



Tβ10 基因过表达对离体鹿茸干细胞增殖、衰老和迁移的影响

张伟 褚文辉 付晶 孙红梅 李春义*

中国农业科学院 特产研究所/特种经济动物分子生物学国家重点实验/吉林省鹿茸工程研究中心, 长春 130112

*通讯作者, lichunyi1959@163.com

摘 要 胸腺素β10(thymosin beta 10, *Tβ10*)基因是肿瘤发生以及恶化分级的一个预判指标。研究发现, 鹿(*Cervidae*)茸顶端的生长中心组织中*Tβ10*高度表达, 而鹿茸却能快速生长(2 cm/d)不发生任何癌变。为了研究内源性鹿*Tβ10*基因过表达对鹿茸干细胞部分生物学特性的影响。本研究通过采集鹿生茸区骨膜(antlerogenic periosteum, AP)组织并对其进行原代培养获得了高纯度AP细胞。通过克隆鹿*Tβ10*基因并构建慢病毒过表达载体, 离体包装并收集慢病毒颗粒后感染AP细胞, qRT-PCR检测表明*Tβ10*基因表达量相对于对照上调了2.5倍, 进而建立*Tβ10*过表达AP细胞系。四甲基偶氮唑盐比色法(methyl thiazolyl tetrazolium assay, MTT)实验表明, *Tβ10*基因过表达能极显著抑制AP细胞增殖($P<0.01$); β-半乳糖苷酶染色显示, *Tβ10*基因过表达极显著地促进了AP细胞的衰老($P<0.01$); 细胞划痕实验表明, *Tβ10*基因过表达显著抑制人(*Homo sapiens*)脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)的细胞迁移($P<0.05$)。本研究为揭示鹿茸快速生长机制而不发生癌变以及深入研究鹿*Tβ10*基因在鹿茸快速生长中的功能提供了理论依据。

关键词 鹿, 胸腺素β10(*Tβ10*), 慢病毒, 生物学特性, 鹿茸干细胞

中图分类号 S825

文献标识码 A

Effects of Deer (*Cervidae*) Thymosin β10 Gene Overexpression on Proliferation, Senescence and Migration of Antler Stem Cells *In vitro*

ZHANG Wei CHU Wen-Hui FU Jing SUN Hong-Mei LI Chun-Yi*

1 State Key Laboratory for Molecular Biology of Special Economic Animals/Deer Antler Engineering Center of Jilin Province, Institute of Special Animal and Plant Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130112, China

* Corresponding author, lichunyi1959@163.com

Abstract Overexpression of thymosin beta 10 (*Tβ10*) gene is detected in many of neoplastic tissues and cell lines compared to the respective normal tissue types. So *Tβ10* is considered to be an anticipated marker for tumorigenesis and tumor progression. Deer (*Cervidae*) antlers are not a cancerous organ with the astonishing growth rate up to 2 cm/d. *Tβ10* gene was highly expressed in the growing tips of antlers by using *in situ* hybridization. Therefore, tests of the effects on biological properties (proliferation, migration and senescence) of endogenous *Tβ10* gene expressed in the antler stem cells by using a lentiviral vector were performed in this study. In the experiment, antlerogenic periosteum (AP) tissue from a 8 months old male sika deer was collected by using surgical operation in a relative sterile environment and primary culture for AP cells was carried out by using type II collagenase. Total RNAs of AP cells were extracted by using PureLink™ mini RNA

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31500792)、吉林省科技发展计划项目(No. 20140101139JC)和中国农业科学院科技创新工程项目(No. CAAS-ASTIP-2014-ISAPS-04)

收稿日期: 2016-08-18 接受日期: 2016-09-26

kit and *Tβ10* gene was cloned using RT-PCR. AP cell lines with the overexpression of *Tβ10* gene were successfully established by using lentiviral vector guidance system and determined the effects on proliferation, migration and senescence, which may be influenced by endogenous Tβ10. AP cells could proliferate *in vitro*, morphology of these cells was bipolar spindle shaped under a phase contrast microscope. *Tβ10* gene was cloned accurately based on sequencing and inserted into the lentiviral vector plvx-ires-mCherry-puro successfully. Recombinant lentivirus was packed and produced successfully by using co-transfection of three-plasmid lentiviral vectors and X-treme GENE HP transfection reagents in ERK 293T cells. Transfection efficiency was evaluated through the expression of red fluorescent protein (RFP) by using an inverted fluorescence microscope. The lentivirus from culture medium were collected and concentrated by using Lenti-X concentrator reagents, and the titer of lentivirus achieved 4×10^8 TU/mL detected with 293T cells. AP cells infected by recombinant lentivirus were selected and enriched by applying puromycin ($2.5 \mu\text{g/mL}$) in culture medium for 10 days. AP cell lines with overexpression of *Tβ10* gene were established and identified by qRT-PCR and Western blotting. The results of methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay showed that *Tβ10* gene inhibited proliferation of AP cells significantly ($P < 0.01$), compared to the control; β -galactosidase staining showed that *Tβ10* gene promoted senescence of AP cells significantly ($P < 0.01$) and the migration assay showed that *Tβ10* gene inhibited human (*Homo sapiens*) umbilical vein endothelial cells (HUVEC) migration significantly ($P < 0.05$). This study would lay the foundation for revealing the underlying mechanism of rapid growth of deer antlers without becoming cancerous.

Keywords Deer, Thymosin beta 10, Lentiviral vector, Biological characteristics, Antler stem cells

鹿(*Cervidae*)胸腺素β10 (thymosin beta 10, Tβ10)是分子量约为5 kD的肌动蛋白结合因子,广泛存在于哺乳动物器官中,是Thymosin beta家族的重要一员(和金周等, 2012)。目前,Tβ10的研究主要集中在肿瘤以及癌症发生上,Tβ10在众多(如甲状腺乳头状癌和胆管癌等)肿瘤发生以及恶化过程中高表达,且其表达量与肿瘤恶化程度呈现一定的相关性,因此,Tβ10被认为是肿瘤发生及恶化程度的一个可靠标记和重要预判指标,也是现今兴起的一个肿瘤治疗潜在靶点(Zhang et al., 2014; Sribenja et al., 2013; Bodey et al., 2000)。此外,Tβ10还参与众多的生物学过程,包括细胞生长、分裂、凋亡、迁移以及血管形成等(Rho et al., 2005; Zhang et al., 2009; 李紫璇等, 2014)。

鹿茸是迄今为止发现的唯一能够每年周期性完全再生的哺乳动物附属器官,其周期性再生包含了皮肤、血管、神经和骨/软骨等组织的完全再生。此外,鹿茸的生长非常迅速,在生茸期其生长速度最快能达到2.75 cm/d,是一般肿瘤生长速度的30多倍,但是鹿茸却一般不会发生癌变(Li et al., 2014; Nieto-Diaz et al., 2012)。Deb-Choudhury等(2015)发现*Tβ10*在鹿茸顶端组织中高度表达。在肿瘤和鹿茸中均存在*Tβ10*的高表达,而前者是癌变

的组织后者则是正常组织。据此,*Tβ10*基因可能是调控或平衡鹿茸的快速生长,以避免鹿茸发生癌变的调控因子。揭示*Tβ10*基因在鹿茸中的生物学功能及其调控机制可以为肿瘤治疗及预防提供借鉴。

鹿茸的发生和再生是基于鹿茸干细胞的过程,鹿茸干细胞(antler stem cells)包括生茸区骨膜(antlerogenic periosteum, AP)细胞和角柄骨膜(pedicle periosteum, PP)细胞,AP是鹿茸发生的基础,PP是鹿茸再生的基础(Li et al., 2010)。本实验通过采集AP组织并原代培养AP细胞。利用特异性引物将*Tβ10*克隆至慢病毒介导的表达载体,并包装形成重组慢病毒,再将*Tβ10*基因导入AP细胞,从而构建了*Tβ10*基因过表达的AP细胞系。其次,通过一系列的研究探索了内源*Tβ10*基因过表达对细胞增殖、衰老和迁移的影响。从而综合评价鹿*Tβ10*基因在鹿茸生长发育中的功能,以期为进一步揭示*Tβ10*的生物学功能以及作用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

9月龄雄性梅花鹿(*Cervus nippon*), 体况良好,生茸区未发育,高度约为1.5 cm,购自农业部长白山野

生生物重点观测站;感受态细胞 DH5 α 购自北京全式金生物;细胞株人胚肾细胞(293T)、细胞株人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)、载体质粒 plvx-ires-mCherry-puro 质粒(由本实验室重组构建)、慢病毒包装质粒 pMD2.G 和 pSPAX2 均由本实验室保藏。无缝克隆连接试剂盒购自南京维诺赞生物;小量质粒提取试剂盒(E.Z.N.A, 美国);无内毒素大量质粒制备试剂盒(Promega, 美国);琼脂糖凝胶高效回收试剂盒(E.Z.N.A, 美国);DNA Marker(Takara, 日本);DMEM 基础培养基和 RPMI 1640 培养基、标准胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(Gibco, 美国),胰酶(Trypsin)(Life tech, 美国), X-tremeGENE HP(Roche, 德国), Ploy brene (Millipore, 美国), 兔抗人 T β 10 抗体(Abcam, 美国), 鼠抗人甘油醛-3-磷酸脱氢酶抗体 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) (Proteintech, 美国),其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 方法

1.2.1 AP 组织采样及其原代培养

参照 Li 和 Suttie(2003)的方法并加以改进,在无菌样品采集箱中进行生茸区骨膜(antlerogenic periosteum, AP)组织采集,揭开生茸区皮肤,去除 AP 组织上的结缔组织,随后利用鼠牙镊将 AP 组织撕下,将 AP 置于无菌样品存储液(DMEM 含双抗)中,带至实验室进行组织原代培养。原代培养主要参考 Sun 等(2012)并加以改进,具体如下:利用无菌 PBS 将 AP 组织洗涤 2 次,组织切割装置(专利号: ZL201420335401.8;发明人:李春义,褚文辉和赵海平)将 AP 组织切割成 2~3 mm³ 的小块,利用 II 型胶原

蛋白酶(150 U)于 37 ℃ 水浴消化约 10 min,待 AP 组织出现毛边时,离心收集 AP 组织块,用少量培养基(DMEM, 10% FBS)重悬组织块并接种于 T-25 培养瓶中,先倒置培养 2~4 h 后,随后将培养瓶转为正置状态,同时添加适量培养基使其没过组织块。连续培养约 6 d 后,待细胞长出后进行正常传代、冻存和复苏等常规细胞操作,并将培养的细胞命名为 AP 细胞。

1.2.2 T β 10 基因 ORF 克隆及慢病毒表达载体的构建与鉴定

根据 T β 10 的基因 ORF 序列,设计特异性引物(携带载体同源臂,表 1 中带底纹部分),胰酶消化生长状态良好的 AP 细胞,利用 Life Technology 总 RNA 制备试剂盒提取 AP 细胞总 RNA,随后利用微孔板酶标仪测定所提 RNA 浓度及纯度后,利用 Takara 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录合成 cDNA 模板,并利用 RT-T β 10-F/R 引物进行 PCR 扩增,反应体系(50 μ L):上下游引物(RT-T β 10-F/R,表 1)各 1 μ L(10 μ mol/L),cDNA 模板 2 μ L(50 ng/ μ L),Takara premix Tag 25 μ L,ddH₂O 21 μ L。扩增程序为:94 ℃,5 min;(94 ℃,30 s;55 ℃,30 s;72 ℃,40 s) $\times$ 40;72 ℃,5 min。将 PCR 产物进行凝胶电泳分析,胶回收目的条带后与经过 Xho I 酶切过的线性化载体进行无缝重组,将重组产物转化 DH5 α 感受态细胞,挑选单克隆并进行质粒提取。利用 PCR 鉴定重组质粒,反应体系(20 μ L):上下游引物(Plvx-puro-F/R,表 1)各 0.5 μ L(10 μ mol/L),质粒模板 0.5 μ L(100 ng/ μ L),Takara premix Taq 10 μ L,ddH₂O 8.5 μ L。反应程序:95 ℃ 预变性 15 min;94 ℃ 变性 15 s,55.0 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 35 min,共 35 个循

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

引物名称 Primer name	序列(5'~3') Sequence	产物大小/bp Product length	T _m /℃
RT-T β 10-F	TACCGGACTCAGATCtgaATGGCAGACAAGCCCGACAT	165	55.8
RT-T β 10-R	AATACCGGAGTACTCGATCATTGCTTGCTTCTCCTGCTC		
Plvx-puro-F	GTCGTAACAACCTCCGCC	315	54.6
Plvx-puro-R	CGGGGAAACAGAAGTGC		
GAPDH-F	ATGTTTGTGATGGGCGTGAAC	184	59.5
GAPDH-R	CCAGTAGAAGCAGGGATGATGTT		
qPCR-T β 10-F	TAAGGCCAAGCTGAAGAAGACTGA	87	58.5
qPCR-T β 10-R	CATTGCTTGCTTCTCCTGCTC		

底纹:载体同源臂 Shading: Homologous arms of vector

环, 72 °C 5 min, 4 °C。采用凝胶电泳对 PCR 产物进行鉴定, 将阳性的质粒进行测序鉴定(哈尔滨博仕生物科技有限公司)。经测序确认后的质粒命名为 plvx-mCherry-ires-puro-*Tβ10*, 并利用 Promega 高品质无内毒素质粒提取试剂盒大量制备, 同时对慢病毒空载体质粒 plvx-mCherry-ires-puro、包装质粒 pSPAX2 和 pMD2.G 进行大量制备。

1.2.3 重组质粒(携带鹿 *Tβ10* 基因)的慢病毒包装

利用 0.8% 胰酶消化人胚肾细胞 293T 细胞并准确计数, 将其接种于经无菌多聚赖氨酸处理过的 10 cm² 细胞皿中, 添加 10 mL 培养基(含 10% 标准胎牛血清(FBS), 不含抗生素, 使其生长状态达到较佳水平), 使 293T 包装细胞在预转染时细胞融合度达到 80% 以上。使用 1.0 mL opti-MEM 培养基稀释总共 10 μg 质粒 DNA (m (plvx-mCherry-ires-puro/-*Tβ10*):m(Pspax2):m(pMD2.G) 的比为 4:4:2), 同时添加 22 μL 细胞高效转染试剂后, 在室温下孵育 25~30 min 后, 将该复合物缓慢添加到细胞培养皿中, 并轻轻摇动培养皿以混匀。置于细胞培养箱中, 37 °C, 5% CO₂, 孵育 12 h 后, 然后更换培养基。转染操作 24 h 后在 EVOS 倒置荧光显微镜下, 检测红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)的表达分布情况以此确定本次转染效率(间接反映慢病毒包装效率)。在转染效率较高的前提下, 缓慢收集细胞培养皿中上清于 50 mL 离心管中(0.45 μm 过滤上清)。依据慢病毒浓缩液(Lenti-X concentrator, Clontech)的使用要求, 按比例添加慢病毒浓缩液, 于 4 °C 静置约 12 h 后, 1 500×g 离心 30 min, 弃去上清并利用适量 PBS 重悬沉淀, 取一小部分进行病毒滴度测定, 剩余病毒小量分装后置于 -80 °C 保存待用。

1.2.4 重组慢病毒(携带鹿 *Tβ10* 基因)感染 AP 细胞

在细胞生长对数期, 胰酶消化并重悬一定数量的 AP 细胞, 准确计数后, 添加 3×10⁴ 个细胞于 6 孔板中央, 随后添加 2 mL 完全培养基(10% FBS, 含抗生素)。培养约 6 h, 待细胞全部贴壁后进行重组慢病毒感染操作, 首先弃去 6 孔板中的培养基, 替换 2 mL DMEM 培养基含病毒 200 μL 及 poly-brene(2 μL)的混合液, 12 h 后更换为完全培养基, 感染病毒 24 h 后在倒置荧光显微镜下观察 AP 细胞荧光蛋白 RFP 的表达情况。待含有荧光细胞达到约 50% 以上时, 添加 2.5 μg/mL 的嘌呤霉素(puro)于培养基中, 连续筛选 10 d, 以去除未携带目的载体的细

胞。将携带 *Tβ10* 基因的 AP 细胞命名为 AP-*Tβ10*, 将携带空载体对照的 AP 细胞命名为 AP-Vector, 将未经处理的 AP 细胞命名为 AP-Negative。

1.2.5 qRT-PCR 检测 AP 细胞 *Tβ10* mRNA 表达效率

从 AP-*Tβ10*、AP-Vector 以及 AP-Negative 细胞中分别提取总 RNA, 对 RNA 进行定量分析后将其反转录合成 cDNA 后, 利用 SYBR Green 荧光定量试剂盒进行荧光定量 PCR 反应, 结合 qPCR-*Tβ10*-F/R 特异性引物进行实验, 并选择 *GAPDH* 作为内参基因, 以对结果进行校正, 每组设立 3 个复孔以减少实验误差, 以 AP-Negative 作为对照, 反应体系 (25 μL): 上下游引物各 0.5 μL (10 μmol/L), 模板 1 μL (50 ng/μL), Roche SYBR master 12.5 μL, ddH₂O 10.5 μL。反应条件: 95 °C 预变性 15 min; 94 °C 变性 15 s, 55.8 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 40 个循环, 72 °C 5 min, 4 °C。同时设立熔解曲线, 以判断引物的特异性。

1.2.6 Western blot 检测 AP 细胞 *Tβ10* 蛋白表达效率

AP 细胞经 PBS 洗涤后, 胰酶消化细胞后, 利用自制裂解液和组织细胞破碎仪将其裂解并收集于离心管中, 随后于 4 °C, 12 000×g 离心 15 min, 收集上清并添加蛋白酶抑制剂(董振等, 2015)。利用 Bradford 微孔板法测定蛋白浓度后, 等量上样 (60 μg) 于 15% 聚丙烯酰胺 (polyacrylamide gelelectrophoresis, PAGE) 凝胶上, 随后在 4 °C 的条件下, 将蛋白转印至聚偏氟乙烯 (poly vinylidene difluoride, PVDF) 膜 (0.22 μm) 上, 5% 脱脂奶粉封闭, 一抗室温孵育 2 h, 洗涤后, 添加相对应二抗, 室温孵育 1 h, 洗涤后, 利用 DAB 显色试剂盒进行显色。利用扫描仪扫描图像进行处理分析。

1.2.7 MTT 法测定 *Tβ10* 过表达对细胞增殖的影响

消化 AP-*Tβ10*、AP-Vector 以及 AP-Negative 细胞并准确计数, 调整细胞浓度为 5×10⁴ 个/mL, 每孔 (96 孔板) 取 200 μL 细胞悬液, 每个处理设立 6 个复孔, 每 2~3 d 更换完全培养基, 分别于接种 1、3、5 和 7 d 后进行 MTT 检测。检测方法: 在原培养基基础上每孔添加 20 μL MTT 试剂 (5 mg/mL), 轻微晃动以使 MTT 分布均匀, 继续培养孵育 4 h 后, 利用排枪小心弃去培养上清后, 每孔加入 150 μL 高品质二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO) 溶解, 摇床避光反应 10 min 后, 利用微孔板酶标仪在 570 nm 处测定吸光

度。将OD值扣除空白对照(添加AP细胞,不加MTT试剂)后,以时间为横坐标,吸光度为纵坐标绘制细胞增殖曲线。

1.2.8 β -半乳糖苷酶法检测 $T\beta 10$ 基因对细胞衰老的影响

提前1 d将AP- $T\beta 10$ 、AP-Vector以及AP-Negative细胞接种到6孔板中,待细胞融合度达到80%左右时,将细胞进行固定、洗涤后添加1 mL β -半乳糖苷酶染色工作液(碧云天生物,上海),封口膜封口后置于37℃(不能使用含CO₂的细胞培养箱)过夜孵育。在普通光学显微镜下观察细胞着色情况并采集照片。每种处理随机选取3个视野,参照试剂盒着色情况说明,统计被着色细胞占全部细胞的比例,计算细胞衰老率(%)=(着色细胞数/总细胞数)×100。

1.2.9 细胞划痕实验检测 $T\beta 10$ 对细胞迁移的影响

前期实验发现AP细胞几乎不具备迁移特性,因此本实验选用HUVEC进行迁移实验。按照1.2.4中的方法,利用慢病毒系统将鹿 $T\beta 10$ 基因导入HUVEC细胞。接种细胞前,先用marker笔在6孔板背后,用直尺比着,均匀地划横线,大约每隔0.5~1 cm一道,横穿过孔。每孔至少穿过5条线。在孔中分别加入HUVEC细胞 $T\beta 10$ 过表达组(HUVEC- $T\beta 10$)、空载体感染组(HUVEC-Vector)和正常HUVEC细胞(HUVEC-Negative),接种密度为 5×10^5 个细胞/孔,第二天用枪头比着直尺,垂直于背后的横线划痕,用PBS洗细胞3次,去除划下的细胞,加入无血清培养基。放入37℃,5% CO₂培养箱,培养。按0, 6, 12, 18和24 h取样,拍照。结果使用Image-pro plus图像分析软件进行迁移距离分析,为消除实验误差,每组进行3个复孔。

1.2.10 数据统计与分析

利用Excel以及IBM SPSS 20.0软件进行数据统计和分析,利用GraphPad prism 5绘图软件进行图形绘制,数据以均值±标准差($\bar{X} \pm SD$)表示,以单因素方差分析(one-way ANOVA)检验判断差异显著性。

2 结果与分析

2.1 AP组织采集及AP细胞原代培养

AP组织(图1A)培养1周后的AP细胞,于倒置相差显微镜观察,可见AP细胞形态呈均一的梭型,

无杂细胞,且生长状态良好。同时,AP细胞可形成单克隆(图1B),说明AP组织采集成功,且原代细胞培养顺利,所获得的AP细胞纯度较高,可用于后续实验分析。

2.2 目的载体扩增与重组慢病毒载体构建

以AP细胞的cDNA为扩增模板,利用携带载体同源臂的 $T\beta 10$ 基因的特异性引物进行RT-PCR扩增,扩增产物经电泳鉴定,在165 bp左右出现特异性条带(图2,泳道1),与理论预测一致,说明 $T\beta 10$ 基因克隆成功。目的片段胶回收后与经酶切线性化的过表达载体plvx-ires-mCherry-puro进行质粒同源克隆重组,PCR产物经鉴定发现,空载体在315 bp左右出现特异性条带(图2,泳道2),目的载体在444 bp左右出现特异性条带(图2,泳道3),结果与预期相符,将目的载体测序后,进一步证明 $T\beta 10$ 基因ORF成功克隆至目标载体并命名为plvx-ires-mCherry-puro- $T\beta 10$ 。

2.3 重组慢病毒三质粒共转染293T细胞效果

由X-tremeGENE HP介导的重组慢病毒质粒

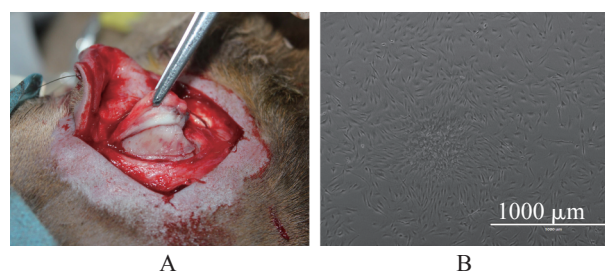


图1 AP组织采集(A)及其原代细胞培养(B)

Figure 1 Tissue sampling (A) and primary culture of AP cells (B)

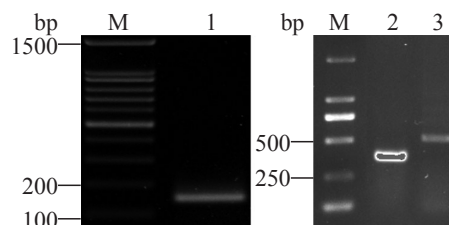


图2 重组质粒PCR鉴定结果

Figure 2 PCR identification of recombinant plasmid

M: DL2000 maker; 1: $T\beta 10$ 目的条带; 2: 空载体扩增片段; 3: 目的载体扩增片段

1: Target band of $T\beta 10$; 2: Band of vector; 3: Target band of recombinant vector

plvx-ires-mCherry-puro/-*Tβ10*、包装质粒pSPAX2和pMD2.G三质粒共转染293T细胞24 h后,倒置荧光显微镜下,视野中观察到大量的RFP荧光,且荧光呈明暗交替均匀分布(图3A)。为考察病毒包装对293T细胞状态的影响,在相差模式下,该细胞呈圆粒型,生长旺盛,紧密排列,且无死细胞漂浮于上清中(图3B)。表明本次实验成功进行了293T细胞质粒共转染并在该细胞中形成了慢病毒颗粒。慢病毒颗粒经收集浓缩进行滴度测定(梯度稀释法),发现本实验包装形成的病毒滴度达到 4×10^8 TU/mL,达到后续感染实验要求。

2.4 重组慢病毒感染AP细胞效果

用包装成功的慢病毒感染AP细胞,经过嘌呤霉素(puro)的连续筛选,倒置荧光显微镜下观察发现,视野中AP细胞(图4A)全部表达RFP,说明*Tβ10*基因已成功导入AP细胞。在可见光下可看到AP细胞(图4B)生长状况良好,说明本实验成功建立了携带*Tβ10* ORF的AP细胞系。

2.5 AP细胞*Tβ10* mRNA和蛋白表达水平

由qRT-PCR的扩增曲线和熔解曲线可知,内参基因*GAPDH*和目标基因*Tβ10*均被引物特异性扩增。仪器自动设置基线后导出对应的*Ct*值,然后利用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 分析算法进行基因表达数据分析,由图5A可知:与对照AP-Negative相比,AP-Vector *Tβ10* mRNA表达上调差异不显著($P > 0.05$),说明该载体对基因表达的影响较小。但AP-*Tβ10*中*Tβ10* mRNA表达水平出现极显著升高($P < 0.01$),是AP-Negative和AP-Vector的2.5倍左右。结果说明,本

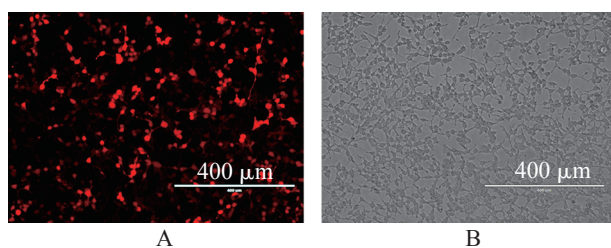


图3 三质粒共转染24 h后的293T细胞

Figure 3 293T cells 24 h after transfection by using 3 plasmids

A. 倒置荧光显微镜下荧光表达情况; B. 倒置相差显微镜下细胞形态

A. RFP expression in 293T cells under an inverted fluorescence microscope; B. 293T cells under a phase contrast microscope

实验成功地在AP细胞中上调了*Tβ10* mRNA的表达水平。

由图5B可知,DAB显色3种蛋白的内参(*GAPDH*)条带大小粗细一致,说明内参表达丰度一致。相对于AP-Negative和AP-Vector,AP-*Tβ10*的目的蛋白条带较深,目的蛋白表达量较高,说明成功地在AP细胞中过表达了*Tβ10*蛋白。

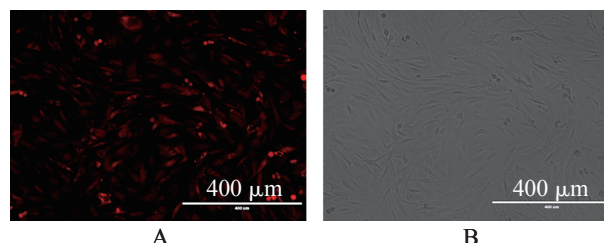


图4 重组慢病毒感染的AP细胞

Figure 4 Infected AP cells by using Lentivirus

A. AP细胞荧光表达情况; B. AP细胞的形态

A. RFP expression in AP cells; B. Morphology of AP cells under phase contrast

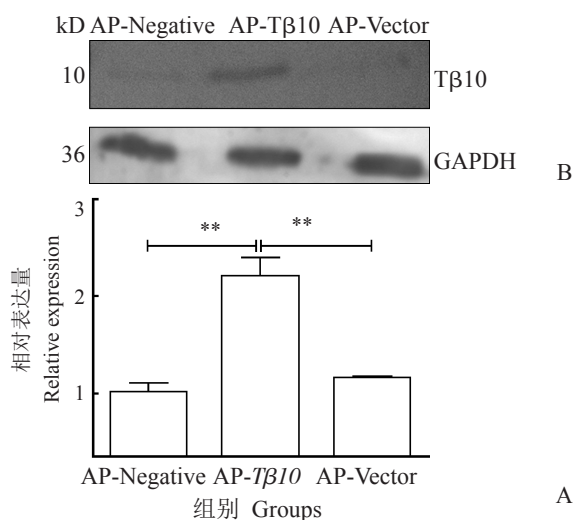


图5 过表达AP细胞系的*Tβ10* mRNA水平(A)和蛋白表达水平(B)检测

Figure 5 Expression level of *Tβ10* mRNA (A) and protein level (B) in the AP cell lines with *Tβ10* overexpression

AP-Negative: 未经处理的AP细胞; AP-*Tβ10*: 携带*Tβ10*基因的AP细胞; AP-Vector: 携带空载体对照的AP细胞; **: 与AP-*Tβ10*相比差异极显著($P < 0.01$); 内参基因: *GAPDH*, $n = 3$; 下同

AP-Negative: Untreated AP cells; AP-*Tβ10*: AP cells overexpress *Tβ10*; AP-Vector: AP cells contain vector; **: Significant difference compared with the AP-*Tβ10* ($P < 0.01$), Reference gene: *GAPDH*, $n = 3$; The same below.

2.6 *Tβ10* 基因过表达对细胞增殖的 MTT 检测结果

胰酶消化 AP-*Tβ10*、AP-Vector 和 AP-Negative 这 3 种细胞,计数后铺板培养并进行连续天数的 MTT 测定,由图 6 可知,与 AP-Vector 和 AP-Negative 相比,AP-*Tβ10* 过表达极显著地抑制了细胞增殖($P<0.01$),说明 *Tβ10* 基因的上调抑制了 AP 细胞的增殖。此外,AP-Negative 的增殖速度较 AP-Vector 快,说明载体构建、嘌呤霉素筛选等实验操作对细胞增殖有一定的影响。

2.7 *Tβ10* 基因过表达对细胞衰老的影响(β -半乳糖苷酶染色)

β -半乳糖苷酶染色结果(图中黑色箭头指示为着色细胞)显示,各组均有一定数量着色的细胞,但是各组之间存在差异。由图 7 可知,AP-Vector 的着色细胞数高于 AP-Negative,说明空白载体对 AP 细胞衰老有一定的影响,但是两者间差异不显著($P>0.05$)。值得注意的是两者着色细胞数占比均极显著地低于 AP-*Tβ10*($P<0.01$)。综合以上结果,*Tβ10* 基因极显著地加速了 AP 细胞的衰老。

2.8 *Tβ10* 过表达对细胞迁移的影响(细胞划痕实验)

本实验以各组的相对迁移距离进行统计分析,相对迁移距离的计算方法为(以 0~6 h 为例):在 0 h 划痕的平均距离减去 6 h 划痕的平均距离,以此类推,计算各时间段的相对迁移距离,相对迁移距离越大,则迁移能力越强。

由图 8 以及表 2 可知,在 0~6 h 时, HUVEC-*Tβ10* 相对于 HUVEC-Vector ($P>0.05$)和正常 HUVEC-Negative($P<0.01$)表现出一定的促迁移效果,但在 6~12 h 以及 12~18 h 时,各组之间的相对迁移距离差

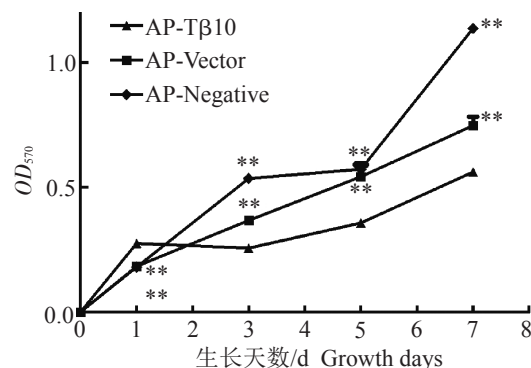


图 6 AP 细胞的生长曲线

Figure 6 Growth curve of AP cells via MTT assay

异不显著($P>0.05$)。值得注意的是在 18~24 h 时, HUVEC-*Tβ10* 的相对迁移距离显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)地低于 HUVEC-Vector 和 HUVEC-Negative($P<0.05$),这些结果综合说明梅花鹿 *Tβ10* 基因过表达具有显著地抑制细胞迁移的作用。

3 讨论

Tβ10 是一类较为保守的含有 43 个氨基酸的小分子蛋白。已有研究表明 *Tβ10* 是现今通用的一个肿瘤恶化以及恶化分级的预判指标,也正成为肿瘤治疗的一个目标靶点。此外, *Tβ10* 还参与血管形成、炎症发生以及早期器官发育等过程,可以说该因子是一类功能多样的因子(Shiotsuka et al., 2013; Lee et al., 2005)。鹿茸与肿瘤组织具有许多相似之处,比如生长迅速,富含血管,高度表达 *Tβ10*,但鹿茸却是结构井然有序的正常组织而不是癌组织。因此,通过揭示鹿 *Tβ10* 基因在鹿茸干细胞中的生物学功能,可以用于推测该因子在鹿茸快速生长以及肿瘤恶化等方面的作用。本实验通过无菌采集梅花鹿 AP 及其细胞的原代培养,获得了高纯度的 AP 细胞。此外,成功构建了含 *Tβ10* 基因慢病毒过表达载体,并成功地建立了 *Tβ10* 过表达 AP 细胞系。研究发现, *Tβ10* 过表达能显著抑制 AP 细胞的增殖、加速细胞衰老和抑制细胞迁移。

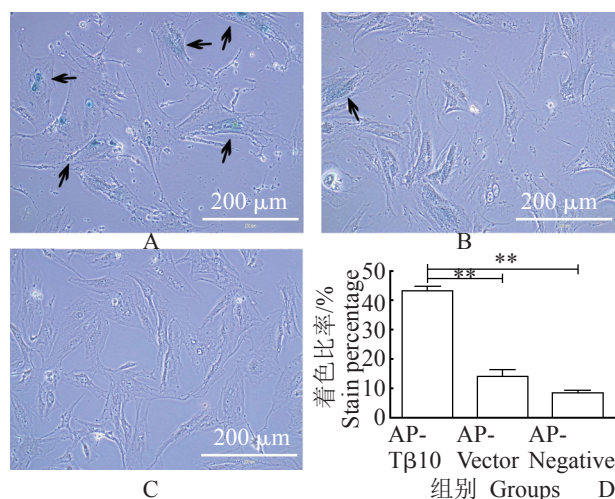


图 7 β -半乳糖苷酶染色结果

Figure 7 Results of β -galactosidase staining

A. AP-*Tβ10*; B. AP-Vector; C. AP-Negative; D. 统计分析结果。黑色箭头: 着色细胞

A. AP-*Tβ10*; B. AP-Vector; C. AP-Negative; D. Bar graph. Black arrow: Staining cells

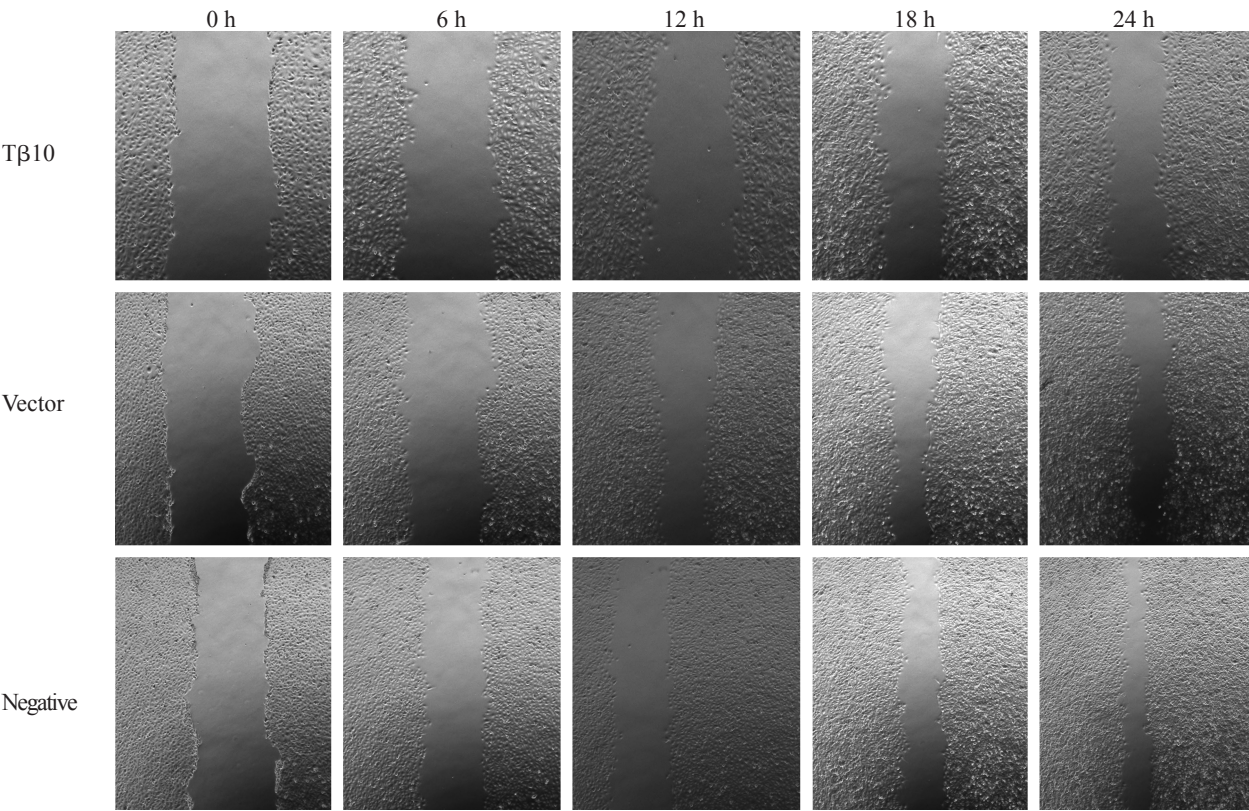


图 8 HUVEC 细胞迁移
Figure 8 Migration of HUVEC cells

表 2 细胞迁移统计结果
Table 2 Statistical results of HUVEC cell migration

组别 Groups	0~6 h	6~12 h	12~18 h	18~24 h
Tβ10 组 Tβ10	37.36±5.36 ^{Aa}	19.27±1.54	21.70±2.50	30.84±1.82 ^{Bb}
空载体组 Vector	34.45±1.37 ^{ABa}	22.66±6.51	26.05±8.92	37.79±0.61 ^{Aa}
未处理组 Negative	23.99±3.75 ^{Bb}	21.33±6.13	18.89±1.49	35.49±2.42 ^{ABa}

同一列中上标不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$); 同一列中不同小写字母表示差异显著($P<0.05$); 同一列中相同字母表示差异不显著($P>0.05$)
Values in same column with different superscripts capital letter denoted extremely significant difference ($P<0.01$); The different small letters means significant difference ($P<0.05$); The same superscripts letters denoted not significant difference ($P>0.05$)

Liu 等(2004)在黑色素瘤细胞中的研究发现, *Tβ10* 上调表达与细胞 F actin 下调呈现显著的相关性, 本实验研究发现, 内源鹿 *Tβ10* 基因过表达后能够显著地抑制 AP 细胞增殖, 可能的解释是 *Tβ10* 过表达能够引起细胞 F actin 解聚, 造成细胞骨架损伤, 从而抑制细胞增殖。但是, Viglietto 等(1999)发现 *Tβ10* mRNA 表达的上调能够促进小鼠(*Mus musculus*)甲状腺腺泡细胞增殖。此外, Shiotsuka 等(2013)发现对胚胎时期小鼠进行 *Tβ10*-siRNA 处理能够显著抑制其骨髓和上皮细胞增殖。对比上述

研究结果可以发现, AP 细胞虽然同属正常的体细胞但是其调控类型更加接近肿瘤细胞。可能的原因是, 在鹿茸生长期, 内部细胞迅速分裂增殖, 为保证鹿茸组织不发生癌变, 系统中必须有与刺激快速生长因子相平衡的因子, *Tβ10* 可能起到了这个作用。在细胞迁移方面, Sribenja 等(2013)研究发现 *Tβ10* 的沉默显著加快胆管癌细胞系细胞的迁移、侵染及伤口愈合过程, 而 *Tβ10* 的过表达则能通过调节 ERK1/2 通路显著抑制该细胞的迁移。本实验结果表明, 内源性过表达鹿 *Tβ10* 蛋白在经过 24 h

实验后,显著地抑制了细胞迁移,这个结论与前人研究报告相符,推测 $T\beta 10$ 可能通过调控 ERK1/2/通路从而抑制了细胞的迁移。此外,本实验还首次地检测了 $T\beta 10$ 基因与细胞衰老的关系,结果表明 $T\beta 10$ 过表达加速细胞衰老,为进一步全面揭示 $T\beta 10$ 基因的功能提供了依据。

4 结论

本研究成功地构建了携带鹿 $T\beta 10$ 基因的慢病毒表达载体,体外进行了慢病毒包装并获得了高滴度慢病毒颗粒,感染 AP 细胞后获得了 $T\beta 10$ 过表达 AP 细胞系。研究发现内源性 $T\beta 10$ 过表达极显著抑制 AP 细胞增殖,加快 AP 细胞衰老和抑制 HUVEC 细胞迁移。本研究可为进一步探明 $T\beta 10$ 基因在鹿茸快速生长以及再生过程中的功能提供理论依据。

参考文献

- 董振,王权威,刘振,等. 2015. 梅花鹿鹿茸再生干细胞蛋白组双向电泳条件优化[J]. 农业生物技术学报, 23(3): 414-420. (Dong Z, Wang Q W, Liu Z, et al. 2015. The optimization of two-dimensional electrophoresis for antler stemcells in sika deer (*Cervus nippon*)[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 23(3): 414-420.)
- 和金周,周长林,方宏清. 2012. 胸腺素 $\beta 10$ 的研究进展[J]. 生物技术通讯, 23(4): 613-616. (He J Z, Zhou C L, Fang H Q. 2012. Advances in Thymosin $\beta 10$ [J]. Letters in Biotechnology, 23(4): 613-616.)
- 李紫璇,曲连悦,钟红珊,等. 2014. 胸腺素 $\beta 10$ 在人肺腺癌细胞株 A549 中抑制细胞凋亡、促进细胞增殖机制研究[J]. 中国肺癌杂志, 17(11): 783-788. (Li Z X, Qu L Y, Zhong H S, et al. 2014. Mechanism of thymosin beta 10 inhibiting the apoptosis and prompting proliferation in a549 cells [J]. Chinese Journal of Lung Cancer, 17(11): 783-788.)
- Bodey B, Siegel S E, Hosseini s H P. 2000. Review of thymic hormones in cancer diagnosis and treatment[J]. International Journal of Immunopharmacology, 22(4): 261-273.
- Deb-Choudhury S, Wang W, Clerens S, et al. 2015. Direct localisation of molecules in tissue sections of growing antler tips using MALDI imaging[J]. Mol Cell Biochem, 409(1-2): 225-241.
- Lee S H, Son M J, Oh S H, et al. 2005. Thymosin $\beta 10$ inhibits angiogenesis and tumor growth by interfering with Ras function[J]. Cancer Research, 65(1): 137-148.
- Li C, Suttie J M. 2003. Tissue collection methods for antler research[J]. European Journal of Morphology, 41(1): 23-30.
- Li C, Yang F, Haines S, et al. 2010. Stem cells responsible for deer antler regeneration are unable to recapitulate the process of first antler development-revealed through intradermal and subcutaneous tissue transplantation[J]. Journal of Experimental Zoology. Part B, Molecular and Developmental Evolution, 314(7): 552-570.
- Li C, Zhao H, Liu Z, et al. 2014. Deer antler-a novel model for studying organ regeneration in mammals[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 56: 111-22.
- Liu C R, Ma C S, Ning J Y, et al. 2004. Differential thymosin $\beta 10$ expression levels and actin filament organization in tumor cell lines with different metastatic potential[J]. Chinese Medical Journal, 117(2): 213-218.
- Nieto-Diaz M, Pita-Thomas D W, Munoz-Galdeano T, et al. 2012. Deer antler innervation and regeneration[J]. Front Biosci (Landmark Ed), 17: 1389-401.
- Rho S B, Lee K W, Chun T, et al. 2005. The identification of apoptosis-related residues in human thymosin beta-10 by mutational analysis and computational modeling[J]. The Journal of Biological Chemistry, 280(40): 34003-34007.
- Shiotsuka M, Wada H, Kiyoshima T, et al. 2013. The expression and function of thymosin beta-10 in tooth germ development[J]. The International Journal of Developmental Biology, 57(11-12): 873-883.
- Sribenja S, Sawanyawisuth K, Kraiklang R, et al. 2013. Suppression of thymosin $\beta 10$ increases cell migration and metastasis of cholangiocarcinoma[J]. BMC Cancer, 13: 430.
- Sun H, Yang F, Chu W, et al. 2012. Lentiviral-mediated RNAi knockdown of *Cbfa1* gene inhibits endochondral ossification of antler stem cells in micromass culture[J]. PLoS One, 7(10): e47367.
- Viglietto G, Califano D, Bruni P, et al. 1999. Regulation of thymosin $\beta 10$ expression by TSH and other mitogenic signals in the thyroid gland and in cultured thyrocytes[J]. European Journal of Endocrinology, 140(6): 597-607.
- Zhang X J, Su Y R, Liu D, et al. 2014. Thymosin beta 10 correlates with lymph node metastases of papillary thyroid carcinoma[J]. The Journal of Surgical Research, 192(2): 487-493.
- Zhang T, Li X, Yu W, et al. 2009. Overexpression of thymosin beta- 10 inhibits *VEGF* mRNA expression, autocrine VEGF protein production, and tube formation in hypoxia-induced monkey choroid-retinal endothelial cells[J]. Ophthalmic Research, 41(1): 36-43.