文章编号:1000-5404(2008)05-0427-04

论著

血管内皮生长因子基因修饰内皮祖细胞对内膜损伤血管修复的影响

赵 刚,黄 岚,宋耀明,朱光绪,宋明堡 (第三军医大学新桥医院心血管内科,全军心血管病研究所,重庆 400037)

摘 要:目的 探讨人血管内皮细胞生长因子 165(hVEGF165)基因转染骨髓源性内皮祖细胞(EPCs)及对 EPCs 增殖的影响,在体研究 VEGF 基因修饰 EPCs 对内膜损伤血管再内皮化的影响。**方法** 体外分离、培养、鉴定 EPCs,脂质体介导 pcDNA3-hVEGF165 质粒转染组、pcDNA3 空质粒转染组、空白对照组。ELISA 法检测 EPCs 表达 VEGF 蛋白,MTT 法检测 hVEGF165 基因修饰对 EPCs 增殖的影响。基因修饰 EPCs 移植到内膜损伤血管模型中,观察基因修饰对 EPCs 修复内膜损伤的效应。**结果** FITC-UEA-I 和 DiI-acLDL 荧光双染证实分化的 EPCs,脂质体介导 pcDNA3-hVEGF165 质粒转染组 EPCs 培养基上清中表达 VEGF,hVEGF165 基因转染促进 EPCs 迁移、黏附和增殖。基因修饰 EPCs 促进损伤内膜修复。**结论** EPCs 可以成功转染 hVEGF165 基因,并且促进 EPCs 的迁移、黏附和增殖,增强 EPCs 对损伤内膜修复的能力。

关键词:内皮祖细胞;血管内皮细胞生长因子;基因转染
中图法分类号:R322.12;R329.25;R394.2 **文献标识码:**A

Re-endothelialization of VEGF-transfected endothelial progenitor cells in rat artery intimal injury model

ZHAO Gang, HUANG Lan, SONG Yao-Ming, ZHU Guang-Xu, SONG Ming-Bao (Department of Cardiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To explore the proliferation of endothelial progenitor cells (EPCs) after the transfection of human VEGF165, and investigate the re-endothelialization of the transfected cells in artery intimal injury rats. Methods After isolated from rat bone marrow, EPCs were cultured and then identified by FITC-UEA-I and Dil-acLDL. EPCs cells were transfected with pcDNA3-hVEGF165 or pcDNA3 by DOTAP Liposome. After transfection, the expression of VEGF was detected by using ELISA. The EPCs proliferation was studied by MTT methods. VEGF-transfected EPCs were transplanted into experimental artery intimal injury rats and its effect on injured vascular re-endothelial was studied. Results Cells expressed double FITC-UEA-I and Dil-acLDL fluorescence were confirmed to EPCs. The medium of EPCs transfected with pcDNA3-hVEGF165 had expression of VEGF. VEGF165 gene transfer stimulated EPCs adhesion, migration and proliferation. Gene-modified EPCs transplanted into rats, survived in intimal vascular injury site, repaired intimal vascular injury better than those in normal EPCs group. Conclusion VEGF165 gene is successfully transfected into EPCs, which can stimulate EPCs' migration, adherence and proliferation. VEGF-transfected EPCs have stronger intimal repair ability compared with non-transfected EPCs. VEGF-transfected EPCs repair injured vascular intima, restore normal vascular endothelial structure.

Key words: endothelial progenitor cells; vascular endothelial growth factor; gene transfer

血管内皮细胞(endothelial cells,ECs)在调节血管功能和血管稳态上起关键作用。动脉粥样硬化、血管损伤导致血管性疾病,其共同病理生理基础是血管内膜损伤引起内皮细胞功能失调。血管内皮细胞功能修复已成为血管损伤性疾病主要的治疗方向。

EPCs 参与血管损伤修复过程[1,2],组织损伤和缺血促使实质细胞和炎症细胞合成并释放 VEGF、FGF-2 等促血管新生因子,动员并趋化骨髓中的 EPCs 整合到血管新生的活跃区域。但是移植 EPCs 尚不能达到完全修复内膜损伤血管、彻底恢复血管内膜的结构和功能。VEGF 基因治疗血管内膜损伤已经在血管和心

基金项目:国家自然科学基金(30470729)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30470729)
作者简介:赵 刚,男,河北省邢台市人,博士研究生,主治医师,主要从事冠心病的诊断与治疗方面的研究。电话:(023)68774601,E-mail:zgred120@yahoo.com
通信作者:黄 岚,电话:(023)68755601
收稿日期:2007-11-30 修回日期:2008-01-04

肌疾病动物模型得到初步证实[3-5]。但是受载体缺陷,只能部分修复内皮细胞功能限制,基因治疗尚不能达到完全恢复正常内皮细胞生理功能目的。

本研究探讨将干细胞和基因治疗联合应用,通过转基因手段将调控干细胞向内皮分化的重要细胞因子——血管内皮生长因子(VEGF)基因转染到内皮祖细胞(EPCs),在体外细胞水平研究基因修饰对内皮祖细胞黏附、迁移和增殖的影响。我们将基因修饰 EPCs 移植到血管内膜受损的大鼠体内,研究基因修饰 EPCs 对修复内膜损伤的影响,探讨基因修饰 EPCs 对损伤血管的再内皮化、治疗内膜损伤性血管性疾病的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

实验大鼠购自第三军医大学实验动物中心;FITC 标记荆豆凝集素Ⅰ(FITC-UEA-I)购自 Vector 公司;DiI 标记的乙酰化低密度脂蛋白(DiI-acLDL)购自 Molecular Probe 公司;低糖 DMEM、胎牛血清购自 HyClone;大鼠淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物制品有限公司;限制性核酸内切酶 *EcoR* Ⅰ、*Xba* Ⅰ、T_4 DNA连接酶为 Promega 公司产品;G_{418}购自 GIBCO BRL 公司;去内毒素质粒抽提试剂盒购自 QIAGEN 公司;脂质体转染试剂盒(DOTAP Liposomal)购自 Roche 公司;MTT 购自美国 Sigma 公司;VEGF 购自 Pepro Tech 公司;人 VEGF ELISA Kit 购自深圳晶美生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 EPCs 的采集、分离和培养 取体质量 150 g 大鼠颈椎脱臼法处死,无菌分离股骨,消毒针头在大鼠股骨两端各穿小孔,PBS 冲洗骨髓,200 目孔不锈钢筛网过滤骨髓冲洗液,采用密度梯度离心法分离 EPCs:将骨髓冲洗液按 3∶5比例加入大鼠淋巴细胞分离液,离心 20 min,吸出第 2 层的单核细胞层,PBS 清洗 3 次后细胞计数,以 4×10^5/孔的细胞数接种于铺有纤维连接蛋白(FN)的 24 孔培养板,加入含 15% 胎牛血清、VEGF 50 ng/ml、青霉素 100 U/ml 的低糖 DMEM 于 37 ℃ 5% CO_2 细胞培养箱培养 4 d,弃去未贴壁细胞,换液后继续培养 7 d 后备用。

1.2.2 EPCs 的鉴定 细胞与 DiI-acLDL (2.4 μg/ml),37 ℃孵育 1 h 以检测 EPCs 对 DiI-acLDL 的摄取。然后用 2% 多聚甲醛固定细胞 10 min。固定后用 PBS 浸洗,将 FITC-UEA-I (10 μg/ml)加于上述标本 37 ℃孵育 1 h,激光共聚焦显微镜鉴定 UEA-I 和 DiI-acLDL 双染色阳性细胞被认为是正在分化的 EPCs。

1.2.3 pcDNA3-hVEGF165 质粒的构建、扩增、提取、纯化和鉴定 扩增、提取 pGEM-hVEGF 165 质粒和 pcDNA3 质粒,应用 *Eco*R Ⅰ、*Xba* Ⅰ双酶切,连接 hVEGF165 和 pcDNA3,构建 pcDNA3-hVEGF165 真核表达质粒,扩增、提取质粒,酶切、测序鉴定 pcDNA3-hVEGF165 质粒。

1.2.4 pcDNA3-hVEGF165 质粒扩增、抽提 将构建的 pcDNA3-hVEGF165 质粒转化大肠杆菌,LB 培养液摇菌过夜,用去内毒素质粒抽提试剂盒抽提 pcDNA3-hVEGF165 质粒。

1.2.5 pcDNA3-hVEGF165 转染 EPCs 培养第 7 天细胞融合约 50% 的 EPCs 在 24 孔板中进行基因转染,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基换液,1 h 后用无血清培养基冲洗 2 次。分为 3 组,每组 6 孔:A 组脂质体介导 pcDNA3-hVEGF165 质粒转染组、B 组 pcDNA3 空质粒转染组、C 组空白对照组。按照脂质体 DOTAP Liposomal 试剂盒说明步骤,质粒与脂质体比例为 1 μg∶6 μl;分别取质粒 2.5 μg,加入无血清培养基稀释至 50 μl;另取脂质体 15 μl,加入无血清培养基稀释至 50 μl;两组液体混合后室温放置 15 min,向混合液加入 800 μl 无血清培养基,混匀后加入待转染 EPCs 细胞中,37 ℃ 培养 8 h,加入含 15% 胎牛血清 DMEM 培养。G_{418}(浓度 200 μg/ml)筛选转染 hVEGF 165 基因的 EPCs。

1.2.6 各组内皮祖细胞黏附功能鉴定 用 0.25% 胰蛋白酶消化后,各组细胞悬浮在 500 μl 培养液并计数,将同等数目的各组 EPCs 铺在 24 孔板,在 37 ℃ 5% CO_2 孵箱培养 1 h 后,计数贴壁细胞(×200)。

1.2.7 内皮祖细胞迁移功能鉴定 将 200 μl 培养液和 VEGF 10 μl(50 ng/ml)加入改良的 Boyden 小室的下室。用 0.25% 胰蛋白酶消化各组细胞,用含 5% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养基配成 $1\times10^5\,ml^{-1}$ 的细胞悬液。将 100 μl 细胞悬液注入上室,在 37 ℃ 5% CO_2 孵箱培养 6 h,取出微孔滤膜,0.01 mol/L PBS 漂洗,以无水乙醇固定,Harris 苏木精染色,37 ℃烤膜过夜,无水乙醇脱水,二甲苯透明滤膜,随机选择 3 个显微镜视野(×400)计数迁移到低层的细胞。

1.2.8 MTT 法检测基因修饰的 EPCs 增殖活性 将转染 pcDNA3-hVEGF 165、pcDNA3 质粒后 24 h EPCs 及未转染基因的 EPCs 转入 96 孔板,加入纤维结合素培养 48 h。每孔加入 20 μl MTT 溶液(5 g/L)培养 4 h,终止培养,小心弃去培养液,每孔加 DMSO(二甲基亚砜)150 μl,微量振荡器上振摇 5 min,全自动酶标仪测定 490 nm 波长的吸光度,分析各组细胞的增殖活性。

1.2.9 血管内皮损伤动物模型 实验大鼠麻醉后,将左大腿皮肤进行碘酒、酒精消毒,切开皮肤 3 cm,依次分离皮下组织与肌肉,寻找、分离左股动脉;将股动脉,远心端结扎,近心端用动脉钳夹闭,于股动脉远端穿刺插入表面粗糙的 0.035 英寸弹性导丝,反复抽送 5 次,然后两次旋转导丝 120 度,每个角度重复抽送 5 次。逐层缝合皮下组织与皮肤,术后局部使用青霉素以预防感染。

1.2.10 移植细胞悬液的制备 将细胞分为 3 组,分别为 pcDNA3-hVEGF165 质粒转染组(A 组)、pcDNA3 空质粒转染组(B 组)和对照组(C 组)。VEGF165 基因转染 EPCs 方法同前。将各组细胞加 10% FCS DMEM 低糖培养基培养 2 d。制成细胞数为 $5\times10^5\,ml^{-1}$ 的单细胞悬液。单设转基因 EPCs 荧光标记组,注入 DiI 标记的等量 EPCs。

1.2.11 EPCs 分组移植 血管内皮损伤大鼠分组,将各组移植细胞 1 ml 穿刺大鼠尾静脉注射。

1.2.12 取材和病理切片 移植 7 d 后将 EPCs 荧光标记组

大鼠处死,取出内膜损伤血管段,立即送冰冻切片,荧光显微镜下观察 EPCs 在损伤内膜归巢。其余大鼠移植 14 d 后取出内膜损伤血管段,进行 DAPI 标记、伊文思蓝复染,观察内膜增生及修复情况。

1.3　统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　EPCs 分离、培养及鉴定结果

新分离的骨髓源性内皮祖细胞呈圆形、折光好,悬浮于培养液中,第 2 天开始贴壁,第 4 天细胞明显增殖,细胞体积逐渐增大,由圆形逐渐变形为短梭形。FITC-UEA-I 和 DiI-acLDL 双荧光染色,激光共聚焦显微镜下双染色阳性的黄色细胞是正在分化的 EPCs(图 1)。

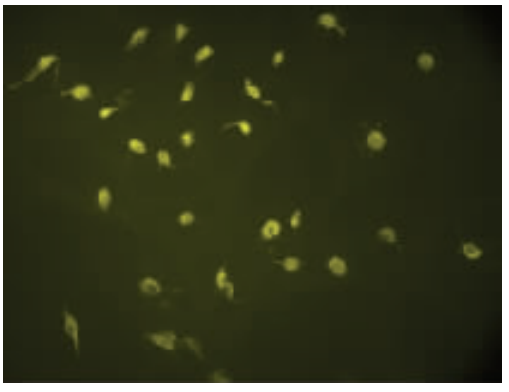


图 1　FITC-UEA-I 和 DiI-acLDL 双荧光染色结果　(激光共聚焦显微镜 ×200)

2.2　pcDNA3-hVEGF165 真核表达载体的鉴定

*Eco*R Ⅰ、*Xba* Ⅰ双酶切结果显示,在 500 ~ 750 bp 有一条带出现。送 Invitrogen 公司测序,在 GenBank 中 blast 比对,测序结果与 hVEGFl65 序列完全一致。

2.3　各组内皮祖细胞黏附功能鉴定

内皮祖细胞黏附功能测定各组 EPCs 黏附能力,显微镜(×200)下细胞计数为(56.2 ± 7.8)、(30.5 ± 3.2)、(31.7 ± 5.3)贴壁细胞/视野,组间比较差异有统计学意义($P < 0.01$),显示基因修饰组 EPCs 黏附功能增强。

2.4　内皮祖细胞迁移功能鉴定

内皮祖细胞迁移功能各组 EPCs 迁移能力,显微镜(×400)下细胞计数分别为(38.6 ± 3.5)、(19.1 ± 3.1)、(18.6 ± 2.7)细胞/视野,组间比较差异有统计学意义($P < 0.01$),显示基因修饰组 EPCs 迁移能力增强。

2.5　MTT 法检测基因修饰 EPCs 的增殖活性

MTT 法测定 A、B、C 组 490 nm 波长的吸光度值,分别为(0.48 ± 0.03)、(0.34 ± 0.01)、(0.32 ± 0.02),组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$),显示基因修饰组 EPCs 增殖活性增强。

2.6　移植 EPCs 参与损伤血管修复

转基因 EPCs 荧光标记移植组损伤血管冰冻切片,倒置荧光显微镜下可见损伤血管内膜处有荧光标记,提示移植的 EPCs 可以到达内膜损伤部位并参与内膜修复(图 2)。

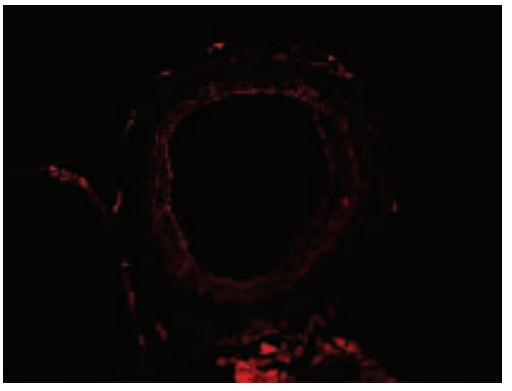
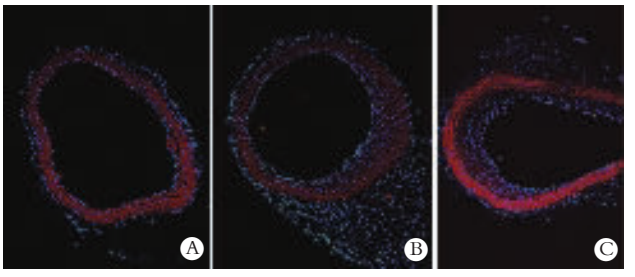


图 2　DiI-acLDL 标记基因修饰 EPCs 移植的内膜损伤血管荧光显色　(×100)

2.7　移植细胞对血管损伤后内膜增生的影响

内膜损伤血管 DAPI 标记、1% 的伊文思蓝复染后,荧光显微镜下观察可见红色荧光的中膜层和蓝色荧光的内膜增生细胞,发现基因修饰 EPCs 移植组内膜增生不明显,EPCs 移植组内膜有轻度增生,空白对照组内膜增生明显(图 3)。



A 基因修饰 EPCs 移植组;B EPCs 移植组;C 空白对照组

图 3　移植后 14 d 损伤血管内膜增生情况　(DAPI/伊文思蓝 ×100)

3　讨论

针对损伤血管内膜结构及功能修复,是治疗多种损伤血管性疾病的关键步骤。干细胞具有在体外培养保持未分化状态的增殖能力及相应的条件下分化为各种细胞类型的潜能,在细胞移植及组织工程中有诱人的应用前景[6]。1997 年 Asahara 等[7]在体外成功地将 $CD34^+$ 细胞诱导成血管内皮细胞,并在体内证明其生成血管的能力。研究表明骨髓、脐带血及外周血中存在干细胞来源的内皮祖细胞(endothelial progenitor cells,EPCs),体外培养过程中能够保持未分化表型增殖达到所需数量,在体外经诱导分化可表达内皮细胞特征性抗原[8,9]。Rafii 等[10-12]研究发现血管内膜损伤后可以动员、募集 EPCs 迁移至损伤部位,在体内局部微环境作用下能发育为适宜局部生长的内皮细胞,从而修复、恢复受损内皮细胞功能。崔斌等[13]研究发现循环内皮祖细胞同冠心病、冠状动脉狭窄有相关性。

EPCs 参与血管损伤修复过程[1,2]，组织损伤和缺血促使实质细胞和炎症细胞合成并释放 VEGF、FGF-2 等促血管新生因子，动员并趋化骨髓中的 EPCs 整合到血管新生的活跃区域。通过体外培养扩增[14]，可以增加 EPCs 的数量、提高 EPCs 的纯度，但是移植 EPCs 尚不能达到完全修复内膜损伤血管、彻底恢复血管内膜的结构和功能。基因治疗策略已经在血管和心肌疾病动物模型得到初步证实[4-6]。但是受载体缺陷、只能部分修复内皮细胞功能限制，基因治疗尚不能达到完全恢复正常内皮细胞生理功能目的。本研究在目前损伤血管内膜的基因及干细胞治疗修复的研究基础上，通过转基因手段将调控干细胞向内皮分化的重要细胞因子——VEGF 基因转染到 EPCs，从而将基因治疗和干细胞治疗方法联合应用在血管损伤的内皮修复治疗，探讨基因修饰 EPCs 对损伤血管的再内皮化、重建血管生物学功能治疗内膜损伤性血管性疾病的意义。

本实验成功构建了携带 VEGF 基因的真核表达载体 pcDNA3-hVEGF165 质粒，分离并鉴定骨髓源性 EPCs，通过脂质体介导 pcDNA3-hVEGF165 质粒成功转染 EPCs，转基因后 EPCs 有 VEGF 蛋白表达，且迁移、黏附和增殖能力增强。将 DiI-acLDL 标记示踪的基因修饰 EPCs 移植到内皮损伤动物模型，观察到 EPCs 归巢至损伤血管内膜并存活，基因修饰 EPCs 移植组损伤内膜细胞增生程度最轻，内膜修复效果优于单纯 EPCs 移植组，能更好的恢复正常的血管内皮结构。

EPCs 具有容易获取、操作简单、定向归巢至血管内膜损伤部位等特点，因此 EPCs 是基因治疗的一个很好的靶细胞。而 VEGF 基因是高度特异性的血管内皮细胞生长刺激因子，目前已有较深入的研究。本实验显示在转染 VEGF165 基因的 EPCs 上清液中检测的 VEGF 浓度较未转染的明显增高，因此推测 VEGF 转染后移植到体内一方面可以改善 EPCs 的功能，另一方面也可以通过外分泌蛋白发挥其刺激血管内皮细胞生长的作用。本实验中基因转染的 EPCs 组较单纯 EPCs 移植组有更好的疗效，可能有如下几方面的机制：外分泌 VEGF 蛋白在局部浓度显著增高，更利于 EPCs 分化为内皮细胞，整合到受损的内膜中，从而提高了损伤血管段的内膜修复；转染后的 EPCs 释放出的 VEGF 蛋白，作用于内皮细胞上的受体 VEGFR2，促进内皮细胞的增生并趋化至损伤区，修复损伤的血管内膜；VEGF 内源性地动员骨髓干细胞，进而分化成血管内皮祖细胞，并进入外周血循环，归巢至血管内膜损伤部位并分化成血管内皮细胞。

本实验初步研究了基因修饰 EPCs 移植对内膜损伤血管的形态学修复，尚需要对修复的血管功能及修复机制做更深入的研究。

参考文献：

[1] Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, *et al*. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines[J]. Circulation, 2001, 104(9): 1046-1052.

[2] Hamano K, Li T S, Kobayashi T, *et al*. Therapeutic angiogenesis induced by local autologous bone marrow cell implantation[J]. Ann Thorac Surg, 2002, 73(4): 1210-1215.

[3] Bekeredjian R, Shohet R V. Cardiovascular gene therapy: angiogenesis and beyond[J]. Am J Med Sci, 2004, 327(3): 139-148.

[4] Isner J M. Myocardial gene therapy[J]. Nature, 2002, 415(6868): 234-239.

[5] Wang T, Li H, Zhao C, *et al*. Recombinant adeno-associated virus-mediated kallikrein gene therapy reduces hypertension and attenuates its cardiovascular injuries[J]. Gene Ther, 2004, 11(17): 1342-1350.

[6] Raikwar S P, Mueller T, Zavazava N. Strategies for developing therapeutic application of human embryonic stem cells[J]. Physiology (Bethesda), 2006, 21: 19-28.

[7] Asahara T, Murohara T, Sullivan A, *et al*. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis[J]. Science, 1997, 275(5302): 964-967.

[8] Yildirim S, Boehmler A M, Kanz L, *et al*. Expansion of cord blood CD34+ hematopoietic progenitor cells in coculture with autologous umbilical vein endothelial cells (HUVEC) is superior to cytokine-supplemented liquid culture[J]. Bone Marrow Transplant, 2005, 36(1): 71-79.

[9] Zhang L, Yang R, Han Z C. Transplantation of umbilical cord blood-derived endothelial progenitor cells: a promising method of therapeutic revascularisation[J]. Eur J Haematol, 2006, 76(1): 1-8.

[10] Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration[J]. Nat Med, 2003, 9(6): 702-712.

[11] Kong D, Melo L G, Mangi A A, *et al*. Enhanced inhibition of neointimal hyperplasia by genetically engineered endothelial progenitor cells[J]. Circulation, 2004, 109(14): 1769-1775.

[12] Griese D P, Ehsan A, Melo L G, *et al*. Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy[J]. Circulation, 2003, 108(21): 2710-2715.

[13] 崔 斌，黄 岚，宋耀明，等. 冠心病患者高敏C反应蛋白与循环内皮祖细胞的关系及临床意义[J]. 重庆医学，2005，34(9)：1344-1346.

[14] Kalka C, Masuda H, Takahashi T, *et al*. Transplantation of *ex vivo* expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(7): 3422-3427.

（编辑 邓强庭）