

脂质体介导 *Bcl-xL* 基因体外转染人角膜基质细胞的动态表达

李新宇, 刘磊, 李贵刚, 栗静

基金项目: 中国湖北省自然科学基金资助项目 (No. 2008CDB214)
作者单位: (430030) 中国湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属同济医院眼屈光中心
作者简介: 李新宇, 男, 副教授, 副主任医师, 医学博士, 研究方向: 角膜病及屈光手术。
通讯作者: 李新宇. lixy07@126. com
收稿日期: 2009-12-19 **修回日期:** 2010-01-15

Investigation of liposome mediated *Bcl-xL* gene transfer into keratocyte

Xin-Yu Li, Lei Liu, Gui-Gang Li, Jing Li

Foundation item: Natural Science Foundation of Hubei Province, China (No. 2008CDB214)

Department of Ophthalmology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China

Correspondence to: Xin-Yu Li. Department of Ophthalmology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei Province, China. lixy07@126. com

Received: 2009-12-19 Accepted: 2010-01-15

Abstract

- **AIM:** To evaluate *Bcl-xL* gene expression rule in human keratocyte transferred with Lipofectamine™ (LF)2000.
- **METHODS:** The transfection efficiency was examined with RT-PCR, flow cytometry 1 day, 2, 3, 5, 10, 15 days after transfection.
- **RESULTS:** *Bcl-xL* expression in keratocyte was observed 1 day after transfection, at the top on 3 days (48.3%), and declined thereafter, while on 15 days there were still a little *Bcl-xL* positive cells.
- **CONCLUSION:** Liposome can transfer *Bcl-xL* gene into keratocyte.
- **KEYWORDS:** keratocyte; gene transfer; liposome

Li XY, Liu L, Li GG, et al. Investigation of liposome mediated *Bcl-xL* gene transfer into keratocyte. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010;10(2):229-230

摘要

目的: 观察脂质体 Lipofectamine™ (LF)2000 介导 *Bcl-xL* 基因在人角膜基质细胞中表达的时间规律。

方法: *Bcl-xL*/LF 2000 载体复合物转染人角膜基质细胞, 转染后 1~15d, 采用定量 RT-PCR 及流式细胞计数法检测目的基因 *Bcl-xL* 表达阳性细胞率, 观察目的基因在角膜基

质细胞中表达的时间变化规律。

结果: RT-PCR 及流式细胞计数法均显示: 在转染后 1d 开始检测到 *Bcl-xL* 表达阳性细胞, 阳性率在转染后 3d 最高 (48.3%), 此后逐渐降低, 转染后 15d 有少量细胞仍表达 *Bcl-xL* 基因。

结论: LF 2000 能有效介导外源基因 *Bcl-xL* 转染人角膜基质细胞。

关键词: 角膜基质细胞; 基因转染; 脂质体

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2010.02.008

李新宇, 刘磊, 李贵刚, 等. 脂质体介导 *Bcl-xL* 基因体外转染人角膜基质细胞的动态表达. *国际眼科杂志* 2010;10(2):229-230

0 引言

准分子激光屈光性角膜手术的有效性、安全性及可预测性已得到了广泛的临床证实, 但仍有术后回退、角膜雾状混浊等现象。越来越多的研究试图从细胞分子水平对其机制进行研究。Helena 等^[1] 研究认为角膜基质细胞凋亡是屈光术后角膜损伤愈合反应的启动因子, 且不同术式均可引起角膜细胞的凋亡。基质细胞的凋亡水平和分布, 可引起激活切口的基质细胞的增殖, 是引起准分子激光术后屈光度不稳定及回退的原因。Wilson^[2] 认为抑制角膜基质细胞的凋亡将可控制随后引起的损伤愈合反应。阻断早期基质细胞的凋亡可以将细胞凋亡、坏死及增殖减轻到最低程度。我们利用阳离子脂质体 LF 2000 将抗凋亡基因 *Bcl-xL* 转染到体外培养人的角膜基质细胞, 观察 *Bcl-xL* 基因在人角膜基质细胞的表达, 为基因预防及治疗角膜屈光手术后欠矫、过矫、层间混浊等提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料 低速恒温离心机 (Hereus 公司); 流式细胞仪 (Becton Dickinson 公司 BD FACSsort); 质粒大提试剂盒 (华美生物工程公司); 内切酶 EcoRI, PstI (晶美生物公司 FACSsort); 脂质体 Lipofectamine™ 2000 (Gibco/BRL 公司); 逆转录和 PCR 试剂盒 (Sigma 公司)。pSFFV-*Bcl-xL* 质粒, 全长 771bp (测序结果), *Bcl-xL* 基因插在质粒表达载体 SFFV-neo 的多克隆位点内, 酶切位点为 EcoRI。质粒线性化的位点为 PstI, 位于 SFFV-LTR 上游。重组质粒的转化后进行质粒的大量提取。捐献的健康成人眼球摘除后组织块培养法, 用传 3~5 代的人眼角膜基质细胞用于实验。
1.2 方法 取 6 孔培养板 (免疫组化染色实验组各孔中预铺有无菌盖玻片用于制作细胞爬片), 每组 3 孔, 在每孔中分别接种 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ /L 的角膜基质细胞, 50mL/L CO₂, 37℃ 孵育 24h, 转染前 1d 更换培养基, 细胞增长至 70%~80% 密度。(2) 转染: 倒掉培养基, 用 D-hanks 液冲洗 2~3 次, 加入 2.5mg/L *Bcl-xL*/20mg/L Lipofectamine™ 2000 的转染液, 继续在 37℃, 50mL/L CO₂ 培养。孵育

24h,弃去转染液,更换2mL含200mL/L胎牛血清的DMEM培养液继续培养。转染后1,2,3,5,10,15d分别采用RT-PCR和流式细胞计数法检测*Bcl-xL*的表达效率。

1.2.1 RT-PCR检测*Bcl-xL*mRNA表达的检测 依照*Bcl-xL*cDNA,设计下列引物:上游引物:5'gttgaagcgttctctggccctt'3(相当于目的基因99-120);下游引物:5'cagaatggact-gaatcggagat3'(相当于目的基因598-619);*Bcl-xL*转录产物长度为561bp。 β -actin为内参照,上游引物:5'atcatgttt-gagacctcaac3'(相当于目的基因2158-2178);下游引物:5'ttgatcttcatggtgctagga3'(相当于目的基因2845-2865)。PCR产物长度为708bp。合成于赛百盛生物工程技术公司。PCR反应体系50 μ L,包括逆转录产物4 μ L,寡核苷酸引物各5pmol,2.5mmol/L dNTP 4 μ L,10 \times PCR反应缓冲液5mL,TaqDNA聚合酶(华美公司)1.5U,在PCR扩增仪上(PE公司)扩增。*Bcl-xL*及 β -actin反应条件:94 $^{\circ}$ C 45s,55 $^{\circ}$ C 40s,72 $^{\circ}$ C 50s。30个循环,30g/L琼脂糖凝胶电泳,图像经UVP GRAB-itIMAGEL软件采集,Gelwords ID Advanced V4.01软件处理分析。相对表达率=实验灰度值/内参灰度值。

1.2.2 检测细胞*Bcl-xL*表达 转染后3d,用2.5g/L胰蛋白酶消化下细胞,4 $^{\circ}$ C离心,800r/min,5min,弃掉上清液,用PBS 1mL重新悬浮细胞,计数,细胞密度 $\geq 5 \times 10^8$ /L。慢慢加入4 $^{\circ}$ C冷丙酮,使其终浓度为850mL/L,冰浴30min,固定过夜(12h)。(2)*Bcl-xL*染色:荧光标记免疫染色法。离心细胞,弃去上清液,用PBS漂洗3次,重新用PBS 1mL悬浮细胞,加入1:200稀释的小鼠抗人NF-K β mAb 20 μ L,4 $^{\circ}$ C孵育45min。离心,弃去上清液,用PBS漂洗2次,重新用1mL PBS悬浮细胞,加入用1:100稀释的FITC(异硫氰酸荧光素)标记的羊抗鼠多克隆抗体,4 $^{\circ}$ C孵育45min。离心,弃去上清液,用PBS漂洗2次,加PBS 200~300 μ L悬浮细胞。另设两组阴性对照:一组不加I抗和II抗,用于荧光强度的基线校正;一组仅加II抗,用于非特异性结合对照。将已染色的细胞转入专用上样试管,流式细胞仪检测各组*Bcl-xL*表达率。

统计学分析:所有实验数据应用SPSS 11.5软件包处理。

2 结果

在转染后1d开始检测到*Bcl-xL*表达阳性细胞,转染后1,2,3,5,10,15d RT-PCR检测吸光度值分别为 0.14 ± 0.02 , 0.20 ± 0.04 , 0.37 ± 0.07 , 0.30 ± 0.05 , 0.21 ± 0.09 , 0.06 ± 0.03 。流式细胞计数法检测转染后人角膜基质细胞*Bcl-xL*表达阳性率(%)分别为 11.0 ± 2.5 , 26.3 ± 0.9 , 48.3 ± 2.9 , 35.2 ± 1.9 , 22.6 ± 3.1 , 9.6 ± 0.8 。可见阳性率在转染后3d最高(48.3%),此后逐渐降低,转染后15d有少量细胞仍表达*Bcl-xL*基因(9.6%)。

3 讨论

角膜基质区的主要细胞成分为角膜基质细胞,它合成和分泌纤维,并且对其排列和平衡都起作用。静止状态下,角膜基质细胞处于脱水状态,但在发育和修复时,分泌和合成胶原与介质的能力增强。在行准分子激光屈光性角膜手术后,基质细胞出现明显的凋亡。我们利用基因转染方法,尝试将外源性人抗凋亡基因*Bcl-xL*直接引入体外培养的角膜基质细胞,研究局部*Bcl-xL*基因的表达规律。

准分子激光角膜手术后角膜创伤修复过程主要包括:细胞的激活、增殖、分化、细胞因子的释放,细胞外基质的合成与重塑等^[3]。准分子激光表面切削术后4h前基质细胞凋亡达到高峰,其后逐渐下降,可延续至10d以后,同时邻近的基质细胞被激活、增殖、并在损伤后3d后重新分布于前基质,这些新生的基质细胞合成细胞骨架成分、黏附分子、细胞纤维连接素和各种胶原等细胞外基质,在创伤修复及瘢痕收缩中起着重要作用^[4]。术后角膜雾状混浊(haze)一般认为是基质细胞被激活,分泌过多的紊乱排列的以VII型胶原为主的胶原引起。其屈光回退则与激活基质过度增生及合成的细胞骨架成分、纤维连接素等所致的瘢痕收缩有一定关系^[5]。目前,用于调控回退及haze的药物主要有糖皮质激素,非甾体类激素及抗代谢药物等,因疗效有限且有一定的毒副作用,使临床应用受到了限制,随着分子生物技术的迅速发展,基因治疗作为一种全新的治疗手段已日益受到重视。我们前期的已经研究了目的基因与阳离子脂质体的比例对转染效率的影响,确定了最佳的转染浓度^[6]。将抗凋亡基因*Bcl-xL*转染到体外培养人的角膜基质细胞,观察其在人角膜基质细胞中表达试图通过*Bcl-xL*干预准分子激光角膜手术后角膜修复过程,为基因预防及治疗角膜屈光手术后层间混浊、屈光回退等提供一种新的探索。

细胞凋亡的发生是机体在内外环境的刺激下启动自身机制,由基因调控的细胞死亡过程,许多基因参与了凋亡的调控,如*Bcl-xL*,*p53*,*ICE*,*Fas*等。*Bcl-xL*作为*Bcl-2*基因家族的一员,对细胞凋亡有抑制作用^[7]。其机制为通过对凋亡的阻遏,使受阻遏的细胞难以进入细胞周期,从而抑制细胞增殖。从检测结果可以看出,正常情况下,角膜基质细胞不表达*Bcl-xL*基因,转染后的角膜基质细胞中存在*Bcl-xL*的表达。利用RT-PCR及流式细胞计数法对*Bcl-xL*进行定量检测均显示:在转染后1d开始检测到*Bcl-xL*表达阳性细胞,阳性率在转染后3d最高(48.3%),此后逐渐降低,转染后15d有少量细胞仍表达*Bcl-xL*基因(9.6%)。

参考文献

- 1 Helena MC, Baerveldt F, Kim WJ, et al. Keratocyte apoptosis after corneal surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(2):276-283
- 2 Wilson SE. Role of apoptosis in wound healing in the cornea. *Cornea* 2000;19(3 Suppl):S7-12
- 3 Mohan RR, Hutcheon AE, Choi R, et al. Apoptosis, necrosis, proliferation, and myofibroblast generation in the stroma following LASIK and PRK. *Exp Eye Res* 2003;76(1):71-87
- 4 Wilson SE. Analysis of the keratocyte apoptosis, keratocyte proliferation, and myofibroblast transformation responses after photorefractive keratectomy and laser *in situ* keratomileusis. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2002;100:411-433
- 5 Bilgihan K, Bilgihan A, Adiguzel U, et al. Keratocyte apoptosis and corneal antioxidant enzyme activities after refractive corneal surgery. *Eye* 2002;16(1):63-68
- 6 李新宇,李贵刚,朱雪菲. *Bcl-xL*/LipofectamineTM2000 比值对人角膜基质细胞转染效率的影响. *眼科新进展* 2006;26(7):524-526
- 7 Tsujiato Y, Shimizu S, Eguchi Y, et al. *Bcl-2* and *Bcl-xL* block apoptosis as well as necrosis; possible involvement of common mediators in apoptotic and necrotic signal transduction pathways. *Leukemia* 1997;11(3):380-382