研究工作

外源性端粒酶基因对人脐静脉内皮细胞的影响

杨玉琮* 李 旭 陈 葳 程小丽

（西安交通大学第一医院实验医学中心 西安 710061）

摘 要 为了观察外源性端粒酶逆转录酶基因(hTERT)在人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)的表达及对细胞功能和生长的影响。采用逆转录病毒载体转导的方法，将 hTERT 基因转入 HUVEC，检测基因转导后内皮细胞端粒酶的活性和生物学特性。结果发现 hTERT 转导后细胞端粒酶表达阳性，未转导的亲代细胞为阴性；转导细胞的体外生存时间延长但未永生化，而内皮细胞黏附分子表达的功能未受影响。

关键词：端粒酶 血管内皮细胞 基因转导 细胞培养

血管内皮细胞为被覆于血管内壁的单层细胞，其功能改变参与多种病理过程，如高血压、冠心病的形成，在肿瘤的生长、浸润、转移过程中起着重要作用。脐带血管为血管内皮细胞的重要来源，但是由于其难以传代或传代短暂而使研究工作受限。因此，获得长寿命血管内皮细胞就成为血管内皮研究的关键之一。

端粒是染色体末端的结构，其 DNA 长度随细胞分裂次数增加而变短；端粒酶具有维持端粒长度的作用，端粒酶的表达与细胞寿命延长及永生化有关[1]。因此，为了获得在体外能长期传代的人血管内皮细胞，本文采用基因转导的方法将 hTERT 基因导入人脐静脉血管内皮细胞，探讨该基因对内皮细胞生存期的作用，以及对细胞生物学特性的影响。

材料和方法

1. 实验材料

(1) 细胞来源 小鼠成纤维细胞 PA317 和 NIH3T3 为本室保存；HUVEC 见 2(1)

(2) 质粒 所用的 PLNC-hTERT 载体为包含新霉素抗性基因 Neo^r 和端粒酶基因 hTERT 的逆转录病毒载体(7.5Kb)，其结构图为：

该质粒为 Wright 博士授权 CLONETECH 公司惠赠，对照为不含 hTERT 基因的 PLNCX 质粒。

(3) 主要试剂 RPMI 1640 培养基、DMEM 培养基、人内皮细胞-SFM(Human Endothelial-SFM)培养基(GIBCO/BRL)；胶原酶 II(GIBCO/BRL)；兔抗人 VIII 因子多克隆抗体(上海森雄公司)；端粒酶检测试剂盒(华美公司)；抗 CD31-FITC 单克隆抗体，抗 CD54-FITC 单克隆抗体(DIACLONE RESEARCH)；G418(SIGMA)；脂质体 LF-2000(GIBCO/BRL)；聚凝胺(Polybrene，SIGMA)。

2. 实验方法

(1) *人脐静脉血管内皮细胞的培养和鉴定* 培养，见文献[2]，简述如下：取产后新鲜脐带；无菌剪取长 10－15cm 一段，生理盐水冲洗去除静脉内的血液和血凝块，注入0.1%胶原酶 II20ml，脐带两端用止血钳夹住，室温(22℃－25℃)消化静脉内壁 20－25min；放出脐带内的消化液，入离心管中离心，弃去上清，加入 RPMI 1640 培养液，制成细胞悬液，接种于明胶铺层的培养皿，37℃，5% CO_2 孵箱中培养。约 4h 后内皮细胞贴附于培养皿上，弃去上清，加入新鲜的 Human Endothelial-SFM 培养基培养。

鉴定——免疫组化检测 VIII 因子抗原是鉴定血管内皮细胞最可靠有效的方法。将 1cm×1cm 的无菌盖玻片放入培养皿中，待细胞爬满后取出，0.25%的戊二醛固定，3% H_2O_2 温盒内作用 5－10min，PBS 洗 3 次，封闭血清盖在片上，作用于温盒中 20min，倾去血清，加一抗(1:200 稀释的兔抗人 VIII 因子多抗)37℃作用 1h，然后用 PBS 洗 3 遍(设立的阴性对照不加一抗，用 PBS 代替)；加入二抗(生物素标记的抗兔抗体)37℃作用 1h 后 PBS 洗 3 遍；再加入亲和素生物

本文 2003 年 4 月 30 日收到，9 月 6 日接受。

* 通讯作者。E-mail：yangyucong@eyou.com

素过氧化物酶复合物37℃作用1h后PBS洗3遍。加入$DAB\text{-}H_2O_2$作用6－10min，自来水洗5min。

(2) *hTERT基因转染内皮细胞* 建立hTERT基因逆转录病毒包装细胞系——采用脂质体转染的方法，转染前一天，将PA317细胞(5×10^5细胞/孔)接种于六孔培养板，培养18－24h。将PLNC-hTERT质粒1.0μg加入50μl的DMEM(无血清)中为A液，将2μl的LF-2000加入50μl的DMEM(无血清)为B液，混合A、B两液(比例1:1)，室温放置25min后加入待转染的细胞中，作用24h。细胞按1:10种入培养皿，培养24h后加入G418 0.8g/L筛选。在未经LF-2000转染的细胞中也加入0.8g/L的G418作为对照。当对照细胞大部分死亡时(5d)更换新的DMEM培养基继续筛选，10－15d后，转染细胞出现抗性克隆。倒置显微镜下，挑出PA317-hTERT单克隆细胞传代培养，收集培养上清(含hTERT基因的复制缺陷型逆转录病毒)，用0.22μm滤器过滤后，－70℃保存。以小鼠成纤维细胞NIH3T3为靶细胞，常规方法[3]检测病毒滴度为2×10^6cfu/ml。病毒感染内皮细胞——吸去原代培养的内皮细胞培养上清，加入含病毒的PA317-hTERT上清1ml于内皮细胞中，并加入终浓度为8μg/ml的Polybrene，作用3小时后补足培养液培养3小时。并重复感染3次。24h后，换为选择培养基(培养基内加入终浓度为0.4g/L的G418)继续培养1周。筛出抗性克隆，对筛出的内皮细胞克隆混合培养。对照采用不含hTERT基因的PLNCX质粒转染获得的逆转录病毒，同样操作感染原代培养的内皮细胞后培养。

(3) *PCR法检测Neo^r基因* 根据Neo^r基因序列设计并合成特异性引物，提取内皮细胞和PA317/hTERT包装细胞基因组DNA为模板，用聚合酶链反应(PCR)分析Neo^r基因的整合状况。Neo^r引物，上游：5′-CGTTGTCACT-GAAGCGGGAAGG-3′，Neo^r下游：5′-CGGCAAGCAGGCC-CATGATATT-3′，PCR试剂均由大连宝生物公司提供。PCR反应参数：95℃ 1min，60℃ 1min，共30个循环。扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳分析。

(4) *端粒酶活性检测* PCR-ELISA法检测①原代培养的内皮细胞，②hTERT基因转染的内皮细胞的端粒酶活性，按试剂盒说明操作如下：A.提细胞内的端粒酶，取1×10^6个细胞加入50μl裂解液，冰浴30min，4℃ 12 000g离心20min。取上清2μl做TRAP反应模板。B.端粒重复序列扩增——45μl TRAP反应混合液入无RNA酶的PCR反应管内，并加入2μl待测细胞抽提液，30μl液体石蜡，离心数秒，25℃水浴30min，PCR仪上循环。94℃ 120s，94℃ 30s，48℃ 30s，72℃ 30s，72℃ 300s循环35次。C.产物杂交检测——每个PCR产物加入链霉素亲和素包被的酶标板微孔中37℃反应60min，(设立空白对照、阴性对照、阳性对照)用洗涤液洗板3次，再加入酶标抗体，37℃反应30min，洗涤后加入TMB底物显色，10min终止显色，450nm波长比色，空白对照调零，样本OD值大于阴性对照的2.1倍，判断为端粒酶阳性。

(5) *转导hTERT基因的内皮细胞生物学特性* 细胞生存时间——每天观察细胞生长状况，直至细胞衰老，不能传代为止，按每代3－4个群体倍增(PDL)计算转导细胞的倍增次数。

流式细胞仪检测黏附分子表达——取转导后3－5代细胞，用抗CD_{31}(PECAM-1)-FITC抗体标记，设IgG-FITC同型对照，流式细胞仪(EPICS ELITE)检测。同时用TNF-α刺激HUVEC，在测定前加入20ng/L的TNF-α作用15h，然后标记抗CD_{54}-FITC(ICAM-1)抗体及IgG-FITC同型对照各10μl，室温孵育30min，流式细胞仪检测。

结 果

1. 脐静脉血管内皮细胞的培养和VIII因子表达

脐静脉血管经胶原酶消化后的悬液中主要为内皮细胞和少量血细胞，内皮细胞约4h贴附于瓶底，而血细胞仍呈悬浮状态，因此，静置4h后轻轻晃动培养瓶，弃去上清，加入新的培养基，则获得的人脐静脉血管内皮细胞较为纯净，VIII因子检测95%以上的细胞都呈阳性反应，细胞内可见棕红色颗粒，在核周深染，见图1。

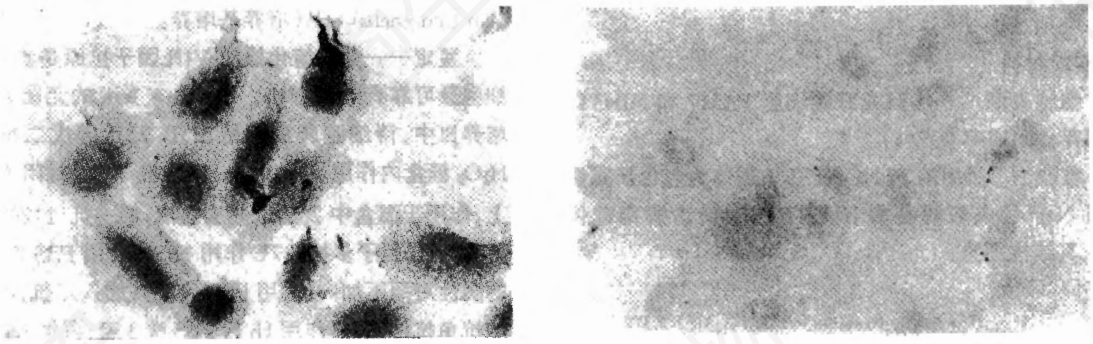

图1 免疫组化ABC法VIII因子染色 10×40

左图为阳性染色，细胞胞浆有棕红色颗粒，核周深染。右图为阴性对照，未着色，可见淡淡的细胞核，细胞形态因未着色而不清。

2. hTERT 基因转染的内皮细胞

基因转染的内皮细胞经 G418 筛选后,获得了 5 个克隆,将这些克隆混合培养传代;而对照质粒转染的内皮细胞由于不含有 Neo^r 基因,G418 筛选后无细胞存活。

用 Human Endothelial-SFM 培养基培养转导的内皮细胞,培养 2－3 日可观察到细胞生长迅速各集落开始融合,形成排列疏松的单层细胞,相差显微镜观察,细胞为多边形,排列疏松呈“铺路石”样,边界清楚,见图 2;待长满瓶底后细胞停止生长,不能重叠生长。

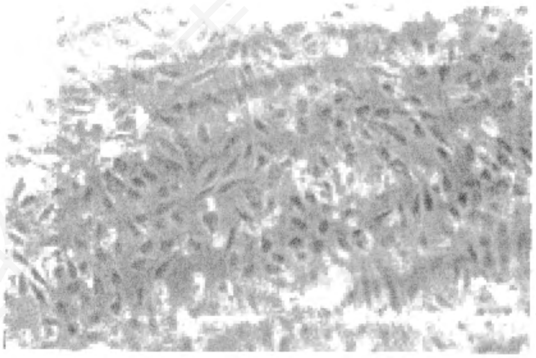

图 2 相差显微镜显示转导细胞的形态(10×4)
细胞为多边形,排列疏松呈“铺路石”样。

3. Neo^r 基因的检测

逆转录病毒可介导外源基因转移并整合到靶细胞基因组。由于内皮细胞基因组中含有内源性的 hTERT 基因,所以,通过 Neo^r 基因的检测提示外源基因的整合。

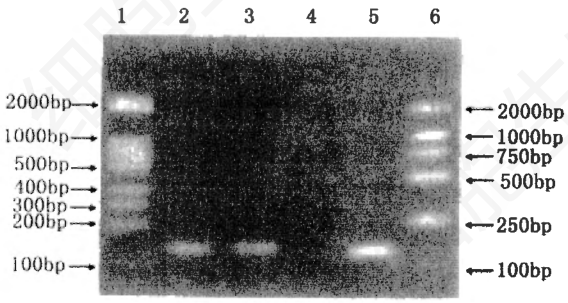

图 3 PCR 分析 Neo^r 基因的整合
lane1. Marker, 100bp 分子量标准(大连宝生物公司); lane2. 病毒感染内皮细胞; lane3. 对照质粒转染的内皮细胞; lane4. 原代内皮细胞; lane5. Neo 质粒阳性对照; lane6. Marker, DL-2000 分子量标准(大连宝生物公司)。

如下 PCR 结果显示逆转录病毒将外源基因转移入内皮细胞,PCR 扩增出 Neo^r 基因特异的 121bp 片段,而对照内皮细胞未检测出 Neo^r 基因特异片段。见图 3。

4. 端粒酶活性

病毒感染内皮细胞后,hTERT 基因被转移入内皮细胞,转染的内皮细胞表达端粒酶的活性,而原代内皮细胞、对照质粒转染的内皮细胞,端粒酶检测为阴性(见表 1)。

表 1 端粒酶活性检测

样品管	吸光度值	与阴性比值(>2.1 阳性)
阴性对照	0.156	－
阳性对照	1.023	6.5
原代内皮细胞	0.272	1.7
对照质粒转染的内皮细胞	0.298	1.9
hTERT 转染的内皮细胞	0.809	5.2

5. 基因转导的内皮细胞的生存时间

在培养条件不变的情况下,对照内皮细胞仅传 3－5 代,根据传代时种入的细胞数与细胞长满后再次传代时的收获的细胞数计算,内皮细胞传代 1 次,倍增 3－4 次,按每代 3 个细胞倍增计算,约 12 个 PDL;而 hTERT 基因转导的内皮细胞传 10－15 代,折算为约 36 个 PDL,因此,hTERT 基因转导的内皮细胞生存时间延长 3 倍(见图 4)。

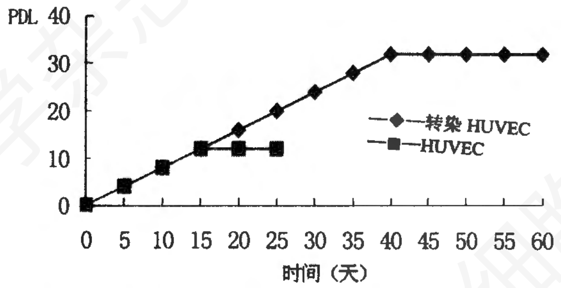

图 4 基因转导的细胞与对照细胞生存时间比较图

6. 基因转导的内皮细胞黏附分子 CD_{31} 和 CD_{54} 表达

基因转导的内皮细胞高表达 CD_{31} (PECAM-1) 抗原,阳性率约 99%,荧光强度为阴性对照的 100 倍左右,见图 5。TNF-α 刺激转导的内皮细胞,CD_{54} (ICAM-1)表达率 90%,荧光强度为阴性对照的 100 倍,见图 6。基因转导的内皮细胞表达正常内皮细胞具有的血小板内皮细胞黏附分子 PECAM-1,并具

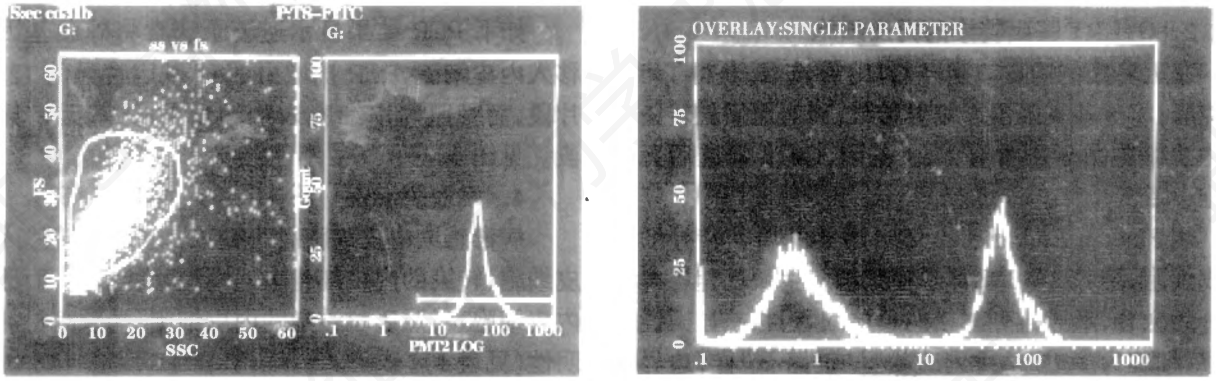

图 5　基因转导的内皮细胞 CD_{31}表达图

左图显示转导的细胞 99％表达 CD_{31}抗原；右图为阳性与阴性叠加图，显示阳性荧光强度远远高于阴性对照，说明 CD_{31}在转导细胞高表达。

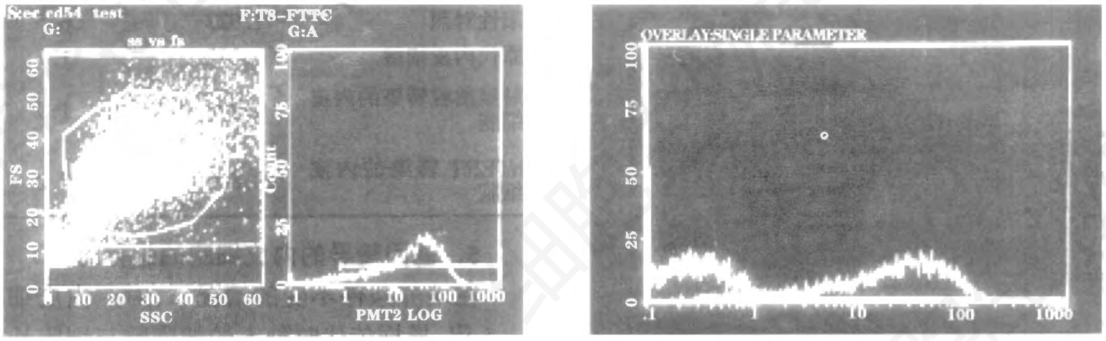

图 6　基因转导的内皮细胞 CD_{54}表达

左图显示转导的细胞经 TNF 刺激后 CD_{54}表达阳性率 90％；右图为阳性与阴性叠加图，显示 CD_{54}在转导细胞高表达。

有受刺激后表达细胞间黏附分子 ICAM-1 的功能。

讨　论

在对血管内皮细胞的研究中发现，正常血管内皮细胞传代后的生存时间一般较短，而转染的内皮细胞生物学特性可能已发生改变。因此，延长血管内皮细胞存活时间并保持其生物学特性至关重要。

我们将人端粒酶活性亚单位 hTERT 转入人脐静脉血管内皮细胞后，细胞表达端粒酶活性，生长旺盛，但有接触抑制，长满后呈“铺路石”样排列，VIII 因子高表达；PECAM-1(CD_{31})在细胞膜上的表达率为 99％，细胞经 TNF-α 刺激后表达 ICAM-1 (CD_{54})，表达率为 90％，未经刺激时不表达，具有正常内皮细胞黏附分子表达的功能。而 ECV304 细胞(自发转化的人脐静脉血管内皮细胞系)可重叠生长，CD_{31}表达率低，仅为 5.6％(本文未示)；同时，hTERT 基因转导的内皮细胞的生存期延长，超过对照细胞生存期的 3 倍，表明外源性 hTERT 的表达使人脐带静脉血管内皮细胞保持着正常内皮细胞的形态、功能特征，有着比对照细胞明显延长的生存期。但是未能引起细胞永生化，细胞在培养 10－15 代后，不能继续传代培养，而此时仍可检测到端粒酶的活性。

转导 hTERT 的人脐静脉血管内皮细胞形态和功能未改变，分析可能与 hTERT 基因性质和作用部位有关。根据 DNA 转染实验，人们将癌基因分为两类：永生化基因和转化基因。转化基因产物位于胞浆，与胞质膜内侧结合，使细胞减少对生长因子的需求，诱导其形态变化，使细胞粘附功能、接触抑制等功能发生改变。而永生化基因产物定位于胞核，引起细胞增殖特性改变，但不会引起细胞形态及贴壁生长特性的改变[4]。hTERT 基因的作用靶点位于细胞核内，与细胞转化时起永生化作用的基因作用部位相同。因此，hTERT 在转导细胞中的表达可能只引起增殖特性的改变，不引起其他生物学特性的改变。另外，hTERT 是人细胞基因组内正常的基因，受时空表达调节，在分化的体细胞中不表达；而将其转入内皮细胞后的调节表达可能对细胞生物学特性无明显影响。

表达 hTERT 仅延长了人脐静脉血管内皮细胞生存期，并没有引起细胞永生化，结果与 hTERT 基因在某些细胞中的作用不一致。有研究[5,6]将 hTERT 基因在端粒酶阴性的正常成纤维细胞、视网膜色素细胞中表达，建立了永生的细胞系。但同样的研究[7]发现，hTERT 基因转导后的表达并不足以使其他类型的细胞如角化上皮和其他上皮细胞永生化，提示不同细胞类型对端粒酶激活和永生化的敏感性不同[8]。因此，对于某些细胞，如角化上皮细胞、卵巢上皮细胞，可能也包括人脐静脉血管内皮细胞等，除端粒酶活性升高外，其他调控因子对永生化的作用也是必需的[9]。新近的研究报告，外源 hTERT 的表达不能使人前额角化上皮永生化，需与 HPV E7 或 P16 共同表达才可使此细胞跨越衰老，进入永生状态。hTERT 与 SV_{40} 大 T 基因共同转入成纤维细胞和内皮细胞后可以得到永生的细胞株，但永生细胞株生长状态的维持依赖大 T 抗原的表达，单一的 hTERT 不能使细胞维持永生化状态[10]。这些研究表明细胞永生化过程需要癌基因蛋白与端粒酶活性共同参与[11]。我们转导 hTERT 基因虽然未使内皮细胞永生化，但证实 hTERT 基因可延长内皮细胞的生存期，为 hTERT 与内皮细胞永生化的研究积累了有价值的资料。永生性内皮细胞模型的建立可依赖 hTERT 与其他基因的共同作用。

参 考 文 献

[1] Yaswen P and Stampfer M R. 2002, *Int J Biochem Cell Biol*. Nov; **34**(11):1382－1394.

[2] 鄂征主编，组织培养和分子细胞学技术，北京出版社，1995，第一版，P125－128.

[3] Xu L et al., 1989, *Virology*, **171**(2):331－337.

[4] Jing Y, et al., 2001, *Virology*, **290**:192－198.

[5] Bodnar A G, et al., 1998, *Science*, **279**:349－352.

[6] Jiang X, et al., 1999, *Nature Genet*, **21**:111－114.

[7] Dickson MA, et al., 2000, *Mol Cell Biol*. *Feb*; **20**(4):1436－1447.

[8] Kiyono T, et al., 1998, *Nature*, **396**:84－88.

[9] Farewell DG, et al., 2000, *Am J Pathol*, **156**:1537－1547.

[10] Michael JO, et al., 2001, *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**:646－651.

[11] Migliaccio U, et al., 2000, *J Immununol*, **165**(9):4978－4984.

EFFECT OF EXOGENOUS TELOMERASE REVERSE TRANSCRIPTASE GENE EXPRESSION ON ENDOTHELIAL CELL

YANG Yu Cong　LI Xu　CHEN Wei　CHENG Xiao Li

(*First Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xian*　710061　*China*)

ABSTRACT　To observe the effect of exogenous human telomerase reverse transcriptase(hTERT) gene expression on the development and growth of human umbilical veins endothelial cell (HUVEC). The hTERT gene was transducted into HUVEC by the replicating defective retrovirus produced by PA317 packaging cells. The expression of telomerase was analyzed by PCR-ELISA method and the changes of some biological characteristics of the transducted endothelial cells were detected. It was found that the ectopic expression of the telomerase catalytic subunit (hTERT) reconstructed the activity of telomerase in HUVEC, prolonged their life span which had 36 Population Doubles (PDL), but the non-transducted cells only had 12 PDL. Meanwhile, the transducted cells still had normal functions of adhesive factors expression, CD_{31} and CD_{54}. So, Ectopic hTERT gene expression can extend the life span without altering the cells' characteristic phenotype and function. It can be used in creating endothelial cell culture model, but only hTERT is not sufficient for the immortalizing human umbilical vein endothelial cell.

Key words: Telomerase　Vascular　endothelial cell　Gene transduction　Cell cultrue