分泌睫状神经营养因子腺病毒载体的构建及小量复制病毒增强其分泌表达的研究*

李惠明 裘 玮 王 丰 韦 芳 张巨峰 陈霞芳 黄 倩△

(上海交通大学附属第一人民医院中心实验室 上海 200080)

摘要 目的：探讨复制型腺病毒能否增强增殖缺陷型腺病毒 Ad5-hCNTF 所携带外源基因的表达分泌。方法：亚克隆获得分泌型睫状神经营养因子的基因（ciliary neurotrophic factor），然后将此基因插入到穿梭质粒 pshuttle。pshuttle-hCNTF 经 pme1 酶切后，CIAP 去磷酸化，利用 Ad-EASY 腺病毒制备系统，将其与腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 共同转化大肠杆菌 BJ5183，通过同源重组，筛选出含目的基因的重组型腺病毒质粒的菌株，获得大量该质粒后转染病毒包装细胞 AD-293，成功包装出一种血清 5 型增殖缺陷型腺病毒 Ad5-hCNTF。结果：经 PCR 鉴定该病毒含有该基因片断，Western blotting 证实该病毒感染细胞后能表达 CNTF 蛋白。采用 ELISA 法检测培养液证实感染细胞能高水平地分泌 CNTF。结论：体外实验表明在不同滴度的复制型腺病毒 Ad5-E1+E3+ 的带动下，该病毒感染细胞后分泌表达目的蛋白的水平显著提高，为今后应用 Ad 作为基因治疗的载体提供实验证据。

关键词 腺病毒 睫状神经营养因子 基因 分泌表达

中图分类号 Q75 Q78 R373 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2011)05-808-04

Construction of Adenovirus Vector of Secretory Ciliary Neurotrophic Factor and Increasing of Its Secretion by Replicative Adenovirus*

LI Hui-Ming, QIU Wei, WANG Feng, WEI Fang, ZHANG Ju-Feng, CHEN Xia-Fang, HUANG Qian△

(Central Laboratory, The First People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200080, China)

ABSTRACT Objective: We investigate whether replication-competent adenovirus Ad5 (E1+E3+) could enhance the expression of hCNTF secreted by celllines after replication-defective adenovirus Ad5-hCNTF infection in vitro. Methods: Plasmid encoding human CNTF was digested and subcloned into shuttle plasmid pshuttle to obtain a recombinant plasmid pshuttle-hCNTF. Using Ad-EASY system, the lineared and dephosphorylated shuttle vector and pAdEasy-1 plasmid which contain most of the human adenovirus serotype 5 genome were cotransfomed into BJ5183 bacteria, a recombination event then take place and result in the production of recombinant AdEasy plasmid, then the plasmid carrying adenovirus major genome and target gene was transfected into package cells AD-293 celllines to obtain a replication-defective adenovirus Ad5-hCNTF. Results: The recombinant adenovirus Ad5-hCNTF were analyzed by PCR and the expression of hCNTF in retinal pigment epithelium (RPE) cells after Ad infection were examined by Western blotting, and the ability of the cell to secrete CNTF was measured with a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). the results indicated that Ad5-hCNTF contained the target gene, and were capable of infecting RPE celllines and produce the protein into the supernatant. Conclusion: We also have demonstrated that combined with different amount of replication-competent adenovirus Ad5 (E1+E3+) in vitro, the expression of hCNTF secreted by celllines after Ad infection was enhanced significantly, and the enhancement of gene expression was observed in a concentration- dependent manner, and it offers basis for further study of gene therapy by Ad.

Key words: adenovirus; ciliary neurotrophic factor; sectete; gene therapy

Chinese Library Classification: Q75 Q78 R373 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2011)05-808-04

前言

睫状神经营养因子（ciliary neurotrophic factor, CNTF）最初是从鸡眼组织中分离出来的，因能支持体外培养的鸡副交感睫状神经元的存活而得名[1]。现已明确 CNTF 对交感神经元、感觉神经元及运动神经元等均有作用，已被应用于肌萎缩性侧索硬化[2,3]、亨廷顿舞蹈病[4,5]等的基因治疗。此外，CNTF 还具有促进体外培养的视网膜神经细胞存活、增殖、分化的作用[6]。玻璃体内注射 CNTF 能够延长遗传性视网膜变性动物模型视网膜光感受器存活，减轻缺血再灌注时视网膜神经细胞凋亡、视神经横断伤后视网膜神经节细胞死亡，并促进神经节细胞突触再生等[7-9]。

在体外培养条件下加入 CNTF 可以使节细胞及光感受器的存活增加[10]；直接向玻璃体内注射 CNTF 或通过腺病毒、腺相关病毒导入 CNTF 编码基因时，可明显增加 rds/rds 及 opsin-/- 小鼠光感受器的存活率，增加视神经横断伤后节细胞

* 基金项目：国家自然科学基金杰出青年项目(No. 30428015)和上海市自然科学基金资助项目(09ZR1425000)

作者简介：李惠明（1973-），女，硕士生导师，副研究员，主要研究方向：病毒载体介导的基因治疗

△通讯作者：黄倩，电话：021-37798753，E-mail: qhuang@sjtu.edu.cn。

（收稿日期：2010-12-02 接受日期：2010-12-23）

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的存活率[11]。上述作用在反复应用 CNTF 时，或联合使用其他神经营养因子如 BDNF 时明显增强。此外，在玻璃体内或视神经断端应用 CNTF 还可促进轴突的再生[11]。而其他营养因子和生长因子如 BDNF、NT-3、NT4/5、bFGF 等均无此作用。因此，CNTF 在视神经损伤的治疗以及眼底疾病治疗方面有潜在的应用前景。本文构建了能分泌表达 CNTF 的重组腺病毒，检测分析其在视网膜色素上皮（retinal pigment epithelium, RPE）中的表达以及探讨提高分泌的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 腺病毒的构建及包装采用 stratagene 公司的 Adeasy 系统，穿梭质粒采用 pshuttle，骨架载体采用 pAdEasy-1；CNTF 表达质粒 pNUT-hCNTF-DT 由 Dr. Patrick Aebischer[3]赠送；限制性内切酶，T4 连接酶为 Takara 公司产品；Lipofectamine 2000 转染试剂盒购自 Invitrogen 公司，胎牛血清及新生牛血清，DMEM、Opti-MEM I 和 DMEM 培养基购自 Gibcol 公司。CNTF 的多克隆抗体（SC-13996）购自 San taCruz 公司, HRP 标记的山羊抗兔二抗（DC03L）Oncogene 公司产品，人 CNTF 定量 ELISA 检测试剂盒购自 R&D 公司。

1.1.2 细胞株及病毒 腺病毒包装细胞 AD-293 购自 Stratagen 公司，采用含 10%新生小牛血清的 DMEM 培养基培养。成人 RPE 细胞株 CRL-2302 购自美国 American Type and Culture Collection (ATCC)，是由意外死亡的 19 岁黑人男青年 RPE 原代培养自发产生的。其培养采用 DMEM/F12 培养基（Gibco），补充 10%胎牛血清（Fetal bovine serum，FBS，杭州四季青）、谷胺酰胺（Gibco）及青、链霉素。株 5 型血清型复制型腺病毒 Ad5 (E1+E3+)由本实验室构建并保存。

1.2 方法

1.2.1 全长 hCNTF 编码基因的亚克隆和鉴定 CNTF 表达质粒 pNUT-hCNTF-DT 由 Dr. Patrick Aebischer[3]赠送。以 CMV 为启动子调控 CNTF 表达，在 CNTF 编码基因前加入了免疫球蛋白信号肽，使 CNTF 能自行通过细胞膜分泌到细胞外。在 CNTF 编码基因内还有一段内含子顺序，以增强 CNTF 的表达。

该质粒经限制性内切酶 kpn1 和 sal1 酶切消化后插入腺病毒穿梭质粒 pshuttle 中得到重组质粒 pshuttle-hCNTF。再经限制性内切酶 pme1 酶切线性化后，CIAP 去磷酸化，然后利用 stratagene 公司的 Adeasy 腺病毒制备系统，将其与腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 共同转化大肠杆菌 BJ5183 感受态细胞，通过在大肠杆菌内的同源重组，筛选出含目的基因的重组型腺病毒质粒的菌株。

重组的大质粒分别采用 pac1 酶切鉴定以及 PCR 扩增进行鉴定。通过 PCR 扩增 CNTF 基因的第二外显子 DNA 以鉴定重组是否成功。

1.2.2 重组腺病毒的包装，筛选和扩增 获得大量该质粒后转染病毒包装细胞 AD-293，成功包装出一种血清 5 型增殖缺陷型腺病毒 Ad5-hCNTF。具体如下：

采用阳离子脂质体介导含 CNTF 基因的病毒基因组转染 AD-293 腺病毒包装细胞，在转染的前一天分别将 3× 10^5 细胞接种于 60 mm 直径的细胞培养盘中，次日细胞生长至 50%-60%融合。转染前先将 2μg 质粒 DNA 及 2μl 脂质体（Lipofectamine, GibcoBRL）分别加入 500μl 无血清的 Opti-Mem 培养基内，轻弹管壁混匀。再将质粒 DNA 与脂质体合并混匀，室温放置 30 分钟，使脂质体充分包裹质粒 DNA。用无血清培养基漂洗细胞一次，将脂质体 DNA 混合物加入培养盘内，使之均匀覆盖细胞，37 ℃培养 5－6 小时。然后加入含 20%胎牛血清的 DMEM 培养基，转染 4－6 天后待细胞长满培养盘时，将其消化并转移至 10cm 细胞培养盘中，继续培养 4－15 天即可观察到病毒病变斑出现，继续培养 1－2 天使病变斑扩大，1000g 离心 5min 收集细胞，将细胞上清转移至另外的离心管－80℃保存，细胞沉淀用少量上清液悬浮，于－80℃和 37℃反复冻融 3 次后，12,000 g 离心 10min，上清即为初次收获得的病毒液。然后用病毒空斑挑选法筛选稳定的病毒。

将通过上述方法获得的病毒感染汇合度约 90% 的 AD-293 细胞，刚开始感染时培养基体积为只覆盖细胞层为佳，37℃ 5% CO_2 培养条件下感染 24h 后，添加 DMEM 培养基，继续培养 24h。1000g 离心收集细胞。向细胞沉淀加入一定量的病毒裂解液，反复冻融 3 次使细胞裂解释放病毒，离心收集上清收获病毒。然后采用 PCR 及 Western blot 进行鉴定，将鉴定正确的病毒按照上述方法大量扩增并合并成一批分装备用。病毒滴度用 TCID50 法测定。

1.2.3 重组腺病毒的 PCR 鉴定和目的蛋白表达的检测 取 100μl 含病毒的 AD-293 细胞裂解液用病毒核酸抽提试剂盒抽提得到病毒 DNA 后，采用 5' 引物 cggaattcgtgaagcatcagggcctg 和 3' 引物 gcggtcgacctacattttcttgttgttagc，PCR 扩增 hCNTF 的第二个外显子 DNA 序列，鉴定重组病毒中是否含有目的基因片断。50 μl 的反应体系中分别加入 dNTP（10mM) 1 μl，5' 引物 (20 μM) 1μl，3' 引物 (20 μM) 1μl，10× buffer 5μl，template DNA 0.5μl，taq DNA 聚合酶 1μl，和 H_2O 41 μl，经 95℃ 45 "→ 60℃ 45"→ 72℃45" 30 个循环后，理论上目的 DNA 片段长 506 bp。

按照 10 MOI（感染复数）的剂量感染细胞，48 小时后先用 PBS 洗 2 遍，吸干 PBS 后的细胞经蛋白抽提液（Tris-HCl 5 mmol, pH 7.5, EDTA 5 mmol, NP-40 1%, PMSF 2 μmol）抽提细胞总蛋白，紫外分光光度计测定蛋白含量。采用 50 μg 总蛋白作 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳，电转移至硝酸纤维素膜上。用抗 CNTF 的单克隆抗体（Santa Cruz 公司）及相应的二抗孵育后，采用 ECL 试剂盒（GibcoBRL 公司）在暗室中作自显影。

另一种检测方法为 ELISA 检测感染病毒后细胞培养液中 CNTF 的含量，将 5× 10^4 AD-293 细胞接种到 24 孔板中，次日感染病毒后改换为仅含 2 %小牛血清的 DMEM 培养基，培养 24 小时后收集培养液。采用 R&D 公司的人 CNTF Elisa 检测试剂盒测定培养液中 CNTF 的含量，以感染空病毒 Ad-null 的 AD-293 细胞的培养液作为阴性对照。

1.3 复制型腺病毒提高非复制型腺病毒对细胞的感染 RPE 细胞株，为人视网膜色素上皮细胞株，是眼科实验研究中经常采用的细胞株，具有增生稳定、易于培养的优点。将 RPE 细胞按每孔 5× 10^4 接种在 24 孔细胞培养板中，置 37℃ 5% CO_2 培养箱中培养过夜。复制缺陷型腺病毒 10 moi Ad5-hCNTF 单独或联合不同剂量的复制型腺病毒 Ad5-(E1+E3+)感染 RPE 细胞，

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

感染后继续培养 24 小时后，更换为仅含 2%胎牛血清的培养基，24 小时后收集上清检测上清中 CNTF 的分泌情况，每一种条件重复 3 孔，采用 ELISA 方法检测经 Ad5-hCNTF 感染的细胞培养液上清中 CNTF 含量。

2 结果

2.1 重组质粒 pAd5-hCNTF 基因的酶切与 PCR 结果

CNTF 表达质粒 pNUT-hCNTF-DT 经限制性内切酶 kpn1 和 sal1 酶切消化后获得 2900bp 左右的片段，该片段插入腺病毒穿梭质粒 pshuttle 中得到重组质粒 pshuttle-hCNTF。该质粒经限制性内切酶 pme1 酶切线性化后，CIAP 去磷酸化，然后利用 stratagene 公司的 Adeasy 腺病毒制备系统，将其与腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 共同转化大肠杆菌 BJ5183，通过在大肠杆菌内的同源重组，筛选出含目的基因的重组型腺病毒质粒的菌株。

重组的大质粒分别采用 pac1 酶切鉴定以及通过 PCR 扩增 CNTF 基因的第二外显子 DNA 进行鉴定。阳性重组的克隆限制酶切后可得到 4.5 kb 左右的条带；经 PCR 鉴定出 506 bp 大小的产物，为 hCNTF 的第二外显子。

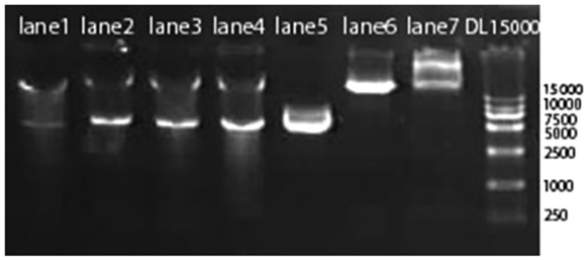

图 1 重组质粒 pAd5-hCNTF 酶切鉴定图谱

Fig .1 the map of recombinant plasmid pAd5-hCNTF digested with restriction enzymes pac I

Lane 1 and 2: clone 1 and 2 of pAd5-hCNTF digested with pac I; Lane 3 and 4: positive control recombinant plasmid digested with pac I; lane 5: control vector pNUT-hCNTF-DT; lane 6: uncut pAd5-hCNTF plasmids; lane7: uncut positive control plasmids; lane 8: DNA marker DL15000.

2.2 重组腺病毒 PCR 鉴定以及目的蛋白的表达

携带目的基因的重组穿梭质粒 pshuttle-hCNTF 和腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 在大肠杆菌内重组，获得大量该质粒后在脂质体 Lipofectamine 2000 辅助下转染 AD-293 包装细胞，于转染后第 5 天经胰酶消化，扩增至 10cm 培养盘中，继续培养一周，即观察到局部细胞形态出现变圆漂起，随之形成典型的彗星状病变，即空斑。待病变进一步扩大，大部分细胞变圆漂起时，收集细胞及其培养液，反复冻融三次后，作为原始病毒保存于－80℃。从中取出少量用病毒空斑法筛选三轮，获得稳定的毒株，成功包装出一种血清 5 型增殖缺陷型腺病毒 Ad5-hCNTF。我们从中选取 2 个毒株，分别命名为 Ad5-hCNTF1 和 Ad5-hCNTF2。毒株的快速鉴定采用 PCR 方法，采用病毒核酸提取试剂盒分别抽提病毒感染的细胞以及上清液得到病毒 DNA 作为模板，利用引物 PCR 扩增第二外显子，得到的产物大小约为 506bp，与以重组质粒 pAd5-hCNTF 以及阳性对照质粒 pNUT-hCNTF-DT 作为模板 PCR 扩增得到的片断大小完全一致（见图 2），证明包装出的病毒含有目的基因片断。将经鉴定确认无误的病毒扩增后用测定其病毒滴度 pfu。

采用 Western blot 方法检测重组腺病毒所携带的外源基因是否表达。AD-293 经 Ad5-hCNTF 感染后，作 SDS-PAGE 电泳，然后转移到硝酸纤维素膜上，与抗 CNTF 抗体杂交，感染对照空病毒的 AD-293 作为阴性对照。结果显示，感染携带目的基因病毒的 AD-293 细胞在 22.8 kDa 处检测到特异的 CNTF 蛋白条带，与目的蛋白大小一致。（见图 3）

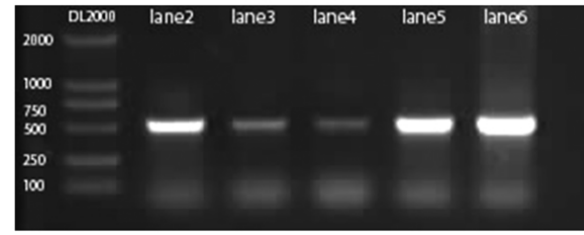

图 2 重组病毒 Ad5-hCNTF 以及重组质粒 pAd5-hCNTF 的 PCR 产物电泳图谱

Fig. 2 PCR analysis of recombinant plasmid pAd5-hCNTF and the packaged adenovirus Ad5-hCNTF.

Lane1: DNA marker DL2000; lane 2: PCR product of recombinant plasmid pAd5-hCNTF; lane 3 and 4: PCR product of supernant of infected AD-293 cellines; lane 5: PCR product of adenovirus Ad5-hCNTF infected AD-293 cellines; lane6: PCR product of positive control plasmid pNUT-hCNTF-DT.

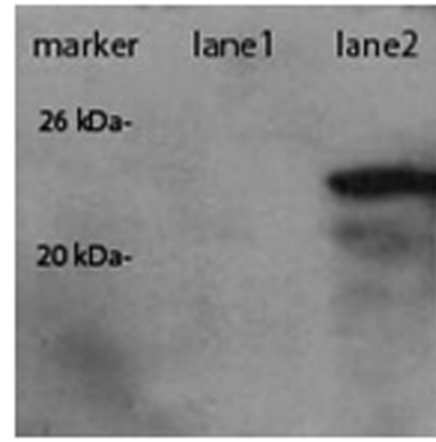

图 3 病毒空斑的形成以及包装的重组缺陷型腺病毒 Ad5-hCNTF 感染 AD-293 细胞后 Western blot 分析

Fig. 3 Western blotting analysis of hCNTF expression in AD-293 cellines infected with Ad5-hCNTF or Ad-null.

protein marker; Lane 1: AD-293 cell lines infected with Ad-null showed no signal; lane 2: Positive results are shown in Ad5-hCNTF infected AD-293 celllines with MW 22.8 KDA.

2.3 复制型腺病毒 Ad35 显著提高复制缺陷型腺病毒感染细胞后营养因子的分泌

复制缺陷型腺病毒 Ad5-hCNTF 10 moi 单独或联合不同较低剂量的复制型腺病毒 Ad5-(E1+E3+)感染 RPE 细胞，较低剂量的复制型腺病毒感染复数分别为 0、0.01、0.1、0.5、1、5moi 或更高，收集的 24 小时培养上清 Elisa 检测结果显示，细胞感染

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

病毒后产生的 CNTF 能自行分泌到细胞外，随着所加入的复制型腺病毒的剂量增加，细胞分泌到上清中的营养因子的浓度逐渐增加，与单独用 Ad5-hCNTF 病毒感染的细胞比较，分泌量最高可提高了 5.7 倍左右，24 小时培养液中分泌量可达 CNTF (2236 pg/ml)/5 × 10^4 细胞，且显示明显的剂量效应关系。但是若复制病毒超过一定的剂量，细胞发生明显的病变，导致细胞死亡，分泌到上清中的蛋白相应减少。

表 1 小剂量复制型腺病毒 Ad5-(E1+E3+)增强复制缺陷型腺病毒 Ad5-hCNTF(10 MOI)感染 RPE 细胞后目的 CNTF 蛋白的分泌(培养基中 hCNTF 的分泌量)

Table 1 improved secretion of hCNTF enhanced by Ad5-(E1+E3+)

Group		CNTF (ng/ml)
Control group	Ad5-(E1+E3+)0MOI	0.397
Ad5-(E1+E3+)	(0.01MOI)	1.166
Ad5-(E1+E3+)	(0.1MOI)	1.393
Ad5-(E1+E3+)	(0.5MOI)	1.913
Ad5-(E1+E3+)	(1MOI)	2.236
Ad5-(E1+E3+)	(5MOI)	1.484

3 讨论

视神经损伤的治疗一直是眼科及神经科十分关注并迫切需要解决的问题。近年来大量实验研究证明神经营养因子如睫状神经营养因子 (ciliary neurotrophic factor，CNTF) [2,3]对体内外神经细胞有一定的保护作用，Aebischer P 曾报道采用磷酸钙沉淀方法将 CNTF 表达质粒转入小仓鼠肾细胞 (baby hamster kidney, BHK cellline)，通过 MTX 筛选获得了高水平表达 CNTF 的细胞株，移植到肌萎缩性侧索硬化小鼠脑室内或椎管内，或亨廷顿舞蹈病灵长类猴 (Macaca fascicularis) 动物模型脑室内，接受移植的动物脑皮层神经元变性明显减缓，认知能力明显改善[5]。反复多次玻璃体内注射 CNTF 或者利用病毒载体介导 CNTF 基因转移能够延长遗传性视网膜变性动物模型视网膜光感受器存活[7,8,12]，减轻缺血再灌注时视网膜神经细胞凋亡。视神经横断伤后局部应用 CNTF 或移植表达 CNTF 的细胞能明显提高视网膜神经节细胞存活率，并促进突触再生等[9,11,13]。表明 CNTF 具有广泛的保护神经细胞的作用，有着广阔的临床应用前景[17-19]。

鉴于 CNTF 纯品价格昂贵，在体外条件下也很不稳定，因此限制了 CNTF 在临床的应用。在基因治疗研究中，腺病毒载体应用较多，主要是因为其具有宿主范围广，能够感染不同组织学起源的细胞，基因转移效率高，在体内能够介导外源基因高水平表达等优点。为了达到经济、实用、高效的目的，我们通过基因技术包装了高水平分泌表达 CNTF 的复制缺陷型腺病毒，拟通过该病毒感染细胞，能够局部分泌细胞因子，从而达到其治疗视网膜变性或视神经损伤等疾病的目的，由于病毒作为载体方便储存、运输等优点，因此，不再受分离纯化或储存转运等各种体内外因素的影响，可以较大限度地发挥 CNTF 的生物学效应，为视网膜变性等疾病的治疗提供新的手段和方法。我们构建的重组复制缺陷型腺病毒 Ad5-CNTF，经 Western blot 及 Elisa 检测证实感染细胞后能够表达目的蛋白 hCNTF，该蛋白可分泌到上清中，为眼底疾病或神经损伤的治疗提供了辅助手段。

过去出于安全性的考虑，基因治疗大多采用复制缺陷型腺病毒，随着腺病毒的大量使用，以及人们对腺病毒生活周期等的了解，目前人们重新考虑使用更强效的条件复制型腺病毒 (replication-competent virus)来治疗一些疾病。鉴于复制型腺病毒在复制过程中所产生的 E1A 或 E1B 可提供给非复制型腺病毒，非复制型腺病毒可利用复制型腺病毒所产生的 E1A 或 E1B 产生新的腺病毒载体。因此将复制型腺病毒与非复制型腺病毒混合感染细胞，可以使非复制型腺病毒也在细胞内复制，复制的效率主要取决于复制型腺病毒所提供的 E1A 或 E1B 的量。非复制型腺病毒的定位也将限制在复制型腺病毒所在的范围内[14-16]。利用这一特点，我们利用了较低剂量的复制型腺病毒和携带治疗基因的复制缺陷型腺病毒感染视网膜色素上皮细胞，提高其对细胞的感染效率以及治疗基因的表达分泌。在体外实验的基础上，我们可进一步研究其在体内的增强作用，为疾病的治疗提供实验依据。

参考文献(References)

[1] Manthorpe M, Skaper S, Adler R, et al. Cholinergic neurotrophic factors: fractionation properties of an extract from selected chick embryonic eye tissues[J]. J Neuro chem., 1980, 34(1): 69-75

[2] Aebischer P, Schluep M, Deglon N, et al. Intrathecal delivery of CNTF using encapsulated genetically modified xenogeneic cells in amyotrophic lateral sclerosis patients [J]. Nature Med, 1996, 2: 696-699

[3] Mittoux V, Joseph JM, Conde F, et al. Restoration of cognitive and motor functions by ciliary neurotrophic factor in a primate model of Huntington s disease[J]. Hum Gene Ther, 2000,11:1177-1187

[4] Bachoud-Levi AC, Delgon N, Nguyen JP, et al. Neuroprotective gene therapy for Huntington s disease using a polymer encapsulated BHK cell line engineered to secrete human CNTF [J]. Hum Gene Ther, 2000, 11(12):1723-1729

[5] Chong NH, Alexander RA, Waters L, et al. Repeated injections of a ciliary neurotrophic factor analogue leading to long-term photoreceptor survival in hereditary retinal degeneration [J]. Inves Cphthalmol Vis Sci,1999, 40:1298-1305

(下转第 836 页)

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

用能特异性地与细胞内游离 Ca^{2+} 结合的荧光染料，依据不同生理、病理状态下 Ca^{2+} 浓度差异所造成的荧光强度改变来测算细胞内 Ca^{2+} 含量。常用的 Ca^{2+} 荧光指示剂有 indo-1、quin-2、Fura-2、Fluo-3、Fluo-4 等。本实验采用 HPMVEC 为研究对象，采用荧光法以 Fluo-3 为特异性荧光染料，由于该染料荧光选择性强，自身不产生荧光而是进入细胞内与游离钙结合后才发出荧光，不需紫外光激发等，所以能有效地避免非特异性染色，避免紫外光对 HPMVEC 活细胞样品的损伤，具有细胞损伤小、敏感性高、不易淬灭、测量不易受干扰等优点，因而能更精准反应在缺氧条件下 HPMVEC 内 Ca^{2+} 浓度的变化。

LSCM 是目前进行钙研究的重要手段之一[6-8]。本实验将 HPMVEC 分别进行不同时间的缺氧培养，并设置 1 个空白对照组，应用荧光染料 Fluo-3 染色后经 LSCM 技术连续动态观察各组 HPMVEC 内 Ca^{2+} 浓度水平及随时间推移的变化。与传统的荧光显微镜相比，LSCM 具有以下独特优势：①有较高的分辨率，观察细胞内 Ca^{2+} 浓度更准确；可尽量避免人为因素导致的偏差，使测量结果更客观；②利用 Fluo-3 荧光探针可以测量 Ca^{2+} 在活细胞内的浓度及变化；③一般来说，电生理记录装置加摄像技术检测细胞内离子量变化的速度相对较快，但其图像本身的价值较低，而 LSCM 可以提供亚细胞结构中 Ca^{2+} 浓度动态变化更好的图像，对于研究 Ca^{2+} 细胞内动力学有突出意义。④可以利用激光点扫描成像，形成所谓的“光学切片”，沿纵轴上移动标本进行多个光学切片的叠加后，形成组织或细胞中荧光标记结构的总体图像。因此，LSCM 可以观察到更立体、更全面的样本状态，如较重要的切片和一些表面不平的标本。⑤可以进行三维图像重建和标记强度的半定量分析，使图像和结构数据化，利于实验分析和研究。

参考文献（References）

[1] Hen'era JA,Arevalo-Herrera M, Shahabuddin AK,et al. Calci um and conjugated linoleic acid reduces pregnancy-induced hypertension and decreases intraeellular calcium in lymphocytes [J]. Am J Hypertens, 2006,19(4):381

[2] 古雅丽，石四箴.细胞内钙离子分析[J].同济大学学报（医学版），2001,22(6)：54-56
Gu Ya-li,Shi Si-zhen. Analysis of intraceellar calcium [J].Journal Of Tongji University (Medical Science) ,2001,22(6):54-56

[3] Katz E, Verbitaky M, Rothlin C, et a1. High calcium permeability and calcium block of the alpha9 nicotinic acetylcholine receptor [J]. Hear Res,2000,l4l:ll7-l28

[4] Albert AP, Liu M, Large WA. Dual effect of calmodulin on store-operated Ca^{2+} permeable cation channels in rabbit portal vein myoeytes[J]. Br J Pharmacol,2006,148(7):1001-l011

[5] Leiba A, Vald A, Peleg E,et a1. Does dietary recall adequately assess sodium,potassium, and calcium intake in hypertensive patients [J]. Nutrition, 2005,21(4):462

[6] 韦国锋，程金生，徐群清，等.用激光扫描共聚焦显微镜观察仙人掌提取物镇痛作用对小鼠脑细胞内钙离子的影响[J].应用激光，2006,26(6)：460-461
Wei Guo-feng, Cheng Jin-sheng, Xu Qun-qing, et a1. LSCM technology to investigate the influence of the Abirritation of Opuntia Ailleii Haw extractive on the concentration of [Ca^{2+}] in mouse brain cell[J].APPLIED LASER ,2006,26(6):460-461

[7] Chen JT ,Chen RM ,Lin YL ,et a1.Confocal laser scanning microscopy:an overview of principle and practice in biomedical research[J].Acta Anaesthesiol Taiwan ,2004 ,42(1):33-40

[8] Amos WB ,White JG. How the confocal laser scanning microscope entered biological research[J]. Biol Cell ,2003, 95 (6) :335-342

（上接第 811 页）

[6] Liang FQ, Dejneka NS, Cohen DR, et al. AAV-mediated delivery of ciliary neurotrophic factor prolongs photoreceptor survival in the rhodopsin knockout mouse[J]. Mol Ther,2001, 3 (2);241-248

[7] Cui Q, Lu Q, So KF, et al. CNTF, not other trophic factors, promotes axonal regeneration of axotomized retinal ganglion cells in adult hamsters[J]. Inves Cphthalmol Vis Sci, 1999,40:760-766

[8] Loh NK, Woerly S, Bunt SM, et al. The regrowth of axons within tissue defects in the CNS is promoted by implanted hydrogel matrices that contain BDNF and CNTF producing fibroblasts [J]. Exp Neurol, 2001,170(1):72-84

[9] Manthorpe M, Skaper SD, Williams LR, et al. Purification of adult rat sciatic nerve ciliary neurotrophic factor [J]. Brain Res, 1986,367: 282-286

[10] Aebischer P, Pochon NA, Heyd B, et al. Gene therapy for amyotrophic lateral sclerosis (ALS) using a polymer encapsulated xenogeneic cell line engineered to secrete Hcntf [J]. Hum Gene Ther,1996, 7: 851-860

[11] Chun MH, Ju WK, Kim KY, et al. Upregulation of ciliary neurotrophic factor in reactive Muller cells in the rat retina following optic nerve transaction[J]. Brain Res,2000, 23, 868:358-362

[12] Jo SA, Wang E, Benowitz LI. Ciliary neurotrophic factor is an axogenesis factor for retinal ganglion cells[J]. Neuroscience,1999,89: 579-591

[13] Cui Q, Harvey AR. CNTF promotes the regrowth of retinal ganglion cell axons into murine peripheral nerve grafts [J]. Neuroreport,2000, 11 : 3999-4002

[14] McConnell MJ, Imperiale MJ.Biology of adenovirus and its use as a vector for gene therapy [J]. Human Gene Therapy, 2004,15 (11): 1022-1033

[15] Mizuguchi H, Hayakawa T. Targeted adenovirus vectors [J]. Human Gene Therapy,2004, 15(11):1034-1044

[16] Kim M, Zinn KR, Barnett BG, Sumerel LA,et.al. The thera peutic efficacy of adenoviral vectors for cancer gene therapy is limited by a low level of primary adenovirus receptors on tumour cells [J]. European Journal of Cancer Prevention,2002, 38(14):1917-1926

[17] Harvey AR, Hellstr?m M, Rodger J.Gene therapy and transplantation in the retinofugal pathway[J]. Prog Brain Res,2009,175:151-161

[18] McGill TJ, Prusky GT, Douglas RM, et al., Intraocular CNTF reduces vision in normal rats in a dose-dependent manner [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2007, 48(12):5756-5766

[19] MacLaren RE, Buch PK, Smith AJ, et al. CNTF gene transfer protects ganglion cells in rat retinae undergoing focal injury and branch vessel occlusion[J]. Exp Eye Res,2006, 83(5):1118-1127

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net