

心肌特异性启动子表达载体的构建及其功能鉴定

何文俊*, 李世崇*, 叶玲玲, 王启伟, 王海涛, 谢靖, 刘红, 陈昭烈

军事医学科学院生物工程研究所 细胞工程研究室, 北京 100071

摘要: 本研究构建了心肌特异性 α -肌球蛋白重链(α -MHC)启动子表达载体, 并对其功能进行了鉴定。以小鼠基因组DNA为模板, 通过PCR扩增得到 α -MHC启动子, 插入pGEM[®]-T Easy载体, 酶切后回收目的片段, 置换pcDNA3.1(+)-EGFP-hygro中的CMV启动子, 成功构建出 α -MHC-EGFP表达载体。对其进行酶切鉴定后, 通过电穿孔法转染原代小鼠心肌细胞, 转染阳性的心肌细胞出现绿色荧光, 而非心肌细胞无荧光出现。 α -MHC-EGFP表达载体具有心肌特异性表达特性, 可用于纯化胚胎干细胞来源的心肌细胞。

关键词: 心肌细胞, 胚胎干细胞, α -肌球蛋白重链, 启动子, 增强型绿色荧光蛋白

Construction and characterization of cardiac specific promoter-driven expression vector

Wenjun He*, Shichong Li*, Lingling Ye, Qiwei Wang, Haitao Wang, Jing Xie, Hong Liu, and Zhaolie Chen

Department of Cell Engineering, Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

Abstract: We constructed and identified cardiac-specific α -myosin heavy chain (α -MHC) promoter-driven expression vector. α -MHC promoter was amplified by PCR by using mouse genomic DNA as template and inserted into pGEM[®]-T Easy vector. The inserted fragment was released by enzyme digestion, and then the cytomegalo virus (CMV) promoter in pcDNA3.1(+)-EGFP-hygro vector was replaced by the α -MHC promoter to construct α -MHC-EGFP expression vector. After identification with enzyme digestion, α -MHC-EGFP was transfected into mouse primary cardiomyocytes by electroporation. Green fluorescence could be observed in transfected cardiomyocytes, but not in transfected non-cardiomyocytes. α -MHC-EGFP expression vector was specifically expressed in cardiomyocytes, and could be used to purify embryonic stem cell-derived cardiomyocytes.

Keywords: cardiomyocytes, embryonic stem cells, α -myosin heavy chain, promoter, enhanced green fluorescent protein

许多心血管疾病都伴随急性或慢性心肌损伤, 由于心肌细胞不能再生, 心肌细胞死亡将导致瘢痕组织的形成, 削弱心脏功能, 最终引起心力衰竭。最近的研究证实, 将分离的细胞直接移植到心脏受损

部位能够改善心脏功能^[1-5], 是一种很有希望的治疗缺血性心脏病的方法, 但这需要大量的心肌细胞。胚胎干细胞(Embryonic stem cells, ESC)是一种来源于囊胚内细胞团的多能性干细胞, 不仅可在体外无

Received: June 9, 2009; Accepted: August 14, 2009

Supported by: The Eleventh Five-year Program for Young Scholar Project in Military (No. 06Q86).

Corresponding author: Zhaolie Chen. E-mail: chenlz23@hotmail.com

* These authors contributed equally to this study.

军队十一五计划课题青年学者项目(No. 06Q86)资助。

限增殖, 又能分化为心肌细胞, 是目前最有前途的细胞来源之一^[6]。尽管报道了多种可使 ESC 分化为心肌细胞的方法, 但 ESC 分化来的细胞中仍然含有大量的非心肌细胞及部分未分化的 ESC, 这些细胞的存在会影响 ESC 来源的心肌细胞的临床应用。

ESC 来源的心肌细胞特异性表达 α -肌球蛋白重链(α -myosin heavy chain, α -MHC)、 α -tropomyosin、MLC-2v、心房利钠因子等。为了从胚胎干细胞分化来的细胞中选择心肌细胞, Klug 等构建了 α -MHC 启动子驱动的新霉素选择基因的表达载体, 将其转染到 ESC 中, 启动 ESC 分化后用 G418 筛选, 获得了纯化的心肌细胞^[7]。本研究将心肌特异性 α -MHC 启动子与增强型绿色荧光蛋白(Enhanced green fluorescent protein, EGFP)连接, 构建出心肌特异性表达载体 α -MHC-EGFP。当用 α -MHC-EGFP 转染原代小鼠心肌细胞时, 心肌细胞表达 EGFP, 而非心肌细胞不表达。如果将 α -MHC-EGFP 应用于小鼠 ESC, ESC 分化来的心肌细胞也可表达 EGFP, 因此, 利用流式细胞分选技术可达到纯化 ESC 来源的心肌细胞的目的。

1 材料和方法

1.1 质粒、感受态、细胞系和实验动物

载体 pcDNA3.1(+)-EGFP-hygro 由本实验室构建; 大肠杆菌感受态细胞 TOP 10 购自北京全式金生物技术有限公司; 小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)由本实验室保存; 新生 1 d 的昆明小鼠购自军事医学科学院实验动物中心。

1.2 主要试剂

LA *Taq* DNA 聚合酶、IPTG、X-gal、基因组 DNA 提取试剂盒(DV811A)购自 TaKaRa 公司; pGEM®-T Easy 载体系统(A1360)购自 Promega 公司; 限制性内切酶 *Xba*、*EcoR*、*Mlu*、*Nhe*、*Sph*、*Pvu*, T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司; 普通质粒小提试剂盒(DP103-03)和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(DP209)购自天根生化科技有限公司; 高糖 DMEM 和胎牛血清(FBS)购自 Invitrogen 公司; 胰蛋白酶购自 Hyclone 公司; 乙二胺四乙酸二钠(EDTA)购自北京化工厂; 肌钙蛋白 T 购自福州迈新生物技术开发有限公司; TRITC 标记的羊抗小鼠 IgG 购自北京中杉

金桥生物技术有限公司; DAPI 购自 Sigma 公司。

1.3 仪器设备

PCR 仪购自 Biometra 公司; 离心机购自 Eppendorf 公司; 电泳仪购自北京市六一仪器厂; 凝胶成像采集系统购自 United-Bio 公司; 水浴锅购自 Huber 公司; 台式恒温振荡器购自江苏太仓市实验设备厂; 恒温培养箱购自上海市跃进医疗器械一厂; 超净工作台购自上海力申科学仪器有限公司; CO₂ 孵箱购自 Thermo Forma 公司; 相差显微镜购自 Nikon 公司; 荧光显微镜购自 Zeiss 公司; 电穿孔仪购自 Bio-Rad 公司。

1.4 心肌特异性启动子表达载体的构建策略 构建过程见图 1。

1.5 引物设计

用软件 pDRAW32 找到小鼠心肌 α -MHC 启动子合适的酶切位点 *Sph* I, 酶切位置在 2659 bp, 将 α -MHC 启动子分为 MHC1(2659 bp)和 MHC2(2784 bp)两段进行 PCR 扩增。

MHC1 上游引物: 5'-GATC ACGCGT GGA TCC TGC AAG GTC ACA CAA GGG TCT CCA CCC AC-3'(下划线为 *Mlu* I 酶切位点); MHC1 下游引物: 5'-GTC TT GCAATG AGT ATT CTT GAA GGG ACC TGA TTC-3'(下划线为 *Sph* I 酶切位点)。MHC2 上游引物: 5'-GAA TAC T GCAATG AAG ACC TAA GAC CCC TGG AGA GAG G-3'(下划线为 *Sph* I 酶切位点); MHC2 下游引物: 5'-GATC GCTAGC GTC GAC TCA AAC TCT TAT GGG GGA GAT AGG AGG GAT C-3'(下划线为 *Nhe* I 酶切位点)。*Mlu* I 和 *Nhe* I 两个酶切位点用于置换载体 pcDNA3.1(+)-EGFP-hygro 中的 CMV 启动子, 而在 α -MHC 启动子中不存在。

1.6 目的片段的扩增及回收

从 MEF 中提取基因组 DNA, 作为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系如下: 小鼠基因组 DNA 1 μ L, 10 μ mol/L 的上下游引物各 1 μ L, LA *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μ L, 10 \times LA PCR Buffer 5 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 8 μ L, 加无菌蒸馏水至总体积 50 μ L。PCR 反应条件如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2.5 min, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳, 切取目的片段进行回收。

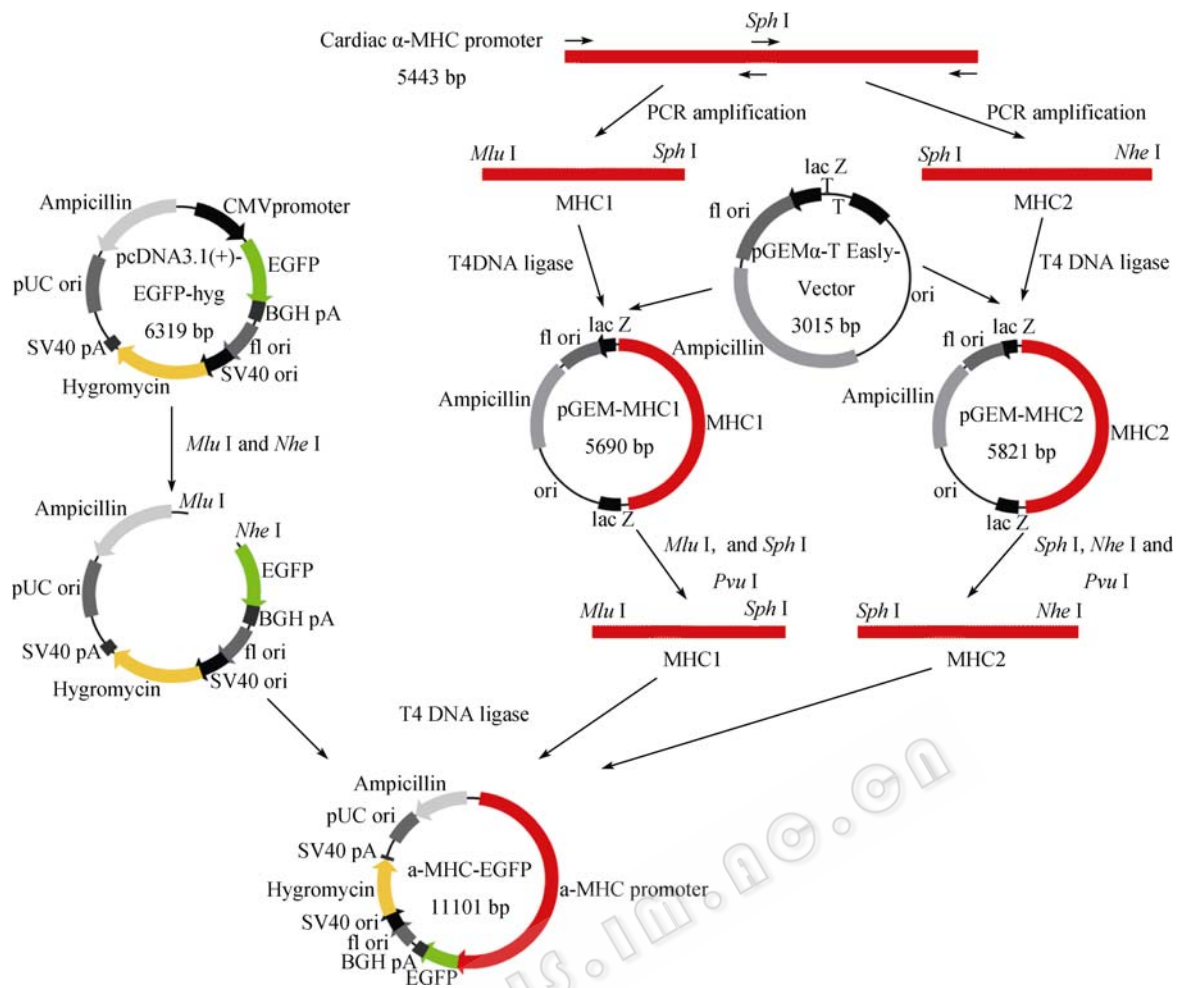


图1 α -MHC-EGFP 表达载体的构建过程
Fig. 1 Construction of α -MHC-EGFP expression vector.

1.7 目的片段与 pGEM[®]-T Easy 载体连接及酶切鉴定

取回收纯化的 PCR 产物 MHC1 和 MHC2 各 3 μ L, 分别加 2 \times 快速连接缓冲液 5 μ L, pGEM[®]-T Easy 载体 0.5 μ L, T4 DNA 连接酶 1 μ L, 加无菌蒸馏水至总体积 10 μ L, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。将连接产物与大肠杆菌感受态细胞 TOP 10 充分混合, 冰浴 30 min 后 42 $^{\circ}$ C 热激 90 s, 再冰浴 3 min。然后加入 800 μ L LB 培养基, 置于 37 $^{\circ}$ C 恒温振荡器 150 r/min 孵育 1 h, 2000 r/min 离心 5 min, 再用 200 μ L LB 培养基重悬, 并加入 20% 的 IPTG 10 μ L 和 2% 的 X-gal 50 μ L, 混匀后涂于含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上。37 $^{\circ}$ C 培养 16 h 后出现蓝、白噬菌斑, 挑选白色单菌落接种于 5 mL 含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中培养过夜。第 2 天提取质粒, pGEM-MHC1 用 *Xba* 酶切,

GEM-MHC2 用 *EcoR* I 酶切, 然后进行琼脂糖凝胶电泳检测目的片段有无插入。

1.8 α -MHC-EGFP 表达载体的构建及酶切鉴定

pGEM-MHC1 用 *Mlu* I、*Sph* I 和 *Pvu* I 酶切, pGEM-MHC2 用 *Sph* I、*Nhe* I 和 *Pvu* I 酶切, pcDNA3.1(+)-EGFP-hygro 用 *Mlu* I 和 *Nhe* I 酶切。pGEM-MHC1 酶切后回收 2659 bp 片段, pGEM-MHC2 酶切后回收 2784 bp 片段, pcDNA3.1(+)-EGFP-hygro 酶切后回收 5652 bp 片段。将上述 3 个回收片段分别取 8 μ L、8 μ L 和 5 μ L, 10 \times T4 DNA 连接缓冲液 2.5 μ L, T4 DNA 连接酶 1 μ L, 加无菌蒸馏水至总体积 25 μ L, 16 $^{\circ}$ C 孵育过夜。将连接产物转化感受态细胞 TOP 10, 涂于含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上。37 $^{\circ}$ C 培养 16 h 后, 挑选单菌落接种于含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中培养过夜。第 2 天提取

质粒 α -MHC-EGFP, 用 *EcoR* 酶切后进行琼脂糖凝胶电泳。

1.9 小鼠心肌细胞的分离

取 20 只新生 1 d 的昆明小鼠, 取出心脏剪碎后, 用 PBS 漂洗 3 次去除血细胞和死细胞, 加入 0.25% 胰酶+0.04% EDTA 消化液, 37°C 水浴消化 1 min, 静置后吸取上清用血清终止消化。未消化的组织块, 再加入胰酶溶液消化, 重复几次, 直至组织块消化完全。将收集的消化上清用 200 目筛网过滤后, 2000 r/min 离心 5 min。PBS 漂洗 1 次后, 用含 10% FBS 的 DMEM 重悬细胞, 接种于 100 mm 组织培养皿中差速贴壁 40 min 去除成纤维细胞。再次收集未贴壁的心肌细胞。

1.10 α -MHC-EGFP 表达载体的功能鉴定

用 800 μ L 无血清 DMEM 重悬心肌细胞, 使其细胞密度为 1×10^7 mL, 加入 50 μ g 线性化的 α -MHC-EGFP, 充分混合于 0.4 cm 的电激槽中, 室温静置 5 min, 电穿孔前再次混匀细胞与质粒, 电穿孔参数为 240 V、500 μ F。电穿孔后冰浴 10 min, 然后加入新鲜的培养液于 24 孔培养板中培养。48 h 后加入 200 μ g/mL 潮霉素 B 筛选转染阳性的细胞, 并于荧光显微镜下观察转染阳性的心肌细胞是否出现绿色荧光。

1.11 免疫荧光染色鉴定

观察到细胞发绿色荧光后, 进行肌钙蛋白 T 免疫荧光染色。用 PBS 快速洗 1 次细胞, 然后立刻加入 4% 多聚甲醛室温固定 30 min。PBS 漂洗除去残余的固定液, 0.3% TritonX-100 作用 30 min, PBS 漂洗后加羊血清封闭 20 min。甩掉血清, 加一抗 cTnT(1:200), 4°C 过夜。PBS 漂洗, 加二抗 TRITC 标记的羊抗小鼠 IgG(1:50), 室温避光孵育 2 h。PBS 漂洗, DAPI 复染细胞核, 荧光显微镜下观察。

2 结果

2.1 目的片段的 PCR 扩增

以小鼠基因组 DNA 为模板, 将 α -MHC 启动子分为两段进行 PCR 扩增后, 1% 琼脂糖凝胶电泳可见特异性 2675 bp(MHC1)和 2806 bp(MHC2)扩增片段(图 2)。

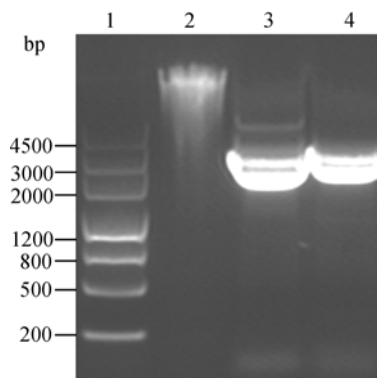


图 2 目的片段 PCR 扩增产物的凝胶电泳图

Fig. 2 PCR products of target gene. 1: DNA marker; 2: mouse genomic DNA; 3: PCR product of MHC1 (2675 bp); 4: PCR product of MHC2 (2806 bp).

2.2 目的片段与 T easy 载体连接后的酶切鉴定

扩增产物 MHC1 和 MHC2 分别与 pGEM[®]-T Easy 载体连接, 转化大肠杆菌感受态细胞 TOP 10, 挑选白色单菌落扩增。提取质粒后, pGEM-MHC1 用 *Xba* I 酶切将出现 1871 bp 和 3821 bp 两条带, pGEM-MHC2 用 *EcoR* I 酶切预期出现 1129 bp、1719 bp 和 2997 bp 三条带, 鉴定结果与预期结果相符(图 3)。

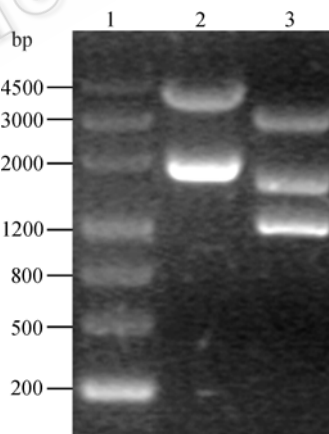


图 3 pGEM-MHC1 和 pGEM-MHC2 的酶切鉴定

Fig. 3 Identification of pGEM-MHC1 and pGEM-MHC2 by restricted enzyme digestion. 1: DNA marker; 2: pGEM-MHC1 digested with *Xba* I; 3: pGEM-MHC2 digested with *EcoR* I.

2.3 α -MHC-EGFP 表达载体的构建及酶切鉴定

pGEM-MHC1、pGEM-MHC2 和 pcDNA3.1(+)-EGFP-hygro 酶切后分别回收目的片段, T4 DNA 连接酶连接后得到 α -MHC-EGFP, 转化大肠杆菌感受态细胞 TOP 10, 挑选单菌落扩增。提取质粒后, α -MHC-EGFP 用 *EcoR* I 酶切出现了 1734 bp、2101 bp 和 7266 bp 三条带(图 4), 与预期相符。

2.4 α -MHC-EGFP 表达载体的功能鉴定

α -MHC-EGFP 表达载体转染小鼠心肌细胞 72 h

后,部分心肌细胞发出绿色荧光(图 5B)。肌钙蛋白 T 为心肌细胞特异性标志物^[8],免疫荧光染色结果显示,转染阳性的绿色荧光细胞同时发出红色荧光(图 5C),而转染阳性的非心肌细胞始终未观察到绿色荧光(图 5A 和 5D,箭头所示)。

3 讨论

肌球蛋白是心肌肌小节粗肌丝的主要成分,由重链(MHC)和轻链(MLC)组成。在心肌中, MHC 有两种亚型,即 α -MHC 和 β -MHC。 β -MHC 是胚胎发生和发育过程中心肌中存在的主要亚型;而 α -MHC 在小鼠出生后的表达水平增加,是成年小鼠心肌中的主要形式^[9]。Gulick 等分离出小鼠心肌 MHC 基因座,并鉴定了 α -MHC 基因的启动子区, α -MHC 启动子能够在心肌中特异性驱动 CAT 基因的表达,而非心肌组织中不表达^[10]。

本研究克隆了 α -MHC 基因的启动子区, α -MHC

启动子全长为 5443 bp,由于目的片段较大,为了提高 PCR 过程中的保真性,考虑将其分为两段 MHC1 和 MHC2 进行 PCR 扩增。pcDNA3.(+)-EGFP-hygro 载体由 pcDNA3.1(+)-改造而成,在 CMV 启动子后插入了 EGFP 基因,并将新霉素基因替换成潮霉素 B

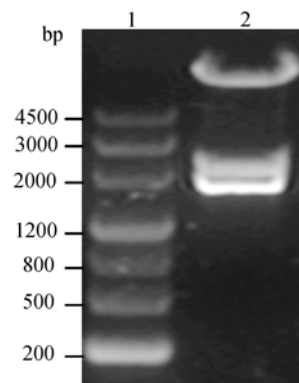


图 4 α -MHC-EGFP 的酶切鉴定

Fig. 4 Identification of α -MHC-EGFP by restricted enzyme digestion. 1: DNA marker; 2: α -MHC-EGFP digested with *EcoRI*.

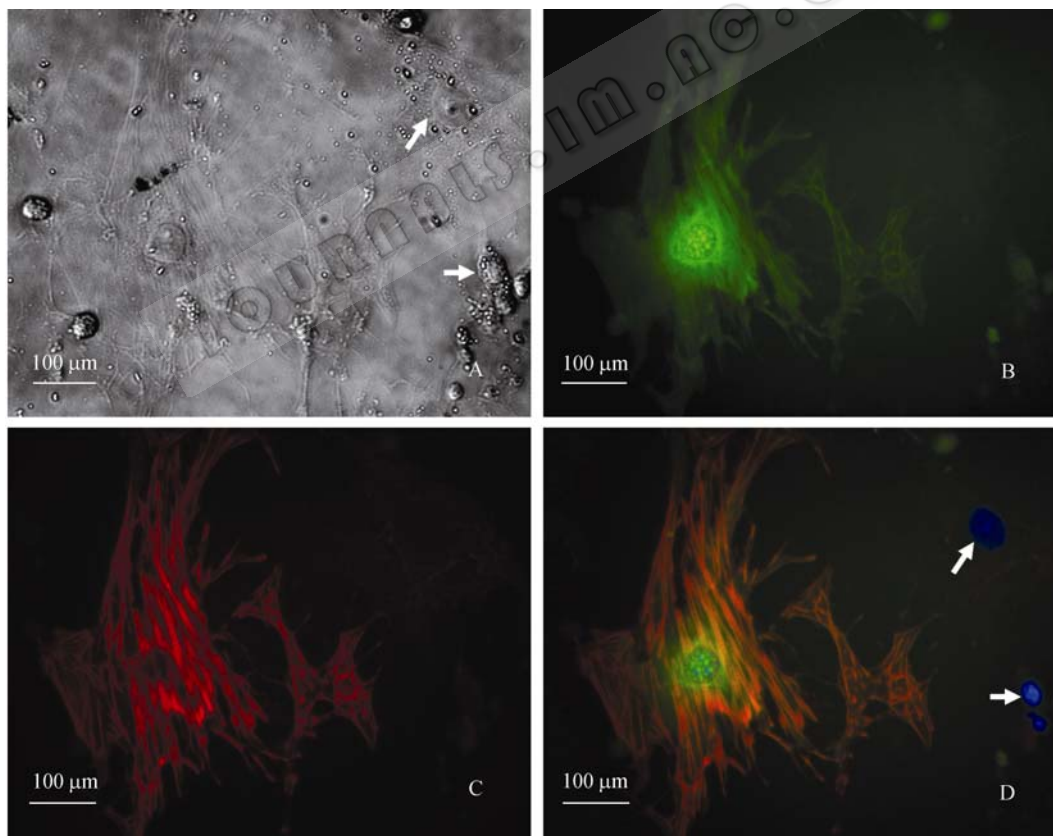


图 5 α -MHC-EGFP 表达载体转染的小鼠心肌细胞

Fig. 5 Green fluorescent proteins were expressed by mouse cardiomyocytes transfected by α -MHC-EGFP expression vector. (A) Contrast phase microscope observation of cardiomyocytes transfected by α -MHC-EGFP. (B) Cardiomyocytes of transfection positive show green fluorescent. (C) Troponin T in cardiomyocytes in the same area show red fluorescent. (D) Merge of B and C, and nuclei marked with DAPI show blue fluorescent (bar=100 μ m).

基因。为了验证 α -MHC 启动子的功能, 将 pcDNA3.1(+)-EGFP-hygro 载体上的 CMV 启动子替换为 α -MHC 启动子。通过在 MHC1 的 5 端和 MHC2 的 3 端分别引入 *Mlu* 和 *Nhe* 酶切位点, 用 *Mlu* 和 *Nhe* 酶切 CMV 启动子, 成功将 α -MHC 启动子定向插入到 *EGFP* 基因的 5 端。再将构建好的 α -MHC-EGFP 表达载体通过电穿孔法转染原代小鼠心肌细胞, 转染 72 h 后, 在荧光显微镜下可见心肌细胞发出绿色荧光, 而成纤维细胞没有出现绿色荧光, 说明构建的 α -MHC-EGFP 表达载体能够在心肌细胞中特异性表达。

Klug 等证实 MHC-neo^r 转染不影响 ESC 向心肌细胞分化, 纯化后的心肌细胞可达到 99% 以上, 分化来的心肌细胞结构和功能也没有受到影响, 而且在心脏内能够形成稳定的移植体^[7]。将 α -MHC-EGFP 表达载体转染小鼠 ESC, 当 ESC 分化为心肌细胞时可表达 EGFP, 因此, 不仅可以在活细胞状态下监测 ESC 向心肌细胞分化的状态^[11], 而且还可利用流式细胞分选技术纯化 ESC 来源的心肌细胞。这种筛选方法还可应用到所有 ESC 来源的细胞衍生物中, 以及研究某些基因的组织特异性或发育阶段特异性表达。

REFERENCES

- [1] Laflamme MA, Murry CE. Regenerating the heart. *Nat Biotechnol*, 2005, **23**(7): 845–856.
- [2] Dimmeler S, Zeiher AM, Schneider MD. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest*, 2005, **115**(3): 572–583.
- [3] Ye L, Haider HK, Sim EK. Adult stem cells for cardiac repair: a choice between skeletal myoblasts and bone marrow stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2006, **231**(1): 8–19.
- [4] Menasché P. Skeletal myoblasts and cardiac repair. *J Mol Cell Cardiol*, 2008, **45**(4): 545–553.
- [5] Hristov M, Weber C. The therapeutic potential of progenitor cells in ischemic heart disease—past, present and future. *Basic Res Cardiol*, 2006, **101**(1): 1–7.
- [6] He WJ, Chen ZL. Progresses in myocardial tissue engineering. *Lett Biotechnol*, 2009, **20**(3): 426–429. 何文俊, 陈昭烈. 心肌组织工程研究进展. 生物技术通讯, 2009, **20**(3): 426–429.
- [7] Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, et al. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest*, 1996, **98**(1): 216–224.
- [8] Saba Z, Nassar R, Ungerleider RM, et al. Cardiac troponin T isoform expression correlates with pathophysiological descriptors in patients who underwent corrective surgery for congenital heart disease. *Circulation*, 1996, **94**(3): 472–476.
- [9] Liew CC, Jandreski MA. Construction and characterization of the alpha form of a cardiac myosin heavy chain cDNA clone and its developmental expression in the Syrian hamster. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, **83**(10): 3175–3179.
- [10] Gulick J, Subramaniam A, Neumann J, et al. Isolation and characterization of the mouse cardiac myosin heavy chain genes. *J Biol Chem*, 1991, **266**(14): 9180–9185.
- [11] Takahashi T, Lord B, Schulze PC, et al. Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes. *Circulation*, 2003, **107**(14): 1912–1916.

快 讯

心肌再生研究取得重要进展

心肌梗死是严重影响人类健康的常见疾病。心肌损伤后的再生是现代医学面临的重大科学难题。中国科学院遗传发育所戴建武实验室从事再生医学研究, 在功能生物材料和干细胞研究中取得了一系列的创新成果。

最近, 戴建武实验室与南京市鼓楼医院以及专门从事组织再生生物医用材料研发与生产的烟台正海生物技术有限公司合作, 在心肌损伤再生研究中取得了重要突破。心肌梗死后, 损伤部位形成以胶原蛋白为主要成分的纤维化区域, 相关区域功能降低。戴建武实验室研制了能特异与胶原材料结合的基因工程重组的人内皮生长因子 (CBD-VEGF), 提出了将心肌梗死纤维化区域内源的胶原基质作为 CBD-VEGF 的结合靶点和心肌再生的支架的科研思路。他们与合作者在大鼠心肌梗死模型中证明心肌梗死部位的胶原蛋白能够作为 CBD-VEGF 有效的靶点。通过多种心脏功能测试和组织学分析表明 CBD-VEGF 可以有效地促进心肌的再生和心脏功能恢复。

心肌再生的机理可能涉及到特异结合到坏死区胶原蛋白纤维的 CBD-VEGF 能促进纤维化区域的重新血管化和引导区域内干细胞参与心肌的再生。作为国家中长期重大科研计划“调控干细胞自我更新的分子网络研究”项目的首席科学家, 戴建武研究员表示“目前虽然还不清楚心肌干细胞和外周血干细胞是否或如何参与心肌的再生, 但这一发现为临床上心肌梗死病人的治疗和其它纤维化组织的再生的研究提供了新的思路。研究成果有非常广阔的临床应用前景”。

这项工作以该实验室博士研究生张晶为第一作者发表在近期《循环》(CIRCULATION) 上。

来源: 中国科学院遗传与发育生物学研究所