

pEGFP-C2-ASIC2a 真核表达载体的构建及其在大鼠关节软骨细胞中的表达

倪文琳, 唐杰, 潘春晓, 葛金芳, 陈飞虎

摘要 目的 通过构建真核表达 pEGFP-C2-ASIC2a 质粒 转染大鼠关节软骨细胞, 建立 ASIC2a 在关节软骨细胞中过表达的模型, 观察 ASIC2a mRNA 及其蛋白在细胞中的表达。方法 从大鼠脑组织中提取目的基因 ASIC2a, 并用 EcoR I 和 Kpn I 进行双酶切, 同时用这两种酶双酶切质粒 pEGFP-C2, 将其酶切产物按常规方法连接并转化入大肠杆菌 DH5a, 挑单克隆菌进行培养, 提取质粒, 再通过双酶切鉴定及测序后, 用 Lipofectamine 2000 将所构建质粒转染入关节软骨细胞, 在荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达, 使用 RT-PCR 和 Western blot 法检测 ASIC2a mRNA 和蛋白表达, 以鉴定模型建立成功与否。结果 进行双酶切鉴定目的条带清晰准确, 转染后可在荧光显微镜下观察到绿色荧光表达, 通过 RT-PCR 可发现 mRNA 转录, Western blot 法可发现目的蛋白表达。结论 成功构建重组 pEGFP-C2-ASIC2a 表达载体, 将用于进一步观察 ASICs 对软骨细胞的影响。
关键词 ASIC2a; pEGFP-C2; 软骨细胞; 基因表达; 蛋白表达

中图分类号 R 593.22

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)03-0304-05

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)属于系统性自身免疫性疾病,是一种以慢性、多关节炎滑膜炎、关节外病变为主要表现的病因不明的全身性临床疾病。在 RA 发展过程中,软骨与骨组织的破坏是导致关节畸形和功能障碍的重要因素。研究^[1]表明,炎性滑液的低 pH 值及其引发的软骨细胞过度凋亡是导致软骨基质无法修复和再生的重要原因,纠正低 pH 环境导致的病理损伤成为 RA 防治的靶点之一。有研究^[2-4]表明,酸敏感离子通道(acid sensing ion channels, ASICs)对细胞外酸化环境敏感,受 H⁺ 门控(ASIC4 除外),激活的 ASICs 导致胞外 Na⁺、Ca²⁺ 内流并激发各种病理效应,在炎症、肿瘤、癫痫等以组织酸化为主要病理特征的疾病中发挥重要作用。关于 ASIC2a 在 RA 中的作用尚不明确,该研究通过构建真核表达 pEGFP-C2-ASIC2a 质粒,通过 Lipofectamine 2000 转入大鼠关节软骨细胞内,建立 ASIC2a 过表达模型,以期为进一步阐明 ASICs 在 RA 中的作用提供实验依据。

2013-08-26 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81271949)

作者单位:安徽医科大学药学院,合肥 230032

作者简介:倪文琳,女,硕士研究生;

陈飞虎,男,博士生导师,责任作者,E-mail: aydcfh@163.

com

chymal stem cells (MSCs) in microenvironment of rat myocardial ischemia *in vivo*. **Methods** The myocardial infarction (MI) models of rats were established by ligating the left anterior descending coronary artery. The MSCs labeled by green fluorescent protein (GFP) were injected into the surrounding area of the epicardium myocardial infarction ($n = 62$); the protein expression of the main myocardial specific markers (cTnI, MYH, Cx43, α -actin) on the transplanted MSCs was observed by immunofluorescence staining at day 3, day 5, day 7 and day 9; the corresponding mRNA related to the non-transplanted MSCs was acquired by laser capture microdissection and was measured by real-time PCR. Then, the transplanted area was observed by TUNEL staining. **Results** Immunofluorescence staining and real-time PCR indicated MYH were detected at day 3, significantly lower than day 5 and day 7; Cx43 were indicated at day 3, and at day 7 higher than day 5; cTnI was found at day 5, decreased compared to day 7 significantly ($P < 0.05$); while α -actin was not found; the transplanted MSCs which shared morphological features known from apoptotic cells by TUNEL staining decreased gradually and disappeared at day 9. **Conclusion**

The transplanted MSCs could express some main myocardial specific markers in the microenvironment of myocardial infarction, but the differentiated cardiomyocytes were immature, and could not survive for a long time effectively.

Key words myocardial infarction; mesenchymal stem cell; transplantation; myocardial specific markers; MYH; Cx43; cTnI; α -actin

1 材料与方法

1.1 实验动物 SD大鼠8只,清洁级,体重(160±20)g,由安徽医科大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂 真核表达重组质粒 pEGFP-C2(由安徽医科大学基础教研室都建老师馈赠);大鼠软骨细胞(原代提取)、DH5 α 感受态细胞为安徽省天然药物活性研究重点实验室保存。胰蛋白酶、高糖DMEM液体培养基(Hyclone公司,美国);EcoR I、Kpn I内切酶(Fermentas生物工程公司,加拿大);Solution I(TaKaRa公司,加拿大);Lipofectamine 2000、Opti-MEM、TRIzol Reagent(Invitrogen公司,美国);ASIC2a一抗(Alomone公司,以色列);胎牛血清(Gibco公司,美国);逆转录试剂盒(Fermentas公司,加拿大);倒置荧光显微镜(Olympus公司,日本)。

1.3 目的基因 ASIC2a cDNA 的扩增制备 根据目的基因序列,根据引物设计 PCR 特异性引物,上游引物序列:5'-CGGAATTCATGGACCTCAAG-GAGAGCCCC-3';下游引物:5'-CGGGTACCTCAG-CAGGCAATCTCTCCAG-3',上、下游引物分别引入酶切位点 EcoR I、Kpn I 及保护性碱基,并保持 ASIC2a 阅读框正确;所有引物由上海英潍捷基技术有限公司合成。扩增长度为 1 581 bp。 β -actin 引物上游为 5'-ACCACAGCTGAGAGGGAAATCG-3',引物下游为 5'-AGAGGTTTACGGATGTCAACG-3'作为内参。ASIC2a cDNA PCR 扩增条件:buffer 4 μ l, dNTP 2 μ l,上、下游引物各 1.5 μ l, TaqLA 酶 1 μ l 模板 3 μ l,剩下的用无酶水补足;反应条件:94 $^{\circ}$ C 变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 1 min 61 $^{\circ}$ C 1 min 72 $^{\circ}$ C 1.5 min,共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,获得目的片段。用胶回收试剂盒对 PCR 产物进行回收,然后用限制酶 EcoR I 和 Kpn I 对 T 载体进行酶切。将回收后的 PCR 产物和酶切后的 T 载体用 Solution I 进行连接(16 $^{\circ}$ C, 1.5 h)。转化连接产物至大肠杆菌 DH5a 感受态后,挑取单菌落进行扩增,提取质粒并用 EcoR I 和 Kpn I 双酶切连接产物,跑胶回收目的条带,以同样的方法对表达载体进行双酶切,与回收 PCR 产物以同样条件连接,并转化至大肠杆菌感受态 DH5a,挑选单克隆扩大培养,提取的质粒经双酶切后用 0.1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定酶切结果。将酶切正确的结果送上海英潍捷基技术有限公司测序。

1.4 大鼠关节软骨细胞原代、传代培养与脂质体转染

1.4.1 细胞准备 SD大鼠股动脉放血处死,取后肢关节软骨细胞,用 II 型胶原酶消化法获得原代软骨细胞,1 周后用胰酶消化,进行传代培养。待培养瓶中细胞生长至 80%~90% 时进行转染实验,试验分 3 组:正常组、空载体组、过表达组。

1.4.2 鼠源 pEGFP-C2-ASIC2a 重组质粒转染大鼠软骨细胞 软骨细胞在含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中培养,转染前 1 d 将对数生长期的软骨细胞消化计数(密度为 2×10^5 /孔),种于 6 孔板中,置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 24 h 后细胞生长至 80%~90%,分别将 4 μ g 质粒和 4 μ l 脂质体溶于 150 μ l OPTI-MEM 培养基中,5 min 后将两者混合室温静置 20 min;用 PBS 洗涤细胞 2 次后加入 1.7 ml OPTI-MEM,再逐滴加入质粒-脂质体混合物,轻轻摇晃,置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 5 h,然后更换含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液 2 ml,继续培养,分别于转染后 6、12、24 h 在荧光显微镜下观察,实验中同时空载体组作为对照。

1.5 过表达模型的鉴定

1.5.1 转染 24 h 后利用 RT-PCR 法检测细胞中 ASIC2a 的基因表达 取转染后细胞,按 TRIzol 试剂盒说明书提取总 RNA,分光光度计法测量 RNA 的浓度及纯度。按反转录试剂盒说明书合成 cDNA,反应体系为 20 μ l:总 RNA 8 μ l、Oligo(dT) 1 μ l、Nuclease-free 水补足 12 μ l,65 $^{\circ}$ C 孵育 5 min、冰上冷却 5 min 后加 5 \times Reaction Buffer 4 μ l、RNase inhibitor 1 μ l、10 mol/L dNTPMix 2 μ l、RevertAidTM M-MuLV Reverse Transcriptase 1 μ l,混匀后 42 $^{\circ}$ C 孵育 60 min,70 $^{\circ}$ C 加热 5 min。设计 PCR 扩增 ASIC2a 的引物序列,上游引物:5'-ACTGTCTCTGCAGGACAC-CCT-3';下游引物:5'-CACAGGTGCTCATGTTCT-CAT-3' 扩增长度 378 bp;PCR 体系 Mix 12.5 μ l,上、下游引物各 0.5 μ l, cDNA 1.0 μ l 剩余用无酶水补足 25 μ l。

1.5.2 转染 24 h 后利用 Western blot 法检测细胞中 ASIC2a 的蛋白表达 转染 24 h 后,提取各组细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,10% SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜并封闭非特异性结合位点,TBST 洗膜后,分别用 β -actin、ASIC2a 的一抗孵育(抗体稀释浓度分别为 1:10 000、1:4 500) 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜,TBST 洗膜后,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠和抗兔二抗室温孵育 1 h,TBST 洗膜后,加入 ECL 发光剂反应 30 s,电脑显影成像,实验重复 3 次。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件分析,

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间均数比较采用 *t* 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析,以 $\alpha = 0.05$ 作为检验水准。

2 结果

2.1 ASIC2a 基因的扩增 如图 1 所示,琼脂糖电泳结果表明,在 1 000 ~ 2 000 bp 之间有明显条带,目的基因为 1 581 bp。

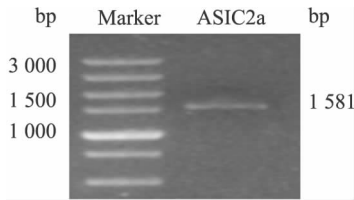


图 1 ASIC2a 基因 PCR 扩增结果

2.2 ASIC2a 与 T 载体和 pEGFP-C2 载体的连接与酶切 ASIC2a 与 T 载体连接后双酶切,出现目的条带和空载体条带,再将目的条带进行胶回收后与 pEGFP-C2 连接、双酶切,出现目的条带和空载体,表明质粒构建成功。测序结果表明所扩片段与目的片段呈高度同源性,提示所构建的质粒是可以使用的,见图 2 ~ 5。

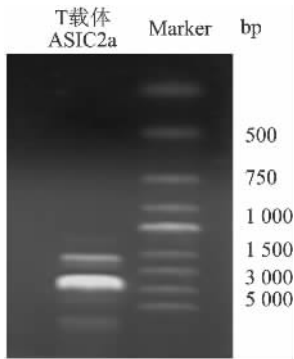


图 2 ASIC2a 与 T 载体连接后重组质粒条带

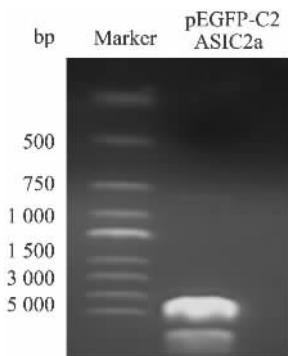


图 3 ASIC2a 与 pEGFP-C2 载体连接后重组质粒条带

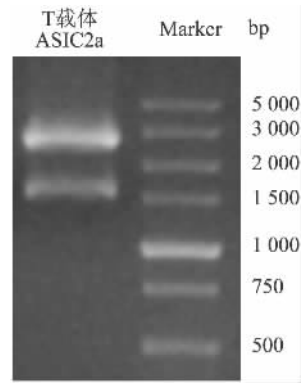


图 4 与 T 载体酶切鉴定结果

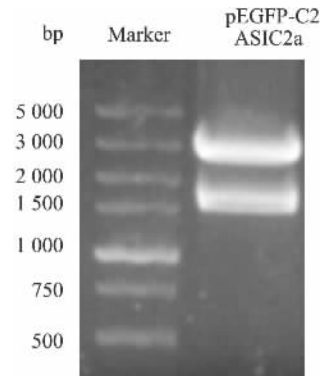


图 5 与 pEGFP-C2 载体酶切鉴定结果

2.3 pEGFP-C2-ASIC2a 转染进入软骨细胞后 ASIC2a 后表达情况

2.3.1 荧光显微镜下观察 pEGFP-C2-ASIC2a 在软骨细胞中的表达 在转染 6、12、24 h 后观察即可见绿色荧光细胞, pEGFP-C2 载体在细胞中呈现弥散性分布表达,且 24 h 效果最明显,见图 6。

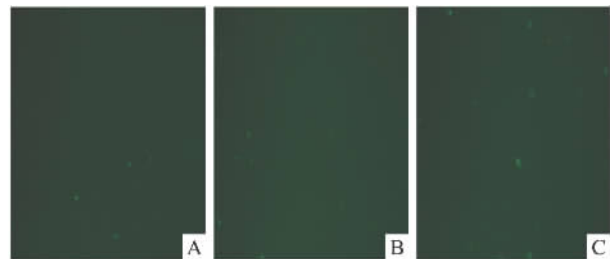


图 6 荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达 ×400
A: 转染 6 h; B: 转染 12 h; C: 转染 24 h

2.3.2 pEGFP-C2-ASIC2a 转染细胞后 ASIC2a 的基因表达情况 RT-PCR 法检测结果显示,空质粒 pEGFP-C2 对照组 ASIC2a 的 mRNA 表达与正常组比较差异无统计学意义,而 pEGFP-C2-ASIC2a 转染组 ASIC2a 基因的转录明显高于正常细胞和空载体转染细胞,差异有统计学意义 ($F = 110.709, P < 0.01$) 见图 7、8。

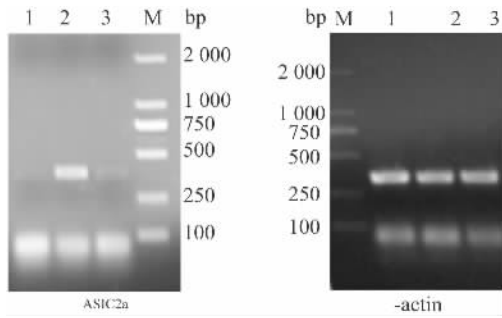


图7 RT-PCR 法检测 ASIC2a、 β -actin mRNA 的表达
M: DNA Marker; 1: 正常组; 2: 空载体组; 3: 过表达组

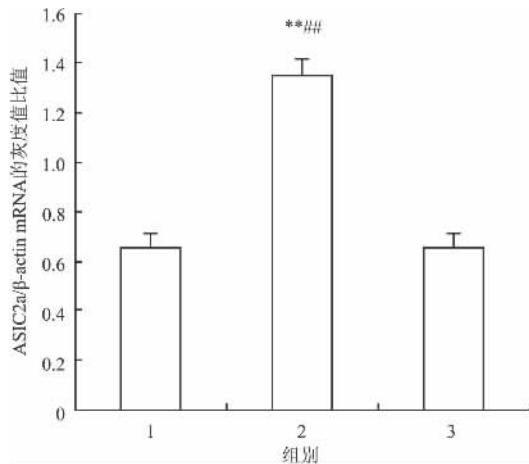


图8 ASIC2a mRNA 的相对表达水平

1: 正常组; 2: 过表达组; 3: 空载体组; 与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与空质粒转染组比较: ## $P < 0.01$

2.3.3 pEGFP-C2-ASIC2a 转入细胞后的蛋白表达情况的检测 经 Western blot 法检测显示: ASIC2a 转染组和空质粒 pEGFP-C2 对照组的细胞内均有 ASIC2a 蛋白表达, 转染后 ASIC2a 蛋白的表达明显高于正常组和空载体转染细胞 ($F = 245.32, P < 0.01$), 见图 9、10。

3 讨论

pEGFP-C2 是能够表达绿色荧光蛋白的真核表达质粒, 可以在荧光显微镜下进行观察, 具有易转染真核细胞的特点, 且以 pEGFP 为报告基因的表达载

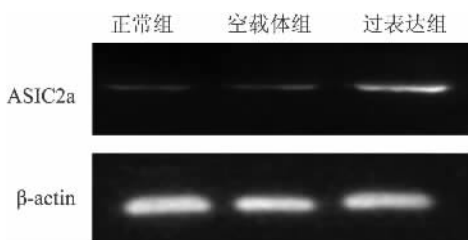


图9 Western blot 法检测 ASIC2a 蛋白的表达

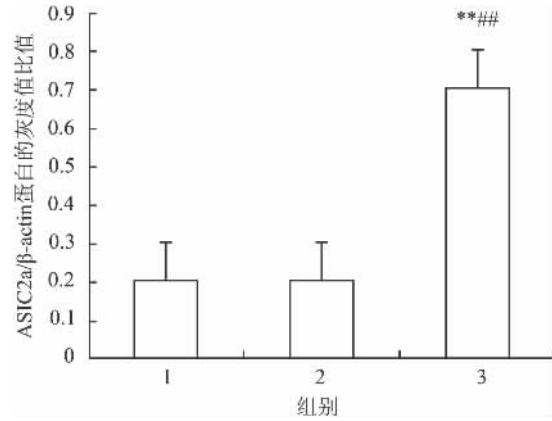


图10 ASIC2a 蛋白的相对表达水平

1: 正常组; 2: 空载体组; 3: 过表达组; 与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与空载体组比较: ## $P < 0.01$

体具有检测方便、荧光稳定、对宿主细胞无任何毒害、不影响目的蛋白的生物活性等优点^[5]。鉴于 T 载体可以提高克隆的稳定性, 提高连接的成功率^[6], 本研究将目的基因 ASIC2a 与 T 载体连接后再与表达载体 pEGFP-C2 连接, 通过 Lipofectamine 2000 转入大鼠关节软骨细胞内, 建立 ASIC2a 过表达模型。双酶切鉴定与测序以及 RT-PCR 与 Western blot 法结果均表明目的基因 ASIC2a 表达升高, 提示质粒构建成功。

RA 是一种不明病因, 以慢性多关节炎为主要临床症状的自身免疫性疾病, 关节腔内炎性介质导致 pH 值的降低是 RA 发病的主要原因之一, 可引起侵蚀性外周滑膜炎, 继而导致滑膜组织增生, 软骨细胞过度凋亡。机体可以通过 ASICs 感受胞外 pH 的变化^[7]。本课题组前期研究^[8]证实佐剂性关节炎 (adjuvant arthritis, AA) 大鼠关节软骨细胞上广泛表达 ASIC1a、ASIC2a 和 ASIC3, 并且 ASIC1a 已被证明参与酸激活介导 Ca^{2+} 内流导致的大鼠关节软骨细胞凋亡并且已经通过建立 ASIC1a 的沉默和过表达的模型证实 ASIC1a 在酸诱导的关节软骨细胞凋亡中的作用。然而, 对于 ASIC2a 及其他亚基在 RA 中的作用尚不明确。文献^[9-10]报道, 上调 ASIC2a 可达到缺血预处理对脑缺血损伤的神经保护作用, ASIC2a 对 Ca^{2+} 的渗透和质子浓度的改变有相对较低的敏感性, 且 ASIC2a 的上调表达与抗凋亡因子 Bcl-2、Bcl-w 有相似的表达模式。ASIC2a 敲除则可导致 C6 胶质细胞瘤细胞 Ca^{2+} 内流增加^[11], 提示 ASIC2a 表达改变也可以影响 ASICs 对酸的敏感性和 Ca^{2+} 的通透性, 参与脑缺血等疾病的发病。本研究成功构建了 pEGFP-C2-ASIC2a 真核表达载

体并建立大鼠关节软骨细胞 ASIC2a 过表达模型, 本研究的开展将有助于进一步研究 ASIC2a 在 RA 发病中的作用, 为寻找 RA 的治疗靶标提供依据。

参考文献

- [1] Bao J P, Chen W P, Wu L D, et al. a potential therapeutic target for rheumatoid arthritis[J]. *J Int Med Res* 2009, 37(6): 1655-61.
- [2] Xiong Z G, Chen W P, Simon R P. Acid sensing ion channels—novel therapeutic targets for ischemic brain injury[J]. *Front Biosci*, 2007, 12: 1376-86.
- [3] He Z Y, Zheng X, Wu X H, et al. Development of glycyrrhizin acid-modified stealth cationic liposomes for gene delivery[J]. *Int J Pharm* 2010, 397(1-2): 147-54.
- [4] Wang X, Singer S D, Liu Z. Silencing of meiosis-critical genes for engineering male sterility in plants[J]. *Plant Cell Rep* 2012, 31(4): 747-56.
- [5] Lu Y, Zhang A F, Han W Q, et al. Construction of recombinant plasmid pEGFP-C2-L539fs/47 and its expression in HEK293 cells[J]. *J Med Coll PLA*, 2012, 27(3): 125-33.
- [6] 王念, 陈飞虎, 江晟, 等. pcDNA3.1/ASIC1a 真核表达载体的构建及其在佐剂性关节炎大鼠关节软骨细胞中的表达[J]. *安徽医科大学学报* 2011, 46(6): 514-8.
- [7] Rong C, Chen F H, Jiang S, et al. Inhibition of acid-sensing ion channels by amiloride protects rat articular chondrocytes from acid-induced apoptosis via a mitochondrial-mediated pathway. [J] *Cell Biol Int*, 2012, 36(7): 635-41.
- [8] 袁凤来, 陈飞虎, 李霞, 等. 大鼠关节软骨酸敏感离子通道的表达[J]. *安徽医科大学学报*, 2007, 42(5): 513-6.
- [9] Miao Y, Zhang W, Lin Y, et al. Neuroprotective effects of ischemic preconditioning on global brain ischemia through up-regulation of acid-sensing ion channel 2a[J]. *Int J Mol Sci*, 2010, 11(1): 140-53.
- [10] Johnson M B, Jin K, Minami M, et al. Global ischemia induces expression of acid-sensing ion channel 2a in rat brain[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2001, 21(6): 734-40.
- [11] Liu X Y, Zhang S Z, Ma X Y, et al. Knockdown of ASIC2a subunit aggravates injury of rat C6 glioma cells in acidosis[J]. *J Physiol Biochem*, 2011, 67(2): 275-81.

Construction of pEGFP-C2-ASIC2a eukaryotic expression vector and its expression in articular cartilage cells of rats

Ni Wenlin, Tang Jie, Pan Chunxiao, et al

(School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To construct eukaryotic expression vector of acid sensing ion channel-2a(ASIC2a), and transfect it into the articular cartilage cells of rats to make the model of overexpression of ASIC2a. **Methods** Got the cDNA of ASIC2a from rat brain, then ASIC2a cDNA was amplified by PCR and cut with double enzyme EcoR I and Kpn I, then inserted into the eukaryotic expression vector pEGFP-C2. The recombinant vector was verified by PCR, restriction enzymes cut and sequencing identified. We used Lipofectamine 2000 transfection reagent to transfect the plasmid into the cartilage cells of rats, then observed GFP expression under the fluorescence microscope. We also determined the relative expression of the mRNA and protein of ASIC2a by RT-PCR and Western blot to identify whether the model of overexpression was constructed successfully. **Results** The plasmid was identified by enzyme cutting where the purpose gene was included, and the electrophoretic stripes were accurate and distinct, also GFP could be detected in the transfected articular cartilage cells of rats. ASIC2a gene expression could be detected by PCR, also its protein expression was detected by Western blot. **Conclusion** The model of overexpression is constructed successfully which can be used to observe the effect on cartilage cells of the acid sensing ion channels expression.

Key words ASIC2a; pEGFP-C2; chondrocytes; gene expression; protein expression