· ARTICLES · · 论 著 ·

DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2019.02.001
http://xbyxb.csu.edu.cn/xbwk/fileup/PDF/201902117.pdf

SCL基因重组慢病毒上调高糖环境下Cajal间质细胞中c-kit蛋白表达

申茂磊[1]，钱彪[1]，徐浩[2]，傅家豪[1]，王昱琛[1]，王勤章[1]

(1. 石河子大学医学院第一附属医院泌尿外科，新疆 石河子 832000；2. 解放军69235部队卫生所，新疆 奎屯 833200)

[摘要] 目的：探讨含人干细胞白血病(stem cell leukemia，SCL)基因重组慢病毒对高糖环境下受损Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal，ICC)中酪氨酸激酶受体(c-kit)蛋白表达的影响。**方法：**分离ICC，培养24 h贴壁，经倒置显微镜、免疫荧光鉴定后，将ICC细胞分为对照组、高糖组，对照组加入含5 mmol/L葡萄糖的培养基，高糖组加入含20 mmol/L葡萄糖的培养基，培养48 h后；对照组不变，高糖组分成空白组、空慢病毒组和实验组3个亚组，3组分别加入PBS、空慢病毒和含SCL基因重组慢病毒5 mmol/L葡萄糖的培养基，继续培养24和48 h，采用Western印迹法检测两个时段各组中ICC中c-kit 蛋白表达情况。**结果：**24或48 h后，空白组、空慢病毒组中ICC的c-kit蛋白表达水平均明显低于对照组，实验组中ICC中c-kit蛋白的表达水平明显均高于空白组和空慢病毒组，但是仍低于对照组(均$P<0.05$)。**结论：**SCL基因重组慢病毒可以上调高糖环境下功能受损ICC中c-kit蛋白表达量。

[关键词] 干细胞白血病基因重组慢病毒；高糖；Cajal间质细胞；c-kit蛋白

Effect of recombinant lentivirus of SCL gene on expression of c-kit protein in interstitial cells of Cajal under high glucose condition

SHEN Maolei[1], QIAN Biao[1], XU Hao[2], FU Jiahao[1], WANG Yuchen[1], WANG Qinzhang[1]

(1. Department of Urology, First Affiliated Hospital, Medical College, Shihezi University, Shihezi Xinjiang 832000; 2. Health Center, PLA 69235, Kuitun Xinjiang 833200, China)

ABSTRACT

Objective: To determine the effect of a recombinant lentivirus containing human stem cell leukemia (SCL) gene on the expression of c-kit protein in damaged interstitial cells of Cajal (ICC) under high glucose condition.

Methods: After isolation of ICC, the cells were cultured for 24 hours until the cells were adherent. After identification by inverted microscope and immunofluorescence, ICC cells were divided into

收稿日期(Date of reception)：2018-04-28
第一作者(First author)：申茂磊，Email: 4372943711@qq.com, ORCID: 0000-0001-6275-4359
通信作者(Corresponding author)：王勤章，Email: wqz1969@sina.com, ORCID: 0000-0002-7202-3282
基金项目(Foundation item)：国家自然科学基金(81360120)。This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81360120).

two groups: A control group and a high glucose group. The control group was added with a medium containing 5 mmol/L of glucose. The high glucose group was added with a medium containing 20 mmol/L of glucose. After 48 h of continuous cultivation, the high glucose group was divided into 3 subgroups: A blank group, an empty lentivirus group, and an experimental group. The blank group, the empty lentivirus group, and the experimental group were added a medium containing PBS solution, empty lentivirus, and a recombinant lentivirus containing the SCL gene with a glucose concentration of 5 mmol/L, respectively. The cultures were incubated for 24 and 48 h. The expression of c-kit protein in ICC in each group was detected by Western blot.

Results: After 24 or 48 h, the expression of c-kit protein in ICC was significantly lower in the blank group and the lentivirus group than that in the control group, and the expression of c-kit protein in ICC was significantly higher in the experimental group than that in the blank group and the empty lentivirus group, but it was still lower than that in the control group (all $P<0.05$).

Conclusion: The recombinant lentivirus of SCL gene can up-regulate the expression of c-kit protein in functionally impaired ICC under high glucose condition.

KEY WORDS stem cell leukemia gene recombinant lentivirus; high glucose; interstitial cells of Cajal; c-kit protein

糖尿病膀胱病变(diabetic cystopathy，DCP)是糖尿病最重要的并发症，超过80%的糖尿病患者会出现下尿路症状，主要表现为尿急、尿频和尿失禁，膀胱顺应性增高，膀胱收缩功能障碍，后期可引起尿储留，甚至会引发尿毒症，严重影响DCP患者的生活质量[1-2]。有研究[3-4]显示高糖环境下Cajal间质细胞(interstitial cells of Cajal，ICC)中c-kit mRNA表达减少，导致c-kit信号通路异常，ICC的结构和功能发生改变，可能是引发DCP的机制之一。ICC是膀胱起搏细胞，其自发产生电活动传递到平滑肌细胞，引起膀胱平滑肌收缩，对膀胱收缩功能有重要作用[5]。ICC细胞表面及胞质中存在一种酪氨酸激酶受体c-kit，被认为是ICC的特异性标志物[6-7]。而干细胞白血病(stem cell leukemia，SCL)基因是c-kit上游的重要调控基因，其结合位点在c-kit转录调控区，SCL主要是通过作用于c-kit基因启动子发挥功能，从而调节c-kit表达[8]，这为DCP的治疗提供了新思路。本实验从体外细胞水平研究SCL基因重组慢病毒对高糖环境下豚鼠膀胱受损ICC中c-kit蛋白表达的影响，旨在为体内SCL基因治疗DCP提供重要理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

健康雄性豚鼠15只购自新疆医科大学实验动物中心，体重约245 g；SCL慢病毒由上海吉凯基因公司提供；Tris碱、甘氨酸、甲醇、氯化钠、脱脂奶粉、抗CD117 抗体及PBS为德国Merck-Millipore公司产品(批号：WBULS0100)；小鼠抗β-actin抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG为北京中衫金桥有限公司产品(批号：ZB-2301，ZB-2305)；化学发光试剂为美国Thermo公司产品(批号：SJ258383)；荧光定量试剂盒为日本TaKaRa公司产品(批号：RR820L)。

1.2 方法

1.2.1 含人SCL基因重组慢病毒的构建、鉴定以及滴度测定

通过Western印迹及基因测序方法鉴定含人SCL基因重组慢病毒，运用反转录聚合酶链反应(reverse transcription PCR，RT-PCR)方法检测SCL基因在ICC细胞中的表达，其构建、鉴定以及滴度测定参照于建超等[9]的方法进行操作。

1.2.2 体外培养膀胱ICC及实验分组

ICC 来源于豚鼠膀胱，ICC的分离培养参照于建超等[10]的方法。细胞接种24 h后，于倒置显微镜下观察ICC的形态，过滤掉未贴壁的平滑肌细胞。对照组加入含5 mmol/L葡萄糖的培养基；根据蔡志强等[11]研究结果，高糖组加入含20 mmol/L葡萄糖的培养基。继续培养48 h后，对照组维持不变，高糖组被分为空白组、空慢病毒组和实验组。空白组、空慢病毒组和实验组分别加入含有PBS、空慢病毒和最佳感染复数(multiplicities of infection，MOI)为10.0[5]的SCL基因重组慢病毒+5 mmol/L葡萄糖的培养基，继续培养24和48 h。

1.2.3 免疫荧光法鉴定ICC

用镊子取出细胞爬片，用1%PBS缓冲液漂洗3次，100%丙酮溶液固定15 min；用0.03% H_2O_2溶液将内源性过氧化物酶密封处理0.5 h，1%PBS漂洗3次，5 min/次；于室温下在含1%小牛血清白蛋白的PBS中孵化0.5 h；缓慢吸取孵化液，加1 μL用抗体稀释液稀

释的浓度为1:100的特异性一抗(大鼠抗小鼠单克隆c-kit抗体)进行融合，在湿盒内室温下孵育2 h后放置于4 ℃冰箱内继续孵育48 h；在室温下，与浓度1:100的二抗(异硫氰酸荧光素标记荧光兔抗大鼠抗体)避光孵育1 h；最后滴加50%甘油溶液，用盖玻片封闭后在激光共聚焦显微镜下观察c-kit受体的表达情况。

1.2.4 Western 印迹检测ICC中c-kit蛋白表达

首先将配制好的蛋白裂解液置于冰袋上备用；将处理好的ICC细胞用PBS清洗1遍，用移液枪吸弃培养皿中的PBS，然后将适量蛋白裂解液加入培养皿中，置冰上裂解3~5 min，将蛋白裂解液移置1.5 mL EP管中，将离心机调至4 ℃，以12 000 r/min离心15 min，取上清放入另一新EP管中保存。采用BCA法测定蛋白浓度。制备分离胶和浓缩胶，将样品和上样缓冲液混匀煮沸，加样20 μL，以恒压80 V电泳跑胶；结束后采用湿转法转膜，用脱脂奶粉封闭1 h，利用含有氨丁三醇、氯化钠、吐温20的混合缓冲液洗膜2次，加入稀释后的一抗后，在4 ℃恒温条件下孵育过夜，再用含有氨丁三醇、氯化钠、吐温20混合缓冲液洗膜，共3次。在ECL发光试剂中显色，然后进行显影和定影，利用Quantity one软件分析实验图片。

1.3 统计学处理

所得的数据应用SPSS 22.0统计软件进行分析，所有计量资料用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，多组间的比较采用单因素方差分析及两两比较q检验，$P<0.05$表示差异有统计学意义。

2 结　果

2.1 ICC体外培养

在倒置相差显微镜下可以观察到一些形态较规则、贴壁、胞核比较大的纺锥形细胞，从细胞体中心向两侧有明显的特征性突起；而其他细胞呈扁平形状，且不贴壁，细胞两极也无外凸性分枝。由此，成功地培养出具有特征性形态的膀胱ICC(图1)。

2.2 ICC鉴定

采用免疫荧光法，在激光共聚焦显微镜下可见c-kit蛋白的表达。C-kit为ICC细胞表面的特异性受体蛋白，因此，该细胞即本研究中所需要的ICC(图2)。

2.3 ICC中c-kit蛋白的表达水平

在24 h时，实验组中ICC细胞c-kit蛋白的表达水平明显高于空白组和空慢病毒组($P<0.05$)，空白组和空慢病毒组中ICC细胞c-kit蛋白的表达水平明显低于对照组($P<0.05$)。在48 h时，实验组与空白组、空慢病毒组相比c-kit蛋白的表达水平明显升高($P<0.05$)，空白组和空慢病毒组与对照组相比ICC细胞c-kit蛋白的表达水平显著降低($P<0.05$)。在两个时段实验组中ICC的c-kit蛋白表达水平低于对照组($P<0.05$，图3)。

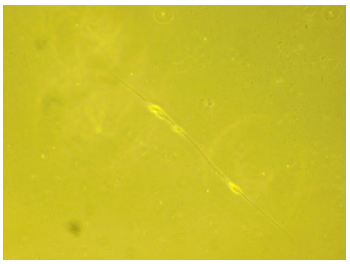

图1　倒置显微镜下ICC的鉴定(×100)

Figure 1　Identification for ICC under an inverted microscope (×100)

ICC adherence after 24 h culture

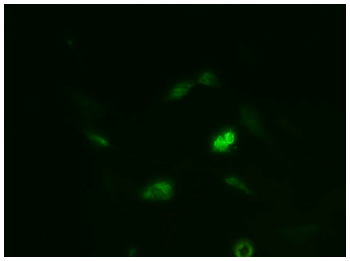

图2　ICC免疫荧光鉴定图(×200)

Figure 2　Immunofluorescence identification for ICC (×200)

Immunofluorescence image after 24 h culture

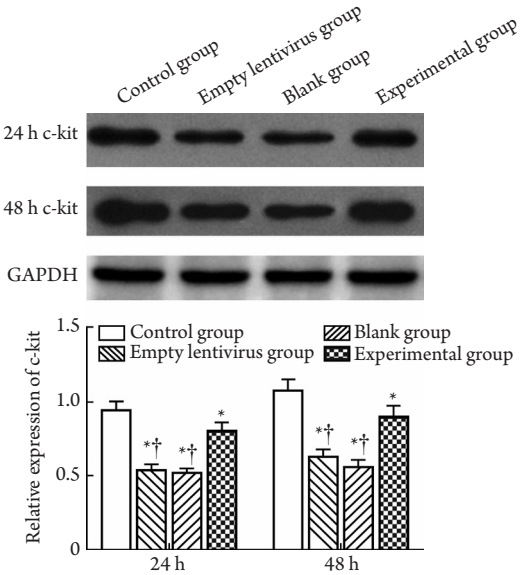

图3　不同时间段 Western 印迹检测各组ICC中c-kit蛋白表达情况

Figure 3　Western blot for c-kit protein expression in ICC in different groups at 24 and 48 h

*$P<0.05$ vs the control group; †$P<0.05$ vs the experimental group

3 讨 论

ICC在胃肠道和膀胱中具有起搏器的独特作用，糖尿病患者逼尿肌中ICC数量、结构、功能改变会引起膀胱收缩功能下降，从而导致DCP的发生[12]。前期本课题组的实验[13-14]表明：在高糖环境下，一定时间范围内ICC的数量随着时间延长逐渐减少，超微结构损伤逐渐加重。众所周知，c-kit可以作为研究ICC的特异性蛋白，而干细胞因子(stem cell factor，SCF)又是ICC细胞表面c-kit的配体，两者结合形成的二聚体复合物对ICC发挥正常的生理功能有重要作用。C-kit被激活后会导致细胞膜内酪氨酸残基的磷酸化以及改变c-kit下游信号，从而对ICC，神经细胞等的生长、分化产生影响[15-18]。SCL是一种干细胞白血病基因，编码在造血和内皮发育中都有重要作用的螺旋-环-螺旋转录因子[19]， SCL基因可以有效转染ICC，SCL基因重组慢病毒转染ICC的最佳MOI为10.0，其又是c-kit上游的调控基因，可上调SCF依赖的造血干细胞以及CD34阳性细胞表达c-kit[9, 20]。本研究结果表明SCL基因能上调高糖环境下受损ICC中c-kit的表达水平。

本研究通过倒置显微镜观察分离培养的ICC样间质细胞，观察到细胞核较大、贴壁生长的梭形或纺锥形细胞；免疫荧光染色后，通过激光共聚焦显微镜可观察到ICC表面c-kit阳性，证实其就是本实验需要的ICC细胞。Western印迹结果显示：空白组、空慢病毒组中ICC细胞表达c-kit蛋白量较对照组明显减少，证明高糖环境可以使ICC中c-kit蛋白表达水平下降，这与刘永国等[21]研究结果相符；经24和48 h培养后实验组ICC中c-kit蛋白表达量虽然较空白组和空慢病毒组明显增加，但是仍少于对照组，表明SCL基因重组慢病毒确实能够转染在高糖环境下受损的ICC，在高糖环境下受损的ICC中c-kit蛋白表达量可被SCL基因上调，但是ICC中的c-kit蛋白并不能完全恢复，低糖环境并不能使在高糖环境下受损的ICC中c-kit蛋白表达量增加，这与Li等[22]的研究结果相吻合。

综上所述，c-kit蛋白在维持ICC功能及表型稳定方面有重要作用，体外模拟糖尿病高糖环境，ICC表面的c-kit蛋白的表达量较对照组明显减少，导致ICC起搏功能有所降低，从而引起膀胱收缩功能障碍，导致DCP的发生；SCL基因重组慢病毒可以上调高糖环境下功能受损ICC中的c-kit蛋白表达量，这可能有助于ICC起搏功能的恢复，逆转DCP受损的膀胱收缩功能。本研究结果为以后深入研究DCP的基因治疗提供了理论依据，但是SCL上调ICC中c-kit蛋白表达的具体机制有待于进一步深入研究。

利益冲突声明：作者声称无任何利益冲突。

参考文献

[1] 罗丰伟, 黎玮. 糖尿病膀胱功能障碍的研究进展[J]. 临床荟萃, 2016, 31(6): 689-692.
LUO Fengwei, LI Wei. Research progress of diabetic bladder dysfunction[J]. Clinical Focus, 2016, 31(6): 689-692.

[2] 何朝辉, 曹石金, 潘卫兵, 等. 腺相关病毒介导胰岛素样生长因子-1对糖尿病大鼠膀胱病变的治疗作用[J]. 中华实验外科杂志, 2013, 30(6): 1157-1160.
HE Chaohui, CAO Shijin, PAN Weibing, et al. Adeno-associated virus-mediated insulin-like growth factor-1 in the treatment of diabetic cystopathy[J] . Chinese Journal of Experimental Surgery, 2013, 30(6): 1157-1160.

[3] 王子雄, 王勤章, 钱彪. 经尿道灌注SCL基因重组慢病毒的DCP豚鼠膀胱Cajal样间质细胞数量、分布及超微结构观察[J]. 山东医药, 2017, 57(15): 26-30.
WANG Zixiong, WANG Qinzhang, QIAN Biao. Observation on number, distribution and ultrastructure of interstitial cells of Cajal in guinea pig with DCP after transurethral perfusion of SCL recombinant lentiviral vector[J]. Shandong Medical Journal, 2017, 57(15): 26-30.

[4] 余运运, 王勤章, 王子雄, 等. 经尿道灌注干细胞白血病重组基因慢病毒对糖尿病膀胱病变豚鼠膀胱功能的影响[J]. 山东医药, 2017, 57(30): 30-32.
YU Yunyun, WANG Qinzhang, WANG Zixiong, et al. Effect of transurethral perfusion of stem cell leukemia recombinant gene lentivirus on the bladder function of diabetic bladder lesions in guinea pigs[J]. Shandong Medical Journal, 2017, 57(30): 30-32.

[5] Mccloskey KD. Interstitial cells and bladder pathophysiology—passive bystanders or active participants?[J]. J Urol, 2011, 185(5): 1562-1573.

[6] Wang L, Liang Y, Chen Q, et al. Identification and distribution of the interstitial cells of Cajal in the abomasum of goats[J]. Cell Transplant, 2018, 27(2): 335-344.

[7] 尹焯, 杨金瑞. 膀胱间质细胞与膀胱病理生理[J]. 中南大学学报(医学版), 2014, 39(6): 644-648.
YIN Zhuo, YANG Jinrui. Bladder interstitial cells and pathophysioIogy[J]. Journal of Central South University. Medical Science, 2014, 39(6): 644-648.

[8] Lang RJ, Tonta MA, Zoltkowski BZ, et al. Pyeloureteric peristalsis: role of atypical smooth muscle cells and interstitial cells of Cajal-like cells as pacemakers[J]. J Physiol, 2006, 576(3): 695-705.

[9] 于建超, 王江平, 李应龙, 等. 人干细胞白血病基因重组慢病毒载体的构建及其在Cajal样间质细胞中的表达[J]. 中国现代医

学杂志, 2017, 27(6): 10-16.
YU Jianchao, WANG Jiangping, LI Yinglong, et al. Construction of recombinant human stem cell leukemia gene lentiviral vector and its expression in Cajal-like interstitial cells[J]. China Journal of Modern Medicine, 2017, 27(6): 10-16.

[10] 于建超, 王勤章, 王江平, 等. 含人干细胞白血病基因慢病毒载体转染Cajal样间质细胞的效果研究[J]. 中国全科医学, 2016, 19(15): 1796-1802.
YU Jianchao, WANG Qinzhang, WANG Jiangping, et al. Effect of transfecting human SCL gene lentiviral vectors into Caja-like cells[J]. Chinese General Practice, 2016, 19(15):1796-1802.

[11] 蔡志强, 王勤章, 丁国富, 等. 豚鼠膀胱Cajal样细胞在高糖环境中的形态学变化[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(22): 4248-4250.
CAI Zhiqiang, WANG Qinzhang, DING Guofu, et al. Interstitial cells of Cajal-like of blabder of guinea pig in the high-glucose environment[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2009, 9(22): 4248-4250.

[12] Zuo DC, Choi S, Shahi PK, et al. Inhibition of pacemaker activity in interstitial cells of Cajal by LPS via NF-κB and MAP kinase[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(8): 1210-1218.

[13] 蔡志强, 丁国富, 李云飞, 等. 体外Cajal样细胞c-kit基因mRNA在高糖环境下表达变化及意义[J]. 农垦医学, 2010, 32(1): 1-4.
CAI Zhiqiang, DING Guofu, LI Yunfei, et al. Diversity of hyperglycemia on the expressions of c-kit mRNA of interstitial cells of Caial-1ike in vitro[J]. Journal of Nongken Medicine, 2010, 32(1): 1-4.

[14] 李云飞, 王勤章, 丁国富. 早期糖尿病膀胱尿动力学及cajal样细胞的变化和意义[J]. 临床泌尿外科杂志, 2009, 24(9): 694-697.
LI Yunfei, WANG Qinzhang, DING Guofu. Changes and significances of urodynamics and Cajal-like cells in diabetic cystopathy of the early stage[J]. Journal of Clinical Urology, 2009, 24(9): 694-697.

[15] Liang J, Wu YL, Chen BJ, et al. The C-kit receptor-mediated signal transduction and tumor-related diseases[J]. Inter J Biol Sci, 2013, 9(5): 435-443.

[16] Chai Y, Huang Y, Tang H, et al. Role of stem cell growth factor/c-kit in the pathogenesis of irritable bowel syndrome[J]. Exper Ther Med, 2017, 13(4): 1187-1193.

[17] 唐洪梅, 房财富, 廖小红, 等. 神经肽Y和5-羟色胺在腹泻型肠易激综合征模型大鼠中表达的研究[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(7): 916-920.
TANG Hongmei, FANG Caifu, LIAO Xiaohong, et al. Expression of NPY and 5-HT in rat model of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2012, 28(7): 916-920.

[18] 柴玉娜, 黄育生, 唐洪梅, 等. 疏肝健脾法肠激安方对IBS-D大鼠免疫功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(21): 93-98.
CHAI Yuna, HUANG Yusheng, TANG Hongmei, et al. Effect of Shugan Jianpi method (Changji'an Fomulation) on IBS-D immune function[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2016, 22(21): 93-98.

[19] Sánchez MJ, Bockamp EO, Miller J, et al. Selective rescue of early haematopoietic progenitors in $Scl^{-/-}$ mice by expressing Scl under the control of a stem cell enhancer[J]. Development, 2001, 128(23): 4815-4827.

[20] Lecuyer E, Herblot SDM, Martin R, et al. The SCL complex regulates c-kit expression in hematopoietic cells through functional interaction with Sp1[J]. Blood, 2002, 100(7): 2430-2440.

[21] 刘永国, 王勤章, 丁国富, 等. 干细胞因子对高糖环境下豚鼠膀胱Cajal样间质细胞c-kit mRNA及蛋白表达的影响[J]. 临床与实验病理学杂志, 2011, 27(3): 282-285.
LIU Yongguo, WANG Qinzhang, DING Guofu, et al. Effects of SCF on the expressions of c-kit mRNA and protein of interstitial cells of Cajal-like cells in the bladder of guinea pig in the high glucose environment[J]. Chinese Journal of Clinical & Experimental Pathology, 2011, 27(3): 282-285.

[22] Li F, Zhang L, Li C, et al. Adenovirus-mediated stem cell leukemia gene transfer induces rescue of interstitial cells of Cajal in ICC-loss mice[J]. Int J Colorectal Dis, 2010, 25(5): 557-566.

(本文编辑　陈丽文)

本文引用：申茂磊, 钱彪, 徐浩, 傅家豪, 王昱琛, 王勤章. SCL基因重组慢病毒上调高糖环境下Cajal间质细胞中c-kit蛋白表达[J]. 中南大学学报(医学版), 2019, 44(2): 117-121. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2019.02.001

Cite this article as: SHEN Maolei, QIAN Biao, XU Hao, FU Jiahao, WANG Yuchen, WANG Qinzhang. Effect of recombinant lentivirus of SCL gene on expression of c-kit protein in interstitial cells of Cajal under high glucose condition[J]. Journal of Central South University. Medical Science, 2019, 44(2): 117-121. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2019.02.001