基础研究 文章编号:0253-3626(2010)05-0663-03

pcDNA3.1(+)/VEGF165 质粒转染骨髓内皮祖细胞后 VEGF165 的表达

杨钰兴[1],肖明朝[1],苟 欣[1],邱 明[1]
(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:培养和鉴定大鼠内皮祖细胞(Endothelial progenitor cells,EPCs),观察 pcDNA3.1(+)/VEGF165 质粒转染大鼠骨髓内皮祖细胞后内皮细胞生长因子 165(Vascular endot-helial growth fator-165,VEGF165)的表达。方法:体外培养内皮祖细胞,以免疫细胞化学法检测其表面抗原(CD34、CD133、KDR)的表达。通过 pcDNA3.1(+)质粒转染 VEGF165 后,采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测内皮祖细胞培养上清液中 VEGF 蛋白的水平,反转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测内皮祖细胞中 VEGF165mRNA 的表达。结果:免疫细胞化学检测表明培养的细胞为大鼠内皮祖细胞,PCR 后凝胶电泳显示 pcDNA3.1(+)/VEGF165 质粒转染组在 576 bp 处可见有明显条带,pcDNA3.1(+)空质粒转染组和未转染组可见微弱的电泳带位于 500 bp 与 600 bp 之间,约 576 bp 大小。ELISA 检测结果为 pcDNA3.1(+)/VEGF165 质粒转染组上清液中 VEGF165 水平为(175.8 ± 10.7) pg/ml, pcDNA3.1(+)空质粒组为(10.5 ± 1.6) pg/ml,未转染组为(9.3 ± 1.3) pg/ml。结论:内皮祖细胞体外培养有微量 VEGF165 表达,应用 pcDNA3.1(+)/VEGF165 载体转染,可使 SD 大鼠内皮祖细胞高效表达 VEGF165。

【关键词】血管内皮生长因子;内皮祖细胞;转染
【中国图书分类法分类号】R698.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-09-03

Expression of vascular endothelial growth factor-165 in endothelial progenitor cells transfected with pcDNA3.1(+)/VEGF165 plasmid

YANG Yu-xing, et al
(*Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To culture and identify rat endothelial progenitor cells, and to observe the expression of recombinant human vascular endothelial growth fator-165 (VEGF165) in endothelial progenitor cells transfected with pcDNA3.1 (+)/VEGF165 plasmid. *Methods*: Endothelial progenitor cells were cultured in vitro, and immunocytochemical staining was used to detect the expression of surface antigen (CD34, CD133, KDR). After transfection of VEGF165, VEGF protein in the culture supernatant of endothelial progenitor cells was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and VEGF165 mRNA in endothelial progenitor cells was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). *Results*: The cultured cells were identified to be endothelial progenitor cells by immunocytochemical analysis. Gel electrophoresis showed that a 576 bp product was amplified by RT-PCR in VEGF165-transfected cells, while a weak expression of VEGF165 was observed in mock-transfected and non-transfected cells. The protein level of VEGF165 in the supernatant of VEGF165-transfected, mock-transfected and non-transfected cells were 175.8 ± 10.7 pg/ml, 10.5 ± 1.6 pg/ml and 9.3 ± 1.3 pg/ml, respectively. *Conclusion*: There is small amount of VEGF165 expression in endothelial progenitor cells in vitro, and the endothelial progenitor cells transfected with pcDNA3.1(+)/VEGF165 plasmid have an increased expression of VEGF165.

【Key words】Vascular endothelial growth factor(VEGF); Endothelial progenitor cells (EPCs); Transfection

内皮祖细胞(Endothelial progenitor cells,EPCs)是能促进组织血管新生的血管内皮细胞的前体细胞。EPCs 不仅参与人胚胎血管生成,同时也参与出生后血管新生和机体血管损伤后的修复过程[1]。血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor,VEGF)是调控 EPCs 向内皮分化的重要细胞因子[2]。VEGF 通过作用于血管内皮细胞不仅参与炎症的发生、缺血损伤的修复和肿瘤发生发展过程,也可以改善阴茎勃起功能障碍[3,4]。本实验以脂质体为载体,介导 pcDNA3.1(+)/VEGF165 质粒转染 EPCs,观察其在体外能否产生 VEGF165 蛋白。

作者介绍:杨钰兴(1982-),男,硕士,
研究方向:泌尿外科基础与临床。
通讯作者:肖明朝,男,副教授,E-mail: xmz.2004@163.com。
基金项目:重庆市自然科学基金计划项目(编号:2007BB5288)。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 2 周龄 SD 大鼠 20 只，体重约 20 g，由重庆医科大学实验动物中心提供，清洁级。

1.1.2 实验主要试剂和仪器 M199 培养基（Invitrogen 公司），淋巴细胞分离液（TBD 公司），胎牛血清（Gibico 公司），纤维连结蛋白（Fibronectin，Sigma 公司），胰蛋白酶，兔抗大鼠 CD34、兔抗大鼠 CD133（北京博奥森公司），小鼠抗大鼠 KDR（Kinase insert domain containing receptor，Santa Cruz 公司），FITC 标记抗 CD34、FITC 标记抗 KDR 抗体、PE 标记抗 CD133 抗体（北京中杉金桥），RT-PCR 试剂盒（Takara 公司），人 VEGF ELISA Kit（欣博盛），荧光倒置显微镜（Olympus 公司）。实验其他所需器材均由重庆市神经病学重点实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 大鼠骨髓 EPCs 的分离培养 取 2 周龄 SD 大鼠，断颈处死，75%乙醇浸泡 15 min，在无菌条件下，分离股骨和胫骨，预冷至 4℃的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液（PBS）5 ml 冲洗骨髓腔，至冲洗液清亮，骨干发白。将冲洗液充分吹打混匀以获得单细胞悬液，缓慢加入装有淋巴细胞分离液的离心管，冲洗液与分离液的体积比为 1∶1。20℃下 2 000 r/min 离心 20 min。轻轻吸取离心管中间乳白色云雾状单个核细胞（Mononuclear cells，MNCs）层到新的离心管中，加入 PBS 液洗细胞沉淀 2 次。M199 培养液重悬细胞，反复轻柔吹打制成单细胞悬液后进行细胞计数。将细胞以 1×10^6 个/ml 的浓度分别接种到提前 2 h 纤维连接蛋白（5 μg/cm²）包被的 100 ml 培养瓶中。培养条件：37℃，5%CO_2，饱和湿度恒温培养，分别于培养第 4、7、10 d 换液。

1.2.2 免疫细胞化学鉴定 EPCs 将培养第 7 d 的贴壁细胞消化，制备细胞爬片，4%多聚甲醛固定 30 min，免疫荧光染色分别检测 CD34、CD133、KDR。

1.2.3 pcDNA3.1(+)/VEGF165 质粒脂转 转染前 24 h 计数细胞，5×10^5 个/孔细胞接种于 24 孔板，待内皮祖细胞达到 80%～90%融合时准备转染，设立 A 组载体组、B 组空载体组和 C 组未转染组。载体组转染 pcDNA3.1(+)/VEGF165，空载体组转染 pcDNA3.1(+)载体，C 组未转染组无特殊处理。pcDNA3.1(+)/VEGF165 由上海英俊公司构建，转染时将 5 μg 质粒与 15 μl 脂质体 Lipofecte- min2 000 混合，室温放置 20 min；细胞经无血清、无抗生素的培养基冲洗后加入质粒与脂质体混合物，孵育 6 h 后，改用完全培养基（含 20%胎牛血清）。

1.2.4 RT-PCR 检测内皮祖细胞中 VEGF165mRNA 的表达

收集转染 72 h 后各组细胞，提取总 RNA，并进行逆转反应。建立 PCR 体系进行扩增。人血管内皮生长因子基因：上游引物：5'-AAGCTT GCCACCATGAACTTTCTGCTGT-3'；下游引物：5'-CTCGAGTCACCGCCTCGGCTTGTC-3'，扩增产物为 576 bp，由上海英俊公司设计，同时以 β-actin 为反应内参：上游为 5'- CCGTAA AGACCTCTAT GCCAAC -3'，下游为 5'-ACTCATCGTACTCCTGCTTGCT -3'，扩增片段 227 bp，由大连宝生物公司设计。扩增产物经 20 g/L 的琼脂糖凝胶电泳分离，紫外线下观察。

1.2.5 ELISA 检测细胞上清液中 VEGF 蛋白含量 收集转染 72 h 后细胞培养上清液，进行 VEGF 蛋白表达含量的测定（按试剂盒说明书操作）。酶标仪 450 nm 处检测各组吸光光度值，以此表示上清液中 VEGF 蛋白相对含量。

1.3 统计学分析

采用 SPSS13.0 进行统计处理，细胞上清中血管内皮生长因子含量检测结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间比较采用 *LSD-t* 检验分析。

2 结 果

2.1 EPCs 形态学观察

在倒置显微镜下观察发现：新分离的骨髓单个核细胞呈圆形，大小不一（图 1A）。接种后 24 h 开始有细胞贴壁生长，逐渐变为梭形和不规则形。4 d 后细胞呈集落样生长，细胞生长加速，集落周边细胞呈梭形，近似单层生长，集落中心细胞密集多呈圆形，并出现线样结构（图 1B）。9 d 后出现多个细胞簇，呈集落式生长，贴壁的梭形细胞开始从细胞簇边缘出芽长出，呈纤维细胞样长生（图 1C）。第 12 d 后贴壁细胞接近融合，铺满瓶底。

2.2 EPCs 的鉴定

将培养第 7 d 的贴壁细胞消化，制备细胞爬片，免疫细胞化学分别检测 CD34，CD133，KDR 的表达。荧光倒置显微镜下观察发现贴壁细胞 CD34，CD133，KDR 表达阳性（图 2A、2B、2C）。

2.3 RT-PCR 产物琼脂凝胶电泳检测

RT-PCR 产物琼脂凝胶电泳结果可见，空载体转染组、未转染组可以见微弱的电泳带位于 500 bp 与 600 bp 之间，约 576 bp 大小，说明内皮祖细胞自身可表达微量 VEGF165。载体转染组电泳带较强，位于 500 bp 与 600 bp 之间，约 576 bp 大小（图 3）。

2.4 VEGF165 可溶性表达产物 ELISA 定量检测

ELISA 检测结果表明，转染 72 h 后，A 组的 EPCs 培养上清液中 VEGF165 蛋白浓度为（175.8 ± 10.7）pg/ml，B 组为（10.5 ± 1.6）pg/ml，C 组为（9.3 ± 1.3）pg/ml，A 组与其他两组比较，差异有显著性意义（$P<0.01$）。而 B 组与 C 组差异无统计学意义（$P>0.05$）。

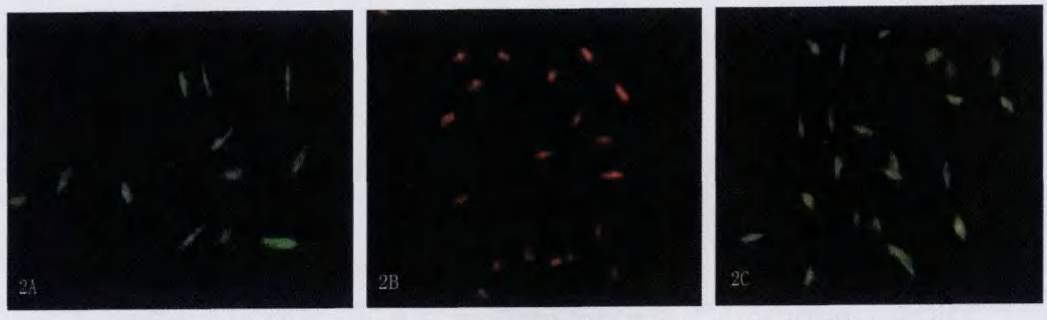
3 讨 论

近年来，随着组织工程和基因工程研究的快速发展，利用组织工程和基因工程的方法将促进血管新生的细胞因子导入损伤部位，改善和促进局部血管再生，进而促进损伤部



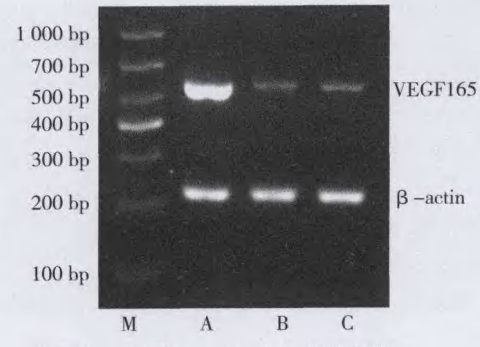
1A 为新分离出的骨髓单个核细胞，大小不一(×100)；1B 为培养第 4 d 的细胞，出现线样结构(×200)；1C 为培养第 9 d 的细胞，出现多个细胞簇(×200)

图 1　培养中 EPCs 的变化



2A 为 CD34 染色阳性(×200)；2B 为 CD133 染色阳性(×200)；2C 为 KDR 染色阳性(×200)

图 2　EPCs 的免疫荧光鉴定



M 为 1 000 bp marker，A 为载体转染组，B 为空载体转染组，C 为未转染组

图 3　RT-PCR 产物琼脂凝胶电泳结果

位组织的修复，这种治疗方法已成为勃起功能障碍研究的热点之一[3]。

在 1989 年，Leung 等[5]首先发现 VEGF，表明它是血管内皮细胞的特异丝裂原，具有促进血管内皮细胞增殖、游走及血管新生和提高血管通透性等生物活性。VEGF 是目前发现的最强效的促血管生成因子，有 5 种亚型，其中 VEGF165 是一个主要表型，分泌最多，发挥主要的生物学功能。Koransky 研究小组应用 VEGF 基因治疗缺血性心血管病证实其安全有效[6]。Staria 等[7]用 VEGF 治疗 172 名糖尿病眼底病变患者，68 名患者的视觉灵敏度好转，视网膜浑浊度较对照组明显降低。Park 等[3]在勃起功能障碍的治疗研究中，将 VEGF 注入老年大鼠的阴茎海绵体内发现老年大鼠的勃起功能得到显著的改善。VEGF 的生物半衰期较短为 6 min，直接注射难以在体内保持持续的有效浓度，且提取困难，价格昂贵。选用合适的载体，通过转基因方法使其高效、稳定表达，以达到用于治疗的目的。

EPCs 是具有自身复制、多分化潜能的干细胞，1997 年 Asahara 等[8]首次从人外周血中发现了 EPCs 之后，很快成为研究热点。一些研究表明 EPCs 不仅仅存在于外周血中，还存在于骨髓、脐带血、胚胎组织、脂肪组织等部位[9-12]。相对于外周血和脐带血来讲，骨髓中 EPCs 含量更丰富，增殖能力更强，而且容易获得，无需特殊处理，操作过程简单[13]，所以本研究选择大鼠骨髓作为 EPCs 的来源。EPCs 是血管内皮细胞的前体细胞，在生理和病理条件下能修复损伤血管内皮细胞，对维持血管内皮细胞的完整性具有重要的作用。因 EPCs 分化增殖能力强，体外扩增培养速度快，来源广泛，目前已成为干细胞移植治疗的种子细胞。

本研究成功将 pcDNA3.1(+)/VEGF165 转入大鼠骨髓 EPCs 中，转染目的基因 72 h 后，受体细胞可以分泌较多量的 VEGF165。RT-PCR 结果表明转染后的细胞内含有 VEGF 165mRNA，从转录水平证实了 VEGF165 的表达。ELISA 显示转染后的 EPCs 细胞能分泌 VEGF165。ELISA 定量结果的统计学分析表明，载体转染组 VEGF165 表达强于空载体转染组和未转染组。说明 pcDNA3.1(+) /VEGF165 质粒转染大鼠骨髓 EPCs 后，可使其分泌出较大量的 VEGF165，较其基础分泌量明显增加。

本研究表明 EPCs 可以被 pcDNA3.1(+)/VEGF165 质粒转染，并高效表达 VEGF165 蛋白，为后期糖尿病性勃起功能障碍动物模型的基因治疗提供实验依据。

基础研究 文章编号:0253-3626(2010)05-0666-04

相较正常结肠黏膜,Hath1 在非粘液性结肠腺癌中的表达下调

朱代华[1],龚建平[2],任 柯[2],孙建明[2],魏思东[2]
(重庆医科大学附属第二医院 1. 普通外科;2. 肝胆外科,重庆 400010)

【摘 要】目的:研究 Hath1 基因在非粘液性结肠癌中的表达。方法:从 48 例非粘液性结肠腺癌患者的标本中取材,石蜡包埋切片,H&E 染色,观察正常结肠黏膜、癌旁黏膜和结肠癌组织中杯状细胞数量的变化。用定量实时 RT-PCR 和 Western blot 的方法,检测这 3 种组织中 Hath1 蛋白和 Muc2 蛋白的表达。结果:在结肠癌组织中未发现杯状细胞;结肠癌组织中 Hath1 mRNA、Hath1 蛋白、Muc2 mRNA 和 Muc2 蛋白的表达均显著下调。结论:Hath1 基因的表达下调,可能与非粘液性结肠腺癌的发生有关。

【关键词】结肠癌;Hath1 基因;病因学
【中国图书分类法分类号】R730.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-03-30

Hath1 expression is down-regulated in colon non-mucinous adenocarcinomas compared with the expression in normal colon mucosa

ZHU Dai-hua, et al
(*Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the Hath1 expression in colon non-mucinous adenocarcinomas. *Methods*: Sections of paraffin-embedded tissues were used to investigate the goblet cell population of normal colon mucosa, mucosa adjacent colon cancer and colon cancer samples which came from 48 patients with colon non-mucinous adenocarcinoma. Hath1 and Muc2 expression in these samples were tested by immunohistochemistry, quantitative real-time reverse transcription-PCR and Western blot. *Results*: There were not any goblet cell to be found in colon cancr. The levels of Hath1 mRNA and Hath1, Muc2 mRNA and Muc2 were significantly down-regulated in colon cancer. *Conclusion*: The down-regulation of Hath1 expression may correlate with colon carcinogenesis.

【Key words】Colon carcinoma; Hath1 gene; Etiology

作者介绍:朱代华(1966-),男,副教授,
研究方向:大肠癌的基础研究。
通讯作者:龚建平,男,教授,E-mail:gongjianping11@126.com。
基金项目:重庆市自然科学基金(编号:CSTC,2007BB5262)。

参 考 文 献

[1] Zampetaki A, Kirton J P, Xu Q. Vascular repair by endothelial progenitor cells[J].Cardiovasc Res, 2008, 78(3): 413-421.

[2] Asahara T, Takahashi T, Masuda H, et al.VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells[J].Embo J, 1999, 18(14): 3964-3972.

[3] Park K, Ahn K Y, Kim M K, et al.Intracavernosal injection of vascular endothelial growth factor improves erectile function in aged rats[J].Eur Urol, 2004, 46(3): 403-407.

[4] Dall'Era J E, Meacham R B, Mills J N, et al.Vascular endothelial growth factor(VEGF) gene therapy using a nonviral gene delivery system improves erectile function in a diabetic rat model[J].Int J Impot Res, 2008, 20(3): 307-314.

[5] Leung D W, Cachianes G, Kuang W J, et al.Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen[J].Science, 1989, 246(4935): 1306-1309.

[6] Koransky M L, Robbins R C, Blau H M.VEGF gene delivery for treatment of ischemic cardiovascular disease[J].Trends CardioVasc Med, 2002, 12(3): 108-114.

[7] Staria C, Patel M, Kate B, et al.Vascular endothelial growth factor and the potential therapeutic use of pegaptanib(macugen)in diabetic retinopathy[J].Dev Ophthalmol, 2007, 39(1): 122-148.

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

[9] Matsumoto T, Mifune Y, Kawamoto A, et al.Fracture induced mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for bone healing[J].J Cell Physiol, 2008, 215(1): 234-242.

[10] Au P, Daheron L M, Duda D G, et al.Differential in vivo potential of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood and adult peripheral blood to form functional long-lasting vessels[J].Blood, 2008, 111(3): 1302-1305.

[11] Cherqui S, Kurian S M, Schussler O, et al.Isolation and angiogenesis by endothelial progenitors in the fetal liver[J].Stem Cells, 2006, 24(1): 44-54.

[12] Martinez-Estrada O M, Munoz-Santos Y, Julve J, et al.Human adipose tissue as a source of Flk-1+ cells: new method of differentiation and expansion[J].Cardiovasc Res, 2005, 65(2): 328-333.

[13] Wang Q R, Wang B H, Huang Y H, et al.Purification and growth of endothelial progenitor cells from murine bone marrow mononuclear cells [J].J Cell Biochem, 2008, 103(1): 21-29.

(责任编辑:关蕴良)