

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2002)10-02-0118-04

脂质体介导血管内皮生长因子基因 在内皮细胞的稳定表达

刘录山¹, 张善春², 尹卫东², 危当恒², 王贵学³, 蔡绍皙³, 杨永宗²

(1. 中南大学湘雅医学院病理生理学教研室, 湖南省长沙市 410078; 2. 南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001; 3. 重庆大学生物工程学院·教育部生物力学与组织工程重点实验室, 重庆市 400044)

[主题词] 血管组织工程; 内皮细胞生长因子; 阳离子脂质体; 稳定转染

[摘要] 建立稳定表达血管内皮生长因子的人脐静脉内皮细胞系, 为在组织化工程血管的应用奠定基础。将真核表达载体 PCD₂-VEGF₁₂₁ 用阳离子脂质体介导, 转染人脐静脉内皮细胞系细胞, G418 筛选, 获得 G418 抗性单克隆细胞, 扩增后分别用逆转录聚合酶链反应、免疫组织化学及血管通透性实验检测血管内皮生长因子的转录、蛋白质的表达及其生物学活性。结果发现, 逆转录聚合酶链反应检测出了转录血管内皮生长因子的稳定转染细胞克隆, 该单克隆细胞的免疫组织化学检测血管内皮生长因子蛋白质表达呈阳性, 血管通透性实验和细胞生长实验发现其表达产物具有生物学活性, 而作为对照的转空白质粒细胞和未转染细胞上述实验结果皆为阴性。结果表明, 该方法成功建立了稳定表达血管内皮生长因子的人脐静脉内皮细胞系单克隆细胞。

[中图分类号] Q78

[文献标识码] A

The Stable Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Gene Mediated by Lipofect AMINE in Human Umbilical Vein Endothelial Cell Line Cells

LIU Lu-Shan, ZHANG Shan-Chun, YIN Wei-Dong, WEI Dang-Heng, YANG Yong-Zong, WANG Gu-Xue, and CAI Shao-Xi
(1. Department of Pharmacology, Xiangya Medical College, South Central University, Changsha 410078; 2. Institute of Cardiovascular Disease, Nanhua University, Hengyang 421001; 3. Key Lab for Biomechanics and Tissue Engineering under the State Ministry of Education, College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400044; China)

[MeSH] Vascular Tissue Engineering; Endothelial Growth Factor; Lipofect AMINE; Stable Transfection

[ABSTRACT] **Aim** To establish a human umbilical vein endothelial cell (hUVEC) line monoclonal cells with the stable expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene. **Methods** The eukaryotic expression vector PCD₂-VEGF₁₂₁ were transfected into hUVEC line cells mediated by lipofect AMINE. The positive clones were obtained by the screen of G₄₁₈. The transcription and expression of VEGF gene were investigated by RT-PCR and immunocytochemistry respectively. The experiment of Miles was applied for the assay of the biological activity of the protein of the VEGF produced by the hUVEC line cells which transfected PCD₂-VEGF₁₂₁. The growth curve was made for comparison with that of non-transfected hUVEC line cells. **Results** A positive clone cells from which transcribed the mRNA of VEGF₁₂₁ gene was obtained by RT-PCR; The positive results of the immunocytochemistry were found and the highly biological activity of VEGF in the media was detected each only in the positive clone cells. The doubling time of the positive clone cells was shorter than that of the non-transfected hUVEC line cells calculated from the growth curve. **Conclusion** The hUVEC line monoclonal cells with the stable expression of VEGF gene has been established successfully.

近年来, 在治疗狭窄和闭塞性血管疾病方面, 血管组织工程的研究取得了很大的进展, 如在病变部位放置金属血管内支架, 用涤纶、丝绸或其它材料的工程化血管取代病变血管等等。但由于工程化血管植入时易损伤血管内皮, 且作为体内的异物易致血栓形成, 以至于达不到理想的结果。为了防止工程

化血管直接暴露于血流而引起的血栓形成和防止老化, 在工程化血管表面进行各种修饰和处理是行之有效的办法。其中可能最有前景的是在工程化血管表面铺上一层内皮细胞, 如人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, hUVEC)铺盖在不锈钢血管内支架上再行血管内支架放置, 可显著降低支架表面血栓的形成。在工程化血管表面内皮化需要解决内皮细胞的稳定粘附和快速生长覆盖等问题。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种特异性促内皮细胞分裂增殖的生长因子, 在促进缺血性心肌侧枝循环的建立及促

[收稿日期] 2001-09-14 [修回日期] 2002-01-28

[基金项目] 湖南省教委基金(972009)资助。

[作者简介] 刘录山, 男, 博士研究生, 研究方向为心血管疾病预防。
张善春, 男, 硕士研究生。王贵学, 男, 硕士研究生导师, 重庆大学生物工程学院教授, 研究方向为心血管生物力学与组织工程。

进血管内皮再生防止介入治疗后再狭窄等应用研究中取得显著进展^[1-3]。其基因治疗已见报道^[4]。如果将 VEGF 基因在体外导入内皮细胞,然后用稳定表达 VEGF 的内皮细胞铺盖工程化血管,就可达到既能避免直接接触血流、降低血栓发生,又可分泌 VEGF 起到促进内皮修复的作用。基于以上设想,本实验建立了一种高效表达 VEGF 的 hUVEC 系,为用于组织化工程血管并在动物模型上研究其促内皮修复和防治再狭窄的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 PCD₂-VEGF₁₂₁ 质粒的提取、鉴定与纯化

用已构建好的真核表达质粒载体 PCD₂-VEGF₁₂₁ 转化 JM101 大肠杆菌,小量提取质粒,酶切鉴定正确后进一步纯化,-20℃保存备用。

1.2 人脐静脉内皮细胞系细胞最适 G₄₁₈ 筛选浓度的测定

0.25% 胰蛋白酶消化对数期生长的人脐静脉内皮细胞系细胞,接种 2×10^5 个细胞/孔于六孔细胞培养板,10% 小牛血清的 DMEM,37℃、5% CO₂ 恒温培养箱培养,待细胞长至 80% 融合后,以 1:12 分传于六孔细胞培养板,加入含终浓度分别为 0 mg/L、100~1 000 mg/L 的不同浓度梯度 G₄₁₈ 下培养,每四天更换一次相同的选择培养基,观察细胞生长情况,以细胞被完全杀死的最低浓度作为最适筛选浓度。

1.3 Lipofect AMINE 介导 PCD₂-VEGF₁₂₁ 转染人脐静脉内皮细胞系细胞

Lipofect AMINE 介导 PCD₂-VEGF₁₂₁ 转染方法按试剂盒上的操作步骤进行。在筛选的第 12 天,显微镜下观察,未转染加 G₄₁₈ 正常对照组细胞完全死亡时弃除培养基终止筛选。用眼科镊夹取灭菌的浸有胰酶 3 mm 见方 3 mm 滤纸,放在要选取的细胞克隆表面,消化 15 s 后取出滤纸,置加有 1 mL DMEM-10 完全培养基的 24 孔培养板中反复漂洗,弃除滤纸,显微镜下观察证实原克隆消失。重复上述步骤,选取所需的细胞克隆。细胞克隆培养扩增后,冻存保种,以备后续的各项检测。

1.4 稳定转染细胞血管内皮生长因子₁₂₁ mRNA 的检测

按 UNIQ-10 总 RNA 提取试剂盒方法提取克隆细胞总 RNA,0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定出 5 S、18 S、28 S 三条带,加入 DNA 酶除去可能的 DNA 污染,紫外分光光度计测定 RNA 含量,-70℃保存备用。设计逆转录聚合酶链反应(reverse transcriptase poly-

merase chain reaction, RT-PCR) 上游引物为: 5' GAG TAC ATC TTC AAG CCA TCC TGT GTG 3',下游引物为 5' CGC CTC GGC TTG TCA CAT TTT TCT TGT 3'; 扩增片断长度为 236 bp。使用一步法 RT-PCR 反应试剂盒(购自基因公司)按下列反应条件: 60℃20 min,一个循环,逆转录合成 cDNA,94℃变性 30 s、64℃退火 30 s、72℃延伸 45 s,30 个循环,72℃延伸 5 min,一个循环对提取的总 RNA 进行 RT-PCR 扩增; 同时在未经逆转录的情况下,直接取总 RNA 进行 PCR 扩增,以排除因 DNA 污染而导致假阳性。扩增产物经 1.7% 琼脂糖凝胶电泳后,凝胶分析系统观察、分析实验结果。另以转空白质粒克隆细胞及未转染细胞作对照。

1.5 血管内皮生长因子蛋白质的表达

将 VEGF₁₂₁ mRNA 阳性克隆细胞接种 3×10^5 个细胞于预先放置了洁净、无菌盖玻片的六孔培养板中,10% 小牛血清 DMEM 培养基 2 mL,5% CO₂、37℃ 恒温培养,待盖玻片上的细胞长至约 50%~70% 融合,取出盖玻片,pH7.4 PBS 冲洗 3 min,90% 乙醇室温下固定 10 min,PBS 冲洗 3×5 min 后,按链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶免疫组织化学染色超敏试剂盒所提供的方法染色(所加 VEGF 的第一抗体的浓度为 4 mg/L,购自 Santa Cruz Biotechnology LTD),酒精逐级脱水、二甲苯透明后,中性树胶封片。

1.6 血管通透性实验

取 300 g 左右重豚鼠,舌下静脉注射 0.5% 伊文氏蓝 1 mL。30 min 后,取稳定转染克隆细胞的培养上清液,分别以未稀释、生理盐水稀释 2 倍及 4 倍的培养基各 100 μL,于豚鼠去毛背部皮下注射,注射皮丘直径约 5 mm。同时取未转染细胞及转空白质粒细胞培养上清作相同注射为对照。注射后 15 min 内观察注射部位皮下有无蓝斑出现及其范围大小,以判断待测上清有无增强血管通透性的生物学活性及强度^[5]。

1.7 转血管内皮生长因子₁₂₁ 单克隆细胞生长曲线的绘制

接种对数期生长的阳性克隆细胞及未转染细胞各 12 孔于 24 孔细胞培养板,每孔接种 2×10^4 个细胞,10% 小牛血清 DMEM 培养基 2 mL,5% CO₂、37℃ 恒温培养。每隔 24 h 消化以上两组细胞个三孔,计数后取值作为该时间点的细胞数,绘制出细胞生长曲线。

2 结果

2.1 PCD₂-VEGF₁₂₁ 真核表达载体提取与鉴定

经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶分析系统观察可见, 酶切产物呈双带, 较轻的片断约 0.55 kb, 与目的基因大小相符, 较重的片断约 6 kb, 与载体质粒大小相符(图 1, Figure 1)。

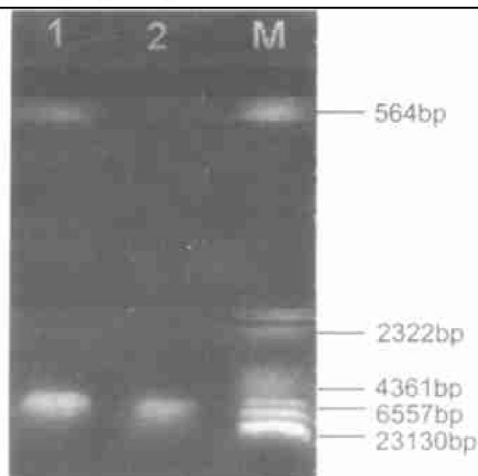


图 1. PCD₂-VEGF₁₂₁ 酶切鉴定结果。

Figure 1. Result of PCD₂-VEGF₁₂₁ identified by enzymes cutting. 1. Cor cutting by Bma HI and Xba I; 2. Cutting by Xba I; 3 DNA Marker.

2.2 人脐静脉内皮细胞系细胞 G₄₁₈ 最适筛选浓度

在实验的前三天, 各 G₄₁₈ 浓度孔及未加 G₄₁₈ 对照孔的细胞数目逐渐增多, 各孔之间无明显差别。但实验第 4 天后 600 mg/L、700 mg/L 和 800 mg/L 等高 G₄₁₈ 浓度孔细胞逐渐停止增殖, 并出现死亡, 低浓度孔仍有细胞增殖, 而对照孔细胞增殖旺盛。实验第 9 天 800 mg/L 孔细胞完全死亡, 实验第 12 天 700 mg/L 孔细胞完全死亡, 600 mg/L 及其以下浓度孔尚有数目不等的活细胞, 细胞数目随筛选浓度的减小而增多, 对照孔细胞在实验第 7 天即已长满。因此, hUVEC 系 G₄₁₈ 最适筛选浓度是 700 mg/L。

2.3 G₄₁₈ 筛选后形成克隆数比较

表 1(Table 1) 可见, 转 PCD₂-VEGF₁₂₁ 组克隆形成数明显高于转空白质粒组 ($P < 0.05$)。

表 1. 转 PCD₂-VEGF₁₂₁ 细胞组和转空白质粒细胞组 G₄₁₈ 筛选后细胞克隆数比较 ($\bar{x} \pm s$)。

Table 1. Comparison of clone numbers between PCD₂-VEGF₁₂₁ transfected group and control plasmid transfected group.

Groups	Clones
PCD ₂ -VEGF ₁₂₁ transfected	10.20 ± 1.64 ^a
Control plasmid transfected	6.20 ± 1.30

a: $P < 0.05$, Compared with control plasmid transfected group.

2.4 血管内皮生长因子₁₂₁ 基因的表达

转 PCD₂-VEGF₁₂₁ 细胞经 G₄₁₈ 筛选所获细胞克隆, 经 RT-PCR 检测, 培养、扩增成功的 A、B、C、D 四个克隆, C 和 D 克隆检出了目的基因的表达, 其中 D 克隆阳性产物条带较强、清晰, C 克隆的阳性产物条带较弱、模糊, 而 A、B 克隆未检出目的基因表达; 以总 RNA 未经逆转录就直接进行 PCR 扩增的结果呈阴性, 作为对照的未转染细胞及转空白质粒克隆细胞均未见目的基因的表达(图 2, Figure 2)。



图 2. 转染细胞逆转录聚合酶链反应结果。

Figure 2. The results of transfected cells by RT-PCR. M: pUC Mix Marker; 1, 4: D clone; 2, 5: control plasmid; 3, 6: nontransfected.

2.5 血管内皮生长因子蛋白的表达

细胞免疫组织化学检测结果显示, D 克隆细胞胞浆有棕色颗粒(图 3A, Figure 3A), 表示 D 克隆细胞转录出目的基因 mRNA, 能在蛋白质水平进行表达。而作为对照的未转染细胞和转空白质粒克隆细胞未见阳性结果(图 3B, Figure 3B)。

2.6 血管通透性实验结果

皮下注射未稀释 D 克隆细胞培养上清液的皮丘在 4 min 内即迅速变蓝, 皮下注射生理盐水稀释培养上清液的皮丘随稀释倍数的增加出现蓝斑的时间延长、范围变小。作为对照的未转染细胞、转空白质粒克隆细胞培养上清及生理盐水注射部位在 15 min 内均无皮下蓝斑出现。

2.7 转 PCD₂-VEGF₁₂₁ 单克隆细胞与未转染细胞生长曲线的比较

从生长曲线可以看出, 在相同的生长条件下转 PCD₂-VEGF₁₂₁ 细胞较未转染细胞生长速度快, 倍增时间缩短(图 4, Figure 4)。

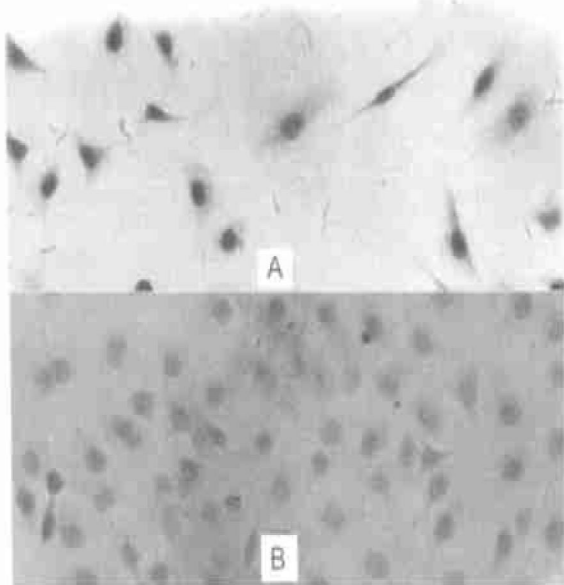


图 3. 转 PCD₂-VEGF₁₂₁ 单克隆细胞和未转染细胞免疫组织化学检测结果。

Figure 3. Immunocytochemistry results of VEGF protein expression in monoclonal cells transfected by PCD₂-VEGF₁₂₁ and non-transfected cells. A: monoclonal cells transfected by PCD₂-VEGF₁₂₁; B: non-transfected cells.

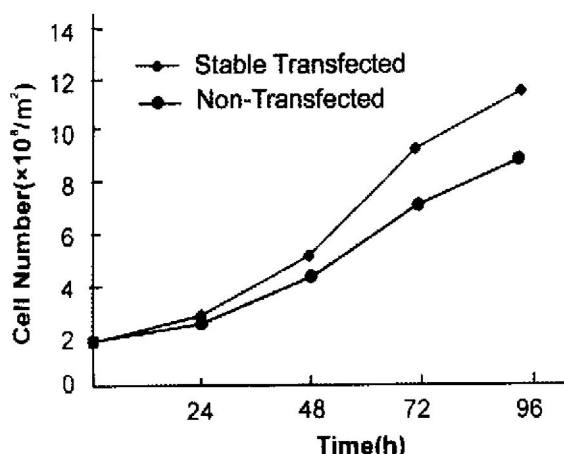


图 4. 稳定转染 PCD₂-VEGF₁₂₁ 单克隆细胞与未转染细胞生长曲线的比较。

Figure 5. Comparison of growing curve line between stable transfected monoclonal cells and non-transfected cells.

3 讨论

在血管组织工程这个跨学科的新领域中,人们利用工程学原理和技术来恢复具有病理改变的血管分子、细胞和组织的结构和功能,为心血管疾病的防治提供新的思路 and 手段,具有广阔的发展前景^[6]。心血管人工移植物如人工血管、人工瓣膜等应用于

临床所遇到的主要问题是血栓形成和钙化,致使移植失败。改善生物材料与血液的相容性以减少生物材料诱发血栓和钙化已成为研究热点。在人工移植物表面种植经体外培养的内皮细胞层,有可能解决这些问题。单纯的内皮细胞种植,其生长与功能与活体内皮细胞相比显得不足。Kader 等^[7]运用基因工程的方法构建了一过度表达 eNOS 的内皮细胞系,能明显地抑制血小板的聚集和平滑肌细胞的增殖,这提示将内皮细胞进行基因工程修饰后再种植到心血管人工移植物能更好地发挥作用。基于此,我们在本实验中用阳离子脂质体介导转染方法构建了一高效表达人血管内皮生长因子的人源性内皮细胞系^[8]。本研究用 Lipofect AMINE 介导 PCD₂-VEGF₁₂₁ 转染人 hUVEC 系细胞,经 G₄₁₈ 抗性筛选获得单细胞克隆,用 RT-PCR 检测到 VEGF mRNA 的转录明显增强,进一步用免疫细胞组织化学方法检测出 VEGF 蛋白的表达显著增加, Miles 实验证实了稳定转染 PCD₂-VEGF₁₂₁ 的细胞分泌的 VEGF 具有增强血管通透性的作用。另外,通过对细胞生长曲线的观察发现,稳定转染 PCD₂-VEGF₁₂₁ 单克隆细胞系较未转染细胞的倍增时间缩短,生长速度明显加快,说明表达的 VEGF 蛋白具有完全的生物学活性,种植到心血管人工移植物表面后将有助于加快其表面的内皮化。该稳定转染 VEGF 基因 hUVEC 系的建立,为内皮细胞在血管组织工程中的进一步应用研究奠定了基础,从而为血管组织工程学研究带来新的突破。

[参考文献]

- [1] Asahara T, Bauters C, Pastore C, et al. Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon injured rat carotid artery. *Circulation*, 1995, **91**: 2 793
- [2] Bauters C, Asahara T, Zhang LP, et al. Recovery of disturbed endothelium-dependent flow in the collateral-perfused rabbit ischemia hindlimb after administration of vascular endothelial growth factor. *Circulation*, 1995, **91**: 2 793
- [3] Isner JM, Walsh K, Symes J, et al. Arterial gene therapy for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease. *Circulation*, 1995, **91**: 2 687
- [4] 王家宁, 张群林, 葛永贵, 等. 血管内皮细胞生长因子基因治疗严重肢体缺血. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (4): 328-331
- [5] Miles AA, Mils EM. Vascular reactions to histamine, histamine liberator and lerkotaxine in the skin of guinea pigs. *J Physiol*, 1952, **118**: 228
- [6] 姜宗来, 杨向群, 张炎, 等. 血管重建与血管组织工程的基础研究. 见: 陶祖莱, 龙勉. *生物力学最新进展*. 北京, 2001, 88
- [7] Kader KN, Akella R, Ziats NP, et al. eNOS-overexpressing endothelial cells inhibit platelet aggregation and smooth muscle cell proliferation in vitro. *Tissue Eng*, 2000, **6** (3): 241
- [8] 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R. E. 等. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖、王海林译. 科学出版社, 1998, 286

(此文编辑 文玉珊)