

·基础研究·

## 腺病毒介导血管内皮细胞生长因子基因 体外转染骨髓间充质干细胞

华平<sup>1</sup>, 陈炬<sup>1</sup>, 张惠忠<sup>1</sup>, 杨淞然<sup>2</sup>, 杨艳旗<sup>1</sup>, 熊利华<sup>1</sup>, 张华<sup>1</sup>

(1. 中山大学附属第二医院心胸外科, 广东 广州 510120; 2. 广州市第一人民医院脑内科, 广东 广州 510180)

**摘要:** 【目的】探讨腺病毒介导血管内皮细胞生长因子(VEGF<sub>165</sub>)基因转染大鼠骨髓间充质干细胞(MSCs)后目的基因表达情况及对 MSCs 增殖分化的影响。【方法】构建含 VEGF 基因的腺病毒表达载体, 利用贴壁法分离培养 MSCs 后, 用荧光显微镜和流式细胞仪检测转染效果和转染率, 用免疫组化、Western-Blot 和 ELISA 方法分别检测 VEGF 基因转染 MSCs 后 VEGF 的表达情况。【结果】腺病毒介导的 VEGF 基因对于 MSCs 具有很高的转染效率, 转染效率与病毒感染复制数(multiplicities of infection, MOI)具有量效关系。MOI 为 150 倍时, 转染效率>95%, 转染 VEGF 后, MSCs 可有效表达 VEGF, 9 d 时达到表达高峰(1 125 pg/mL), 13 d 后仍可检测到 VEGF 的表达。转染 VEGF 对 MSCs 的增殖分化没有明显影响。【结论】腺病毒介导的 VEGF 基因可以有效的转染 MSCs, MSCs 是一种理想的基因载体细胞, 其携带的 VEGF 基因可获得较高的表达水平。

关键词: 血管内皮生长因子; 骨髓间充质干细胞; 腺病毒; 转染

中图分类号: R329.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)01-0001-05

### Experimental Study on Transfection of Adenovirus Containing VEGF Gene into Rat Mesenchymal Stem Cells in Vitro

HUA Ping<sup>1</sup>, CHEN Ju<sup>1</sup>, ZHANG Hui-zhong<sup>1</sup>, YANG Song-ran<sup>2</sup>, YANG YAN-qi,  
XIONG Li-hua<sup>1</sup>, ZHANG Hua<sup>1</sup>

(1. Department of Cardiothoracic Surgery, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China;  
2. Department of Neurology, The First People's Hospital of Guangzhou, Guangzhou 510120, China)

**Abstract:** 【Objective】To investigate the expression of adenovirus transfected vascular endothelial growth factor (VEGF) in rat mesenchymal stem cells in vitro and the effect of transfection on MSCs proliferation. 【Methods】A adenoviral vector containing VEGF<sub>165</sub> gene was constructed and MSCs were isolated and expanded using the preplating method. The infection efficiency of adenovirus vector to MSCs was tested by Ad.GFP infection procedure. Ad.VEGF expression in MSCs and its secretion in culture medium were measured by immunohistochemical staining, Western blot, and ELISA, respectively. 【Results】MSCs could be effectively transfected by adenovirus containing VEGF gene in vitro, the transfection efficiency has the dose-effect relationship with multiplicities of infection (multiplicities of infection, MOI). When MOI was 150, the infection efficiency was more than 95%. The expression of VEGF was traced both in cell lysate and in culture medium. A maximum production of VEGF was observed at 3~9 days after infection (1 125 pg/mL at the ninth day), and VEGF was found even in day 13. 【Conclusion】Gene transfer technology mediated by adenoviral vector can transfect VEGF gene into MSCs with high efficiency. MSCs transfected by VEGF gene could express VEGF.

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

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(1): 1-5]

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 是一种特异的与血管生长有关的因

收稿日期: 2006-09-19

基金项目: 教育部留学回国人员启动基金(2005年); 广东省自然科学基金资助项目(05300713)

作者简介: 华平(1972-), 男, 湖南衡阳人, 博士, 主治医师; 陈炬, 副教授, 通讯作者。E-mail: chenju6v@yahoo.com.cn

子,能与存在于内皮细胞表面的特异性受体结合,促进内皮细胞增值,刺激新生血管的形成<sup>[1]</sup>。骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有取材方便、体外扩增容易、易于基因操作、适合自体移植的特点,被认为是缺血性心脏病的细胞治疗和基因治疗的重要供体细胞<sup>[2,3]</sup>。我们通过构建 VEGF 腺病毒载体,并转染 MSCs,然后检查其在 MSCs 中的表达产物和表达产物的活性,同时观察转染对 MSCs 的生长、转化有无影响,为进一步采用 VEGF 进行的基因治疗和将其用于促进组织工程化心肌组织的形成和再血管化提供实验和理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

IMDM 培养基购于美国 Gibco 公司;胎牛血清(FBS)为 Hyclone 公司产品;Ficoll-paque 分离液购于 Pharmacia 公司;胰蛋白酶和 EDTA 为 Gibco 公司产品;二甲基亚砜(DMSO)购于美国 Sigma 公司;四甲基偶氮唑盐(MTT)购于美国 Sigma 公司;ELISA 试剂盒购于美国 R(D 公司;ABC 免疫组化试剂盒购于博士德生物制品公司;鼠抗人 VEGF 抗体购于博士德生物制品公司;脂质体和细胞转染试剂盒购自 Gibco 公司;hVEGF<sub>165</sub> 基因片段、大肠杆菌 DH5、真核表达载体 pcDNA3 由本实验室保存。4 周龄雄性 SD 大鼠,体质量 200~250 g,由中山大学动物实验中心提供。

### 1.2 方法

1.2.1 pcDNA3/hVEGF<sub>165</sub> 腺病毒载体的构建及鉴定 将 hVEGF<sub>165</sub> 插入 pcDNA3 的 EcoR 和 Hind III 多克隆位点,并转化 DH5 进行扩增,凝胶电泳证实 hVEGF<sub>165</sub> 已插入 pcDNA3 多克隆位点,测序证实 hVEGF<sub>165</sub> 无突变。

1.2.2 MSCs 的分离和培养 将 SD 大鼠颈椎脱臼处死后,无菌条件下取下肢长骨,显露骨髓腔,用含体积分数 15%胎牛血清的 IMDM 培养液冲洗骨髓腔获取骨髓细胞,将冲洗液收集于离心管中,2 000 r/min 离心 15 min (上海医用分析仪器厂离心沉淀仪,型号 LXJ-II, r = 4 cm),弃上清及脂肪层,取沉淀,用 IMDM 培养液混匀,轻轻地加到比重为 1.077 g/mL 的淋巴细胞分离液上,2 000 r/min 离心 10 min,收集中间的单核细胞层,用

IMDM 培养液 1 000 r/min 离心洗涤 10 min,然后收集细胞,用含体积分数 15%胎牛血清的 IMDM 培养液混匀后接种于培养瓶中,置于 37℃ 含体积分数 5%的 CO<sub>2</sub> 孵箱中培养,每 3 d 换液 1 次,原代细胞生长至 90%融合时,用 2.5 g/L 胰酶和 EDTA 消化后按 1:3 的比例传代。

1.2.3 Ad.GFP 转染 MSCs 的效率测定 大鼠 MSCs 传两代后,将细胞接种 12 孔培养板,培养至 90%融合时,弃去培养上清。为获得最佳的病毒感染 MSCs,调整病毒感染复制数(multiplicities of infection, MOI),又称为转染倍数,范围为 50~400。按 MOI 分别为 0、50、100、150、200、400 加入纯化的 Ad.GFP 液(5×10<sup>8</sup> pfu),体积以 PBS 定容为 100 μL,另每孔加入 100 μL IMDM 培养液,转染 2 h 后换含血清的培养液体积分数 5%CO<sub>2</sub>,37℃ 条件下培养 48 h 后检测荧光。荧光显微镜及流式细胞仪检测转染率:转染 48 h 后在荧光显微镜下观察绿色荧光强度,消化细胞,用 IMDM 培养液洗细胞 1 次,重悬于 20 g/L 多聚甲醛中,流式细胞仪检测转染细胞比例。

1.2.4 免疫组化法检测 Ad.VEGF 转染 MSCs 后 VEGF 蛋白的表达情况 MSCs 传两代后,胰酶消化,铺盘于事先放置盖玻片的 6 孔板内,每孔细胞数量为 5×10<sup>5</sup>,两天后细胞贴壁生长于盖玻片上。分为 3 组:转染 Ad.VEGF;转染 Ad.GFP,空白对照组。转染 MOI=150,方法同前(因为发现 MOI=150 时,转染率可达到 95%以上)。细胞转染 72 h 后,中性缓冲福尔马林室温固定 30 min,灭活内源性过氧化物酶,1:50/PBS 正常血清封闭。按 1:100 稀释抗(鼠抗人 VEGF 单克隆抗体)加在玻片上,于 37℃ 反应 1 h,以 1:100 稀释抗(羊抗鼠 IgG),37℃ 反应 30 min,加 SABC 反应 20 min, PBS 洗 2 次。然后用 DAB 显色,苏木素复染,常规脱水,封片,观察。以 PBS 代替抗作阴性对照。

1.2.5 Western blot 鉴定 VEGF 的表达 收获 Ad.VEGF 转染细胞,用 PBS 漂洗细胞 3 次,加入细胞裂解液,使细胞浓度为 10<sup>7</sup>/mL,冰浴 30 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,按 10 μg/mL 加入蛋白酶抑制剂,-20℃ 冻存备用。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。转膜、免疫印迹:PBST 洗涤 4 次,将膜放入可密封的塑料袋,加 5 mL 封闭液旋转摇动 60 min,倾去封闭液,加入鼠抗人 VEGF 抗体工作液,室温下旋转摇动

60 min, 取出膜, 200 mL PBST 洗 4 次, 每次 15 min, 将膜放入新的可密封的塑料袋中, 加入稀释的羊抗鼠二抗, 室温持续摇动 60 min, 200 mL PBST 洗膜 4 次, 每次 15 min, 碱性磷酸酶显色液中显色。

### 1.2.6 ELISA 法测定培养上清中 VEGF 的含量

参照 ELISA 试剂盒说明。在 96 孔板待检孔内加入 50  $\mu$ L 检测稀释液 RDIW, 每孔中加入 200  $\mu$ L 标准品或待检标本, 室温下孵育 2 h, 吸出检测孔内液体, 使用冲洗缓冲液清洗 3 次, 每孔内加入 200  $\mu$ L VEGF 抗体, 室温孵育 2 h, 吸出检测孔内液体, 使用冲洗缓冲液清洗 3 次, 每孔加入 200  $\mu$ L 底物溶液, 室温下避光孵育 20 min, 每孔内加入 50  $\mu$ L 终止液, 在检测波长为 450 nm、校正波长 570 nm 酶联仪上读取吸光度值 (A), 根据标准品测定结果, 计算被检测培养上清内 VEGF 含量。

### 1.2.7 检测转染 Ad.VEGF 对 MSCs 细胞增殖的影响

将细胞接种于 96 孔培养板, 每孔 100  $\mu$ L IMDM 培养液, 24 h 后将 Ad.VEGF 和 Ad.GFP 转染细胞, 48 h 后每孔加入 MTT 10  $\mu$ L, 弃培养液, 每孔加入 DMSO 150  $\mu$ L, 振荡 10 min, 570 nm 波长测定。

### 1.3 统计学处理

SPSS10.0 统计软件对数据进行分析, 所有数据用  $\bar{x} \pm s$  形式表示, 统计学处理采用 t 检验,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 pcDNA3/ hVEGF<sub>165</sub> 的鉴定

琼脂糖凝胶电泳结果显示 hVEGF<sub>165</sub> 片段大小约 560 bp, pcDNA3, hVEGF<sub>165</sub> 连接产生 pcDNA3/hVEGF<sub>165</sub> 大小约 6 kb, 经过 EcoR 和 Hind 双酶切后产生 2 个片段分别约 5.4 kb 和 560 bp, hVEGF<sub>165</sub> 经测序证实无突变。

### 2.2 Ad. GFP 转染 MSCs 的效率测定

用不同滴度的 Ad.GFP 转染 MSCs 后分析 GFP 的表达。在 Ad.GFP 转染培养细胞 48 h 后, GFP 的表达明显增强 (图 1)。荧光显微镜下可见 2 种亚群结构: 型细胞 (又称 RS 细胞) 较少, 细胞形态较小呈梭性 (RS-1) 或圆球型 (RS-2), 折光性较强, 生长较快; 型细胞为宽大、扁平的成熟的 MSCs, 细胞形态宽大扁平, 折光性较弱。

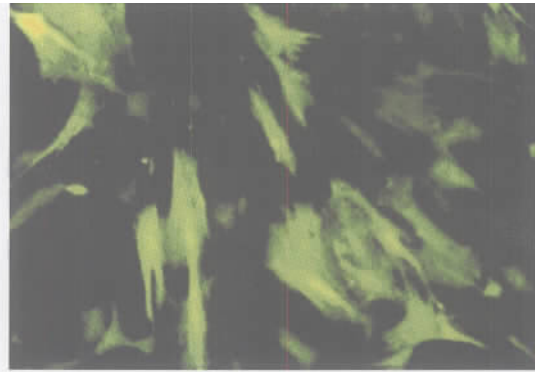


图 1 Ad.GFP 转染 MSCs 后荧光显微镜下形态  
Fig.1 Micrograph of MSCs transfected by Ad.GFP

在 50、100、150、200、400 5 个不同 MOI 条件下, 转染效率在 69%~98% 之间。结果显示: 当 MOI 150 时, 腺病毒的转染效率与病毒剂量呈明显的正相关, 当 MOI 在 150 以上时, 转染率趋于稳定, 均在 95% 以上 (图 2)。

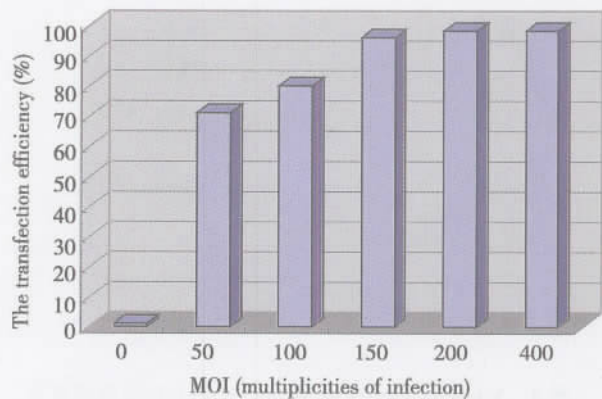


图 2 不同 MOI 浓度条件下转染效率

Fig.2 The transfection efficiency with different MOI

### 2.3 Ad.VEGF 转染骨髓间充质干细胞表达情况

免疫组化检查: 可见 Ad.VEGF 转染组呈明显阳性反应, MSCs 胞浆内充满棕褐色颗粒 (图 3), 而 Ad.GFP 转染组和对照组均为阴性。Western blot 检测: Ad.VEGF 转染 MSCs 3 d 后, 细胞裂解产物中 VEGF 含量明显高于 Ad.GFP 转染组和对照组 (图 4)。ELISA 检测 Ad.VEGF 转染上清中 VEGF 的表达情况: 在转染 Ad. VEGF 后 48 h 开始, 每 48 h 收集培养上清, 直至第 13 天, ELISA 检测 VEGF 表达。结果显示: 转染组上清中 VEGF 的分泌水平明显高于空白对照组 ( $t = 3.31$ ,  $P < 0.01$ )。转染后 48 h, VEGF 就已经有了显著表达, 至第 9 天达到高峰, 此后随着时间的推移,

VEGF表达逐渐下降,但仍保持在一个可检测水平之上,并持续至 13 d 以后(图 5)。



图 3 Ad.VEGF 转染 MSCs 后 VEGF 免疫组化染色  
 Fig.3 VEGF Immunohistochemistry in MSCs transfected by Ad.VEGF (×200)

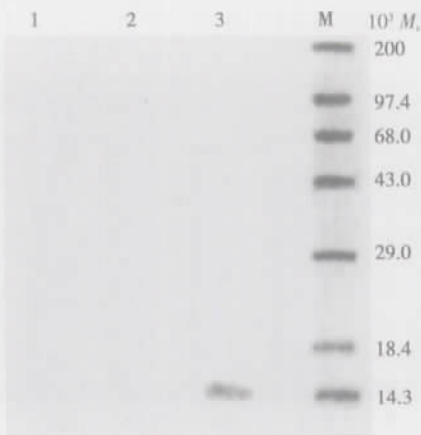


图 4 Western blot 检测 MSCs 中 VEGF 蛋白的表达  
 Fig.4 Western blot analysis of the VEGF protein expression in MSCs

1: control; 2: transfected by Ad.GFP; 3: transfected by Ad.VEGF; M: marker



图.5 ELISA 测定 VEGF 表达  
 Fig.5 ELISA analysis of the VEGF protein expression

#### 2.4 转染 Ad.VEGF 对 MSCs 增殖的影响

在转染 Ad.VEGF 24 h 后用 MTT 法检测

MSCs 的增殖情况,结果显示 VEGF 对 MSCs 的增殖没有明显影响(图 6)。

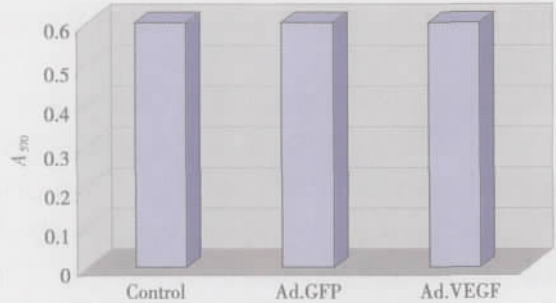


图 6 转染对 MSCs 增殖的影响  
 Fig.6 The effect of transfection on MSCs proliferation

### 3 讨 论

血管内皮细胞生长因子(VEGF)是机体内促进血管生长最主要的生长因子,VEGF 特异性地作用于内皮细胞,促进其增殖和血管生成。因此,以 VEGF 为基础的治疗性血管生成的研究备受关注。在 VEGF 基因成功应用于治疗肢体缺血后<sup>[4]</sup> 近年来人们尝试用 VEGF 基因治疗心肌缺血<sup>[5,6]</sup>。骨髓间充质干细胞(MSCs)由于具有多向分化潜能、容易在体外扩增和可自体移植的特性<sup>[7]</sup>,近年来作为良好的移植细胞来源被用于治疗心肌缺血。已有一些研究表明, MSCs 易于接受外源性基因的导入和表达,可被用于基因载体治疗某些疾病,是一种理想的外源基因转移的靶细胞<sup>[8]</sup>。基因治疗中选择安全高效的载体是关键,目前用于介导血管生长因子基因的载体种类较多,如裸质粒、脂质体和腺病毒等。而腺病毒载体能高效感染多种细胞,因而被广泛用于基因转移的研究中<sup>[9,10]</sup>。

本实验通过腺病毒载体成功的将绿色荧光蛋白 GFP 报告基因和 VEGF 基因分别转入了 MSCs 内,我们观察到用 Ad.GFP 转染 MSCs 后在荧光显微镜下绿色荧光显示的各种形态的细胞与光镜下见到的形态结构相似。本实验结果显示,应用携带报告基因 GFP 的腺病毒载体 (Ad.GFP) 体外转染 MSCs,在 150~400 的转染倍数 (MOI) 范围内可以获得比较稳定的转染效率,转染效率都大于 95%,并且 MOI 为 150 是较为合适的转染倍数,这说明 MSCs 对于腺病毒是易感细胞。我们采用的腺病毒介导 GFP 在 MSCs 表达为基因功能的研究提供一

个理想的模型,可以用于在体内外研究 MSCs 的增殖、分化、归巢、细胞间的相互作用和体内外示踪,标记有 GFP 的 MSCs 还可用流式细胞仪进行分选纯化,较其它系统和荧光染料具有优势<sup>[11]</sup>。

在我们的实验中,通过免疫组化和 Western blot 检测发现转染了 Ad.VEGF 基因的 MSCs 可以稳定表达外源性 VEGF 蛋白。ELISA 检测显示,腺病毒转染 MSCs 48 h 后,培养上清中已经开始有 VEGF 的产生,以后逐渐升高,到第 9 天时表达达到高峰,此后表达水平逐渐下降,但仍能维持在一定水平的 VEGF 表达,并持续至转染后 13 d 左右。因此,我们推断:如果保证在转染后 3 d 内将靶细胞移植至缺血心肌内,将可以保证 VEGF 的分泌高峰期位于宿主体内。我们同时观察到 VEGF 转染 MSCs 效率较高,转染后的 MSCs 增殖力和活力也不受影响。因此采用基因转染的方法将 VEGF 导入 MSCs 中就有可能使 MSCs 在发挥心肌修复作用的同时表达分泌 VEGF,从而促进血管的生成,有利于血管化心肌组织的新生,提高组织工程心肌组织修复缺血心肌的效果。

因此,将 MSCs 细胞移植和 VEGF 基因治疗紧密结合,通过有效目的基因转染入靶细胞,将为下一步的体内移植实验打下基础,亦为基因治疗缺血性心脏病提供了新思路。当然如何适时调控 VEGF 表达以及如何解决腺病毒引起的免疫排斥反应等问题还需要大量深入研究,也将是今后的研究重点。

#### 参考文献:

- [1] SHENG Q H, ZHU G Y, ZHOU A R, et al. Vascular endothelial growth factor gene therapy for peripheral artery disease: experimental study[J]. Natl Med J China, 1999, 79(3):129- 132.
- [2] PITTENGER M F, MACKAY A M, BECK S C. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cell[J]. Science, 1999, 284(2):143- 147.
- [3] WOLLERT K C, DREXLER H. Mesenchymal stem cells for myocardial infarction: promises and pitfalls[J]. Circulation, 2005, 112(2):151- 153.
- [4] OHARA N, KOYAMA H, MIYATA T, et al. Adenovirus-mediated ex vivo gene transfer of basic fibroblast growth factor promotes collateral development in a rabbit model of hind limb ischemia[J]. Gene Ther, 2001, 8(11): 837- 845.
- [5] E-GENDI H, VIOLARIS A G, FOALE R, et al. Endogenous, local, vascular endothelial growth factor production in patients with chronic total coronary artery occlusion: further evidence for its role in angiogenesis [J]. Heart, 2002, 87(2):158- 159.
- [6] WANG H, KEISER J A, OLSZEWSKI B, et al. Delayed angiogenesis in aging rats and therapeutic effect of adenoviral gene transfer of VEGF[J]. Int J Mol Med, 2004, 13(4):581- 587.
- [7] 华 平,熊利华,张 华,等. 体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞[J]. 中山大学学报:医学科学版, 2004, 25(1): 67- 69.
- [8] CHEN S L, FANG W W, QIAN J, et al. Improvement of cardiac function after transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in patients with acute myocardial infarction [J]. Chin Med J (Engl), 2004, 117(10):1443- 1148.
- [9] HENRY T D, ANNEX B H, MCKENDALL G R, et al. The viva trial: vascular endothelial growth factor in ischemia for vascular angiogenesis. Circulation [J]. 2003, 107(10):1359- 1365.
- [10] DULAK J, SCHWARZACHER S P, ZWICK R H, et al. Effects of local gene transfer of VEGF on neointima formation after balloon injury in hypercholesterolemic rabbits[J]. Vasc Med, 2005, 10(4):285- 291.
- [11] ZHANG D, GAI L, FAN R, et al. Efficacy and safety of therapeutic angiogenesis from direct myocardial administration of an adenoviral vector expressing vascular endothelial growth factor 165[J]. Chin Med J (Engl), 2002, 115(5):643- 648.

(编辑 张敏瑞)