

# 猪脐静脉血管内皮细胞永生化的初步研究

马泉荔,洪海霞,张彦明,徐浩,杨蒙,苏正元

(西北农林科技大学 动物科技学院,陕西 杨凌 712100)

**[摘要]** 为了建立稳定的血管内皮细胞系,进而为研究猪瘟病毒致病机理提供理想的细胞模型,将脂质体转染的 pCIneo-hTERT 质粒导入原代猪脐静脉血管内皮细胞中,经 G418 抗性筛选,挑取阳性克隆并扩大培养。对转染后的细胞进行形态观察,研究其增殖及生长特征,并对其端粒酶活性进行了鉴定。结果表明,转染细胞单层贴壁生长,有接触抑制性,呈铺路石状;Factor- $\alpha$  和 CD34 免疫荧光鉴定阳性,具有转染前细胞特征;转染后细胞培养代数增加,传至第 10 代和 15 代转染后细胞端粒酶活性检测为阳性。说明 hTERT 转染可以延长猪血管内皮细胞的寿命。

**[关键词]** 端粒酶催化亚基;脐静脉血管内皮细胞;猪

**[中图分类号]** Q813.1<sup>+</sup>1

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2007)07-0043-05

## Study on immortalization of swine umbilicus veins endothelial cells

MA Quan-li, HONG Hai-xia, ZHANG Yan-ming, XU Hao,

YANG Meng, SU Zheng-yuan

(College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract :** To establish stable vascular endothelial cell line as an ideal cell model in the research of facilitating the study on pathologic mechanism of CSFV, swine umbilical vein endothelial primary cells were transfected with the plasmid pCIneo-hTERT by liposome. Positive cells clone were selected by G418. The morphous, proliferation and growth characteristics of transfected cell were observed and studied, including the identification of telomerase activation. The result showed that the confluent monolayer transfected cells looked like cobblestones with contact inhibition. Immunofluorescence staining showed the transfected cells Factor- $\alpha$  and CD34 positive. The number of cell passage increased after transfection and the telomerase activation was positive at the 10th passage and 15th passage. The results demonstrated the transfection of hTERT gene could prolong the swine umbilical vein endothelial cell survival.

**Key words :** telomerase reverse transcriptase; umbilicus veins endothelial cells; swine

猪血管内皮细胞的分离和培养,为研究猪瘟病毒对猪专一性致病机理提供了基本的实验材料。但该细胞与其他正常组织来源的细胞一样,在体外经过有限次的传代后,就停止分裂增殖,发生衰老和死亡,因此严重影响试验的进行,而永生化的猪血管内皮细胞系的建立,可解决这一难题。细胞永生化的初步研究

通过基因转染等技术来实现,导入外源性人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)基因,可重建细胞端粒酶活性,使端粒长度保持稳定,从而延长细胞在体外培养的生命,甚至可发展成为永生化的细胞<sup>[1]</sup>。Bodnar 等<sup>[2]</sup>首次报道,将外源 hTERT 基因导入正常的人视网膜上皮细胞和

\* [收稿日期] 2006-06-07

[基金项目] 国家自然科学基金项目(编号:30471290)

[作者简介] 马泉荔(1981-),女,陕西西安人,在读硕士,主要从事分子病原学与免疫学研究。

[通讯作者] 张彦明(1956-),男,陕西南郑人,博士,教授,博士生导师,主要从事分子病原学与免疫学研究。

E-mail: Ylzhangym@sohu.com.

人包皮纤维细胞,可使体外培养的细胞寿命延长。之后将 hTERT 基因导入人胰岛细胞<sup>[3]</sup>、人成纤维细胞和其他原代细胞株<sup>[4-5]</sup>后发现,外源性 hTERT 基因导入均可促使正常无端粒酶活性的体细胞端粒酶活性升高,并促使转化细胞通过危机期,使细胞寿命延长。研究发现,hTERT 能够作用于多种哺乳动物细胞的端粒酶 RNA,使端粒延长,从而延长细胞的寿命<sup>[6-8]</sup>。因此,本试验采用脂质体转染法,将含有 hTERT 基因的真核表达质粒 pCIneo-hTERT 导入猪脐静脉血管内皮细胞中,研究其是否能延长猪血管内皮细胞在体外培养的生命,并分析转染后猪脐静脉血管内皮细胞的端粒酶活性及其生物学特性,以期永生猪血管内皮细胞系的建立奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 主要试剂 pCIneo-hTERT 质粒由 werberg 教授惠赠,M199 培养基和胎牛血清均为 Gibco 公司产品,Lipofect AMINE 2000 Reagent 转染试剂盒为 Invitrogen 公司产品,质粒纯化试剂盒(Plasmid Mini Kit)为 Qiagen 公司产品,端粒酶活性检测试剂盒为华美生物工程公司产品,Rabbit polyclonal antibody F8 和 Rabbit polyclonal antibody CD34 均为 Boster 公司产品,羊抗兔 IgG-Cy3 为 Boster 公司产品,EcoR I 和 Sal I 内切酶为 Promega 公司产品。

1.1.2 主要仪器和设备 细胞培养瓶、24 孔细胞培养板、6 孔细胞培养板(Costar 公司),离心机(Sigma 公司),超净工作台(苏净集团安泰公司),组织培养倒置显微镜、荧光显微镜(Nikon 公司),CO<sub>2</sub> 培养箱(上海福玛试验设备有限公司),PCR 仪(Eppendorf 公司)。

### 1.2 质粒 DNA 的制备

将 pCIneo-hTERT 质粒 DNA 转化入感受态细菌,提取质粒,以 EcoR I 和 Sal I 双酶切,用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定,利用质粒纯化试剂盒对阳性质粒 DNA 进行纯化。

### 1.3 猪脐静脉血管内皮细胞培养与 pCIneo-hTERT 转染

无菌采取新鲜猪脐带,分出脐静脉。PBS 液反复冲洗直至脐静脉无血迹。静脉腔内注射 1 g/L 胶原酶(Sigma I 型),37 ℃ 温箱温育 5 min,收集细胞悬液,1 000 r/min 离心 8~10 min 收集细胞沉淀。在细胞沉淀中加入适量 M199 培养液,吹打成细胞

悬液,接种到培养瓶中,在 37 ℃、50 mL/L CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,至 24 h 换液,以后每隔 2~3 d 换液 1 次。将传至第 3 代的细胞接种于 24 孔培养板,每孔接种约 2 × 10<sup>5</sup> 个内皮细胞。待细胞铺板至 90%~95% 时,按 Lipofect AMINE 2000 转染试剂盒说明书进行 pCIneo-hTERT 的转染。第 2 天加 500 μg/μL 的 G418 进行筛选,至未转染组细胞全部死亡时,将 G418 浓度降为 250 μg/μL 直至出现抗性细胞克隆,滤纸片法挑取克隆细胞扩大培养。

### 1.4 转染细胞形态学观察

常规方法培养,在光学显微镜下观察细胞形态。

### 1.5 转染细胞生长曲线的绘制

取转染后第 10 代细胞,按 1 × 10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup> 的密度接种到 24 孔板,每隔 24 h 取 3 孔细胞计数,取其平均值。连续检测 7 d,以培养时间为横轴,细胞数为纵轴,绘制细胞生长曲线。

### 1.6 转染细胞 F- Ag 和 CD34 的检测

将转染细胞接种于 96 孔培养板,稀释至每孔一个细胞,待细胞生长至 70% (低密度单层) 时用 PBS (0.01 mol/L, pH 8.0) 洗 3 次,投入体积分数 95% 的酒精中固定 15 min,用 PBS 洗 3 次,每次 3 min。分别滴加 1:50 稀释的兔抗人 因子相关抗原 (F- Ag) 抗血清和 1:50 稀释的兔抗人 CD34 相关抗原抗血清,置湿盒中 37 ℃ 温育 1 h,同时用 PBS 代替一抗设立阴性对照。PBS 洗 3 次,每次 3 min。加入羊抗兔 IgG 荧光抗体,置湿盒中 37 ℃ 温育 40 min。用 PBS 洗 3 次,每次 3 min。1 g/L 伊文氏兰复染,自然晾干,甘油缓冲液封片后,在 Nikon 荧光显微镜下观察。

### 1.7 转染细胞端粒酶活性检测

取传至第 15 代转染细胞进行端粒酶活性检测,按端粒酶活性检测试剂盒说明操作,同时以未转染的血管内皮细胞为空白对照,以 2 μL 裂解液为阴性对照。根据操作说明于 450 nm/630 nm 处读取 OD 值。阴性对照 OD 值低于 0.05 时按 0.05 计算,高于 0.05 时按实际 OD 值计算。若 OD 值大于 0.3,则判为无效。样本 OD 值大于阴性 OD 值的 2.1 倍时,判为端粒酶活性阳性。

## 2 结果与分析

### 2.1 猪脐静脉血管内皮细胞培养与 pCIneo-hTERT 转染结果

转染 pCIneo-hTERT 的猪脐静脉血管内皮细胞,在加 G418 筛选后第 3 天细胞开始出现死亡。

第 12 天,未转染组细胞在 G418 作用下全部死亡;转染组阳性细胞继续存活,并开始增殖。G418 浓度降至 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  维持筛选,2 周后出现抗性细胞克隆(图 1),消化后进行扩大培养,该细胞至今已传 15



图 1 转染 pCIneo-hTERT 的猪脐静脉血管内皮细胞阳性克隆 ( $\times 100$ )

Fig. 1 The positive endothelial cell clone transfected pCIneo-hTERT ( $\times 100$ )

2.2 猪脐静脉血管内皮细胞形态学观察结果

在显微镜下,猪脐静脉血管内皮细胞呈单层铺路石状排列,贴壁紧密,具接触抑制性。细胞体积大,细胞界限不清,核呈椭圆形,位于细胞中央,胞浆丰富。光镜下,内皮细胞为多角形或梭形,可见 1~2 个清晰的细胞核(图 3),转染后细胞生长速度明显加快,细胞生长周期缩短。

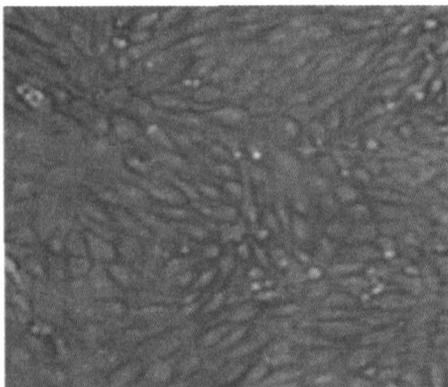


图 3 转染后第 10 代猪脐静脉血管内皮细胞 ( $\times 100$ )

Fig. 3 Micrograph of endothelial cells passed to 10th generation after transfection ( $\times 100$ )

2.3 转染细胞的生长曲线

由图 4 可知,转染前猪脐静脉血管内皮细胞和第 10 代转染细胞的生长曲线都具有典型的“S”型曲线特征,第 1~3 天细胞增殖缓慢,第 3 天后细胞开始迅速增殖,进入对数生长期,至第 5~6 天细胞数

代。分离的原代细胞培养至第 7~8 代后,细胞停止增殖,逐步衰老、死亡(图 2)。与原代培养的细胞相比,转染 hTERT 的血管内皮细胞生长迅速、增殖快,细胞生长周期从 5~7 d 缩短至 3~5 d。

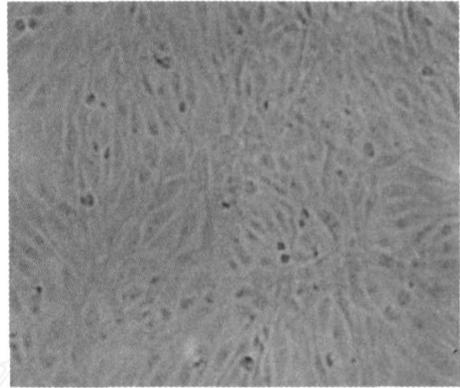


图 2 原代传至第 8 代的猪脐静脉血管内皮细胞

Fig. 2 Micrograph of endothelial cells passed to 8th generation

量达到生长最高峰,之后细胞生长停滞,开始衰老死亡,细胞数量下降,此时细胞进入生长平台期。

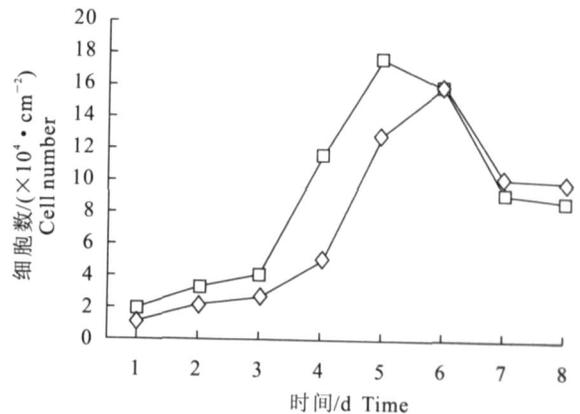


图 4 转染前后猪脐静脉血管内皮细胞的生长曲线

Fig. 4 Growth lines of endothelial cells post-transfected and endothelial cells without transfection  
 - - - Endothelial cells without transfection;  
 - - - Endothelial cells post-transfected

2.4 转染细胞 F- Ag 和 CD34 的检测结果

阴性对照组细胞在荧光显微镜下观察为黑色视野,不发荧光。而猪脐静脉转染细胞 因子染色结果为细胞核周深染(图 5),这与以前报道的核周围着色一致<sup>[9]</sup>。同时,猪脐静脉血管内皮转染细胞 CD34 相关抗原免疫荧光染色结果(图 6)表明,细胞浆均呈明显的棕红色荧光。

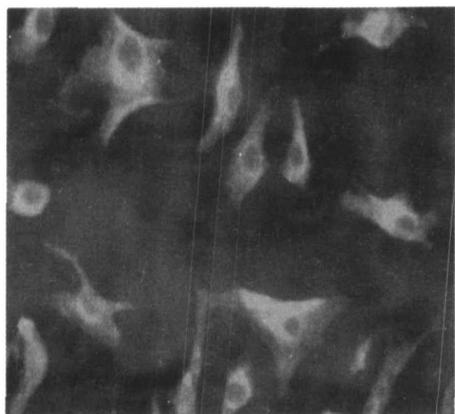


图 5 猪脐静脉转染细胞 因子的检测结果(×100)

Fig. 5 Detection of factor in transfected endothelial cells (×100)

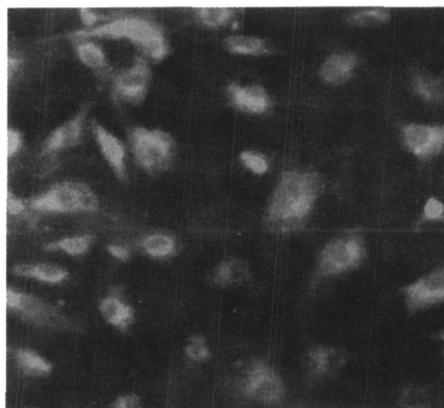


图 6 猪脐静脉转染细胞 CD34 的检测结果(×100)

Fig. 6 Detection of CD34 in transfected endothelial cells(×100)

### 2.5 端粒酶活性的检测结果

按试剂盒操作检测的结果显示,未转染的猪脐静脉血管内皮细胞空白对照的  $OD_{450/630}$  值为 0.032, 阴性对照  $OD_{450/630}$  值为 0.047, 阳性对照  $OD_{450/630}$  值为 0.676(阳性对照为试剂盒自带,不显示端粒酶活性),而转染的猪脐静脉血管内皮细胞 2 个平行样的  $OD_{450/630}$  值分别为 0.413 和 0.231。样 1/ 阴性对照 = 8.26, 样 2/ 阴性对照 = 4.62,  $OD$  值比值均大于 2.1, 判为端粒酶活性阳性。可见,转染细胞具有较强的端粒酶活性。

## 3 讨论

细胞永生化是指体外培养的细胞经过自发的或受外界因素的影响,从增殖衰老危机中逃逸,从而具有无限增殖能力的过程<sup>[10]</sup>。目前,人们已经通过许多方法成功地建立了永生化的细胞系,最常应用于哺乳动物细胞永生化的手段之一是导入 hTERT,即通过构建含 hTERT 的表达载体来转染细胞,这也是本试验选用此方法的初衷。

以往的研究提示,端粒缩短是引发衰老的分子机制,当端粒缩短至一定限制长度时,细胞就脱离细胞周期而停止生长。端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)是端粒酶的催化亚基,与端粒酶 RNA 端粒酶相关蛋白 1(TEP1)复合物结合形成全酶,激活端粒酶活性<sup>[11]</sup>。端粒酶被激活后,以其自身 RNA 为模板不断合成端粒 DNA 来补充和延长端粒有限长度(telomere restriction fragments, TRFs),以维持端粒长度,恢复染色体的稳定性,使细胞得以逾越 M2 期,获得无限分裂和增殖的能力,使细胞发生永生化的<sup>[12-13]</sup>。本研究通过导

入 hTERT 基因重建猪脐静脉血管内皮细胞的端粒酶活性,在体外大大延长了血管内皮细胞的增殖寿命。对转染细胞进行的端粒酶活性检测表明,导入 hTERT 基因使猪脐静脉血管内皮细胞的端粒酶活性得以激活,细胞已经跨越了 M1 期,传代至第 15 代的转染细胞仍然保持较高的端粒酶活性,这与前人报道的 hTERT 能够作用于猪、兔、犬等多种哺乳动物细胞的端粒酶 RNA,使端粒延长从而延长细胞寿命的结果一致<sup>[6-8]</sup>。转染的内皮细胞现已稳定传代 15 代,而分离的原代细胞培养至第 7~8 代后,细胞停止增殖,逐步衰老、死亡。与原代培养的细胞相比,转染细胞保持原细胞的铺路石状形态特征,具有接触抑制性和血清依赖性;其生长迅速、增殖快,细胞生长周期从 5~7 d 缩短至 3~5 d。CD34 与 F-Ag 是内皮细胞的标志性特征,本研究对转染后的猪脐静脉血管内皮细胞进行荧光染色鉴定,结果均为阳性,这说明外源基因 hTERT 的导入,不影响内皮细胞相关抗原及表面标志的表达。

本研究结果初步表明,hTERT 转染可以延长猪血管内皮细胞的寿命。至于能否建立永生化的猪血管内皮细胞系,还需要进一步研究。

### [参考文献]

- [1] Martina, Chang W F, Johannes G, et al. Comparison of early passage, senescent and hTERT immortalized endothelial cells [J]. *Experimental Cell Research*, 2005, 309(1): 121-136.
- [2] Bodnar A G, Ouellette M, Frolkis M, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells [J]. *Science*, 1998, 279(5349): 349-352.
- [3] Halvorsen T L, Beattie G M, Lopez A D, et al. Accelerated telomere shortening and senescence in human pancreatic islet

- cells stimulated to divide *in vitro*[J]. *Journal of Endocrinology*, 2000, 166:103.
- [4] Homayoun V, Samuel B. Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life-span[J]. *Current Biology*, 1998, 8(5): 279-282.
- [5] Funk W D, Wang C K, Shelton D N, et al. Telomerase expression restores dermal integrity to vitro-aged fibroblasts in a reconstituted skin model[J]. *Exp Cell Res*, 2000, 258(2): 270-278.
- [6] Fiedler W, Reinicke D, Aurich H, et al. *In Vitro* immortalisation of Porcine hepatocytes by transfection with the gene for the human catalytic subunit of telomerase reverse transcriptase (hTERT)[J]. *Journal of Hepatology*, 2004, 40(1): 102.
- [7] Xiang H, Wang J, Mao Y W, et al. hTERT can function with rabbit telomerase RNA: regulation of gene expression and attenuation of apoptosis[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 278: 503-510.
- [8] 阮承迈, 陈守义, 吴东林, 等. 端粒酶活性在哺乳动物细胞中的表达[J]. *中国兽医学报*, 2003, 23(1): 66-68.
- [9] 孙继虎, 汪洋, 于彦铮, 等. 血管内皮细胞的体外培养及形态学观察[J]. *解剖学杂志*, 1996, 19(3): 261-263.
- [10] 杨娜娜, 王娟, 杜立新, 等. 细胞永生化的研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2005, 32(1): 37-39.
- [11] Shay J W, Van Der Haegen B A, Ying Y. The frequency of immortalization of human fibroblasts and mammary epithelial cells transfected with SV40 large T-antigen[J]. *Exp Cell Res*, 1993, 209(1): 45-57.
- [12] Toouli C D, Huschtscha L I, Neumann A A. Comparison of human mammary epithelial cell immortalized by simian virus 40 T antigen or by the telomerase catalytic subunit[J]. *Oncogene*, 2002, 21(1): 128-139.
- [13] Thomas M, Suwa T, Yang L. Cooperation of hTERT, SV40 T antigen and oncogenic Ras in tumorigenesis: a cell transplantation model using bovine adrenocortical cells[J]. *Neoplasia*, 2002, 4(6): 493-500.

(上接第42页)

- [8] 谢启文. 现代神经内分泌学[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1999: 246-247.
- [9] 曹咏清, 孙德明, 陈幼珍, 等. 人重组 $\gamma$ -干扰素抗生育效应及其机理研究[J]. *生殖医学杂志*, 1999, 8(2): 98-102.
- [10] 翟向和, 宫新城, 李清艳, 等. 苦楝皮妊娠毒性作用及对妊娠早期小鼠子宫NK、IFN $\gamma$ 和TNF $\alpha$ 含量的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(7): 747-750.
- [11] 刘美玲, 彭景榭, 孙泉红, 等. 妊娠大鼠子宫和胎盘TGF- $\beta$ 1的表达及IFN $\gamma$ 对其的影响[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2005, 32(5): 413-420.
- [12] 孙泉红, 彭景榭. 干扰素 $\gamma$ 对母胎界面免疫调控的影响[J]. *自然科学进展*, 2005, 16(2): 129-134.
- [13] Kiefer R, Keutzberg G W. Gamma interferon like immunoreactivity in the rat nervous system[J]. *Neurosci*, 1991, 37(3): 725-732.
- [14] 肖明, 丁炯, 左国平, 等. 一氧化氮合酶神经元在大鼠下丘脑中的分布观察[J]. *南京医科大学学报*, 2001, 21(5): 220-223.
- [15] Kaehler S T, Singewald N, Sinner C, et al. Nitric oxide modulates the release of serotonin in the rat hypothalamus[J]. *Brain Research*, 1999, 835(2): 346-349.