

# 用 GFP 基因标记梅花鹿生茸骨膜细胞

王大涛,赵海平,褚文辉,李春义  
(中国农业科学院 特产研究所,长春 130122)

中图分类号: Q344<sup>+</sup>.13

文献标识码: A

文章编号: 1004-7034(2014)07-0001-03

DOI:10.13881/j.cnki.hljxmsy.2014.0537

关键词: 生茸骨膜; 逆转录病毒; 绿色荧光蛋白; 标记基因

**摘要:** 为了用绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 标记梅花鹿生茸区骨膜 (antlerogenic periosteum, AP) 细胞, 试验首先构建了含 GFP 基因的重组质粒 pLNHX-GFP, 将重组质粒与包装质粒 VSV 共转染包装细胞 GP2-293, 获得复制缺陷型逆转录病毒上清液, 感染培养的梅花鹿生茸区骨膜细胞, 检测 GFP 在骨膜细胞中的表达情况, 用 G418 对感染后的细胞进行筛选。结果表明: 试验获得了能稳定地表达 GFP 的生茸骨膜细胞。

## Antlerogenic periosteum cells labeled with GFP gene in sika deer

WANG Da-tao, ZHAO Hai-ping, CHU Wen-hui, LI Chun-yi

(Institute of Special Wild Economic Animal and Plant Science, CAAS, Changchun 130122, China)

**Key words:** antlerogenic periosteum; retrovirus; green fluorescent protein; marker gene

**Abstract:** To use green fluorescent protein (GFP) to label the antlerogenic periosteum (AP) cells in sika deer, a recombinant plasmid pLNHX-GFP containing GFP gene was constructed. The recombinant plasmid and the packaging plasmid VSV were co-transfected to package the GP2-293 cells, and then the replication-defective retroviral supernatant was obtained to infect the cultured AP cells. The expression of GFP in the AP cells was detected, and then the infected cells were screened with G418. The result showed that the AP cells stably expressing GFP could be obtained.

鹿茸作为一种传统中药, 在中国已经沿用了两千多年。梅花鹿的鹿茸角每年都能够脱落再生, 鹿茸角再生的循环过程是在一种永久性的骨桩——角柄上进行的, 梅花鹿不是生来就有角柄的, 只有当雄鹿长到一定阶段, 角柄才能长出<sup>[1]</sup>。角柄生长部位的骨膜被命名为生茸区骨膜 (AP), 移植试验证实, AP 组织可以在移植部位诱导异位角柄和鹿茸的生长<sup>[2]</sup>。体外培养的 AP 细胞具有多分化潜能, 在一定的条件下可以分化成软骨细胞、脂肪细胞、神经细胞等, 同时 AP 细胞表达干细胞标记物 CD9, 由此证实了 AP 细胞是一种干细胞<sup>[3]</sup>。绿色荧光蛋白 (GFP) 是来源于发光水母的一种功能独特的蛋白质, 能够自身催化形成发色结构并在蓝光激发下发出绿色荧光, 在活细胞中也可以表达发光蛋白, 检测方法简单, 灵敏度高<sup>[4]</sup>。本研究采用逆转录病毒载体 pLNHX, 通过包

装细胞产生复制缺陷型病毒, 通过感染将携带的基因导入宿主细胞内, 从而有效追踪细胞的增殖分化。

### 1 材料

逆转录病毒表达系统 (包括质粒 pLNHX 和 VS-VG、包装细胞 GP2-293), 购自 Clontech 公司; 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态、质粒 pLL3.7, 中国农业科学院特产研究所吉林省特种经济动物分子生物学重点实验室保存; pfuDNA 聚合酶, Transgen 公司生产; 限制性内切酶 Hpa I 和 Cla I、T4 DNA 连接酶, NEB 公司生产; 质粒 DNA 大提试剂盒、琼脂糖回收试剂盒, Qiagen 公司生产; DMEM、标准胎牛血清、胰蛋白酶、转染试剂, 购自 Invitrogen 公司。

### 2 方法

#### 2.1 完整 GFP 基因的合成

根据质粒 pLL3.7 的序列 (上游引物 1 5'-tggtta-actagtgcacgtcagatcc-3', 下游引物 1 5'-gatcgatcgacga-attcactcttg-3') 设计引物进行扩增, 用琼脂糖凝胶电泳后, 回收 750 bp 条带。

#### 2.2 重组质粒 pLNHX-GFP 的构建

用 Hpa I、Cla I 对质粒 pLNHX 和 GFP 进行双酶切, 回收有效片段后进行连接, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态, 挑选单菌落培养<sup>[5]</sup>, 并进行 PCR 鉴定, 序列为上游引物 2 5'-catactgctctcgttggttc-3', 下游引物 2

收稿日期: 2013-09-10; 修回日期: 2014-04-01

基金项目: “973”计划前期研究专项 (2011CB111515); 国家自然科学基金项目 (31170950)

作者简介: 王大涛 (1984-), 男, 助理研究员, 硕士, 研究方向为鹿茸生物学, wangdatao@aliyun.com。

通信作者: 李春义 (1959-), 男, 研究员, 博士, 研究方向为鹿茸生物学, chunyi.li@agresearch.co.nz。

5'-ctttattatctatggtcctga-3'。将阳性克隆送至上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序、鉴定,测序引物用于 PCR 鉴定。

### 2.3 重组逆转录病毒的包装

将约  $1 \times 10^6$  个 GP2-293 细胞接种于 10 cm 的细胞培养皿中,加入含 10% 标准胎牛血清的 DMEM 完全培养基 15 mL,至细胞融合度在 80% 左右,利用脂质体法转染细胞<sup>[6]</sup>;5 h 后,用 DMEM 完全培养基换液,CO<sub>2</sub> 培养箱培养;12 h 后,用倒置荧光显微镜检测 GFP 表达情况;48 h 后收集培养液,离心后弃去上清液,即为病毒上清液,分装后 -80 °C 保存,备用。

### 2.4 生茸区骨膜细胞的培养

1 岁龄雄性梅花鹿,在鹿茸生长的初期采集骨膜进行原代培养<sup>[7]</sup>。细胞分散后,进行传代培养,细胞生长良好以后冻存部分细胞,并按  $5 \times 10^5$  个/板接种新的 10 cm 培养皿,用于病毒感染。

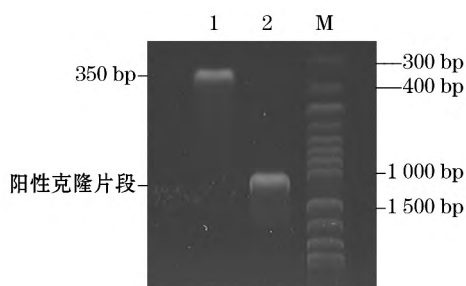
### 2.5 稳定感染细胞系的筛选

将病毒上清液与 DMEM 完全培养基 1:1 混合后,每板细胞加入 10 mL 后放置于 CO<sub>2</sub> 培养箱 24 h 后,用荧光倒置显微镜观察细胞表达 GFP 的情况,能检测到大量 GFP 后给细胞换筛选培养液(筛选培养液中含有 150  $\mu$ g/mL 的 G418),每 2 d 换液 1 次,至细胞全部表达 GFP。

## 3 结果

### 3.1 重组载体质粒 pLNHX-GFP 的 PCR 鉴定结果

根据所设计的引物可知,阴性条带应为 350 bp,插入片段为 760 bp。PCR 鉴定结果表明,阳性克隆的片段(见图 1 泳道 2)在 1 000 bp 到 1 500 bp 之间,并且接近 1 000 bp,符合 1 110 bp 的预期值。测序结果说明阳性克隆中正确插入了 GFP 基因。



1. 阴性对照; 2. 重组质粒 pLNHX-GFP; M. 100 bp DNA Marker。

图 1 重组质粒 pLNHX-GFP 阳性克隆 PCR 鉴定结果

Fig 1 PCR identification result of positive recombinant clone pLNHX-GFP

### 3.2 梅花鹿生茸区骨膜细胞培养结果

将骨膜组织切碎消化后,边缘模糊,部分组织黏附于培养瓶底,培养液中有少数亮点为消化出的细胞和组织碎片,5 d 后组织块(见图 2 中黑色区域)贴附

于培养瓶底,周围的细胞已经长满,细胞呈梭状紧密排列,长势良好。

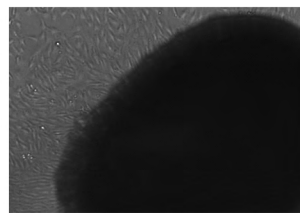


图 2 AP 细胞原代培养结果

Fig 2 Primary culture result of the AP cells

### 3.3 感染后的生茸区骨膜细胞

逆转录病毒感染 AP 细胞后,病毒携带的基因整合到宿主细胞内,GFP 基因是 1 个完整的开放阅读框(ORF),感染的细胞开始表达 GFP,通过荧光显微镜可以检测到(见 228 页彩图 3)。由于逆转录病毒载体内含有新霉素抗性基因,加入含 G418 的培养基后,未获得抗性的细胞不能存活。

## 4 讨论

鹿茸角是哺乳动物唯一能够再生的附属器官,是难得的研究器官再生的模型。鹿茸再生机制的研究,可以对动物器官再生,特别是人体断肢再生提供理论依据。作为鹿茸再生的发起点,AP 组织受到了大量关注,C Li 等<sup>[8-9]</sup>通过组织学和形态学的研究,阐述了鹿茸的再生过程及 AP 的特异之处。AP 组织可以诱导异位鹿茸的生长,甚至在实验裸鼠的移植部位诱导生成类似鹿茸的结构<sup>[10]</sup>,AP 组织包含了鹿茸再生的全部信息。AP 组织的分离培养,为在细胞水平研究鹿茸再生打下了基础<sup>[11]</sup>。本试验选用的逆转录病毒表达系统,主要感染增殖期的宿主细胞,因此待感染的细胞密度不能过大,为了提高病毒效价可以使用半透膜浓缩病毒。

AP 细胞作为一种成体干细胞,可以进行多次传代培养,GFP 基因作为一种易于检测的标记基因,第 1 次被导入了 AP 细胞并得到长效表达,为以后将更多对细胞、组织生长有影响的基因导入 AP 细胞奠定了基础。但是,本试验是在离体状态下完成的,改造后的 AP 细胞在活体内的增殖情况是下一步研究的重点。

## 5 结论

本试验构建了重组质粒 pLNHX-GFP,通过包装细胞产生携带 GFP 基因的复制缺陷型逆转录病毒;通过病毒感染 AP 细胞,获得了稳定表达 GFP 的细胞系。

### 参考文献:

- [1] LI C, SUTTIE J M. Light microscopic studies of pedicle and early first antler development in red deer (*Cervus elaphus*) [J]. Anat Rec, 1994, 239(2): 198-215.

(下转第 6 页)

增多,氧自由基作用于红细胞膜的多聚不饱和脂肪酸(PUFA)进而加剧脂质过氧化反应,使其过氧化产生丙二醛(MDA)增多<sup>[11]</sup>,导致细胞功能丧失和损害,继而使红细胞膜完整性和变形性受到影响,其通透性变化,红细胞活性受损<sup>[12]</sup>,耗氧量降低,红细胞肿大<sup>[13]</sup>,红细胞的渗透脆性增加,从而导致溶血。同时,M. Brzyska等<sup>[14]</sup>研究表明,铜复合物( $\text{A}\beta$ -Cu)能改变细胞的渗透脆性,导致红细胞溶血度升高,与本试验结果相符。

综上所述,试验剂量铜能够显著提高肉鸡红细胞渗透脆性和溶血度,对肉鸡造成损害。

#### 参考文献:

- [1] CERASOLI F J, MCKENNA P J, ROSOLIA D L, et al. Superoxide anion release from blood and bone marrow neutrophils is altered by endotoxemia[J]. Circ Res, 1990, 67(1): 154-165.
- [2] BRAUDE R. Some observations on the need for copper in the diet of fattening pigs[J]. J Agric Sci, 1945, 35(3): 163-167.
- [3] 杨明清, 景小平, 钟亚玲, 等. 两管法测定红细胞渗透脆性[J]. 医学检验杂志, 1991, 6(3): 166-168.
- [4] 罗勇兵, 杜珍, 马爱国, 等. 补充 $\beta$ -胡萝卜素对青年人群红细胞溶血度及淋巴细胞增殖活性影响的研究[J]. 营养学报, 2007, 29(2): 110-111.
- [5] 唐宏伟, 张久丽, 肖银霞, 等. 铜胁迫对山羊红细胞渗透脆性和溶血度的影响[J]. 中国兽医学报, 2008, 28(1): 87-89.
- [6] FEDELI D, CARLONI M, FALCIONI G. Oxidative damage in trout erythrocyte in response to "in vitro" copper exposure[J]. Mar Environ Res, 2010, 69(3): 172-177.
- [7] 唐兆新, 王炫英. 内毒素诱导的红细胞过氧化损伤及山莨菪碱的保护效应[J]. 中国兽医学报, 1998, 18(2): 182-185.
- [8] 石锐, 陈维多, 高福斌, 等. 硒对奶牛红细胞膜物理特性影响的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2003(3): 3-5.
- [9] SARIS N E, SKULSKII I A. Interaction of  $\text{Cu}^{+}$  with mitochondria[J]. Acta Chem Scand, 1991, 45(10): 1042-1046.
- [10] LABIENIEC M, MILOWSKA K, BALCERCZYK A, et al. Interactions of free copper(II) ions alone or in complex with iron(III) ions with erythrocytes of marine fish *Dicentrarchus labrax* [J]. Cell Biol Int, 2009, 33(9): 941-948.
- [11] 马莉, 胡迎芬, 马爱国, 等. 冬枣提取物 S180 荷瘤小鼠的抗氧化作用研究[J]. 青岛大学学报, 2008, 23(3): 30-34.
- [12] VAZZANA M, SALERNO G, CELI M, et al. Effect of in vitro exposure to cadmium and copper on sea bass blood cells[J]. Ital J Anim Sci, 2009, 8(Suppl 2): 884-886.
- [13] WITESKA M, KONDERA E, LIPIONOGA J, et al. Changes in oxygen consumption rate and red blood parameters in common carp *Cyprinus carpio* L. after acute copper and cadmium exposures[J]. Fresen Environ Bull, 2010, 19(1): 115-122.
- [14] BRZYSKA M, TRZESNIEWSKA K, WIECKOWSKA A, et al. Electrochemical and conformational consequences of copper(I) and Cu(II) binding to beta-amyloid(1-40) [J]. ChemBiochem, 2009, 10(6): 1045-1055.

(009)

#### (上接第2页)

- [2] GOSS R J, POWEL R S. Induction of deer antlers by transplanted periosteum. I. Graft size and shape[J]. J Exp Zool, 1985, 235(3): 359-373.
- [3] LI C Y, YANG F H, SHEPPARD A. Adult stem cells and mammalian epimorphic regeneration - insights from studying annual renewal of deer antlers[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2009, 4(3): 237-251.
- [4] 杨英军, 周鹏. 转基因植物中的标记基因研究新进展[J]. 遗传, 2005, 27(3): 499-504.
- [5] 梁宋平. 生物化学与分子生物学实验教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003.
- [6] FELGNER P L, GADEK T R, HOLM M, et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure[J]. PNAS, 1987, 84(21): 7413-7417.
- [7] 程宝鸾. 动物细胞培养技术[M]. 广州: 中山大学出版社, 2006.
- [8] LI C, SUTTIE J M, CLARK D E. Morphological observation of antler regeneration in red deer (*Cervus elaphus*) [J]. J Morphol, 2004, 262(3): 731-740.
- [9] LI C, SUTTIE J M, CLARK D E. Histological examination of antler regeneration in red deer (*Cervus elaphus*) [J]. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2005, 282(2): 163-174.
- [10] LI C, HARRIS A J, SUTTIE J M, et al. Tissue interactions and antlerogenesis: new findings revealed by a xenograft approach [J]. J Exp Zool, 2001, 290(1): 18-30.
- [11] 孙红梅, 邢秀梅, 丛波, 等. 鹿茸干细胞体外培养技术的研究[J]. 经济动物学报, 2007, 11(1): 7-9.

(009)

• 实验研究 •

## 用 GFP 基因标记梅花鹿生茸骨膜细胞

(作者王大涛等, 正文见第 1~2 页)

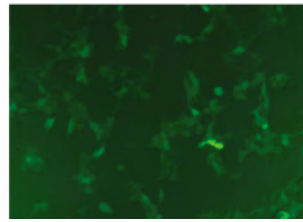


图 3 荧光倒置显微镜下感染后的 AP 细胞

Fig.3 The infected AP cells under the inverted  
fluorescence microscope

• 实验研究 •

## mir-133b 对牛骨骼肌卫星细胞增殖的影响

(作者王亚辉等, 正文见第 14~18 页)

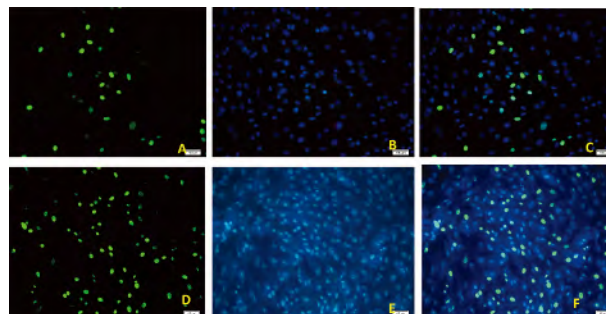
A. 转染 pcDNA3.1(+) EDU 增殖; B. 转染 pcDNA3.1(+) ,  
DAPI 染细胞核; C. A、B 叠加; D. 转染 pcDNA3.1(+) - mir-133b ,  
EDU 增殖; E. 转染 pcDNA3.1(+) - mir-133b ,DAPI 染细胞核。  
F. D、E 叠加。

图 5 EDU 增殖试验结果

Fig.5 The results for the proliferation of EDU

• 实验研究 •

## 杜洛克猪肝脏、肾脏和淋巴结的显微形态及糖原 PAS 反应观察

(作者张家禾等, 正文见第 19~20 页)

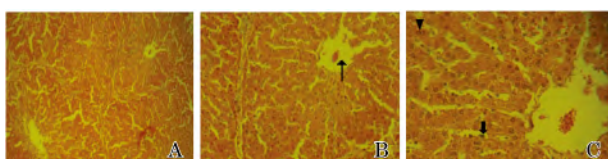
A. 放大 40 倍; B. 放大 100 倍(细尾箭头示中央静脉);  
C. 放大 250 倍(倒置小三角示双核细胞, 粗尾箭头示枯否氏细胞)。

图 1 肝脏 H. E. 染色

Fig.1 H. E. staining in liver

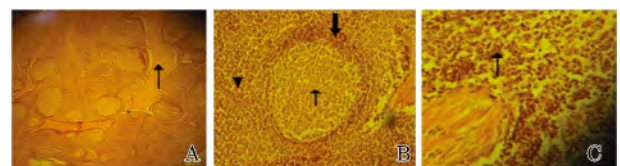
A. 放大 40 倍(细尾箭头示小梁); B. 放大 100 倍(细尾箭头示明区,  
倒置小三角示血管, 粗尾箭头示小结帽); C. 放大 250 倍  
(细尾箭头示淋巴细胞)。

图 2 淋巴结 H. E. 染色

Fig.2 H. E. staining in lymph node