论著

文章编号:1000-5404(2006)18-1854-03

VEGF165基因转染真皮多能干细胞的实验研究

刘志君[1],徐 辉[2],粟永萍[2],冉新泽[2],许川山[3] (第三军医大学:[1]大坪医院野战外科研究所创伤实验室,重庆 400002,[2]军事预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038;[3]重庆医科大学超声影像学研究所,重庆 400010)

提 要:目的 为获得高表达生物活性血管内皮细胞生长因子VEGF165的皮肤种子细胞,拟将转基因治疗与真皮多能干细胞相结合,为难愈性创面的促愈治疗奠定基础。**方法** 构建真核表达载体pIRES2-EGFP-VEGF165,经脂质体法介导转染真皮多能干细胞;半定量RT-PCR检测VEGF165 mRNA的表达,Western blot和酶联免疫ELISA法检测VEGF蛋白的表达;并检测了表达产物的生物活性及转染VEGF(dermal multipotential stem cells, DMSCs)增殖活性的变化。**结果** 转染后VEGF165 mRNA和VEGF蛋白的表达均显著增强($P<0.01$),约为对照组的1.6倍,且转染VEGF后DMSCs的培养上清显著提高hECV304细胞增殖活性($P<0.01$)。MTT结果显示转染VEGF后DMSCs增殖活性显著增高,约为转染空载体组DMSCs的2倍($P<0.01$)。**结论** 成功获得了高水平表达并分泌具有生物活性的VEGF的基因治疗种子细胞DMSCs,为下一步动物在体进行基因治疗打下了基础。

关键词:VEGF165;DMSCs;基因疗法

中图法分类号:R322.991;R394-33;R394.2 **文献标识码**:A

Experimental study on VEGF165 transferred dermal multipotential stem cells

LIU Zhi-jun[1], XU Hui[2], SU Yong-ping[2], RAN Xin-ze[2], XU Chuan-shan[3] ([1]Department of Injury, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400002, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, [3]Institute of Ultrasonography, Chongqing University of Medical Science, Chongqing, 400010, China)

Abstract: Objective To obtain skin seed cells which can highly express active vascular endothelial growth factor 165 (VEGF165) so as to promote refractory wound healing by gene therapy in combination with cell engineering. **Methods** After pIRES2-EGFP-hVEGF165 was transfected into dermal mesenchymal stem cells (DMSCs) by lipofectin, the expression of VEGF mRNA was detected by RT-PCR, VEGF protein in the supernatant and in the cells were assayed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Westen blotting respectively. To evaluate the activity of VEGF secreted by transfected DMSCs, hECV304 was cultured with the supernatant of transfected DMSCs and its proliferation activity was analyzed by MTT assays. Meanwhile, the proliferation activity of VEGF-transfected DMSCs and non transfected DMSCs was investigated by MTT. **Results** The results of RT-PCR, ELISA and Western blot demonstrated that the expression of VEGF in transfected DMSCs was about 1.6 times than that of control DMSCs. The product not only enhanced the proliferation of hECV304 but also increased the proliferation of transfected DMSCs. **Conclusion** The plasmid pIRES2-EGFP-hVEGF165 is successfully transfected into DMSCs with the aid of lipotransfection, and hVEGF165-transfected DMSCs might high-efficiently secrete highly active VEGF165.

Key words: vascular endothelial growth factor 165; refractory wound healing; dermal mesenchymal stem cells; cell engineering; gene therapy

放创复合伤多见于战时核爆炸和平时核事故,损伤后其伤口难愈的主要原因是创面局部的修复种子细胞数量少,功能障碍或低下,血液循环差以及生长因子含量少或缺乏从而表现为愈合过程的延迟甚至长期不愈合。真皮多能干细胞(dermal multipotential stem cells, DMSCs)是军事预防医学院全军复合伤研究所新近从新生大鼠的真皮组织中成功分离的一种具有多向分化潜

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G1999054205),全军医学科研"十五"计划面上项目(01MA166)
Supported by National Key Basic Research Program Foundation (973 Project, G1999054205) and the Research Project of the "Tenth Five-year Plan" for Medical Science Development of PLA (01MA166)

作者简介:刘志君(1975-),女,湖南省洞口县人,博士研究生,主要从事干细胞与组织创伤修复方面的研究。电话:13527573918

收稿日期:2005-06-24;**修回日期**:2005-12-23

能的间充质干细胞[1-3]。初步研究表明这种真皮多能干细胞对创伤局部微环境的反应性明显强于成纤维细胞、血管内皮细胞等修复细胞，是参与皮肤创伤愈合的一种重要组织修复细胞。本课题利用真皮多能干细胞的多向分化潜能与其作为基因治疗良好载体的优越生物学特性，将 VEGF165 表达载体转染入真皮多能干细胞并进行了对其分泌表达的 VEGF 生物活性的分析，为放创复合难愈性创面的促愈治疗奠定了坚实的基础。

1　材料与方法

1.1　主要试剂及材料

真皮多能干细胞（第三军医大学全军复合伤研究所分离、培养），RT-PCR 试剂盒、限制性内切酶均为 TaKaRa 生物技术公司产品，胎牛血清为甘肃省兰州市明海生物制品有限公司产品，IMDM 培养液为美国 Hyclone 公司产品，DOTAP 与胶回收试剂盒为 Roche 公司产品，胰酶、琼脂糖及质粒抽提试剂盒为 Promaga 公司产品，ELISA 试剂检测盒购自晶美生物技术公司。

1.2　重组质粒转染 DMSCs

将 DMSCs 以 1×10^4/ml 的密度接种于 12 孔培养板，待细胞生长融合后，加入不同浓度的 G418，G418 抗性克隆的筛选浓度为 7 d 内杀死 DMSCs 的最低浓度。选取生长融合达 80% 处于对数生长期的 DMSCs，分别转染 pIRES2-EGFP 与 pIRES2-EGFP-hVEGF165，转染方式为脂质体介导的低血清转染 12 h，培养 48 h 后，加入含 G418 的选择培养液，G418 的终浓度为 400 μg/ml。

1.3　转染后细胞的鉴定

荧光显微镜下观察，选取 G418 抗性细胞克隆进行扩增培养，分别提取生长融合的转染 hVEGF165 DMSC 与转染空载体 DMSCs 的总 RNA，进行半定量 RT-PCR 实验。根据 GenBank 中报告的 hVEGF165 全长序列，设计引物：上游 5′-CGGAATTCATGAACTTTCTGCTGTCTTGGGTG-3′，下游 5′-CGGGATCCTCACCGCCTCGGCTTGTCACATCT-3′。反应参数为：逆转录 42 ℃ × 30 min，99 ℃ ×5 min，5 ℃ ×5 min；PCR 94 ℃ ×2 min，94 ℃ × 30 s，56 ℃ ×30 s，72 ℃ ×2 min，72 ℃ ×10 min，4 ℃ ×10 min，30 个循环。

1.4　Western Blot 检测

提取生长融合的转染 hVEGF165 DMSCs、转染 pIRES2-EGFP 空载体 DMSCs 的总蛋白，SDS-PAGE 电泳、转膜后，进行 Western blot 检测分析。

1.5　酶联免疫 ELISA 检测蛋白含量

分别取生长融合的转染 pIRES2-EGFP-VEGF165 DMSCs 与转染 pIRES2-EGFP 空载体 DMSCs 的培养上清，用 hVEGF-ELISA 试剂盒测定 VEGF 含量。

1.6　表达产物生物活性分析

分别用转染 pIRES2-EGFP-VEGF165 DMSCs 与转染 pIRES2-EGFP 空载体 DMSCs 的培养上清刺激培养 ECV304 细胞，传代后以 1×10^3个/ml 细胞密度接种于 96 孔培养板，培养 48 h 后，待细胞生长达 80% ~90% 融合，加入 MTT 溶液 20 μl/孔，继续培养 4 h，终止培养，小心吸除孔内培养上清液，每孔加入 DMSO 150 μl，振荡 10 min，在酶联免疫测试仪波长为490 nm 处检测光密度值[D(490)]。

1.7　转染 VEGF165 DMSCs 增殖活性的变化

将转染空载体 DMSCs 与转染 VEGF165 DMSCs 分别以 1×10^3个/ml 细胞密度接种于 96 孔培养板，培养 36 h 后，加入 MTT 溶液 20 μl/孔，继续培养 4 h，终止培养，小心吸除孔内培养上清液，每孔加入 DMSO 150 μl，振荡 10 min，在酶联免疫测试仪波长为 490 nm 处检测光密度值 D(490)。

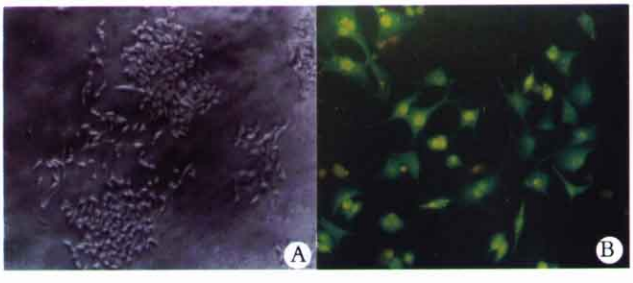
1.8　统计学方法

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行组间比较 t 检验。

2　结果

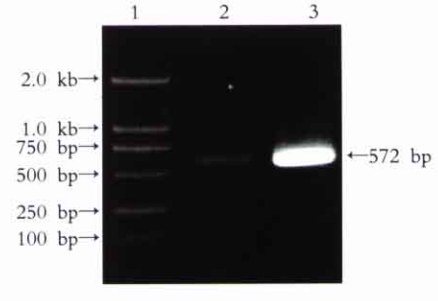
2.1　目的基因导入 DMSCs 的证据

①G418 抗性筛选：G418 筛选浓度为 400 μg/ml。与未转染 DMSCs 相比，10 d 后可见到转染 pIRES2-EGFP 空载体对照组 DMSCs、转染 hVEGF165 实验组 DMSCs 继续生长，并于 15 d 时形成抗性克隆（图 1A）；荧光显微镜下可见有绿色荧光蛋白表达（图 1B），而未转染的 DMSCs 10 d 时已经全部死亡。G418 抗性克隆经 G418 筛选扩增 1 个月后，转染细胞仍继续生长。②半定量 RT-PCR：转染 hVEGF165 DMSCs 与转染空载体组 DMSCs 均能扩增出的 VEGF 特异性条带，但转染 hVEGF165 DMSCs 扩增出的条带表达强度显著高于转染空载体 DMSCs，说明 pIRES2-EGFP-hVEGF165 转染大鼠 DMSCs 后，能显著提高其 VEGF 转录水平的表达（图 2）。③Western blot 检测结果表明转染 hVEGF165 DMSCs 比转染空载体组 DMSCs 的蛋白表达强度明显增高（图 3）。



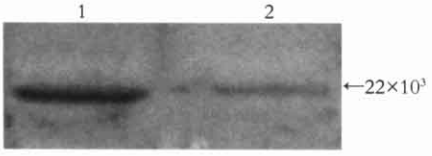
A：经 G418 筛选后形成细胞克隆　（倒置显微镜 ×100）；B：倒置荧光显微镜下可见表达 GFP 的 G418 筛选后细胞克隆（×200）

图 1　转染后 DMSCs 经 G418 筛选形成细胞克隆



1：DNA 标准；2：转染空载体 DMSCs；3：hVEGF165 转染 DMSCs

图 2　RT-PCR 检测 hVEGF165 的表达



1:hVEGF165 转染 DMSCs; 2:转染空载体 DMSCs

图3 Western blot 检测 hVEGF165 蛋白表达

2.2 蛋白含量结果分析

酶联免疫 ELISA 法检测显示转染 hVEGF165 DMSCs 上清中 VEGF 的分泌量为可达 1.0~1.2 ng/ml，是转染空载体 DMSCs 的 1.6 倍($P<0.01$)。

2.3 表达产物生物活性分析

来自转染空载体 DMSCs 的条件培养液与转染 hVEGF165 DMSCs 的条件培养液刺激 ECV304 细胞后，显示其与培养正常的 ECV304 细胞形态一致，呈多角形；但 ECV304 细胞经转染 hVEGF165 DMSCs 条件培养液刺激后，增殖速度明显增快，在 1×10^3个/ml 细胞接种密度下，培养 48 h 可铺满培养孔底部 80%~90%；MTT 法检测其 D(490)吸光值为 0.885~0.912，约为对照组的 1.4 倍($P<0.01$)，说明重组真核表达载体 pIRES2-EGFP-hVEGF165 转染 DMSCs 表达的 VEGF 具有生物学活性。

2.4 转染后 DMSCs 增殖活性的变化

MTT 法检测结果显示：转染 hVEGF165 DMSCs 增殖速度显著增快，其 D(490)值约为转染空载体 DMSCs 的 3 倍($P<0.01$)。说明 pIRES2-EGFP-VEGF165 成功导入 DMSCs，并且能加快其增殖速度。

3 讨论

细胞因子基因治疗成功的关键性环节是选择合适的靶细胞与高效的基因转移技术[1]。作为基因转染的靶细胞—DMSCs 具有很多优点，首先它是一类定位于真皮、来源于中胚层的间充质干细胞，易于分离和培养扩增，具有向多种细胞分化的能力[2,3]；其次经过多次实验我们已经成功掌握了真皮多能干细胞的稳定培养条件。

基因转染大致分为瞬时转染与稳定性转染 2 种。由于创面的愈合是一个短时间的过程，因此在本实验中，我们选用了脂质体介导的瞬时转染的方式。通过实验观察不同时间转染复合物对细胞生长状态的影响及其转染效率的比较，我们选择低血清转染 12 h，并获成功转染。

转染 24 h 后通过在荧光显微镜下观察到 DMSCs 胞体内有报告基因产物的绿色荧光，因而可得出结论：pIRES2-EGFP-hVEGF165 成功导入 DMSCs。转染 48 h 后对 DMSCs 进行加压筛选，G418 的浓度为 400 μg/ml。筛选至第 7 天可见细胞死亡达 95% 以上，每低倍视野中仅残存 1~5 个细胞，第 10 天每低倍视野仅见 0~2 个细胞，筛选至 15 d 时可见细胞克隆形成。利用 RT-PCR 的方法从 mRNA 水平对 VEGF165 进行了检测，结果证实转染后的 DMSCs 中 VEGF165 的表达显著增强；同时用 Western blot 与 ELISA 从蛋白质水平对 VEGF165 进行了定量检测，结果表明转染细胞 VEGF 的增加大约 1.6 倍，进一步证实了转染后 DMSCs 对 VEGF165 的高表达。

VEGF 是血管内皮细胞的特异性有丝分裂原，通过与内皮细胞的特异性受体结合，促使 VEGF 受体的二聚体化，受体酪氨酸酶活化，促使底物磷酸化而发挥其作用，特异性地促进血管内皮细胞的分裂与增殖，促进血管形成[4,5]。本实验中转染 hVEGF165 DMSCs 培养上清液显著促进 hECV304 细胞的增殖，其对 hECV304 细胞的增殖影响能力约为转染空载体 DMSCs 的 1.4 倍，从而证实 VEGF 不仅能从转染的 DMSCs 中分泌，而且具有良好的生物学活性。

此外，除了能特异性促进内皮细胞的生长，VEGF 对其他细胞也有促增殖作用[3]。通过 MTT 法检测转染 hVEGF165 DMSCs 与转染空载体 DMSCs 的增殖活性比较，可以观察到转染 hVEGF165 DMSCs 的增殖活性显著高于转染空载体 DMSCs 的增殖活性，间接证明了转染后 DMSCs VEGF 的高表达及其表达产物的生物学活性。

综上所述，我们通过基因重组技术，成功构建了重组表达载体 pIRES2-EGFP-hVEGF165，并以脂质体介导法顺利将其转染入大鼠 DMSCs，经过 G418 筛选，获得了高表达 VEGF165 的阳性细胞克隆，并具有良好的生物学活性，为观察转染 hVEGF165 DMSCs 对难愈性创面的促愈作用奠定了坚实的基础。

参考文献：

[1] GAUNITZ F, PAPKE M. Gene transfer and expression[J]. Methods Mol Biol, 1998, 107: 361-370.

[2] 史春梦，程天民. 大鼠真皮多能间充质干细胞的分离培养[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(9): 1068-1070.

[3] SEKIYA I, LARSON B L, SMITH J R, *et al*. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality[J]. Stem Cells, 2002, 20(6): 530-541.

[4] TANG K, BREEN E C, GERBER H P, *et al*. Capillary regression in vascular endothelial growth factor deficient skeletal muscle[J]. Physiol Genomics, 2004, 18(1): 63-69.

[5] CURSIEFEN C, CHEN L, BORGES L P, *et al*. VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization *via* macrophage recruitment[J]. J Clin Invest, 2004, 113(7): 1040-1050.

(编辑 栾 嘉)