

· 论 著 ·

VEGF 基因真核表达载体的构建及其在骨髓间充质干细胞中的表达*

张从纪, 杨彦春, 单佑安

(第三军医大学西南医院口腔科, 重庆 400038)

摘要:目的 探讨经腺病毒表达载体转染血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)165 基因的骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)体内外基因表达的特点。方法 构建 VEGF 基因腺病毒表达载体, 将 VEGF165 基因转染到 MSCs 中。用 RT-PCR 法检测转基因 MSCs 中基因表达情况。结果 转基因 MSCs 及其分化的子代细胞均有 VEGF165 的表达, 并持续 2 周左右时间。结论 经腺病毒表达载体转染 VEGF165 基因的 MSCs 在体内外均有良好的基因表达。

关键词:血管内皮细胞生长因子; 骨髓间充质干细胞; 基因转移

中图分类号: R365.641

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)01-0004-03

Construction of vascular endothelial growth factor gene eukaryotic expression vector and its expression in mesenchymal stem cells*

ZHANG Cong-ji, YANG Yan-chun, SHAN You-an

(Department of Stomatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To detect the gene expression of rat mesenchymal stem cells (MSCs) transfected with vascular endothelial growth factor (VEGF)165 mediated by pAdTrack. **Methods** Construction of VEGF gene eukaryotic expression vector, and VEGF gene was transferred to MSCs. Gene expression of transfected cells was detected by RT-PCR. **Results** VEGF transfected MSCs could continuously express gene products during the first 2 weeks. **Conclusion** MSCs transfected with VEGF gene by pAdTrack can express gene products efficiently in vitro and in vivo.

Key words: vascular endothelial growth factor; mesenchymal stem cells; gene transfection

骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有向其他细胞分化的巨大潜能。多种生物组织工程和创伤修复研究结果充分展示了 MSCs 作为种子细胞在创伤愈合过程中的潜在应用前景^[1]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是主要的促进创伤愈合的因子^[2], 本研究将 VEGF DNA 转染到 MSCs 中, 增强其在 MSCs 中的表达, 进一步促使 MSCs 分化为成熟血管内皮细胞以加速创伤愈合过程, 为创伤的救治提供新的方法。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂 pcDNA3.0-VEGF165 质粒、携带 GFP 标记基因的 pTrack-CMV 转移载体、pAdEasy-1 腺病毒载体、菌株 DH5 α 由单佑安博士惠赠。主要试剂: Pac I、Pme I、Bgl III、Sma I、Xho I、EcoR V (Takara 公司), T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶(上海申能博彩生物技术有限公司), Lipofectamine Reagent (Invitrogen 公司), ELISA 检测试剂盒(晶美公司), MMLV 反转录酶, λ -Hind III digest DNA marker (MBI 公司), RNA 抽提试剂盒(上海 Sangon 公司)等。

1.2 MSCs 的分离与纯化 无菌条件下采集骨髓 3mL, 用 1:50 肝素抗凝, 加入等量 PBS 液洗涤离心(1 000 \times g 离心 5min), 弃上清液。加入 PBS 液 4mL 制备细胞悬液, 缓慢加入等量的 Percoll 分离液(1.073g/L)1 800 \times g 离心 20min, 收集白膜层的单个核细胞, 用 PBS 液洗涤(1 000 \times g 离心 5min)2 次, 弃上清液, 重新悬于含有 10% PBS 的 DMEM/F12 培养液中, 按 10⁵~10⁶/mL 的密度接种于 25cm² 塑料培养瓶中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度的孵育箱内培养。24h 内首次全量换液, 其后每 3~4 天半量换液, 至细胞汇合成单层后进行胰酶消化传代, 选取第 3 代细胞进行鉴定, 鉴定选用 CD29、CD34、

CD44、CD45。

1.3 VEGF 基因腺病毒表达载体的构建

1.3.1 重组转移质粒 pTrack-CMV-VEGF165 的构建 根据 VEGF165 序列设计合成上下游引物, VEGF 正义链 5'-TT-GCTGCTCTACCTCCAC-3', 反义链 5'-AATGCTTTCTC-CGCTCTG-3', 长度为 487bp。以本科室原有的经测序正确的 pcDNA3.0-VEGF165 质粒为模板, 用上述引物进行 PCR 扩增, 获得的 PCR 产物经琼脂糖电泳鉴定。将纯化的 PCR 产物和质粒 pTrack-CMV 分别经 Xho I、EcoR V 双酶切后, 用胶回收试剂盒回收目的片段, 用 T4 DNA 连接酶连接过夜, 氯化钙法转化 DH5 α 感受态菌, 挑取后单克隆, PCR 扩增, 双酶切后测序鉴定。

1.3.2 重组腺病毒载体的构建 将测序正确的 pTrack-CMV-VEGF165 基因重组质粒和空载体质粒用 Pme I 单酶切线性化, 胶回收与 pAdEasy-1 腺病毒载体用氯化钙法共转化 BJ5183 感受态, 酶切后鉴定阳性克隆, 获得重组腺病毒载体, 转化 DH5 α 感受态菌, 大量扩增阳性克隆。

1.3.3 重组腺病毒的包装及扩增 按质粒抽提试剂盒说明书操作提取重组腺病毒质粒和空载体质粒, 经 Pac I 线性化后, 按 Lipofectamine Reagent 操作说明书转染 293 细胞, 培养 3~5d 后, 在荧光显微镜下观察 GFP 荧光, 7~10d 收集细胞, 一 70 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C 反复冻融, 离心收集上清液, 获取初毒, 同法进行大量扩增, 氯化铯纯化病毒。倍比稀释法检测病毒滴度, 本实验的病毒滴度为 2.45 \times 10¹⁰ PFU/mL。

1.4 VEGF 转染体外扩增的 MSCs

1.4.1 Ad-VEGF165 转染体外扩增的 MSCs 取 3~6 代 MSCs 按 1 \times 10⁵/孔的密度接种于 24 孔板中, 培养 24h 后吸出

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30670636);重庆市自然科学基金资助项目(2006BB5095)。

培养液,加入用上述培养液作系列稀释的 Ad-VEGF165, 1×10^3 (b)、 1×10^5 (c)、 1×10^6 (d)、 1×10^7 (e)、 1×10^8 (f)、 1×10^9 (g)、 1×10^{10} (h) PFU/mL, 每个滴度加入 4 孔,另设 4 孔作为未加入病毒的空白对照(a),继续培养 48h,定期观察转染率。

1.4.2 MSCs 增殖的检测 采用 CCK-8 法检测细胞增殖,将 MSCs 按 5×10^3 /200 μ L 接种 96 孔板。分为不同滴度病毒转染组和空白对照组,24h 后,每孔加入 10 μ L CCK-8,继续培养 4h,用 WellScan MK22 型酶标仪 450nm 波长测定每个孔的吸光度值(A),连续检测 7d。绘制生长曲线,同时观察细胞形态变化。

1.4.3 MSCs 中 VEGF mRNA 含量的检测^[3] 采用 RT-PCR 法,分别于转基因后 24、48、72h 和 5、7、10、14d 按照 RNA 提取试剂盒说明书提取 MSCs 总 RNA,VEGF 引物如前所述;内参照 β -肌动蛋白 (β -actin) 5' 端引物序列为 5'-AAGGTGAC-CCAGAT-CATGTTTGAG-3',3' 端引物序列为 5'-AGGAG-GAGCAATGATCTTGATCTT-3',DNA 长度为 289bp。采用 RT-PCR 试剂盒进行 RT-PCR 反应。反应结束后取 8 μ L PCR 产物经 1.2% 的普通琼脂糖凝胶电泳后,用溴化乙锭染色,电泳完毕后在紫外灯下观察照相,密度扫描分析 PCR 产物带。将 VEGF 与 β -actin 比值作为 VEGF 表达水平的参数,对 VEGF PCR 产物相对定量。

2 结 果

2.1 pTrack-CMV-VEGF165 重组转移质粒及重组腺病毒载体的构建 以 pcDNA3.0-VEGF165 质粒为模板进行 PCR,能扩增出 VEGF165 目的片段,重组载体 pTrack-CMV-VEGF165 PCR 扩增后,经 Xho I、Eco V 双酶切后同样能释放出 487bp 大小的片段,表明 VEGF165 的基因已成功亚克隆于 pTrack-CMV 转移质粒中(图 1)。DNA 序列测定进一步证实成功构建了 pTrack-CMV-VEGF165 重组转移质粒。基因 VEGF165 成功克隆至腺病毒穿梭载体 pTrack-CMV 中,pTrack-CMV-VEGF165 重组转移质粒与骨架 DNA 在细菌 BJ5183 中成功重组出腺病毒 pAd-VEGF165,重组的腺病毒质粒经 Pac I 酶切后出现一大一小 2 个片段,大片段约 23kb,小片段约 4.0kb,与预期的谱形相同,证实重组腺病毒成功(图 2)。

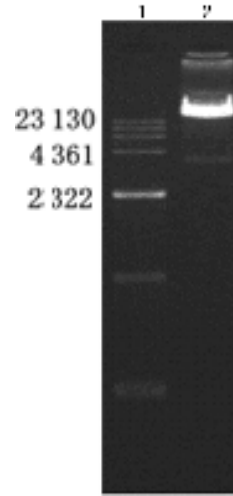


1:marker ;2:双酶切后 pTrack-CMV-VEGF165。

图 1 pTrack-CMV-VEGF165 重组转移质粒鉴定电泳图

2.2 分离、培养 MSCs 细胞 骨髓细胞培养 4h 贴壁,形态均

一,呈长梭形,贴壁细胞增殖迅速,10~14d 后接近融合呈纤维网状形态(图 3)。表面标志 CD34、CD35 阴性表达,而 CD29、CD44 阳性表达,说明所培养的细胞非造血干细胞。



1:marker;2:重组腺病毒 pAd-VEGF165 经 Pac I 酶切。

图 2 重组腺病毒 pAd-VEGF165 经 Pac I 酶切电泳图

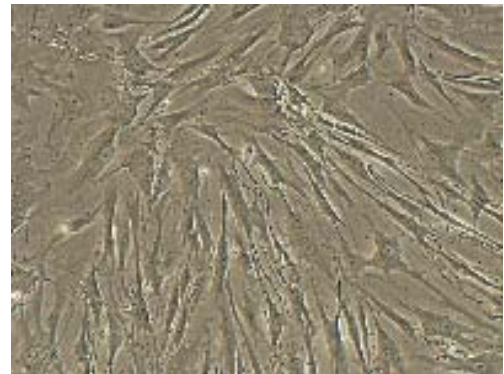


图 3 第 3 代 MSCs 形态(倒置相差显微镜,×20)

2.3 转染 VEGF165 后 MSCs 增殖及形态变化 MSCs 转染 pAd-VEGF165 后每天在荧光显微镜下观察各滴度的荧光表达,激发波长为 488nm、发射波长为 507nm,转染率=暗视野所见发绿色荧光的细胞数/明视野所见细胞数。转染后 24h 可见荧光,7d 时荧光表达最强,其不同病毒滴度的转染率: 1×10^3 PFU/mL 为 0、 1×10^5 PFU/mL 为 12%、 1×10^6 PFU/mL 为 34%、 1×10^7 PFU/mL 为 56%、 1×10^8 PFU/mL 为 78%、 1×10^9 PFU/mL 为 85%、 1×10^{10} PFU/mL 为 85%。

腺病毒载体转染后 MSCs 细胞仍贴壁生长,呈梭形或多角形,有分裂增殖,但速度有所降低。荧光显微镜下,24h 可见细胞有绿色荧光表达,但强度较低,48h 可见细胞有强烈荧光表现,呈全细胞分布,7d 荧光表达最强。CCK-8 结果提示:a、b、c 3 个组间差异无统计学意义($P > 0.05$),其余组与 a 组相比差异有统计学意义($P < 0.01$),说明病毒滴度在 10^5 PFU/mL 以下时,对细胞活力无明显影响,滴度大于 10^6 PFU/mL 时,开始对细胞增殖产生抑制,而且随剂量增加,抑制作用越明显,从细胞生长曲线还可以看出,4d 后病毒对 d、e、f、g 组细胞增殖能力的抑制渐弱,而 h 组细胞 8d 时抑制作用仍明显(图 4)。

2.4 转 VEGF 基因后 MSCs 中 VEGF 的水平变化 提取标本总 RNA,经紫外分光光度计检测 A260/A280 值为 1.8~2.0,证明无蛋白质污染。提取 RNA 总浓度为 0.5~2.0g/L。由于 β -actin 几乎存在于所有细胞中,并且含量相对稳定,

VEGF 的基因表达程度以 VEGF mRNA 相对于 β -actin mRNA 取得。由图 5 可见,转基因后于 48~72h 达到表达高峰。

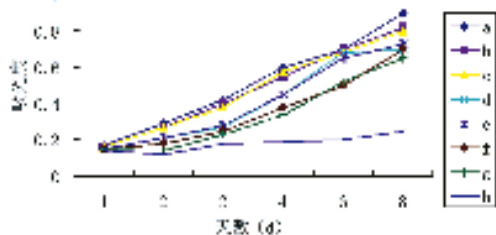


图 4 各组细胞的生长曲线

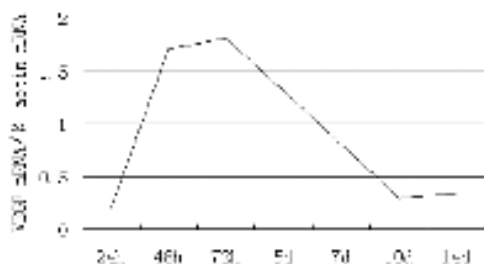


图 5 不同时间段 MSCs 中 VEGF mRNA/ β -actin mRNA 值变化情况

3 讨论

MSCs 具有向其他细胞分化的巨大潜能,近年来其分化潜能不断被发现,已彻底打破了固有的认识。中胚层起源的 MSCs 不但可分化为骨骼、肌肉等中胚层组织,也可以跨胚层分化为外胚层的神经元和上皮组织,还可分化为内胚层的心肌细胞、肝细胞和肾小管上皮细胞^[3-5]。在创伤条件下, MSCs 能分化成血管内皮细胞及表皮细胞参与创伤的修复过程,因此在生物组织工程和创伤修复的研究中 MSCs 占据了重要位置。可以设想,如果能调控 MSCs 转化为血管母细胞,继而分化为成熟血管内皮细胞,将有效地加速创伤的愈合过程,为创伤的救治提供新的方法。

机体损伤后出现协调的愈合过程,其中包括多种细胞、细胞因子和细胞外基质之间错综复杂的网络作用。细胞因子在创伤愈合过程中具有重要作用,它能调节创伤修复过程中的多种细胞反应,影响细胞增殖、迁移、细胞外基质合成和释放等^[6-7]。在众多细胞因子中,VEGF 在血管的再生过程中起着重要的作用,无论是在伤前组织还是伤后不同修复阶段的组织中,VEGF 均呈持续性阳性表达,它通过促进血管内皮细胞的有丝分裂、血管通透性的增加以及协助释放其他生长因子等方式促进局部血管的再生,被公认为首选的促血管生长因子^[8-10]。

本实验使用构建的带有 VEGF165 的重组腺病毒感染培养的 MSCs,滴度为 1×10^7 PFU/mL 时可获得 56% 的感染率,且转染率随病毒滴度的增加而有所增加, 1×10^9 PFU/mL 是转染的最佳滴度,超过此滴度不能提高其转染率,并且对细胞的毒性作用明显。对转染细胞增殖活性的生长曲线分析说明,

滴度在 1×10^5 PFU/mL 以下对细胞增殖无明显影响,随着滴度增加,对细胞的增殖有所影响,主要表现在转染病毒的早期,持续约 4d 左右,之后细胞的增殖能力渐恢复。病毒滴度在 1×10^{10} PFU/mL 时,对细胞的增殖影响最为明显。表明病毒滴度在 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^9$ PFU/mL 时,可以高效转染,并对细胞增殖影响较小,对后续研究无明显影响。

本实验结果显示, MSCs 在转染 VEGF 之后 24h 即检测到基因表达,至 72h 达表达高峰,之后逐渐下调并维持 2 周左右时间。说明外源性的 VEGF 已成功转染到目的细胞体内,并得以正常表达。虽然其表达为 2 周左右时间,但在促进创伤愈合方面可能会起到促进作用,因一般创面愈合时间为 1 周左右。

参考文献:

- [1] Asmis R, Qiao M, Rossi RR, et al. Adriamycin promotes macrophage dysfunction in mice[J]. *Free Radic Biol Med*, 2006, 41(1):165.
- [2] 张从纪,李慧增,周树夏,等.颌面部爆炸伤早期愈合过程中血管内皮生长因子及其受体表达的实验研究[J]. *重庆医学*, 2001, 30(1):8.
- [3] 周光纪,徐海伟,屈纪富,等.胚胎干细胞来源的巢蛋白阳性细胞向胰岛素分泌细胞分化的实验研究[J]. *生物医学工程与临床*, 2007, 11(2):143.
- [4] Husnain Kh, Muhammad A. Bone marrow stem cell transplantation for cardiac repair[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 288: H2557.
- [5] Braun M, Lelieur K, Kietzmann M. Purinergic substances promote murine keratinocyte proliferation and enhance impaired wound healing in mice[J]. *Wound Repair Regen*, 2006, 14(2):152.
- [6] Porock D, Nikolett S, Cameron F. The relationship between factors that impair wound healing and the severity of acute radiation skin and mucosal toxicities in head and neck cancer[J]. *Cancer Nurs*, 2004, 27(1):71.
- [7] Zhou H, Ramiya VK, Visner GA. Bone marrow stem cells as a vehicle for delivery of heme oxygenase-1 gene[J]. *Stem Cells Dev*, 2006, 15(1):79.
- [8] Croll SD, Goodman JH, Scharfman HE. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in seizures: a double-edged sword[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2004, 548:57.
- [9] 张从纪,李慧增,周树夏,等.大鼠颌下腺血管内皮生长因子 cDNA 的转移及表达[J]. *重庆医学*, 2003, 32(11):1476.
- [10] Kraus KH, Kirker-Head C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration[J]. *Vet Surg*, 2006, 35(3):232.

(收稿日期:2009-06-15 修回日期:2009-07-27)