

# 心肌 $\alpha$ 肌球蛋白重链启动子驱动的 CREG 蛋白表达载体的构建及鉴定\*

栾波<sup>1</sup> 李杰<sup>1,2</sup> 段岩<sup>1</sup> 张娜<sup>1</sup> 霍煜<sup>1</sup> 梁卓<sup>1</sup> 闫承慧<sup>1</sup> 韩雅玲<sup>1△</sup>

(1 沈阳军区总院全军心血管病研究所内科 辽宁 沈阳 110840 2 第四军医大学西京医院内科 陕西 西安 710032)

**摘要** 目的 构建心肌特异性  $\alpha$ -肌球蛋白重链( $\alpha$ -myosin heavy chain  $\alpha$ -MHC)启动子启动 E1A 基因阻遏子(cellular repressor of E1A-stimulated genes, CREG)和增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)融合的真核表达载体。绿色荧光蛋白作为报告基因,方便在心肌细胞中直接观察 CREG 蛋白的表达,为心肌特异性转 CREG 基因动物模型制备提供载体。方法:用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切 pcDNA3.1 myc-His/hCREG 质粒得到 CREG 基因,亚克隆入增强绿色荧光蛋白表达质粒 pEGFP-N1 中,构建 pCREG-EGFP-N1,根据 Genebank 中公布的  $\alpha$ -MHC 基因的启动子序列,人工合成 pUC57- $\alpha$ -MHC 启动子基因序列,经 *Ase*I 和 *Nhe*I 双酶切得到启动子  $\alpha$ -MHC,亚克隆入 pCREG-EGFP-N1 中替代原 CMV 启动子,构建 p $\alpha$ -MHC-CREG-EGFP-N1,测序鉴定。用脂质体法将该质粒转染体外培养的小鼠原代心肌细胞,荧光显微镜下观测绿色荧光蛋白的表达;Western blot 检测 CREG 蛋白的表达。结果 成功构建 p $\alpha$ -MHC-CREG-EGFP-N1 质粒,酶切及测序结果正确,成功转染入原代培养小鼠心肌细胞,在荧光显微镜下可见绿色荧光蛋白的表达,Western blot 检测到 CREG 蛋白的表达。结论 重组质粒 p $\alpha$ -MHC-CREG-EGFP-N1 体外转染入原代培养小鼠心肌细胞后,目的基因能够在心肌细胞中有效表达,检测方法简便可靠,为下一步建立心肌细胞特异性表达 CREG 的过表达转基因小鼠,深入探讨 CREG 在心肌疾病发生中的生物学功能研究奠定了基础。

**关键词**  $\alpha$ -MHC;启动子;CREG;质粒构建;转染;小鼠原代心肌细胞

中图分类号:Q95-3,R54,Q75,Q78 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)19-3610-05

## Construction and Identification of $\alpha$ -MHC Promoter-driven CREG Eukaryotic Expressive Plasmid\*

LUAN Bo<sup>1</sup>, LI Jie<sup>1,2</sup>, DUAN Yan<sup>1</sup>, ZHANG Na<sup>1</sup>, HUO Yu<sup>1</sup>, LIANG Zhuo<sup>1</sup>, YAN Cheng-hui<sup>1</sup>, HAN Ya-ling<sup>1△</sup>

(1 Cardiovascular Research Institute and Department of Cardiology, General Hospital of Shenyang Military Area Command, 83 Wenhua Road, 110840, Shenyang, Liaoning, China; 2 Department of Cardiology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, 17 Changle Road, 710032, Xi'an, Shanxi, China)

**ABSTRACT Objective:** To construct a eukaryotic expressive plasmid for cellular repressor of E1A-stimulated genes (CREG) driven by a cardiac specific promoter  $\alpha$ -MHC and reported by green fluorescent protein, and then to observe its expression in mouse primary cardiomyocytes in vitro. **Methods:** CREG fragment was released from pcDNA3.1 myc-His/hCREG plasmid by *Bam*H I and *Eco*R I digestion enzymes, and then was subcloned into pEGFP-N1 plasmid to construct pCREG-EGFP-N1 plasmid. The  $\alpha$ -MHC promoter sequence was synthesized according to Genebank, and was attached with *Ase*I and *Nhe*I restrictive endonuclease sites at each side. The  $\alpha$ -MHC promoter sequence was released from pUC57- $\alpha$ -MHC plasmid by *Ase*I and *Nhe*I digestion enzyme, and then replace cytomegalo virus (CMV) promoter of pCREG-EGFP-N1 plasmid to construct p $\alpha$ -MHC-EGFP-N1 plasmid. Then, the recombinant p $\alpha$ -MHC-CREG-EGFP-N1 plasmid was then transfected into mouse primary cardiomyocytes by liposome. The green fluorescent protein expression was observed by fluorescent microscopy and CREG expression was detected by Western blot. **Results:** p $\alpha$ -MHC-CREG-EGFP-N1 was identified by enzyme digestion and sequencing analysis. The results showed that length of the target genes which were inserted into the recombinant plasmid was correct. The strong expression of green fluorescent protein was observed by fluorescent microscopy, and the expression of CREG protein was detected by Western blot. These results confirmed that mouse primary cardiomyocytes were successfully transfected with plasmid. **Conclusion:** The p $\alpha$ -MHC-CREG-EGFP-N1 eukaryotic expressive plasmid was successfully constructed and the recombinant vector provides a powerful approach in investigating the function and regulation of CREG in cardiovascular diseases development and also in producing mouse cardiomyocyte specific hyper-expressive CREG transgenic mice.

**Key words:**  $\alpha$ -MHC; Promoter; CREG; Plasmid Construction; Transfection; Mouse Primary Cardiomyocyte

**Chinese Library Classification(CLC):** Q95-3, R54, Q75, Q78 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2011)19-3610-05

△通讯作者:韩雅玲,教授,博士生导师,沈阳军区总院全军心血管病研究所, Tel: +86 24 23922184; fax: +86 24 23911006.

E-mail: hanyaling029@163.com

(收稿日期 2011-03-20 接受日期 2011-04-13)

## 前言

E1A 激活基因阻遏子 (cellular repressor of E1A-stimulated genes, CREG) 是一个转录调控相关因子。CREG 基因可与外源性腺病毒 E1A 蛋白及哺乳动物体内转录因子 E2F 家族蛋白竞争性地结合在靶基因的启动子区, 从而阻遏 E1A 蛋白和 E2F 对靶基因的转录, 而 E1A、E2F 均具有促进细胞增殖的作用, 所以 CREG 可能通过与 E1A、E2F 竞争性抑制作用而起到促进细胞分化、抑制细胞增殖的作用<sup>[1]</sup>。本实验室前期研究发现 CREG 蛋白在小鼠胚胎 E5.5 天即开始表达, 随后相继表达于 E9.5 天的 EC、血管中层的 SMC 和周细胞中, 并持续至血管成熟<sup>[2]</sup>。

心肌细胞特异性表达  $\alpha$ -肌球蛋白重链 ( $\alpha$ -myosin heavy chain,  $\alpha$ -MHC)、 $\alpha$ -tropomyosin、MLC-2v、心房利钠因子等。用  $\alpha$ -MHC 启动子驱动的新霉素选择基因的表达载体, 将其转染到 ESC 中, 分化获得了纯化的心肌细胞<sup>[3]</sup>。本实验拟构建 p $\alpha$ -MHC-CREG-EGFP-N1 真核表达质粒, 为下一步建立小鼠心肌细胞特异的 CREG 过表达转基因小鼠、深入探讨 CREG 在心脏疾病发生中的机制奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

限制性内切酶 *Ase*I 和 *Nhe*I (英国 Biolabs 公司); T4 DNA 连接酶及限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Eco*RI (日本 Takara 公司); 质粒提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒 (美国 Promega 公司); pEGFP-N1 (美国 Clontech 公司); 真核表达载体 pcDNA3.1 myc-His (美国 Invitrogen 公司) pcDNA3.1 myc-His/hCREG (本实验室孙鸣宇博士构建); 转染试剂 Lipofectamine 2000 (美国 Invitrogen 公司); DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司); 新生牛血清购自四季青生物材料有限公司; 山羊抗小鼠 CREG 和  $\beta$ -actin 单克隆抗体、兔抗山羊 HRP 标记二抗 (美国 Santa Cruz 公司); DM2000 (北京康为世纪生物公司); 大肠杆菌 (*Escherichia coli* *E.coli*) DH5 $\alpha$  菌种 (本实验室保存)。

### 1.2 方法

1.2.1 pUC57- $\alpha$ -MHC 质粒构建及  $\alpha$ -MHC 片段获取 从 Genebank 中查询到  $\alpha$ -MHC 启动子序列, 从 -1198 到 +1 共 1200 bp。在  $\alpha$ -MHC 启动子两端分别加入 *Ase*I 和 *Nhe*I 酶切位点以及保护碱基, 由上海生工生物公司合成 pUC57- $\alpha$ -MHC 质粒。用 *Ase*I 和 *Nhe*I 双酶切 pUC57- $\alpha$ -MHC 质粒, 完整切下  $\alpha$ -MHC 启动子片段, 37℃ 温育 4 h 后, 1% 琼脂糖电泳, 凝胶回收试剂盒回收约 1200 bp 的目的片段。

1.2.2 pcDNA3.1 myc-His/hCREG 质粒双酶切及 CREG 片段获取 用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切 pcDNA3.1 myc-His/hCREG 质粒, 完整切下 CREG 片段, 37℃ 温育 4 h 后, 1% 琼脂糖电泳, 凝胶回收试剂盒回收约 670 bp 的 CREG 片段。

1.2.3 pCREG-EGFP-N1 质粒构建 用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切 pEGFP-N1 质粒使其线性化。37℃ 温育 12 h 后凝胶回收, 在 T4 DNA 连接酶作用下与 CREG 片段连接, 16℃ 连接过夜。连接产物转化感受态细菌 DH5 $\alpha$ , 在含有卡那霉素的 LB 平板上筛选克隆。挑取阳性克隆, 摇菌扩增, DNA 质粒提取试剂盒提取质粒并进行双酶切鉴定。

1.2.4 p $\alpha$ -MHC-CREG-EGFP-N1 质粒构建 用 *Ase*I 和 *Nhe*I 双酶切 pCREG-EGFP-N1 质粒, 37℃ 温育 4 h 后, 1% 琼脂糖电泳确认切除 CMV 启动子后, 凝胶回收试剂盒回收线性质粒。在 T4 DNA 连接酶作用下与  $\alpha$ -MHC 片段连接, 16℃ 连接过夜。连接产物转化感受态细菌 DH5 $\alpha$ , 在含有卡那霉素的 LB 平板上筛选克隆。挑取阳性克隆, 摇菌扩增, DNA 质粒提取试剂盒提取质粒并进行双酶切鉴定。

1.2.5 小鼠原代心肌细胞的分离培养 取 10 只新生 1 d 的昆明小鼠, 无菌条件下取出心脏剪碎后, 用 PBS 漂洗 3 次去除血细胞和死细胞, 加入 0.125% 胰酶 + 0.02% EDTA 消化液, 37℃ 水浴消化 10 min, 静置后吸取上清用含有 10% 新生牛血清 DMEM 终止消化。未消化的组织块, 再加入胰酶溶液消化, 重复几次, 直至组织块消化完全。将收集的消化上清用 200 目筛网过滤后, 2000 r/min 离心 5 min, 弃上清, PBS 漂洗 1 次后, 用含 10% FBS 的 DMEM 重悬细胞, 接种于 100 mm 组织培养皿中, 于 37℃, 5% CO<sub>2</sub>, 饱和湿度条件下培养 40 min 去除成纤维细胞。再次收集未贴壁的心肌细胞至另一培养皿中继续培养。

1.2.6 细胞转染 应用 Lipofectamine 2000 试剂将 p $\alpha$ -MHC-CREG-EGFP-N1 质粒转染至小鼠心肌细胞中。2 × 10<sup>5</sup> 个细胞 / 孔接种 6 孔板中, 每孔加入 2 mL 含血清、不含抗生素的正常培养基, 24 h 后细胞生长至 50%-60% 融合时转染。转染前每孔细胞换为 2 mL 不含血清不含抗生素的 DMEM 培养基。用 250  $\mu$ l 无血清培养基 (DMEM 培养基) 稀释 4  $\mu$ g DNA (即 CREG 真核表达质粒), 250  $\mu$ l DMEM 培养基稀释 10  $\mu$ l Lipofectamine 2000 试剂, 孵育 5 min 后与稀释的 DNA 混合, 室温保温 20 min。直接将复合物加入到细胞培养基中, 摇动培养板, 轻轻混匀。37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养 24 h 后, 弃掉培养基, 重新加入 2 mL 含 10% FBS 及抗生素的 DMEM 培养基继续培养。

1.2.7 Western blot 检测 CREG 蛋白的表达 细胞转染 72 h 后裂解, 将裂解产物与上样缓冲液混合煮沸 5 min, 12000 r/min, 离心 3 min 后取上清进行 10% 的 SDS-PAGE 电泳, 半干式电转至硝酸纤维素膜上。TBST (20 mmol/L Tris-HCl (pH 7.6), 137 mmol/L NaCl 和 0.1% Tween20) 配制的 5% (w/v) 脱脂奶粉室温封 2 h, 加入山羊抗小鼠 CREG- 抗于 4℃ 过夜反应, TBST 洗涤 3 次, 每次 15 min 后, 加入 HRP 标记的兔抗山羊二抗, 室温作用 2 h; 彻底洗涤后, 用 ECL 于暗室发光显影; 用 Image-Pro Plus 图像分析软件测量各组条带 IOD 值。

1.2.8 荧光显微镜观察荧光蛋白的表达 细胞转染 48 h 后, 用荧光显微镜 (Leica DM3000) 观察转染质粒后小鼠心肌细胞中绿色荧光蛋白的表达情况, 显微数码相机拍照。

1.2.9 统计学分析 实验数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 组间比较用非配对 t 检验, P < 0.05 为差异有显著性意义。

## 2 结果

### 2.1 目的片段 CREG 和线性 pEGFP-N1 的获取和鉴定

经 *Bam*HI 和 *Eco*RI 分别双酶切 pcDNA3.1 myc-His/hCREG 质粒和 pEGFP-N1 质粒, 分别得到 CREG 目的片段和线性化 pEGFP-N1 片段, 1% 的琼脂糖电泳可见到 670 bp 和 4800 bp 左右的条带, 与 CREG 和线性 pEGFP-N1 长度相符 (图 1)。

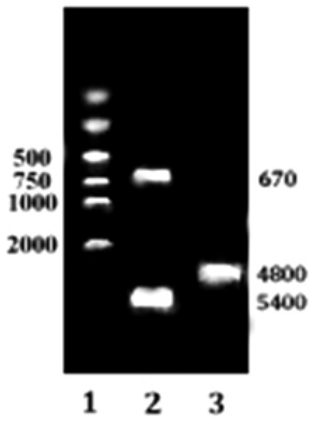


图 1 pcDNA3.1 myc-His/hCREG 和 pEGFP-N1 双酶切鉴定  
Fig.1 Characterization of pcDNA3.1 myc-His/hCREG and pEGFP-N1 by  
restriction endonuclease analysis  
1: DM2000 marker; 2: pcDNA3.1 myc-His/hCREG (*Bam*HI and *Eco*R I);  
3: pEGFP-N1 (*Bam*HI and *Eco*R I).

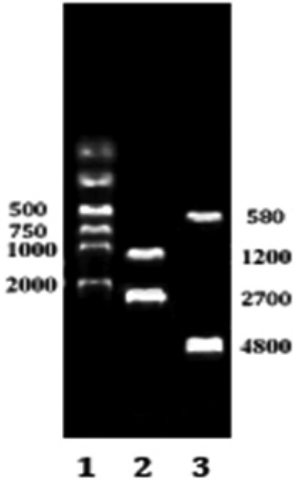


图 3 pUC57-α-MHC 和 pCREG-EGFP-N1 双酶切鉴定  
Fig. 3 Characterization of pUC57-α-MHC and pCREG-EGFP-N1 by  
restrictive endonuclease analysis  
1: DM2000; 2: pUC57-α-MHC (*Ase* I and *Nhe* I); 3: pCREG-EGFP-N1  
(*Ase* I and *Nhe* I)

2.2 真核表达重组质粒 pCREG-EGFP-N1 的构建及鉴定  
将 CREG 片段和线性化 pEGFP-N1 以 T4 DNA 连接酶进行连接。连接产物转化感受态细菌 DH5α 在含有卡那霉素的 LB 平板上筛选克隆。挑取阳性克隆 摇菌扩增 提取质粒。并进行双酶切鉴定 ,1%的琼脂糖电泳可见到 670 bp 和 4800 bp 左右的条带 ,与 CREG 和线性 pEGFP-N1 长度相符(图 2)。

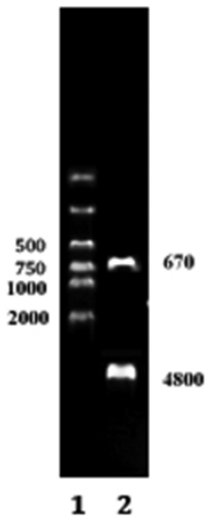


图 2 pCREG-EGFP-N1 双酶切鉴定  
Fig. 2 Characterization of pCREG-EGFP-N1 by restrictive endonuclease  
analysis  
1: DM2000 marker; 2: pCREG-EGFP-N1 (*Bam*HI and *Eco*R I)

2.3 启动子片段 α-MHC 和线性 pCREG-EGFP-N1 的获取和鉴定  
经 *Ase* I 和 *Nhe* I 双酶切 pUC57-α-MHC 和 pCREG-EGFP-N1 质粒 , 分别得到 α-MHC 目的片段和去除 CMV 启动子的 pCREG-EGFP-N1 线性片段 ,1%的琼脂糖电泳可见到 1200 bp 和 580 bp、4800 bp 左右的条带 ,与 α-MHC 和 CMV 启动子、切除 CMV 的线性 pEGFP-N1 长度相符(图 3)。

2.4 真核表达重组质粒 pα-MHC-CREG-EGFP-N1 的构建及鉴定  
将 α-MHC 片段和线性化 pCREG-EGFP-N1 以 T4 DNA 连接酶进行连接。连接产物转化感受态细菌 DH5α 在含有卡那霉素的 LB 平板上筛选克隆。挑取阳性克隆 摇菌扩增 提取质粒。分别用 *Ase* I 和 *Nhe* I、*Bam*HI 和 *Eco*R I 双酶切鉴定 ,1%的琼脂糖电泳可见到 1200 bp、670 bp 和 4800 bp 左右的条带 ,与 α-MHC、CREG 和 切除 CMV 启动子的线性 pCREG-EGFP-N1 长度相符(图 4)。

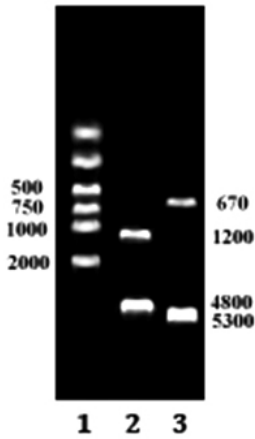


图 4 pα-MHC-CREG-EGFP-N1 双酶切鉴定  
Fig. 4 Characterization of pα-MHC-CREG-EGFP-N1 by restrictive  
endonuclease analysis  
1: DM2000; 2: *Ase* I and *Nhe* I 双酶切质粒 pα-MHC-CREG-EGFP-N1;  
3: *Bam*HI and *Eco*R I 双酶切质粒 pα-MHC-CREG-EGFP-N1  
1: DM2000 marker; 2: pα-MHC-CREG-EGFP-N1(*Ase* I and *Nhe* I);  
3: pα-MHC-CREG-EGFP-N1(*Bam*HI and *Eco*R I)

2.4 pα-MHC-CREG-EGFP-N1 在细胞内的表达  
利用 Western blot 技术 , 以 β-actin 为内参 , 检测 pα-MHC-CREG-EGFP-N1 质粒在小鼠原代心肌细胞中 CREG

蛋白的表达量。正常条件下,小鼠心肌细胞有 CREG 表达,但在转染 p $\alpha$ -MHC-CREG-EGFP-N1 后 CREG 表达明显增高(图 5)。

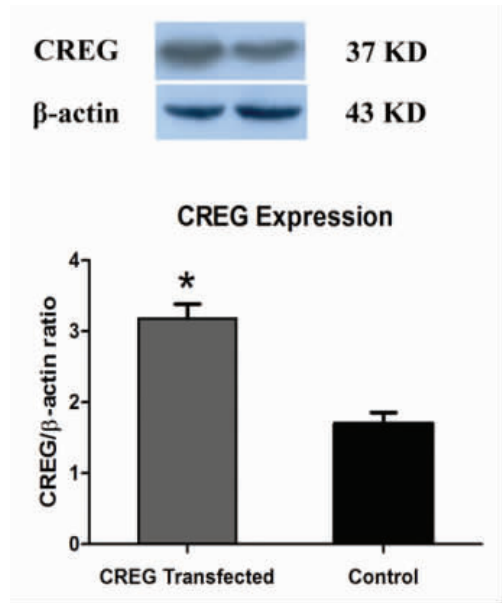


图 5 Western blot 检测 p $\alpha$ -MHC-CREG-EGFP-N1 在小鼠原代心肌细胞中 CREG 蛋白的表达

Fig. 5 Expression of CREG protein in mouse primary cardiomyocytes transfected with p $\alpha$ -MHC-CREG-EGFP-N1 (Western blot).  
1 转染 p $\alpha$ -MHC-CREG-EGFP-N1 质粒的小鼠心肌细胞 2 未转染质粒的对照小鼠心肌细胞 \*P<0.05 vs 对照  
1: mouse primary cardiomyocytes transfected with p $\alpha$ -MHC-CREG-EGFP-N1; 2: mouse primary cardiomyocytes as control.  
\*P<0.05 vs control group.

2.5 p $\alpha$ -MHC-CREG-EGFP-N1 转染小鼠心肌细胞后在荧光显微镜下观察

在 60 mm 培养皿上接种小鼠原代心肌细胞,脂质体转染 p $\alpha$ -MHC-CREG-EGFP-N1 重组质粒,转染 48 h 后,部分心肌细胞可见绿色荧光蛋白的表达(图 6)。

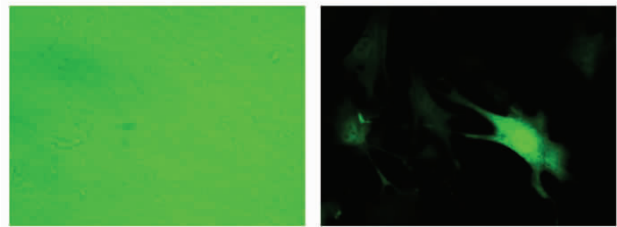


图 6 重组质粒 p $\alpha$ -MHC-CREG-EGFP-N1 转染小鼠原代心肌细胞后相差显微镜和荧光显微镜照相(200 $\times$ )

Fig.6 Phase contrast and fluorescence photos of mouse primary cardiomyocytes transfected with p $\alpha$ -MHC-CREG-EGFP-N1(200 $\times$ )

3 讨论

肌球蛋白是心肌肌小节粗肌丝的主要成分,由重链(myosin heavy chain, MHC)和轻链(myosin light chain, MLC)组

成。在心肌中,MHC 有两种亚型,即  $\alpha$ -MHC 和  $\beta$ -MHC。 $\beta$ -MHC 是胚胎发生和发育过程中心肌中存在的主要亚型,而  $\alpha$ -MHC 在小鼠出生后的表达水平增加,是成年小鼠心肌中的主要形式<sup>[4]</sup>。Gulick J 等分离出小鼠心肌 MHC 基因,并鉴定了  $\alpha$ -MHC 基因的启动子区, $\alpha$ -MHC 启动子能够在心肌中特异性驱动 CAT 基因的表达,而非心肌组织不表达<sup>[5]</sup>。其他研究所采用的  $\alpha$ -MHC 启动子序列包括从 -5446 bp 到 -4 bp 的完整区域,启动子区域总长度达到 5442 bp,不利于质粒的构建和目的基因的表达,因此本研究根据文献报道保留了对心肌特异表达必需的 Trans、MEF-1、MEF-2、MCAT、CARg 元件,构建了 1200 bp 的  $\alpha$ -MHC 启动子序列<sup>[6]</sup>。将构建好的  $\alpha$ -MHC-CREG-EGFP 表达载体通过脂质体法转染原代小鼠心肌细胞,转染 72 h 后,在荧光显微镜下可见心肌细胞发出绿色荧光,而对成纤维细胞没有出现绿色荧光,说明构建的  $\alpha$ -MHC-CREG-EGFP 表达载体能够在心肌细胞中特异性表达,证实该启动子能够保证目的基因在心肌细胞中的特异性表达。

CREG 是 Veal 等从 Hela 细胞 cDNA 文库中克隆的转录调控相关基因<sup>[1]</sup>。CREG mRNA 在成熟分化的组织细胞中广泛表达,但在去分化的小鼠胚胎干细胞、诱导的多功能干细胞、人胚胎瘤细胞中却是低表达的,提示 CREG mRNA 表达与组织分化状态密切相关<sup>[7,8]</sup>。Di Bacco A 等研究发现,CREG 蛋白通过与细胞膜上 M6P/IGF2R 结合发挥其生物效应,对多种肿瘤细胞具有抑制增殖和促进分化的作用<sup>[9]</sup>。本课题组前期研究发现 CREG 蛋白是与 M6P/IGF2R 中 11-13 结构域特异性结合而发挥生物学效应<sup>[10]</sup>。Xu L 等研究发现 CREG 能够通过 ERK1/2 通路抑制心肌肥大<sup>[11]</sup>。Bian Z 等在此研究基础上,进一步发现 CREG 通过抑制 MEK-ERK1/2 信号通路,抑制心肌肥大、炎症和心肌纤维化从而改善心功能<sup>[12]</sup>。本实验室通过大鼠颈动脉拉伤实验证实,CREG 在维持 VSMCs 分化表型中起重要作用,CREG 蛋白表达与血管损伤后再狭窄过程中 VSMCs 增殖能力呈负相关,并且能够抑制新生内膜的过度增生,提示 CREG 基因具有促进分化、抑制 VSMCs 增殖、诱导 VSMCs 向分化表型转换的功能<sup>[13,14]</sup>。通过成功构建 CREG 过表达的小鼠内皮细胞,证实 CREG 过表达的内皮细胞去血清饥饿后凋亡较对照组明显减少,证实 CREG 过表达抑制了去血清诱导的内皮细胞凋亡,机制与 PI3K/Akt 通路有关<sup>[15]</sup>。CREG 在心血管系统发育和一系列生理和病理过程中所起的重要作用仍不清楚,所以本研究构建了血管内皮细胞特异启动的真核表达质粒。

由于 CREG 在心血管疾病的发生发展中起了多方面的作用,重组质粒 p $\alpha$ -MHC-CREG-EGFP-N1 的构建为下一步在体内研究 CREG 在缺血性心脏病中的作用具有重要意义,同时也为下一步采用原核微注射技术得到心肌细胞特异高表达 CREG 的转基因小鼠提供了材料。Chan SS 等研究证实,转染  $\alpha$ -MHC-EGFP 的胚胎干细胞和诱导的多功能干细胞,在向心肌细胞分化早期就可以观察到绿色荧光,而且只在心肌细胞中表达,其敏感性和准确性优于传统的免疫组织化学和细胞化学染色<sup>[16]</sup>。因此,本研究应用  $\alpha$ -MHC 启动子驱动 CREG 和 EGFP 在心肌细胞中表达,这一特点不仅可以方便地追踪研究

CREG 在干细胞向心肌细胞的分化中的表达变化情况,而且能够进行细胞研究其在定向分化和心肌细胞中的作用。

致谢: 本实验由国家自然科学基金面上项目(30971218, 81070097) 国家青年科学基金项目(30800465)资助。

#### 参考文献(References)

- [1] Veal E, Eisenstein M, Tseng ZH, et al. A cellular repressor of E1A-stimulated genes that inhibits activation by E2F [J]. Mol Cell Bio, 1998,18(9): 5032-5041
- [2] Yang G, Han Y, Tian X, et al. Pattern of expression of the CREG gene and CREG protein in the mouse embryo [J]. Mol Biol Rep, 2011,38 (3):2133-2140
- [3] Song H, Yoon C, Kattman SJ, et al. Interrogating functional integration between injected pluripotent stem cell-derived cells and surrogate cardiac tissue[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010,107(8):3329-3334
- [4] Liew CC, Jandreski MA. Construction and characterization of the alpha form of a cardiac myosin heavy chain cDNA clone and its developmental expression in the Syrian hamster [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986, 83(10):3175-3179
- [5] Gulick J, Subramaniam A, Neumann J, et al. Isolation and characterization of the mouse cardiac myosin heavy chain genes [J]. J Biol Chem, 1991, 266(14):9180-9185
- [6] Lee CJ, Fan X, Guo X, et al. Promoter-specific lentivectors for long-term, cardiac-directed therapy of Fabry disease [J]. J Cardiol 2011,57(1):115-122
- [7] Veal E, Groisman R, Eisenstein M, Gill G. The secreted glycoprotein CREG enhances differentiation of NTERA-2 human embryonal carcinoma cells[J]. Oncogene, 2000,19(17):2120-2128
- [8] Li J, Han Y, Yan C, et al. A novel method to inhibit apoptosis and promote differentiation of induced pluripotent stem cells in transplantation therapy for myocardial infarction [J]. Med Hypotheses, 2011, 76 (2):264-265
- [9] Di Bacco A, Gill G. The secreted glycoprotein CREG inhibits cell growth dependent on the mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor[J]. Oncogene, 2003,22(35):5436-5445
- [10] Han Y, Luan B, Sun M, et al. Glycosylation-independent binding to extracellular domains 11-13 of mannose-6-phosphate/insulin-like growth factor-2 receptor mediates the effects of soluble CREG on the phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells[J]. J Mol Cell Cardiol, 2011, 50(4):723-730
- [11] Xu L, Liu JM, Chen LY. CREG, a new regulator of ERK1/2 in cardiac hypertrophy. J Hypertens. 2004, 22(8):1579-1587
- [12] Bian Z, Cai J, Shen DF, et al. Cellular repressor of E1A-stimulated genes attenuates cardiac hypertrophy and fibrosis[J]. J Cell Mol Med, 2009, 13(7):1302-1313
- [13] Han Y, Wu G, Deng J, et al. Cellular repressor of E1A-stimulated genes inhibits human vascular smooth muscle cell apoptosis via blocking P38/JNK MAP kinase activation [J]. J Mol Cell Cardiol, 2010, 48(6):1225-1235
- [14] Han Y, Deng J, Guo L, et al. CREG promotes a mature smooth muscle cell phenotype and reduces neointimal formation in balloon-injured rat carotid artery[J]. Cardiovasc Res, 2008,78(3):597-604
- [15] 陶杰, 闫承慧, 韩雅玲. E1A 激活基因细胞阻遏子蛋白在人脐静脉内皮细胞凋亡中的作用 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009,13(37):7281-7285  
TaoO Jie, Yan Cheng-hui, Hao Ya-ling. Effect of cellular repressor protein of E1A-stimulated genes on the apoptosis of human umbilical vein endothelial cells[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2009,13(37):7281-7285( In Chinese)
- [16] Chan SS, Li HJ, Hsueh YC, et al. Fibroblast growth factor-10 promotes cardiomyocyte differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells[J]. PLoS One, 2010,5(12):e14414-14420