文章编号:1000-5404(2006)09-0883-03

论著

内皮抑素重组腺病毒表达载体的构建及其对血管内皮细胞增殖特性的影响

唐 辉,刘旭盛,梁晚益,李金玺,张小蓉,黄跃生 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 构建含有人内皮抑素(endostatin, ES)基因的重组腺病毒 Ad/hEnd,并探讨与感染该病毒的角朊细胞共培养时内皮细胞增殖特性的改变。**方法** 以人胎肝组织 mRNA 为模板,通过 RT-PCR 及 PCR 获得 ES 基因序列,插入到腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV 中,获得重组质粒 pAdTrack-ES。经鉴定后将阳性重组子转化至 pAdeasy1 受体菌,筛选阳性克隆。脂质体介导转染 293 细胞,获取 Ad/hEnd,经 PCR 鉴定及上清中 ES 含量检测后,感染角朊细胞,并采用套皿法与内皮细胞共培养,测定培养液中 ES 含量、内皮细胞凋亡及细胞抑制率。**结果** 成功获取 Ad/hEnd,病毒滴度可达 1.65×10^{12} pfu/L。感染 Ad/hEnd 的角朊细胞可有效表达并分泌 ES,连续培养 3 d 后,培养液中 ES 含量可达 226 ng/ml;与转基因角朊细胞共培养的内皮细胞凋亡百分数与抑制率分别为(32.7±7.1)%、(60.5±8.3)%,均显著高于对照组[(7.3±2.0)%、(13.8±1.6)%],($P<0.01$)。**结论** 与内皮细胞共培养时,转 Ad/hEnd 角朊细胞可通过分泌 ES 促进内皮细胞凋亡,并抑制其增殖。

关键词:内皮抑素;腺病毒载体;内皮细胞;增殖
中图法分类号:Q782; R332.12; R329.28 **文献标识码**:A

Construction of recombinant adenovirus vector expressing human endostatin and its effect on characteristics of human dermal microvascular endothelial cell proliferation

TANG Hui, LIU Xu-sheng, LIANG Wan-yi, LI Jin-xi, ZHANG Xiao-rong, HUANG Yue-sheng (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct a recombinant adenovirus vector expressing human endostatin (ES), and investigate its effect on the characteristics of proliferation of human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC). **Methods** The ES gene derived from human hepatic tissue by RT-PCR and PCR was inserted into the shuttle plasmid pAdTrack-CMV. After identified by endonuclease and sequencing, the recombinant shuttle plasmid pAdTrack-ES was transformed into *E. coli.* BJ5183-AD-1 cells to obtain the homologous recombination. The adenovirus Ad/hEnd was generated in 293 cells and identified by PCR and fluorescence microscope. The keratinocytes were infected with Ad/hEnd, and co-cultured with HDMEC. The content of ES, apoptosis and inhibition ratio of HDMEC were detected. **Results** Ad/hEnd was constructed and the titer of virus was generally up to 1.65×10^{12} phaque forming units per liter (pfu/L). The endostatin expression by Ad/hEnd-infected keratinocytes reached 226 ng/ml after 3-day co-culture. The apoptosis percentage and the cell inhibition ratio of the HDMEC co-cultured with Ad/hEnd-infected keratinocytes were significantly higher than those in control group. **Conclusion** The Ad/hEnd was successfully constructed and its co-culture with Ad/hEnd-infected keratinocytes could promote apoptosis and inhibit the proliferation of the endothelial cells through excretion of endostatin.

Key words: endostatin; adenoviral vector; endothelium; proliferation

抢救生命、维护功能和恢复烧伤部位外观是烧伤救治的三大任务。随着大面积烧伤患者存活率的提高,越来越多的患者保住了生命,但愈后瘢痕增生严重损害了患者烧伤部位的功能和外观,降低了他们的生活质量。已有研究表明,内皮细胞在烧伤后瘢痕增生过程中起着重要作用[1]。抑制内皮细胞生长可以在一定程度上减轻瘢痕增生。本研究基于 ES 能特异性抑制内皮细胞增殖和在体血管生成的特点,构建携带

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30100196)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30100196)
作者简介:唐 辉(1979-),男,重庆市人,硕士研究生,医师,主要从事创面愈合与瘢痕防治方面的研究。电话:(023)60608809, E-mail: tanghui9791@sina.com
通讯作者:刘旭盛,电话:(023)68752865, E-mail:liuxusheng2002@hotmail.com
收稿日期:2005-07-27;**修回日期**:2006-02-20

人 ES 基因的重组腺病毒，并转染至角朊细胞，探讨与后者共培养时内皮细胞增殖特性的变化，为下一步采用转染 ES 基因的角朊细胞培养后自体移植，加速创面封闭并抑制愈合后瘢痕形成研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 质粒 pAdTrack-CMV 购自 Stratagene 公司；脂质体 Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogene 公司；ES 检测试剂盒购自 Oncogene 公司；Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒购自 R&D 公司。

1.1.2 菌株与细胞株 大肠杆菌 *E. coli.* DH5α，pAdeasy1 受体菌及 293 细胞由本所保存。

1.2 方法

1.2.1 PCR 引物设计 参照 GenBank 上的 ES 序列设计引物，序列如下：P1（含 *Hind* Ⅲ酶切位点）：5′- ATTAAGCTTATG-CACAGCCACCGCGACTTCC-3′；P2（含 *Not* Ⅰ酶切位点）：5′-TATGCGGCCGCCTACTTGGGGCAGTCAGT-3′。

1.2.2 pAdTrack-ES 的构建与鉴定 以人胎肝组织 mRNA 为模板，通过 RT-PCR 及 PCR 的扩增产物经 *Not* Ⅰ及 *Hind* Ⅲ双酶切后定向插入至 pAdTrack-CMV，获得 pAdTrack-ES，用 *Not* Ⅰ/*Hind* Ⅲ双酶切及 PCR 扩增 ES 片断鉴定，并行测序。

1.2.3 pAd/hEnd 的同源重组及其鉴定 将 *Pme* Ⅰ酶切线性化的 pAdTrack-ES 转化至 pAdeasy1 受体菌，筛选获得重组腺病毒载体 pAd/hEnd。用 *Pac* Ⅰ酶切鉴定，并行测序。

1.2.4 Ad/hEnd 的产生与鉴定 常规培养 293 细胞，待细胞汇合至 90% 左右时，经 Lipofectamine™2000 介导，将 *Pac* Ⅰ酶切线性化的 pAd/ hEnd 转染 293 细胞，培养 7～12 d 后可观察到细胞病变效应。收集完全病变的细胞及培养液，离心后弃上清，于 -70 ℃和 37 ℃中冻融 5 次，上清加入 293 细胞中继续感染。提取病毒 DNA，行 PCR 鉴定。

1.2.5 转染 293 细胞后 ES 表达检测 采用 ELISA 法，具体操作按 ES 检测试剂盒说明书。

1.2.6 Ad/hEnd 的纯化与滴度测定 将鉴定为正确重组的 Ad/hEnd 扩增，收集细胞裂解上清，用 CsCl 梯度超速离心法纯化病毒（40 000 r/min，18 h）。滴度检测采用空斑法[2]。

1.2.7 细胞分离培养 常规培养小儿包皮角朊细胞，待其 80% 左右汇合时，加 Ad/hEnd 病毒感染。按姜笃银等[3]的方法分离、培养人真皮微血管内皮细胞（human dermal microvascular endothelial cells，HDMEC）。按王培勇等[4]的方法将 Ad/hEnd 病毒感染的角朊细胞或未转染的角朊细胞（对照）与内皮细胞（传代 2 次）分别接种于微孔滤膜套皿和 24 孔培养板中共培养。

1.2.8 培养液中 ES 检测 方法同 1.2.5。

1.2.9 内皮细胞凋亡检测[5] 用 Annexin V-FITC 标记，流式细胞仪检测。

1.2.10 细胞抑制率测定 采用 MTT 法。按上述方法建立共培养体系 48 h 后向 96 孔培养板中加入 20 μl/孔 MTT 溶液，继续培养 4 h，各孔加入酸化的异丙醇 100 μl，37 ℃温浴 1 h，取出微孔底膜套皿。将各孔充分混匀并去除气泡后置酶标仪检测 595 nm 的 *D* 值，计算抑制率，抑制率（%）=［对照组 *D*（595）值 - 实验组 *D*（595）值］/对照组 *D*（595）值 ×100%。

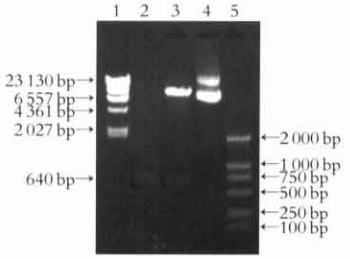
1.3 统计学分析

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 软件进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 pAdTrack - ES 穿梭质粒的鉴定

用 *Not* Ⅰ/*Hind* Ⅲ双酶切 pAdTrack-ES，1.5 % 琼脂糖凝胶电泳；以 pAdTrack-ES 为模板进行 PCR 扩增，均可见 640 bp 目的片段，提示克隆正确。结果见图 1。重组穿梭质粒插入序列由大连宝生物公司测序，结果与已发表的 ES 序列相符。

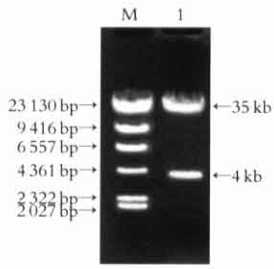


1：λ-*Hind* Ⅲ标准；2：PCR 验证；3：*Not* Ⅰ及 *Hind* Ⅲ双酶切产物；4：pAdTrack-ES 质粒；5：DL2000 标准

图 1 pAdTrack-ES 穿梭质粒的鉴定

2.2 腺病毒同源重组的鉴定

Pac Ⅰ酶切阳性重组子 pAd/hEnd，0.7 % 琼脂糖凝胶电泳（图 2）。同源重组前，pAdeasy1 质粒只有一个 *Pac* Ⅰ酶切位点，重组后 pAd/hEnd 质粒中有两个，酶切后产生 35 kb 和 4 kb 左右的两条片断。插入部分片段测序结果也证实其与 ES 基因序列一致。



M：λ-*Hind* Ⅲ 标准；1：*Pac* Ⅰ酶切产物

图 2 腺病毒同源重组的鉴定结果

2.3 重组腺病毒转染 293 细胞

将 pAd/hEnd 转染至 293 细胞，培养 3 d 开始出现细胞病变效应。12 d 后提取病毒 DNA，PCR 扩增出 640 bp 的目的条带。将鉴定后的病毒上清重复感染 293 细胞，直至全部细胞出现病变效应，反复冻融离心收集病毒，CsCl 纯化后用空斑方法检测，病毒滴度为 1.65×10^{12} pfu/L。

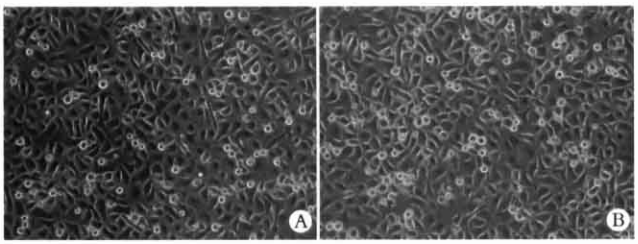
2.4 检测培养液上清 ES 蛋白的浓度

ES 在 Ad/hEnd 感染 293 细胞后第 1 天即可表达，100 MOI

的病毒感染后第3天表达最强，平均达到526 μg/L。

2.5　角朊细胞分离培养

倒置显微镜下角朊细胞呈梭形（图3），内皮细胞呈梭形或圆形。



A：转染前；B：转染后

图3　角朊细胞　（倒置显微镜×100）

2.6　培养液中ES浓度变化

转染角朊细胞可有效表达ES，并将其分泌到培养液中，连续培养3 d，ES浓度分别为（54±4.8）、（179±5.1）、（226±7.8）ng/ml。未转染角朊细胞（对照）培养液未检测出ES。

2.7　内皮细胞凋亡检测结果

由于凋亡细胞DNA发生降解，用PI染色后经流式细胞仪可以检测细胞凋亡峰，并计算出凋亡细胞百分数。结果表明，与Ad/hEnd病毒感染的角朊细胞共培养的内皮细胞凋亡百分数为（32.7±7.1）%，显著高于对照组（7.3±2.0）%（$P<0.01$）。

2.8　细胞抑制率

与Ad/hEnd病毒感染的角朊细胞共培养48 h的内皮细胞抑制率为（60.5±8.3）%，显著高于对照组（13.8±1.6）%（$P<0.01$）。

3　讨论

角朊细胞和内皮细胞增殖都是创面愈合的重要条件。在创面愈合之初，伤口成纤维细胞与内皮细胞等增殖形成肉芽组织填充伤口是创面愈合的前提[6]。但炎性细胞和受损内皮细胞可释放多种细胞因子，刺激内皮细胞增殖和迁移形成新的毛细血管。在创面愈合后期，微血管因内皮细胞的过度增殖而堵塞，导致瘢痕组织内持续的低氧状态，刺激成纤维细胞胶原蛋白合成[7]。可见，内皮细胞增殖在瘢痕增生中具有重要作用。由此推断，抑制内皮细胞增殖可能是减轻瘢痕增生的有效措施。

目前研究已知，ES为胶原XVⅢC末端片段，含183个氨基酸，分子质量为18×10^3，其基因为一保守序列，且ES具有抑制血管内皮细胞增殖的特点[8]。本实验主要构建了含有人ES基因的重组腺病毒Ad/hEnd，并探讨与感染该病毒的角朊细胞共培养时内皮细胞增殖特性的改变。实验先获取Ad/hEnd，用Ad/hEnd感染人皮肤角朊细胞，并用微孔套皿将其与HDMEC共培养，观察内皮细胞增殖与凋亡特性的改变。实验结果表明：Ad/hEnd感染的角朊细胞可有效表达并分泌ES蛋白，连续培养3 d，培养液中ES含量可达226 ng/ml；同时，与Ad/hEnd感染的角朊细胞共培养的内皮细胞凋亡百分数及抑制率分别为（32.7±7.1）%、（60.5±8.3）%，均显著高于对照组[（7.3±2.0）%、（13.8±1.6）%]，（$P<0.01$）。说明感染Ad/hEnd的角朊细胞与内皮细胞共培养时，转基因角朊细胞可通过分泌ES促进内皮细胞凋亡，并抑制其增殖。本实验中，采用微孔套皿将其与HDMEC共培养，可使转基因角朊细胞分泌的ES蛋白通过微孔作用于与之共培养的HDMEC，能较好地模拟创面愈合过程中角朊细胞对HDMEC的作用。

本研究证明，转基因角朊细胞可通过分泌ES促进与其共培养的内皮细胞凋亡，并抑制其增殖。由此推断，采用大规模角朊细胞培养，结合基因转染后自体移植技术，有可能发展为加速严重烧伤患者创面封闭，抑制愈合后瘢痕过度增生的有效治疗手段[9]。同时，本部分细胞学研究为后阶段转基因角朊细胞培养后自体移植抑制瘢痕增生的在体研究奠定了基础。

参考文献：

[1] 钱　利，赵柏程，皮　立，等. 瘢痕组织中微血管数和TSP-1 mRNA表达[J]. 中国现代医学杂志，2004，14(2)：21－24.

[2] BETT A J, HADDARA W, PREVEC L, *et al.* An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3[J]. Proc Natl acad Sci USA, 1994, 91(19)：8802－8807.

[3] 姜笃银，胡大海，汤朝武，等. 人增生性瘢痕组织中微血管内皮细胞的分离、纯化和培养[J]. 第四军医大学学报，2000，21(11)：1359－1362.

[4] 王培勇，刘　健，于中和，等. 缺氧时肺动脉内皮细胞与肺动脉平滑肌细胞增殖的相互影响[J]. 生理学报，1998，50(2)：199－205.

[5] MEINTIERES S, MARZIN D. Apoptosis may contribute to false-positive results in the *in vitro* micronucleus test performed in extreme osmolality, ionic strength and pH conditions[J]. Mutat Res, 2004, 560(2)：101－118.

[6] MENDOZA L, VALCARCEL M, CARRASCAL T, *et al.* Inhibition of cytokine－induced microvascular arrest of tumor cells by recombinant endostatin prevents experimental hepatic melanoma metastasis[J]. Cancer Res, 2004, 64(1)：304－310.

[7] ZHANG Q, WU Y, ANN D K, *et al.* Mechanisms of hypoxic regulation of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression in keloid fibroblasts[J]. J Invest Dermatol, 2003, 121(5)：1005－1012.

[8] BERGER A C, FELDMAN A L, GNANT M F, *et al.* The angiogenesis inhibitor, endostatin, does not affect murine cutaneous wound healing[J]. J Surg Res, 2000, 91(1)：26－31.

[9] WILGUS T A, BERGDALL V K, TOBER K L, *et al.* The impact of cyclooxygenase-2 mediated inflammation on scarless fetal wound healing[J]. Am J Pathol, 2004, 165(3)：753－761.

（编辑　张大春）