

绿色荧光蛋白特性及其在角膜内皮疾病研究中的应用

魏捷 综述 蒋华 审校

Characteristics of green fluorescent protein and its utilization in study of corneal endothelium diseases

Wei Jie, Jiang Hua. Department of Ophthalmology, General Hospital of Jinan Command, Jinan 250031, China

Abstract Since it was firstly utilized as a reporter gene in 1994, green fluorescent protein (GFP) from the bioluminescent jellyfish *aequorea victoria* has been proven to be a powerful tool in molecular and cellular biology as a transcriptional fluorescent marker. The distinguishing features of its properties, such as a high stability during its expression in tissue, minimal toxicity, uninvasive detecting way, being able to emit green light without addition of external substrates or cofactors and without application of expensive equipment etc., makes it very useful in monitoring gene expression and protein localization in living cells. GFP labeling technique also supplies a better understanding of how the gene transfer into corneal endothelial cells. This review focuses on biological characteristics and practical utilization of GFP in the study of corneal endothelial cells.

Keys words green fluorescent protein; corneal endothelial cell; gene therapy

摘要 来源于发光水母的绿色荧光蛋白(GFP)于1994年首次被作为报告基因应用。其内源的荧光基因受到紫外光或蓝光激发时可高效发射清晰可见的绿光,并可在细胞内稳定表达,不需要任何反应底物及其他辅助因子,不影响细胞功能,检测直观方便,可在活体内进行,已成为当今生命科学各领域中应用广泛的新型标记基因。作为一种性质独特、理想的荧光示踪标记物,GFP在角膜内皮疾病的基因治疗研究中,也展示了广阔的应用前景。就GFP的特性及GFP标记示踪技术在角膜内皮疾病基因研究中的应用进展进行综述。

关键词 绿色荧光蛋白;角膜内皮细胞;基因治疗

分类号 R 772.2 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)07-0624-04

绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)是一类存在于水母、水螅和珊瑚等腔肠动物体内的生物发光蛋白,由 Shimomura 等^[1]首次从多管水母属中分离纯化,因受到紫外光或蓝光激发时能发射绿色荧光而得名。Prasher 等^[2]成功分离出维多利亚水母 GFP 的基因结构,Chalfie 等^[3]首次在大肠杆菌中克隆表达了 GFP。此后 GFP 作为一种功能独特的新型标记物,被广泛应用于基因治疗、蛋白在活细胞内的功能定位、移植干细胞的活体示踪等领域,在眼科领域的应用也日益增多。本文就 GFP 的特性及 GFP 标记示踪技术在角膜内皮疾病基因研究中的应用进展进行综述。

1 GFP 概况

1.1 GFP 的结构及发光机制

医学研究中使用的 GFP 来源于维多利亚水母,其

基因由 3 个外显子组成,全长 2 600 bp,蛋白产物是由 238 个氨基酸残基组成的单链多肽,相对分子质量约 27 000。Ormo 等^[4]研究得出 GFP 的晶状体结构呈圆柱体,直径约 3 nm,高约 4 nm,外围由 11 条片层 β -折叠链绕成 1 个圆柱体,内部轴心处含 1 条 α -螺旋,两端由短的螺旋片段封闭,组成单独的致密桶状结构域,称为 β -罐结构。GFP 的活性部位是氨基酸主链上由 65~67 位的“丝氨酸-酪氨酸-甘氨酸”形成的特殊生色基团,它附着在 α -螺旋上,包埋于圆柱体的中心。

GFP 肽链表达后发生折叠,在有氧条件下,丝氨酸-酪氨酸-甘氨酸残基环化加氧形成对羟苯甲基咪唑环酮,和周围其他 3 个氨基酸形成六肽生色团^[5]。该发光过程可以自动催化完成,关于其确切机制,目前普遍赞同的是 Prasher 等^[2]提出的模式,认为 GFP 是在荧光素酶的参与下被 Ca^{2+} 激活,使蛋白质的共价键发生一定的变化,形成不稳定的中间体,中间体分解后,释放能量,产生荧光。但这一模式还需要进一步证实。

作者单位:250031 济南军区总医院眼科

通讯作者:魏捷 (Email: weijie_jn@163.com)

1.2 GFP 的理化性质

GFP 在紫外光激发下发绿色荧光的最大吸收峰为 395 nm,另一小吸收峰为 470 nm,最大发射峰为 509 nm,在 540 nm 处有一尖峰。GFP 的生色基团受到外层致密结构的保护,其荧光表达非常稳定。在激发光下,GFP 荧光在哺乳动物细胞内至少能保持 30 min 以上^[6]。GFP 还能耐受高温处理,甲醛固定和石蜡包埋不影响其荧光性质,长时间照射后也无光漂白现象。用酸、碱或盐酸胍处理,GFP 的荧光消失,但恢复中性环境或去除变性剂后,荧光即可恢复。野生型 GFP 荧光较弱,因而科学家们研究合成了增强型 GFP (enhanced GFP,EGFP),它的激发峰偏移到 488 nm,发射的荧光强度比野生型高 35 倍,比野生型更适合作为报告基因。替换 GFP 肽链中的氨基酸还能生成很多产生不同颜色荧光的 GFP 的突变体,如蓝色荧光蛋白发射蓝色荧光,黄色荧光蛋白发射黄色荧光,这便于同时检测多标记基因的表达^[7]。

2 GFP 作为报告基因的特点和优势

2.1 检测方便直观

GFP 的生色基团是其蛋白质一级序列固有的,所以产生荧光不需加任何底物或辅助因子,只要有足够的表达,在激发光照射下,通过荧光显微镜或激光扫描共焦显微镜就能清晰观察到荧光,检测方便直观,能实现活细胞内的实时定位观察^[8]。结合定量聚合酶链反应、荧光激活细胞分选系统等方法,还可以进行定量检测。

2.2 荧光性质稳定

GFP 的荧光表达只有在过热 (>65 °C)、过酸 (pH <4)、过碱 (pH 12 ~ 13) 或其他变性剂 (如 6M 胍基盐酸) 存在的条件下,才会因 GFP 变性而消失。一旦恢复中性环境或去除变性剂,荧光就可恢复并具有与原来一致的发射光谱。

2.3 适合构建融合基因转染载体

GFP 基因序列仅有 2 600 bp,容易与一些目的基因构建融合基因,融合后既不影响目的基因产物的空间构象和功能,也不影响 GFP 圆柱体结构的形成,使得融合蛋白同时具有 GFP 的荧光特性和目的蛋白质的功能^[9]。

2.4 对标记细胞基本无毒性

GFP 标记后不影响细胞的正常功能,大量表达对细胞无毒性作用。使用 GFP 质粒标记胚胎干细胞、神经干细胞、造血干细胞,对它们的基本生物学特性,如增殖功能和体内多向分化潜能等,均无明显影响^[10-11]。

2.5 表达无种属限制

GFP 的生色基团由常见的氨基酸组成,无物种特异性,GFP 基因在不同种类原核细胞或真核细胞中均可完美表达,蛋白产生不需水母的其他基因产物,表达后在激发光下均能产生强烈荧光。

2.6 检测结果真实可靠

由于其他生物本身不含 GFP,因此不会出现假阳性结果。GFP 作为分子探针仅标记活细胞,可以代替荧光染料,能避免由于染料扩散造成的定位不准,使结果真实可靠。

3 GFP 在角膜内皮疾病基因治疗研究中的应用

角膜内皮细胞 (corneal endothelial cells,CECs) 的屏障作用和主动转运的“液泵”功能是角膜能够保持高度透明性的关键因素。但其自身不具备分裂活性,损伤后容易发生功能失代偿,引发严重的视力损害和剧烈的刺激症状。近年来基因疗法为 CEC 异常眼病的治疗开辟了新的思路。角膜是适合进行基因研究的理想靶器官:解剖层次分明,结构简单,CEC 为单层结构,利于外源基因的导入和定位;位置表浅,清晰透明,基因转染的操作和观察都很方便;体外培养保存时间长,利于评估转染效果^[12]。而 GFP 具备众多特性,在 CEC 的基因研究中得到了广泛应用。

3.1 GFP 在 CEC 基因转染方式研究中的应用

基因转染能否成功取决于外源性目的基因能否转移到靶组织并有效、适度地表达,转染载体的选择是关键因素之一。基因转移应用的载体分为病毒载体和非病毒载体两大类。Lai 等^[13]以巨细胞病毒 (CMV) 为启动子,将 GFP 与重组腺病毒相关病毒 (recombinant adeno-associated virus, rAAV) 构建为重组质粒 ss-rAAV2-CMV-GFP,体外转染人角膜片 1 h 后于 31 °C 下继续培养 2 周,荧光显微镜下以 GFP 阳性表达作为细胞转染成功的标志,结果 24 h 内角膜内皮层即有 GFP 荧光表达并可持续 2 周,CEC 转染率超过 90%。袁进等^[14]将白细胞介素-1 受体拮抗剂 (IL-1ra) cDNA 片断中插入 PEGFP-C2 质粒构建 PEGFP-hIL-1ra 质粒,在阳离子聚合物介导下转染培养的人 CEC,在荧光显微镜下通过 GFP 示踪观察到 24 h 后转染细胞内出现 GFP 荧光表达,转染率为 20% ~ 25%。结合 Western blot 法证实转染 CEC 内人 IL-1ra-GFP 融合蛋白能够持续表达 9 d 以上,说明阳离子聚合物能够介导对 CEC 的有效转染并持续表达目的蛋白。Nguyen 等^[15]也以 GFP 作为报告基因,研究发现 2 种非病毒载体 FuGENE6 和 TransIT-LT 可以有效转染培养的兔 CEC,

转染效率分别达到 28.8% 和 38.8%, 同时 CEC 形态正常, 活性染色无细胞死亡。

转染途径是基因治疗的另一个重要环节。体外转染 CEC 法有广阔的应用前景, 但很多角膜内皮疾病的治疗也需要在活体内进行。Challa 等^[16] 利用延伸因子作为启动子, 将 GFP 与慢病毒构建的重组质粒注入大鼠前房, 3 周后于荧光显微镜下观察眼冰冻切片, 发现在角膜内皮和小梁网有广泛而持久的 GFP 荧光表达。Borrás 等^[17] 则将有复制缺陷的腺病毒与 GFP 重组构建的 Ad-GFP 质粒注入猕猴眼前房, 其中 1 只猕猴 7 个月内注射了 4 次。荧光显微镜下观察到角膜内皮层和小梁网均可见到 GFP 的绿色荧光。在接受连续质粒注射的猕猴, 前 3 次基因转染均获得成功, 但第 4 次失败, 角膜也出现了异常改变, 停药后恢复正常。说明腺病毒作为载体可以连续多次眼内给药, 但用量过大则会产生毒性作用。

上述实验表明, 病毒和非病毒载体都可以有效并稳定地介导针对 CEC 的基因转染, 而利用 GFP 作为报告基因, 既不影响目的基因的表达和目的蛋白质的功能, 允许对载体的基因转移效率进行比较客观的评价, 又能通过非侵入性手段观察转基因过程, 是一种理想的检测方法。

3.2 GFP 在角膜内皮移植追踪研究中的应用

角膜内皮移植术仍是目前治疗角膜内皮不良所致盲的唯一有效方法, 排斥反应是造成手术失败的主要原因。因此, 人们设想在移植前对供体 CEC 行原位基因转染, 可能有利于控制移植术后的排斥反应。

Qian 等^[18] 将供体鼠角膜片与 Ad-GFP 质粒共同孵育 2 h 后用于角膜移植术, 1 周后检测部分角膜切片见 GFP 的荧光仅局限表达于内皮层, 活体角膜检测发现, 以同基因角膜移植组中 4℃ 下转染的植片中 GFP 荧光强度最大, 高峰期 3 d ~ 2 周, 可持续表达 12 周, 植片始终保持透明; 而同种异体移植组的 GFP 荧光表达仅持续 1 ~ 3.5 周, 高浓度转染时还发生明显的植片混浊。说明腺病毒载体转染同基因移植的供体植片不良反应较小, 提示可以对遗传性角膜内皮病实施早期离体基因转染后的自体角膜移植术, 以减缓细胞凋亡速度, 尽量避免行排斥率较高的同种异体角膜移植。绵羊 CEC 的分裂活性和角膜移植手术过程被认为和人类的非常相似, Klebe 等^[19] 就利用 Ad-GFP 质粒与 2 种免疫调节因子 p40 IL-12 和 IL-4 的 cDNA 重组转染质粒, 在室温下与供体绵羊角膜片共同孵育 2 h 后行同种异体角膜移植术。结果显示, 供体角膜残片培养 24 h 即观测到 GFP 的荧光表达, 说明转染成功。

IL-4 质粒转染组与未治疗组的植片平均存活期分别为 18.5 d 和 20 d, 而转染 p40 IL-12 质粒的植片平均正常存活 45 d, 说明 IL-12 的表达显著延迟了排斥反应的发生。同时, 活体观察显示, 绝大多数 (18/21) 受体角膜持续至移植后 36 d 仍有明显的 GFP 荧光表达, 且仅限于植片范围内。即使在动物处死后的眼组织切片中, GFP 的荧光仍不同程度地存在于大部分 CEC 中 (16/21), 甚至在 1 只动物术后 121 d 处死的绵羊眼组织植片中仍有少量分布。

由此可见, 由于角膜观察方便, 用 GFP 标记供体 CEC 进行示踪, 能直观精确地区分供体细胞与宿主细胞, 并观察供体细胞的转归。GFP 自身对转染的 CEC 无明显毒性作用, 是理想的供体植片标记物, 可以满足角膜内皮移植术的研究需要。

3.3 GFP 在角膜内皮移植免疫赦免研究中的应用

角膜移植免疫赦免状态的破坏会引发角膜内皮移植术后的排斥反应, 其中以内皮型最多见, 破坏性也最大, 是导致移植最终失败的重要原因。因此, 许多学者针对这种免疫赦免状态的具体机制进行了大量研究, GFP 也已被引入其中。

由于 MHC-II 类抗原, 尤其是表达于骨髓来源的“过客”细胞的 MHC-II 类抗原, 在触发移植排斥反应中起着重要作用, Liu 等^[20] 于激光共焦显微镜下, 对 GFP 转基因小鼠角膜植片中的 GFP(+) 抗原递呈细胞在移植术后的迁移路线进行追踪, 发现移植后 24 h 内供体来源的 GFP(+) 转基因细胞就可以迁移至受体的同侧颈淋巴结中。随时间推移, 这些细胞由原来表达 MHC-I 类抗原逐渐转变为表达 MHC-II 类抗原, 这种变化在高危角膜移植术后尤为明显。提示这些细胞在角膜移植免疫中起到过客白细胞的作用, 通过直接通路来激活 T 细胞, 推翻了以往被广泛接受的角膜移植的免疫赦免性是由于植片中缺乏过客白细胞或移植抗原与全身免疫系统隔离的理论。Nakamura 等^[21] 则提取 GFP 转基因小鼠的骨髓细胞和骨髓造血干细胞, 经静脉注入受体鼠体内, 结果发现, GFP(+) 细胞于移植后 2 周自角膜缘逐渐移入角膜内, 于移植后 2 ~ 6 个月散布于整个角膜。免疫组织化学检测表明, 部分 GFP(+) 细胞是树突状细胞和巨噬细胞这样的抗原递呈细胞。该实验首次得到了骨髓来源细胞在正常鼠角膜内分布的直接证据, 证明一些抗原递呈细胞可以在角膜内持续存在, 也说明自 GFP 转基因动物中分离得到的干细胞标记较 GFP 质粒转染更加稳定, 不易丢失, 是进行免疫赦免机制研究的理想选择^[22]。

4 应用前景及存在的问题

综上所述,与其他常用标记物如 β -半乳糖苷酶 (β -gal) 和 5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU) 相比,GFP 应用于角膜内皮疾病基因治疗领域的主要优势在于分裂或静息状态下的 CEC 都可以被成功标记,同时活体观察可使基因转染过程可视化;GFP 仅标记活细胞,细胞死亡荧光便随即消失,无扩散干扰;携带 GFP 的转基因动物的转染效果更加稳定,表达时间可大大延长。当然,GFP 也存在一些不足,如 GFP 的表达随载体的不同和体内外环境的转换,转染效率可以差别很大;GFP 突变体能表达不同颜色的荧光,但性质还欠稳定,使得 GFP 双标记或多标记技术的推广受限等。随着对这些问题的深入研究,GFP 在 CEC 的基因转染效果检测、细胞内定位、移植 CEC 来源鉴别及命运追踪、创伤愈合机制等方面的应用空间将进一步扩大。

参考文献

- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, aequorea [J]. *J Cell Comp Physiol*, 1962, 59: 223 - 239
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, et al. Primary structure of the aequorea victoria green-fluorescent protein [J]. *J Gene*, 1992, 111: 229 - 233
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression [J]. *Science*, 1994, 263: 802 - 805
- Ormo M, Cubitt AB, Kallio K, et al. Crystal structure of the aequorea victoria green fluorescent protein [J]. *Science*, 1996, 273: 1392 - 1395
- Cody CW, Prasher DC, Westler WM, et al. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the aequorea green-fluorescent protein [J]. *Biochemistry*, 1993, 32: 1212 - 1218
- Gubin AN, Reddy B, Njoroge JM, et al. Long-term, stable expression of green fluorescent protein in mammalian cells [J]. *Biochem Biop Res Commun*, 1997, 236: 347 - 350
- Stadtfeld M, Varas F, Graf T. Fluorescent protein-cell labeling and its application in time-lapse analysis of hematopoietic differentiation [J]. *Methods Mol Med*, 2005, 105: 395 - 412

- Tsien RY. The green fluorescent protein [J]. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67: 509 - 544
- Tavare JM, Fletcher LM, Welsh GI, et al. Using green fluorescent protein to study intracellular signaling [J]. *J Endocrinol*, 2001, 170: 297 - 306
- Liu YP, Dovzhenko OV, Garthwaite MA, et al. Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells stably over-expressing enhanced green fluorescent protein [J]. *Stem Cells Dev*, 2004, 13: 636 - 645
- Kahn J, Byk T, Jansson-Sjostrand L, et al. Overexpression of CXCR4 on human CD34 + progenitors increases their proliferation, migration, and NOD/SCID repopulation [J]. *Blood*, 2004, 103: 2942 - 2949
- Teresa B. Recent developments in ocular gene therapy [J]. *Exp Eye Res*, 2003, 76: 643 - 652
- Lai L, Lin K, Foulks G, et al. Highly efficient ex vivo gene delivery into human corneal endothelial cells by recombinant adeno-associated virus [J]. *Curr Eye Res*, 2005, 30: 213 - 219
- 袁进, 陈家祺, 刘祖国, 等. IL-1ra 基因修饰角膜内皮细胞及其表达 [J]. *眼科新进展*, 2006, 26: 2 - 6
- Nguyen TH, Murakami A, Fujiki K, et al. Transferrin-polyethylenimine conjugate, FuGENE6 and TransIT-LT as nonviral vectors for gene transfer to the corneal endothelium [J]. *Jpn J Ophthalmol*, 2002, 46: 140 - 146
- Challa P, Luna C, Liton PB, et al. Lentiviral mediated gene delivery to the anterior chamber of rodent eyes [J]. *Mol Vis*, 2005, 11: 425 - 430
- Borrás T, Gabelt BT, Klintworth CK, et al. Non-invasive observation of repeated adenoviral GFP gene delivery to the anterior segment of the monkey eye in vivo [J]. *J Gene Med*, 2001, 3: 437 - 449
- Qian Y, Leong FL, Kazlauskas A, et al. Ex vivo adenovirus-mediated gene transfer to corneal graft endothelial cells in mice [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, 45: 2187 - 2193
- Klebe S, Coster DJ, Sykes PJ, et al. Prolongation of sheep corneal allograft survival by transfer of the gene encoding ovine IL-12-p40 but not IL-4 to donor corneal endothelium [J]. *J Immunol*, 2005, 175: 2219 - 2226
- Liu Y, Hamrah P, Zhang Q, et al. Draining lymph nodes of corneal transplant hosts exhibit evidence for donor major histocompatibility complex (MHC) class II-positive dendritic cells derived from MHC class II-negative grafts [J]. *J Exp Med*, 2002, 195: 259 - 268
- Nakamura T, Ishikawa F, Sonoda KH, et al. Characterization and distribution of bone marrow-derived cells in mouse cornea [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46: 497 - 503
- Brazelton TR, Blau HM. Optimizing techniques for tracking transplanted stem cells in vivo [J]. *Stem Cells*, 2005, 23: 1251 - 1265

(收稿:2008-10-19 修回:2009-05-20)

(本文编辑:王莉红)

· 临床经验 ·

玻璃体视网膜手术治疗严重眼外伤的临床观察

贾乃伟 李兵 李寅伟 张爽 张晓飞 李玉娟

开放性眼外伤合并眼内异物常伴有多种并发症,若不及时治疗,则发展为增生性玻璃体视网膜病变 (proliferative vitreoretinopathy, PVR),重者导致眼球萎缩。我院对严重眼外伤患者进行玻璃体视网膜手术治疗和随访观察,报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本组病例为 2004—2008 年在本院住院治疗的开放性眼外伤患者 45 例 (46 眼),其中男 39 例 (40 眼),女 6 例 (6 眼);右眼 22 眼,左眼 24 眼;年龄 8 - 63 岁。术前视力无光感者 1 例 (1 眼),光感 ~ 0.05 者 37 例 (37 眼),0.06 ~ 0.1 者 7 例 (8 眼)。其中眼球破裂伤 13 眼,眼球贯通伤 8 眼,眼内异物 25 眼;非磁性异物 9 眼,磁性异物 16 眼。术前合并外伤性白内障 27 眼,晶状体脱入玻璃体腔 4 眼,晶状体脱失 3 眼,视网膜脱