

重组腺病毒介导的 Bcl-2 基因转染对缺氧再复氧肠上皮细胞的保护作用*

伊远学^{1,2}, 刘 筑², 罗效梅², 刘晓平¹, 李宝金¹, 张 超¹, 冷希圣¹ (1. 北京大学香港科技大学医学中心, 北京大学深圳医院肝胆腔镜外科 518036; 2. 武警重庆总队医院检验科 400061)

【摘要】 目的 探讨复制缺陷型重组腺病毒介导的 Bcl-2 基因转染对缺氧再复氧损伤肠上皮细胞的保护作用。**方法** 构建能介导 Bcl-2 基因转染和表达的复制缺陷型重组腺病毒载体 (Ad/CMV-Bcl-2), 转染体外培养的小肠上皮细胞株 (IEC-6), 检测其 Bcl-2 基因表达变化, 分别对正常对照组、缺氧复氧组 (单纯给予缺氧复氧处理)、Ad-CMV/Bcl-2 转染组 (AdCMV/Bcl-2 腺病毒载体转染 48 h 后再给予缺氧复氧处理) 细胞的凋亡率、死亡率及活力进行分析。**结果** 对照组微弱表达, Ad/CMV-Bcl-2 转染组细胞 Bcl-2 基因高表达; 经缺氧再复氧处理后, Annexin-V-Fluores 试剂盒检测死亡细胞明显减少 ($P < 0.01$), 凋亡显著受到抑制 ($P < 0.01$); 采用 MTT 法证明, Ad/CMV-Bcl-2 转染组细胞活力较对照组明显增强 ($P < 0.01$)。**结论** 复制缺陷型重组腺病毒介导的 Bcl-2 基因转染可显著减轻缺氧再复氧导致的肠上皮细胞损伤。

【关键词】 Bcl-2; 腺病毒; 转染; 细胞低氧

DIO:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.17.003

中图分类号: R341

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2010)17-1796-03

Protective effects of adenovirus-mediated Bcl-2 gene transfection for the intestinal epithelial cells against hypoxia-reoxygenation in vitro* YI Yuan-xue^{1,2}, LIU Zhu², LUO Xiao-mei², LIU Xiao-ping¹, LI Bao-jin¹, ZHANG Chao¹, LENG Xi-sheng¹. 1. Department of Hepatobiliary and Laparoscopic Surgery, Peking University Shenzhen Hospital, Shenzhen PKU-HKUST Medical Center, Shenzhen, 518036, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Chongqing Corps Hospital of Chinese People's Armed Police Forces, Chongqing 400061, China

【Abstract】 Objective To investigate the possibility of protection of intestinal epithelial cells against hypoxia-reoxygenation through recombinant adenovirus-mediated Bcl-2 gene transfection. **Methods** Replication defective recombinant adenoviral vector Ad/CMV-Bcl-2 had been constructed with full length human Bcl-2 gene. The overexpression of Bcl-2 gene was detected by RT-PCR in transfected groups. After the cells suffered 1 hour of hypoxia followed by 1 hour of reoxygenation, the effects of transfected Bcl-2 gene overexpression were studied. The cell viability was analyzed by MTT method, and the apoptosis and dead cell ratio were evaluated with Annexin-V-Fluores stained kit in vitro. **Results** The expression of Bcl-2 was positive in the Ad/CMV-Bcl-2 transfected intestinal epithelial cells and negative in the control group. After hypoxia-reoxygenation, the cell viability rates of Bcl-2 gene transfected groups were all significantly higher than that of control group ($P < 0.01$), while the apoptosis rates of Bcl-2 gene transfected groups were significantly lower than that of control group ($P < 0.01$). **Conclusion** The experimental results of transfection in vitro showed the indeed protection of the injury intestinal epithelial cells caused by the hypoxia/reoxygenation.

【Key words】 Bcl-2; adenovirus; transfection; cell hypoxia

国内外研究表明, 细胞凋亡与坏死共存于小肠缺血再灌注损伤中, 细胞凋亡是主要的细胞死亡形式; 缺血诱导凋亡, 再灌注加剧凋亡^[1-3]。B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2) 能有效地抑制细胞凋亡, 缺血再灌注条件下的 Bcl-2 在肠道细胞中可能起到重要的抑制凋亡作用。而在正常小肠组织中 Bcl-2 基因不表达或微弱表达, 使人们自然考虑到增加此抗凋亡蛋白的生成将是治疗缺血性凋亡的有效途径^[3]。本研究利用腺病毒介导的基因转移技术, 将全长人 Bcl-2 基因导入体外培养的小肠上皮细胞, 观察 Bcl-2 高表达对小肠上皮细胞的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料 含 Bcl-2 cDNA 的质粒 pcDNA3.1 由第三军医大学组胚教研室李泽桂教授惠赠; 腺病毒穿梭质粒 pAdCMV 和腺病毒包装质粒 pJM17 由第三军医大学解剖教研室杨萍博士惠赠; 限制性内切酶、DOTAP 脂质体、Annexin-V-Fluores 试剂盒、Tripure 试剂购自美国罗氏公司; Bcl-2 抗体购自北京中山公司。

1.2 细胞培养 小肠上皮细胞 IEC-6 由第三军医大学防原复合伤研究所保存并惠赠。

* 基金项目: 广东省医学科研基金 (A2007595); 广东省自然科学基金博士启动项目 (06300934); 国家自然科学基金资助项目 (30371386)。

△ 通讯作者, E-mail: ninliu@163.com。

1.3 实验方法

1.3.1 复制缺陷型重组腺病毒的构建、鉴定、扩增、纯化、滴度测定参照分子克隆试验指南^[4]。

1.3.2 病毒转染 取 70%~100%融合 IEC-6 细胞,弃去培养液,滴加低温保存的病毒液 5 μL,加 0.5 mL 培养液,37℃ 5%CO₂ 孵育,每 15 分钟摇 1 次,使病毒均匀分布。1 h 后添加正常培养基。

1.3.3 实验分组 (1)Bcl-2 基因表达检测:随机将对数生长期 IEC-6 细胞分为重组腺病毒 AdCMV/Bcl-2 转染 24、48、72 h 组与对照组(空腺病毒载体转染 48 h 组)。(2)细胞保护作用检测:随机将对数生长期 IEC-6 细胞分为正常对照组、缺氧复氧组(单纯给予缺氧复氧处理)、AdCMV/Bcl-2 转染组(AdCMV/Bcl-2 腺病毒载体转染 48 h 后再给予缺氧复氧处理)。

1.3.4 RT-PCR 检测 Bcl-2 mRNA 表达水平 提取的 RNA 经核酸定量和纯度检测,符合要求后,进行 RT-PCR 操作。Bcl-2 特异性上游引物:5'-GGT GCC ACC TGT GGT CCA CCT-3',下游引物:5'-CTT CAC TTG TGG CCC AGA TAG G-3',预扩增片段 458 bp。各组同时扩增内参照序列管家基因 GAPDH 特异性上游引物:5'-GCT GAT GCC CCC ATG TTT GT-3',下游引物:5'-GGG TGG TCC AGG GTT TCT TA-3',PCR 扩增循环系数为 94℃,4 min→98℃,30 s;55℃,30 s;72℃,30 s,共 30 个循环→72℃延伸 2 min→4℃保存。取 10 μL PCR 反应产物,进行 1.5 g/L 的琼脂糖凝胶电泳分析。

1.3.5 细胞缺氧再复氧模型 将各组 IEC-6 细胞同时置于密闭容器,95% N₂、5% CO₂ 充气 5 L/min,去除器皿内空气。1 min 后夹闭另一换气管道。充气 5 min 后,抽取气体经血气分析仪检测容器内 O₂ 浓度为 1%左右。达到缺氧条件。将密闭容器置 37℃孵箱缺氧 1.5 h。无菌条件下,打开密闭容器,取出各组 IEC-6 细胞,弃去残余培养基,添加 3 mL 正常含 5%小牛血清的低糖 DMEM 培养基,5% CO₂,37℃孵育 1 h,完成复氧模拟。

1.3.6 Annexin-V-Flous 检测细胞凋亡及死亡 缺氧再复氧后,各组收集细胞 5×10⁶,按说明书操作上机检测。

1.3.7 细胞活力检测 采用四唑盐(MTT)法^[5]。

1.4 统计学方法 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS11.5 统计软件进行统计分析,行 *t* 检验和单因素方差分析。

2 结 果

2.1 本实验利用分子克隆技术,成功地将编码人 Bcl-2 cDNA 完整开放阅读框,具有抗凋亡能力的 Bcl-2 基因克隆到第五型腺病毒穿梭质粒 pAdCMV 的 EcoRV 和 Hind III 位点上,得到 pAd/Bcl-2,经酶切鉴定克隆成功。

2.2 将含有外源基因 Bcl-2 的腺病毒穿梭质粒以及含 LacZ cDNA 的 pAdCMV/LacZ 分别与含有腺病毒基因组的大质粒 PJM17 通过脂质体 DOTAP 介导共转染 293 细胞,产生细胞病变并出现病毒空斑。将产生细胞病变的 293 细胞的培养上清液感染正常 293 细胞 48 h 后,细胞经原位杂交、免疫组化染色鉴定,结果表明外源基因 Bcl-2 能在 293 细胞中表达。感染重组腺病毒的 293 细胞进行色勒染色,光镜下见大量的嗜酸性包涵体。结果提示作者已经成功地得到能携带外源 Bcl-2 基因进行转染的、具有感染活力的复制缺陷型重组腺病毒。

2.3 收集到的重组腺病毒经病毒空斑形成试验测定 AdCMV/s-Bcl-2 和 AdCMV/LacZ 滴度分别为 8.4×10¹⁰ pfu/mL 和 1.4×10¹⁰ pfu/mL,远远超出目前文献报道的常用滴度 1×

10⁹ pfu/mL 以上的要求,为进一步实验提供了保证。

2.4 RT-PCR 结果显示,转染空腺病毒载体的对照组 Bcl-2 微弱表达,而重组腺病毒 AdCMV/ Bcl-2 转染后的 IEC-6 细胞可扩增出 458bp 的特异性条带,其中 AdCMV/ Bcl-2 转染 48h 的 IEC-6 细胞 Bcl-2 表达最强(图 1)。

注:M:DL2000 Marker;1:空载体转染 48 h;2:AdCMV/ Bcl-2 转染 24 h;3:AdCMV/ Bcl-2 转染 48 h;4:AdCMV/ Bcl-2 转染 72 h。

图 1 RT-PCR 方法检测肠上皮细胞中转染 Bcl-2 基因的表达

2.5 Ad/CMV-Bcl-2 转染对缺氧再复氧后细胞凋亡及死亡的影响 Ad/CMV-Bcl-2 转染组活细胞率明显高于缺氧复氧组,死亡率明显低于缺氧复氧组,细胞凋亡率显著低于缺氧复氧组。

2.6 Ad/CMV-Bcl-2 转染对缺氧再复氧后细胞活力的影响 MTT 比色法检测结果显示,与对照组比较,缺氧复氧组 IEC-6 细胞活力明显下降,AdCMV/Bcl-2 转染组细胞活力显著高于缺氧复氧组(表 1)。

表 1 肠上皮细胞缺氧复氧后细胞活力变化(n=8,MTT 比色法)

组别	对照组	缺氧复氧组	AdCMV/ Bcl-2 转染组
OD 值	0.53±0.12	0.37±0.06**	0.45±0.04*#

注:与对照组比较,* P<0.05,** P<0.01;与缺氧复氧组比较,# P<0.05。

3 讨 论

肠缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury,简称 I/R)是外科实践中常见的组织器官损伤之一,有作者甚至提出将肠道称为“应激条件下的中心器官”^[6]。因此肠 I/R 近年来越来越受到重视,其发生发展机制及防治措施的研究也成为外科领域的重点课题之一。肠上皮细胞是构成肠道黏膜屏障的主要成分,它具有增殖代谢旺盛、更新周期短等生理特点,对缺血缺氧和缺血再灌注损伤极为敏感。小肠缺血再灌注损伤后肠上皮细胞的大量凋亡导致细胞间的紧密连接丧失,肠屏障功能受损,细菌或内毒素可通过细胞间隙直接入血或淋巴循环,是不可逆休克和多器官功能衰竭的重要因素^[7-8]。

对缺血再灌注损伤的肠组织及肠腔脱落细胞的大量研究表明:细胞凋亡与坏死共存于其中,细胞凋亡是主要的细胞死亡形式;缺血诱导凋亡,再灌注加剧凋亡。作者近期实验研究表明,缺血再灌注损伤大鼠小肠细胞凋亡特征是:凋亡细胞主要发生于小肠上皮细胞,最先分布于绒毛顶端,逐步扩散至绒毛中下部,固有层和隐窝也有部分凋亡出现^[9]。严重创伤休克后,大量过度的黏膜细胞凋亡,必然导致黏膜屏障的损伤,导致肠源性感染的发生。因此进一步研究缺血再灌注损伤小肠上

皮细胞的凋亡机制及药物防治,无疑对临床防治肠源性感染具有十分重要意义。

Bcl-2 是从 B 细胞淋巴瘤染色体上克隆得到的一个原癌基因,对细胞死亡有明显的抑制作用,被称为“抗死亡基因”,Bcl-2 基因这种抗死亡效应无细胞周期特异性。许多研究推测,在缺血再灌注条件下的 Bcl-2 激活可能在肠道细胞中起到重要的内源性抑制凋亡作用^[3]。

Bcl-2 能有效地抑制细胞凋亡,而在正常小肠组织中 Bcl-2 基因不表达或微弱表达,使人们自然考虑到增加抗凋亡蛋白的生成而减少促凋亡蛋白的生成,将是治疗缺血性凋亡的关键。近年来,许多学者开始尝试利用转基因手段,将抑制凋亡基因 Bcl-2 的过度表达用来保护缺血缺氧细胞免于凋亡,并取得一定效果^[10-11]。但是利用转染 Bcl-2 基因对缺血缺氧或缺血再灌注损伤肠上皮细胞的保护作用尚未见报道。

本研究应用复制缺陷重组腺病毒载体介导 Bcl-2 基因转染体外培养的小肠上皮细胞,证实重组腺病毒转染的 Bcl-2 在体外培养的小肠上皮细胞中有明确表达。并通过细胞活力、凋亡及死亡水平的检测分析,证实重组腺病毒介导的 Bcl-2 基因转染可保护肠上皮细胞抵抗缺氧再复氧损伤,具有显著的细胞保护作用,为后续的体内转染实验提供了依据。

参考文献

- [1] Fujino Y, Suzuki Y, Kakinoki K, et al. Protection against experimental small intestinal ischaemia-reperfusion injury with oxygenated perfluorochemical[J]. Br J Surg, 2008, 90(8):1015-1020.
- [2] Massberh S, Eisenmenger S, Enders G, et al. Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse [J]. Surg, 2009, 258:23-35.

- [3] 聂海,赖西南,黄显凯,等. 舱内腹部爆炸伤对大鼠肠道细胞凋亡的影响[J]. 创伤外科杂志, 2009, 6(19):459-462.
- [4] 金冬雁,黎孟枫,林枫,等译. 分子克隆试验指南[M]. 北京:科学出版社,1999:672-683.
- [5] 卢圣栋. 现代分子生物学试验技术[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,1999:444.
- [6] Wilmore DW, Smith RJ, Odwyer ST, et al. The gut: a central organ after surgical stress[J]. Surg, 1988, 104(5):917-923.
- [7] Koike K, Yamamoto Y. Splanchnic hypoperfusion and distant organ injury[J]. Nippon Geka Gakkai Zasshi, 2009, 100(5):357-360.
- [8] Boros M, Takaichi S, Hstsnsks K. Ischemic time-depent microvascular changes and reperfusion injury in the rst smsll intestine[J]. J Surg Res, 2007, 59(2):311-320.
- [9] 柏干荣,陆松敏. 失血性休克大鼠肠上皮细胞凋亡的实验研究[J]. 中国病理生理杂志, 2001, 17(11):11-13.
- [10] Song E, Chen J. Adenovirus-mediated Bcl-2 gene transfer inhibits apoptosis and promotes survival of allogeneic transplanted hepatocytes [J]. Surg, 2008, 130(3):502-511.
- [11] Takahashi H, Honma M. In vitro and in vivo transfer of bcl-2 gene into keratinocytes suppresses UVB-induced apoptosis[J]. Photochem-Photobiol, 2009, 74(4):579-586.

(收稿日期:2010-07-27)

(上接第 1795 页)

NaCl 溶液处理,但方法简单,价格便宜。药店里卖的注射用生理盐水是 0.9% NaCl 溶液,300 mL 的价格是 1.2 元,将其用蒸馏水稀释到 0.2% 即可。用 300 mL 0.9% NaCl 溶液可以配成 1 350 mL 0.2% 的 NaCl 溶液,可以用 135 次(10 mL/次),每次的费用不到 1 分钱。

2.2 保留了试剂盒的快速、简捷的特点 过去实验室常用的方法有高盐法、超声波处理法^[2]、氯化钠沉淀法^[3]、简化盐析法^[4]、血液 DNA 提取法^[5]、碘化钾法、酚/氯仿法^[6]、氯仿/异戊醇法^[7]等,和过去常用的方法相比,本方法不需要使用传统的有毒的苯酚等试剂,快速、简捷,一个样品操作一般可在 1 h 左右完成。虽然作者的方法增多了白细胞收集这一项,但该项的操作只需 10~15 min 即可完成。

2.3 提取出的基因组 DNA 量较大 100 μ L 全血中可以提取 3~15 μ g 基因组 DNA,同样的试剂量,采用作者的方法可以从 3 mL 全血中提取出 75~150 μ g 基因组 DNA。使试剂的使用率提高了 10 倍。

2.4 提高 PCR 扩增效率 如果用大量全血提取基因组 DNA,血浆中的残留物会阻碍 PCR 反应的效率,而采用作者的方法,先收集白细胞再抽提基因组 DNA,就可以避免这一影响,对下一步实验有好处。

综上所述,采用 0.2% NaCl 溶液处理收集白细胞,再用基

因组 DNA 提取试剂盒抽提基因组 DNA 的方法,具有经济、快捷、大量的特点,值得推广。

参考文献

- [1] 覃扬. 医学分子生物学实验教程[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,2004.
- [2] 杨泽民,罗少洪,陈耕夫. 三种全血基因组 DNA 提取方法的比较 [J]. 中国实用医药, 2009, 4(12):13-14.
- [3] 闫晓华,高立芬,续力云. 外周血 DNA 提取方法比较 [J]. 山东医学高等专科学校学报, 2008, 30(3):175-177.
- [4] 涂向东,江清华,兰风华. 三种简易提取全血基因组 DNA 方法的比较 [J]. 中国实验诊断学, 2006, 10(3):264-266.
- [5] 赵嘉惠,张华屏. 外周血 DNA 提取方法的比较及改良 [J]. 山西医科大学学报, 2006, 37(1):12-13.
- [6] 鞠海英,刘亚珍,刘永茂,等. 碘化钾与酚/氯仿提取外周血基因组 DNA 方法的比较 [J]. 中国生物制品学杂志, 2006, 19(5):532-533.
- [7] 张志,王龙武. 全血基因组 DNA 快速提取法[J]. 湘南学院学报, 2005, 7(1):12-14.

(收稿日期:2010-03-15)