

文章编号:1005-6947(2008)08-0789-04

· 基础研究 ·

VEGF 基因转染血管内皮祖细胞的实验研究

王盛, 陈忠, 唐小斌, 吴章敏, 吴庆华

(首都医科大学附属北京安贞医院 血管外科, 北京 100029)

摘要: **目的** 探讨血管内皮生长因子(VEGF)基因转染血管内皮祖细胞(EPCs)的方法及效果。**方法** 取生长活跃的 EPCs, 分别转染不同浓度的携带 VEGF-165 基因的腺病毒质粒(Adv-GFP-VEGF165)(转染组)及空质粒(Adv-GFP)(空质粒组), 并设空白对照组。荧光显微镜下观察转染效果, MTT 法检测不同病毒滴度时细胞增殖情况; ABC-ELISA 法检测上清液中 VEGF 蛋白表达情况。**结果** 转染组镜下观察到大部分细胞呈现绿色荧光。病毒滴度为 1:100 的转染会导致细胞生长停滞, 并造成细胞损害; 1:50 的转染后对细胞增殖无明显影响。ELISA 检测证实转染组上清液中 VEGF 蛋白浓度明显高于空质粒组及空白对照组($P < 0.01$)。**结论** 以腺病毒为载体的 VEGF 基因转染 EPCs 是可行的, 1:50 是合适的转染比率, 转染后上清液中 VEGF 蛋白表达明显增加。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(8): 789-792]

关键词: 血管内皮生长因子; 血管内皮祖细胞; 基因转染

中图分类号: R 34-33

文献标识码: A

Experimental study of endothelial progenitor cells transfected with VEGF165 gene

WANG Sheng, CHEN Zhong, TANG Xiaobin, WU Zhangmin, WU Qinghua

(Department of Vascular Surgery, Capital University of Medical Sciences, Affiliated Beijing Anzhen Hospital, Beijing 100029, China)

Abstract: **Objective** To investigate the method and effect of endothelial progenitor cells (EPCs) transfected with VEGF165 gene. **Methods** The cultivated EPCs were transfected with recombinant adenovirus in which VEGF165 gene (Adv-GFP-VEGF165 group) or only Adv-GFP (Adv group) was incorporated, then the transfection effect was observed by immunofluorescence. And a blank control group was set up. Observation of the proliferation potential of cells was done by MTT method. The VEGF gene expression was observed by detecting the concentration of VEGF protein in supernatant with ABC-ELISA method. **Results** Green fluorescence was observed in almost all of the cells after transfection with Adv-GFP-VEGF165, which indicated the success of the transfection. The EPCs proliferation was not affected after the transfection, which was confirmed by MTT method. The VEGF protein concentration in the supernatant of transfected group was higher than that of Adv group and control group. **Conclusions** It is feasible for EPCs to be transfected with VEGF165 gene which was incorporated into adenovirus, and the suitable ratio was 1:50. The VEGF protein concentration in the supernatant liquid of endothelial progenitor cells transfected with VEGF increased significantly.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(8): 789-792]

Key words: Vascular Endothelial Growth Factor; Endothelial Progenitor Cells; Gene Transfect

CLC number: R 34-33

Document code: A

基金项目:北京市优秀人才基金资助项目(20071D0300600085)。

收稿日期:2008-03-04; **修订日期:**2008-06-04。

作者简介:王盛,男,首都医科大学附属北京安贞医院主治医师,主要从事血管外科临床和基础方面的研究。

通讯作者:陈忠, E-mail:Chenzhong8658@vip.sina.com

血管内皮生长因子(VEGF)在治疗缺血性疾病中的作用已得到肯定。与成体组织相比,干细胞移植的优势之一在于其易于改造,可以作为基因治疗良好的靶细胞。因此血管内皮祖细胞(EPCs)联合基因(如VEGF)治疗缺血性疾病是一种有前途的方法。为了改善EPCs质量,减少移植时EPCs的用量,笔者尝试利用腺病毒质粒携带的VEGF-165基因转染EPCs,报告如下。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

M199培养基购自Gibco公司;胎牛血清购自Hyclone公司;Ficoll离心液购自Sigma公司;VEGF购自Peprotech公司;碱性纤维细胞生长因子(bFGF)购自Peprotech公司;胰岛素样生长因子(IGF-1)购自Peprotech公司;二甲基亚砜(DMSO)购自北京晶美生物制品公司;四唑蓝(MTT)购自北京晶美生物制品公司。另备酶联免疫吸附实验(ELISA)试剂盒、倒置相差显微镜、荧光显微镜。

1.2 EPCs, VEGF165 基因转染实验

(1)取生长活跃的EPCs,胰酶消化后,移入50 mL离心管中,1 000 r/min离心10 min。弃去上清,加入1 000 μ L培养基,取10 μ L细胞计数。(2)按每孔 10^5 个细胞加入6孔板中。(3)基因转染:将 10^{10} 个病毒/mL的溶液稀释为 $10^6/100 \mu$,质粒转染组(实验组)每孔加入不同滴度的Adv-GFP-VEGF165(北京协和医院血液科惠赠);空质粒组在孔内加入相应病毒滴度的Adv-GFP(北京协和医院血液科惠赠)。(4)轻轻吹打混匀,于 37°C ,5% CO_2 条件下培养2 h。(5)加入3 mL培养基,于 37°C ,5% CO_2 条件下培养2 h。

1.3 镜下观察转染细胞检测转染效果

EPCs转染携带绿色荧光蛋白(GFP)的VEGF165基因后24 h,置荧光显微镜下观察转染效果。

1.4 检测 EPCs 转染 VEGF165 后的增殖情况

(1)取生长活跃的EPCs,按前述方法转染不同病毒滴度的VEGF165,转染比率(细胞:病毒)分别为1:10,1:50,1:100。(2)在对数生长期,分别取上述不同比率转染的EPCs,胰酶消化,用M199培养基制成单细胞悬液。(3)台盼蓝染色,细胞计数。(4)将细胞以 $5 \times 10^3/200 \mu\text{L}$ /孔的密度接种于96孔板。(5)置于 37°C ,5% CO_2 条件下培养,每3~4 d更换培养基。(6)呈色:每孔

加入5 mg/mL MTT溶液20 μL , 37°C ,5% CO_2 条件下孵育4 h后终止培养。小心吸尽上清液,每孔加入DMSO 100 μL ,平板床振荡10 min。(7)比色: = 570 nm 比色。

1.5 EPCs 1:50 转染 VEGF165 后增殖对照实验

将培养7 d的细胞随机分为3组接种:转染Adv-GFP-VEGF165的细胞(转染组,A组),转染空质粒的细胞(空质粒组,B组),未转染的细胞(空白对照组,C组),行MTT试验。

1.6 外分泌 VEGF165 蛋白表达的 ELISA 实验

分别在转染后第1,4,7,14天取上清液行双抗体夹心ABC-ELISA实验,绘制标准曲线,测得样品光密度值(OD)值后在曲线上查得VEGF浓度。

1.7 统计学处理

所有数据应用SPSS11.5统计学软件行 t 检验。

2 结果

2.1 VEGF 基因转染效果

转染携带绿色荧光蛋白表达基因的Adv-GFP-VEGF165后24 h在荧光显微镜下观察,见几乎所有细胞呈绿色荧光,说明转染成功(图1)。

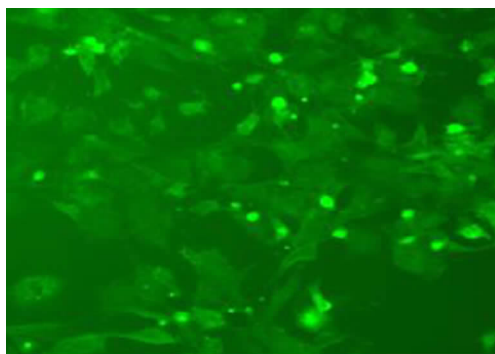


图1 转染 Adv-GFP-VEGF165 后的 EPCs ($\times 10$)

2.2 MTT 实验结果

2.2.1 不同浓度 EPCs 转染 VEGF165 后的增殖情况 1:10 转染组及 1:50 转染组细胞增殖情况基本相似,正常贴壁及生长,而 1:100 比率转染后,细胞的增殖处于停滞状态,同时在镜下发现细胞坏死形成碎片(表1)。

2.2.2 EPCs 1:50 转染 VEGF165 后增殖情况 转染 VEGF165 后的细胞继续培养,并与未转染组及空质粒组对照相比较,MTT 实验显示各组增殖情况无统计学差异($P > 0.05$)(表2)。

2.3 ABC-ELISA 检测 VEGF 含量

A 组上清液中 VEGF 的含量显著高于其他两组,差异有显著性 ($P < 0.01$); 而 B 组与 C 组差异无显著性 ($P > 0.05$) (表 3)。

表 1 MTT 检测不同病毒滴度转染结果($\bar{x} \pm s$)

| 时间(d) | 1:10 转染组 | 1:50 转染组 | 1:100 转染组 |
|-------|-----------------------------|-----------------------------|---------------|
| 2 | 0.166 ± 0.022 | 0.205 ± 0.018 | 0.175 ± 0.023 |
| 4 | 0.208 ± 0.019 | 0.245 ± 0.033 | 0.294 ± 0.065 |
| 6 | 0.265 ± 0.063 | 0.236 ± 0.092 | 0.245 ± 0.043 |
| 8 | 0.312 ± 0.107 ¹⁾ | 0.323 ± 0.038 ¹⁾ | 0.198 ± 0.029 |
| 10 | 0.395 ± 0.121 ¹⁾ | 0.376 ± 0.096 ¹⁾ | 0.212 ± 0.024 |
| 12 | 0.519 ± 0.264 ¹⁾ | 0.495 ± 0.116 ¹⁾ | 0.186 ± 0.051 |
| 14 | 0.497 ± 0.089 ¹⁾ | 0.532 ± 0.198 ¹⁾ | 0.209 ± 0.069 |

注:1)与 1:100 组相比, $P < 0.01$

表 2 3 组细胞的增殖情况($\bar{x} \pm s$)

| 时间(d) | 转染组 | 空质粒组 | 未转染组 |
|-------|---------------|---------------|---------------|
| 2 | 0.237 ± 0.057 | 0.225 ± 0.049 | 0.182 ± 0.012 |
| 4 | 0.220 ± 0.020 | 0.219 ± 0.029 | 0.306 ± 0.231 |
| 6 | 0.311 ± 0.109 | 0.316 ± 0.124 | 0.294 ± 0.023 |
| 8 | 0.380 ± 0.105 | 0.420 ± 0.071 | 0.416 ± 0.065 |
| 10 | 0.362 ± 0.112 | 0.387 ± 0.113 | 0.336 ± 0.136 |
| 12 | 0.481 ± 0.252 | 0.476 ± 0.213 | 0.469 ± 0.069 |
| 14 | 0.616 ± 0.069 | 0.643 ± 0.023 | 0.652 ± 0.103 |

表 3 上清液中 VEGF 的含量(pg/mL):

| 组别 | 转染后天数(d, $\bar{x} \pm s$) | | | |
|----|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | 1 | 4 | 7 | 14 |
| A | 5160.79 ± 518.88 | 5306.25 ± 498.36 | 4986.75 ± 392.46 | 4769.35 ± 369.58 |
| B | 3448.11 ± 235.29 ¹⁾ | 3396.17 ± 295.30 ¹⁾ | 3069.82 ± 226.75 ¹⁾ | 2963.65 ± 219.38 ¹⁾ |
| C | 3403.00 ± 393.60 ¹⁾ | 3495.36 ± 356.39 ¹⁾ | 3269.86 ± 246.35 ¹⁾ | 3026.35 ± 264.31 ¹⁾ |

注:与 A 组比较, $P < 0.01$

3 讨论

干细胞移植在治疗缺血性疾病方面已取得较大的突破^[1-2],其作用已得到肯定。但干细胞移植也有一定的局限性,主要表现在 EPCs 的质量和数量还不够理想,有待提高。利用基因修饰改善 EPCs 的质量,减少其用量是一种有前途的方法。VEGF 基因治疗性血管新生作用也已得到证实。VEGF 能增加小血管的通透性、促进内皮细胞增殖和迁移,抑制内皮细胞凋亡,并能刺激内皮细胞产生纤溶酶原激活物,从而有力地促进血管新生。其他基因如 bFGF 的促血管生成作用也有报道^[3]。转染 VEGF165 基因后的 EPCs 因具有更强大的促血管新生作用,可使需要的 EPCs 数量减少,增加了临床应用的可能^[4-5]。

腺病毒(Ad)是继逆转录病毒载体后发展较快的载体系统,已引起基因转导、基因治疗领域的普遍重视。Ad 宿主范围广,对静止和增生活跃的细胞均有感染性,转染效率高,其目的基因表达效率是质粒的 $10^3 \sim 10^4$ 倍^[6]; Ad 载体较易制备,滴度高达 10^{12} pfu/mL; 而且不整合入宿主细

胞的基因组,不会引起宿主细胞基因的插入性突变,但会使基因在细胞分裂中丢失,不能稳定及长时间地表达,一般维持 1 个月左右。Ad 作为活疫苗应用,无明显不良反应。因此,Ad 载体很适合于体内基因治疗^[7-8]。

本实验选择的转染比率为 1:50 (细胞:病毒),是常用转染比率,转染比率过低效率不够,过高则可能造成细胞损伤。为观察不同转染比率对细胞增殖的影响,本研究选择了 1:10, 1:50, 1:100 3 种转染比率进行实验。从 MTT 结果发现,1:10 转染组及 1:50 转染组细胞增殖情况基本相似,而 1:100 比率转染后,细胞的增殖处于停滞状态,同时在镜下可见细胞坏死形成碎片。这可能与过高滴度的病毒对细胞的损害有关。因此,为保证尽可能高的转染效率,而又不对细胞造成损害,笔者选择了 1:50 的转染比率。1:50 转染后 24 h 在荧光显微镜下观察可见几乎所有细胞都呈绿色荧光,说明转染效果满意。转染后的细胞继续培养并与未转染组及空质粒组对照,显示各组增殖情况无显著性差异,说明以腺病毒为载体行 VEGF 基因转染对细胞生长增殖无明显

影响。

ELISA 实验显示转染后的培养细胞上清液中 VEGF 的含量明显高于空白对照组及空质粒组。因为血管内皮细胞本身已具有分泌 VEGF 的功能,所以各组的上清液中有一定浓度的 VEGF 蛋白,这也从一个侧面证实了所培养的细胞为 EPCs。转染 VEGF165 后上清液中 VEGF 浓度显著增加,说明转染成功,同时也为细胞移植后 VEGF 在体内发挥作用提供了证据。EPCs 具有定向移植于血管生成部位的特点。同时,内皮细胞是最接近于血流的一层细胞,释放出的蛋白质很容易通过血流扩散到全身从而广泛发挥作用,因此 EPCs 是基因治疗理想的导向载体,VEGF 基因转染 EPCs 是一种有效、可行的方法。

参考文献:

- [1] Choi K, Kennedy M, Kazarov A, *et al.* A common precursor for hematopoietic and endothelial cells [J]. *Development*, 1998, 125(4): 725 - 732.
- [2] Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, *et al.* Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34 (+)

cells identifies a population of functional endothelial precursors [J]. *Blood*, 2000, 95(3): 952 - 958.

- [3] 王志伟,马秀现,李天晓,等. bFGF 联合骨髓干细胞动员促进兔缺血后肢血管新生的研究 [J]. *中国普通外科杂志*, 2007, 16(2): 136 - 139.
- [4] Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, *et al.* Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration [J]. *Circulation*, 2002, 105(6): 732 - 738.
- [5] Asahara T, Isner JM. Endothelial progenitor cells for vascular regeneration [J]. *J Hematother Stem Cell Res*, 2002, 11(2): 171 - 178.
- [6] French BA, Mazur W, Geske RS, *et al.* Direct in vivo gene transfer into porcine myocardium using replication-deficient adenoviral vectors [J]. *Circulation*, 1994, 90(5): 2414 - 2424.
- [7] Kalka C, Tehrani H, Laudenberg B, *et al.* VEGF gene transfer mobilizes endothelial progenitor cells in patients with inoperable coronary disease [J]. *Ann Thorac Surg*, 2000, 70(3): 829 - 834.
- [8] 陈仕林,张宝仁,朱家麟,等. 重组腺病毒转染兔心肌细胞的实验研究 [J]. *医学研究生学报*, 2001, 14(4): 289 - 290.

穗港海外胃肠肿瘤学术研讨会暨胃癌高级培训班第二轮通知

由中山大学附属第一医院、广东省抗癌协会胃癌专业委员会和中山大学胃癌诊治研究中心、《中国实用外科杂志》、《消化肿瘤杂志》联合主办的穗港海外胃肠肿瘤学术研讨会暨胃癌高级培训班定于 2008 年 11 月 28 日至 12 月 1 日在广州市召开。会议将邀请国内外著名专家做专题研讨和现场手术演示,欢迎国内外医师踊跃参加。参会者可获国家继续医学教育 I 学分 10 分。

征文内容:胃肠肿瘤的诊治新进展;胃肠肿瘤的扩大和缩小手术;胃肠间质瘤;胃肠恶性肿瘤微创手术的现状和前景;胃肠癌化学治疗、生物治疗的研究进展;胃肠肿瘤外科密切相关的边缘交叉学术问题。

征文要求:①使用 Word 文档格式,全文字数 4000 字符左右,摘要 600 字左右;②摘要内容应包括文题,作者单位,邮编,姓名及“目的、方法、结果、结论”;③稿件请注明准确的通讯地址、单位名称、邮政编码和联系电话,以便联系;④征文截稿日期 2008 年 10 月 30 日前(请自留底稿,恕不退稿),请务必通过电子邮箱将稿件发至 xuzee@medmail.com.cn。

主题请标明“胃肠肿瘤学术研讨会征文”。联系地址:广州市中山二路 58 号中山大学附属第一医院胃肠胰外科(邮编 510080),联系人及电话:张常华 13678987415;徐泽娥 020 - 88263393。