结果

Table 1 Expression of integrin- β_1 gene examined with inner control RT-PCR

Group	Integrin- β_1 volume (Integrin)	β -actin volume (actin)	Integrin/ actin
Experimental	1 498.30	2 466.97	0.61
Control	447.20	4 673.71	0.10

行同源性比对,结果显示,扩增序列与小鼠 integrin- β_1 100%同源。

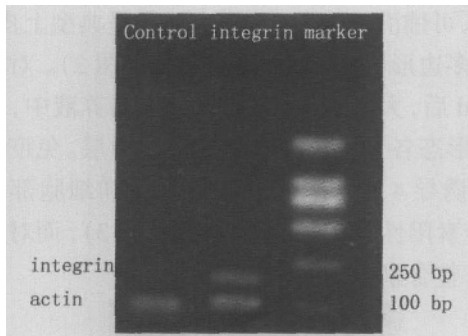


图 4 β_1 整合素 RT-PCR 结果

Fig. 4 RT-PCR result of Integrin- β_1

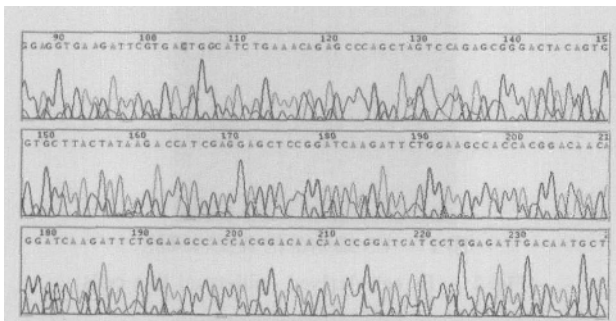


图 5 RT-PCR 扩增序列测序图

Fig. 5 Sequencing graph of RT-PCR product

3 讨论

胚胎干细胞来源于囊胚的内细胞群或桑椹胚的高度未分化细胞,它具有向各种组织细胞分化的潜能^[5]。在个体发育过程中,细胞分化是由程序控制、高度有序的过程,程序的运行结果表现为不同发育阶段、不同组织、不同部分的细胞表现出不同的形态、不同的生长方式和不同的功能。这一结果取决于细胞基因表达上的时空差异,而基因的差异表达除受发育程序的调控外,还受细胞外微环境的影响^[6]。ES 细胞的定向分化及分化过程中的基因表达与调控是当前发育生物学研究的焦点。我们先前的研究表明人羊膜与小鼠 ES 细胞共培养,可诱导 ES 细胞定向分化为表皮样细胞^[6]。在此基础上,我们着重研究其分化过程中 β_1 整合素基因表达的差异。

β_1 整合素是表皮干细胞的重要标记物,它在各种分化发育阶段的表皮细胞中的表达量不同。表皮细胞根据其分化阶段不同可分为干细胞(stem cells)、瞬间放大细胞(transit amplifying cells,TA)

有丝分裂后细胞和终末分化细胞^[7]。表皮干细胞特异地高表达 β_1 整合素,而 TA 细胞中 β_1 整合素同样有表达但较干细胞中弱,有丝分裂后细胞和终末分化细胞几乎不表达 β_1 整合素。最近的研究表明,表皮干细胞通过其表面的 β_1 整合素与基膜的细胞外基质结合,激活细胞催的信号传导通过,通过丝裂原激活的蛋白激酶(MAPK)系统维持其干细胞的特性^[8]。

内参照 RT-PCR 是一种简便灵敏的检测 mRNA 的方法,它以多数细胞内均有稳定表达的 actin 作为内参照,排除了各反应体系扩增效率及模板数不同引起的误差,再结合数字图像分析方法,利用峰体(灰度对峰面积的积分值)来表示样本相对量,能够比较准确地反应 mRNA 的相对表达量。本实验的结果表明,诱导后 β_1 整合素表达比对照组增高了 6 倍。提示 ES 源表皮样干细胞和 TA 细胞中有较高水平的 β_1 整合素的表达。RT-PCR 产物克隆测序与同源性比对结果显示与小鼠 β_1 整合素基因具有 100% 的同源性,排除了非特异性扩增的可能。

参考文献:

- [1] Watt F M. Role of integrins in regulating epidermal adhesion, growth and differentiation[J]. EMBO J, 2002, 21(15): 3919-26.
- [2] Jones P H, Watt F M. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression[J]. Cell, 1993, 73(4): 713-24.
- [3] 张仁礼,李海标,黄冰,等.人羊膜诱导胚胎干细胞向表皮样干细胞的定向分化[J].中山医科大学学报,2001,22(6): 325-8.
- [4] 陈系古,黄冰. BALB/cj 小鼠胚胎干细胞系的建立及其嵌合体小鼠的产生[J].中山医科大学学报,2000,21(6): 封2.
- [5] 徐令.人类的胚胎干细胞的分离和培养[J].中山医科大学学报,1998,19(1): 77-8.
- [6] Watt F M, Hogan B L. Out of Eden: stem cells and their niches[J]. Science, 2000, 287(5457): 1427-30.
- [7] Jones P H, Harper S, Watt F M. Stem cell patterning and fate in human epidermis[J]. Cell, 1995, 80(1): 83-93.
- [8] Zhu A J, Haase I, Watt F M. Signaling via β_1 integrins and mitogenactivated protein kinase determines human epidermal stem cell fate in vitro[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(12): 6728-33.

(编辑 张恩健)