维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2005)01-0027-03

pEGFP-VEGF 重组质粒的构建及其在成骨细胞中的表达

范 伟,安 洪,蒋电明

(重庆医科大学临床学院骨科,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建一种含人血管内皮细胞生长因子 121($VEGF_{121}$)的质粒,以绿色荧光蛋白作为报告基因,观察其在成骨细胞中的表达。方法:从人胎脑文库中,以 PCR 方法扩增出人 $VEGF_{121}$ 基因,构建入增强绿色荧光蛋白表达质粒 pEGFP-C1,脂质体法转染成骨细胞,荧光显微镜下观测绿色荧光蛋白的表达;免疫细胞化学及 ELISA 检测 VEGF 蛋白的表达。结果:PCR 扩增出人 $VEGF_{121}$ 基因;构建入 pEGFP-C1,体外成功转染入成骨细胞,在荧光显微镜下可见强绿色荧光蛋白的表达,免疫细胞化学及 ELISA 检测到 VEGF 蛋白的表达。结论:重组质粒 pEGFP-VEGF 体外转染入成骨细胞后,目的基因能够在细胞有效表达,检测方法简便可靠,为利用转染该种目的基因的成骨细胞进行下一步实验提供了理论支持。

【关键词】血管内皮细胞生长因子;质粒构建;基因转染;成骨细胞

【中国图书分类法分类号】R68 【文献标识码】A 【收稿日期】2004-03-30

Construction of pEGFP-VEGF recombinant plasmid and its expression in osteoblast

FAN Wei, et al

(*Department of Orthopaedics, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct a vector containing human vascular endothelial growth factor, $VEGF_{121}$ ($VEGF_{121}$) with green fluorescence protein as the reporter gene, and then to observe its expression in osteoblast. *Methods*: $VEGF_{121}$ gene was amplified from foetus brain library by PCR, then ligated with pEGFP-C1 to form recombinant plasmid pEGFP-VEGF and transfected into osteoblast by liposome. The green fluorescence protein expression was observed by fluorescence microscopy and the VEGF expression was last detected by immunocytochemistry and ELISA. *Results*: $VEGF_{121}$ gene fragment was amplified by PCR and ligated to pEGFP-C1, then transfected into osteoblast successfully. The strong expression of green fluorecensce protein was observed by fluorecensce microscopy, and the expression of VEGF protein was detected by immunocytochemistry and ELISA. *Conclusion*: Recombinant plasmid pEGFP-VEGF is effectivly expressed after being transfected into osteoblast in vitro, which provides theoretical support for further study with its simple and reliable detecting methods.

【Key words】VEGF; Plasmid construction; Gene transfection; Osteoblast

血管内皮细胞生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)为一类糖蛋白,在血管形成中是一个基本调节因子。它能特异性地作用于血管内皮细胞(VEC),具有维持血管正常状态和完整性、提高血管通透性,可以强烈地刺激 VEC 分裂增殖,促进血管形成[1]。为了研究在骨愈合治疗中更多的 VEGF 的利用方法,我们构建了重组质粒 pEGFP-VEGF,并对其在体外培养的成骨细胞中的表达进行观察。

作者介绍:范 伟(1964-),男,主治医师,博士,主要研究方向:骨愈合。

基金项目:重庆市教委、卫生局科研基金资助项目(渝教科[2001]12号文 30,01-2-017)

1 材料与方法

1.1 主要试剂

人胎脑文库 PT1156-1(Marathon-Ready TM cDNA)由重庆医科大学病理学教研室石毓君博士惠赠。增强绿色荧光蛋白(Enhanced green fluorescent protein, EGFP)表达质粒 pEGFP-C1 购于美国 Clontech 公司。脂质体 Lipofectamin 购于美国 Invitrogen 公司。Taq DNA 聚合酶、T4 连接酶、质粒抽提试剂盒、DNA 回收试剂盒均购于美国 Promega 公司。限制性内切酶购于大连 TAKARA 公司。PCR 引物合成及产物测序由上海申友生物公司完成。抗人 VEGF 蛋白多克隆抗体购于美国 Santa Cruz 公司。SP 试剂盒购于北京中山生物公司。细胞培养实验设备由重庆医科大学超声研究所提供,DMEM 高糖培养基、胎牛血清购于美国 Hy-

维普资讯 http://www.cqvip.com

clone 公司。胰酶、β-甘油磷酸钠购于美国 Sigma 公司。ELISA 试剂盒购于 R&D 公司。

1.2 重组质粒的构建 以人胎脑文库 PTH156-1 为模板，用 PCR 方法扩增人 $VEGF_{121}$ 基因。引物设计为：

上游：5'-CGC GAA TTC ATG AAC TTT CTG CTG-3'；

下游：5'-ATA GGA TCC TCA CCG CCT CGG CTT-3'。

分别在上、下游引物中引入 EcoR Ⅰ和 *BamH* Ⅰ酶切位点。反应条件为：94℃ 预变性 5min；94℃ 30s，60℃ 30s，72℃ 50s，循环 35 次；最后 72℃ 延伸 10min。将回收的 PCR 产物及 pEGFP-C1 均以 EcoR Ⅰ和 *BamH* Ⅰ进行双酶切。回收酶切产物，用 T4 连接酶连接。重组质粒命名为 pEGFP-VEGF。经过酶切及测序验证其正确性。

1.3 胎兔成骨细胞分离、培养及鉴定

取产前 1 周新西兰孕兔(重庆医科大学实验动物中心提供)，麻醉后行剖宫术取出胎兔。无菌操作下取得胎兔颅骨，去尽骨膜及其他软组织，洗涤剪碎后，采用消化-组织块联合法(0.25%胰酶预消化 30min)分离培养成骨细胞并进行原代和传代培养。通过传代培养纯化细胞，镜下形态观察及用钙钴法进行碱性磷酸酶染色鉴别成骨细胞，传代培养于 6 孔板，每孔约有 5×10^4 个细胞，备用于基因转染。

1.4 pEGFP-VEGF 体外转染成骨细胞

将重组质粒 pEGFP-VEGF 采用 SDS 碱裂解法进行大量制备，氯化锂离心法纯化(LiCl 浓度为 4mol/L，离心速度为 10000r/min)，紫外分光光度计定量。当传代培养的第 4 代胎兔成骨细胞在 12 孔板中处于对数生长期时(细胞覆盖培养瓶底 70%-80%)，采用脂质体法转染胎兔成骨细胞，操作方法按照 Lipofectamin 说明书进行。

1.5 荧光显微镜观察绿色荧光蛋白表达

在激发波长 488nm，发射波长 507nm 的荧光显微镜(Nikon-TE300)下观察转染后成骨细胞内绿色荧光表达。

1.6 免疫细胞化学检测 VEGF 蛋白的表达

将转染后的胎兔成骨细胞爬片培养，取贴附于盖玻片的细胞，80%丙酮固定。采用 SP 法染色，DAB 显色，按照试剂盒操作步骤进行。

1.7 ELISA 检测 VEGF 蛋白分泌

以 5×10^4/孔将细胞接种于 12 孔板，设非转染组和转染组各 6 孔，于转染后 24-72h 按照 R&D 公司的 VEGF ELISA kit 试剂盒说明进行 VEGF 蛋白量测定。结果行 t 检验，$P<0.05$ 为统计有显著性。

2 结 果

2.1 从人胎脑文库中 PCR 扩增出 VEGF121 基因全序列，并成功连接至 pEGFP-C1 质粒，结果经酶切并测序鉴定证实。酶切图见图 1。

2.2 采用酶消化-组织块联合法分离培养出胎兔成骨细胞并传代培养，经镜下形态学观察及酶学鉴定确认，细胞纯度达到 90%(见图 2，图 3)。



图 1 重组质粒以 EcoR Ⅰ/*BamH* Ⅰ双酶切，见一约 440bp 片段释放，该片段即为插入质粒中的 VEGF121 基因。



图 2 传代培养的第 4 代成骨细胞 (IM×200)

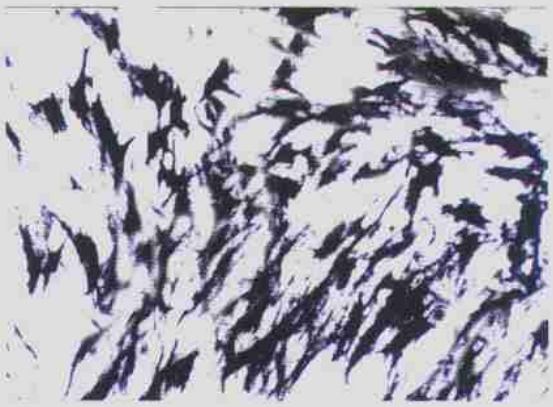


图 3 第 4 代成骨细胞培养 7 天后，碱性磷酸酶染色 (IM×40)

2.3 采用脂质体法对胎兔成骨细胞进行转染，荧光显微镜观察到细胞内有较强绿色荧光的表达。(见图 4)

2.4 免疫细胞化学染色见部分成骨细胞呈阳性表达

2.5 ELISA 法检测细胞培养液中 VEGF 蛋白的含

维普资讯 http://www.cqvip.com

量，结果表明，pEGFP－VEGF 体外转染胎兔成骨细胞可分泌出 VEGF 蛋白。转染组较非转染组的 VEGF 蛋白表达量更高，见表 1。



图 4 成骨细胞内 pEGFP 的表达 (FM×200)

表 1 The expression of VEGF in OB ex vivo

	VEGF(pg/mL/5×10⁴ cell)($\bar{x}\pm s$)
转染组	836.76±173.21*
非转染组	15.47±4.16

*$P<0.05$(V.S pEGFP－VEGF)

3 讨 论

VEGF 在正常成人体内分布广泛，人类 VEGF 家族可根据其蛋白质序列中所含氨基酸的多寡而分为 5 个亚型，即 $VEGF_{121}$、$VEGF^{145}$、$VEGF_{165}$、$VEGF_{189}$和 $VEGF_{206}$。由于基因的调控和蛋白质产物的差异另外还增加了 VEGF－B、VEGF－C 和 VEGF－D 3 个亚型[2]。现在发现胎盘生长因子(Placenta growth factor, PLGF)也属于 VEGF 家族[3]。VEGF 依据人体各部位功能的不同而具有相应强度的表达。有研究表明，利用细胞因子促进局部血管再生对骨愈合可能是比较有前途的手段[4]。

骨愈合是骨科领域研究的重要课题，VEGF 在骨生成和修复中的作用已得到更多的证实。有研究发现，骨组织和其它组织的再生一样，依赖于血管再生。首先由毛细血管长入软骨或骨痂，形成新的微循环网，同时带入成骨细胞，形成新骨[5]。wang 等[6]的研究发现，VEGF 还可促进血管内皮细胞分泌胰岛素样生成因子－I(IGF－I)及内皮素－I(ET－I)刺激成骨细胞生长。Homer 等[7]对人类新生骺板软骨细胞 VEGF 的表达进行了实验研究，表明肥大软骨细胞产生的 VEGF 对骺板生长过程中血管的渗入起重要调节作用。Soker 等[8]将 VEGF cDNA 注射入缺血组织后发现缺血组织周围血供明显改善，侧、副血管生成增加。还有一些学者从正反不同的角度证实了 VEGF 促血管生成及成骨的作用[9-11]。在骨折愈合的过程中，VEGF 作为促使内皮细胞增殖、趋化的特异细胞素，对骨样细胞在缺氧刺激下，其 VEGF mRNA 及蛋白表达明显提高。因而，加强局部血管增生渗入和骨折断端的血流量，可加速骨折愈合。

通过植入组织工程骨来实现骨缺损的修复是目前研究的重点，但组织工程骨在植入体内后的再血管化是影响其种子细胞存活，进而影响缺损区骨愈合的关键因素。目的基因在体内的表达可因其携带方式的不同其表达效用也相差较大。我们通过上述实验构建了易于检测的代有荧光蛋白报告基因的 VEGF 真核表达质粒，并能在经转染后的细胞外分泌表达，为进一步利用转基因技术将目的基因转入靶细胞构建组织工程骨，以促进植入区血管的生成奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor[J]. J Mol Med, 1999; 77(7): 537－543.

[2] Poltorak I, Cohen T, Sivan R, et al. $VEGF_{145}$ a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds toextracellularmatrix[J]. J Biol chem, 1997; 272: 7151－7158.

[3] Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, et al. vascular endothelial growth factor(VEGF)and its receptors[J]. FASEB J, 1999; 13: 9－22.

[4] Elein Y M, Dixit V, Gitnick G. Extensive in vivo angiogenesis following controlled release of human vascular endothelial cell growth factor: implications for tissue engineering and wound healing[J]. Artif Organs, 2001; 25(7): 558－565.

[5] Streeten E A, Brandi M L. Biology of bone endothelial cells[J]. Bone miner, 1990; 10: 85－94.

[6] Wang S, Miura M, Demura H, et al. Anabbic effects of 1, 25－dihydroxy vitamin D3 on osteoblasts are enhanced by vascular endothdial growth factor produced by osteoblasts and by growth factor prodlced by endothelial cells[J]. Endocrinology, 1997; 138: 2953－2962.

[7] Horner A, Bishop N J, Bord S, et al. Immunolocalisation of vascular endothelial growth factor in human neonatal growth plate cartilage[J]. J Anat, 1999; 194: 519－524.

(下转第 38 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

NOS2 G－954C SNP 等位基因组合分布类型仅有 8 种，尚未发现 NOS2 T－1173T＋C－954C 组合基因型。其前 5 种组合基因型分别为：NOS2 C－1173C＋G－954G 233 例(41.24%)、NOS2 C－1173C＋G－954C 143 例(25.31%)、NOS2 C－1173T＋G－954G 89 例(15.75%)、NOS2 C－1173T＋G－954C 59 例(10.44%)、NOS2 T－1173T＋G－954G 27 例(4.78%)，且其组合基因型分布并不存在男、女性别的差异性。这种分布特征是人类发展中长期与环境相互作用(或称为自然选择或遗传压力)的结果，这对研究 NOS2 基因 SNP 及其组合分布和单倍体基因型分布在整体生理与疾病机制中的作用具有极其重要意义。但鉴于上述研究人群的样本量有限，尚需再扩大研究群体的样本量来加以证实。

参 考 文 献

[1] 谢正祥，牛永红，马厚勋，等. Beta 肾上腺素能受体 3 种亚型基因的 5 位点 SNP 的基因型分布[J]. 重庆医科大学学报，2003；28(6)：707－711.

[2] Rutherford S, Johnson MP, Curtain RP, et al. Chromosome 17 and the inducible nitric oxide synthase gene in human essential hypertension[J]. Hum Genet, 2001; 109(4): 408－415.

[3] Morris B J, Glenn C L., Wiicken D E. L., et al. Infuence of an inducible nitric oxide synthase promoter variant on clinical variables in patients with coronary artery disease[J]. Clinical Science, 2001; 100: 551－556.

[4] Shampa Nasreen, Toru Nabika, Hiroshi Shibata, et al. T－786C Polymorphism in Endothelial NO Synthase Gene Affects Cerebral Circulation in Smokers Possible Gene－Environmental Interaction[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002; 22: 605－610.

[5] CHOWDHARY. S, G Andre NG, NUTTALL. S. L, et al. Nitric oxide and cardiac parasympathetic control in human heart failure[J]. Clinical Science, 2002; 102: 397－402.

[6] Yun－He Liu, Jiang Xu, Xiao－Ping Yang, et al. Effect of ACE Inhibitors and Angiotensin Ⅱ Type Ⅰ Receptor Antagonists on Endothelial NO Synthase Knockout Mice With Heart Failure[J]. Hypertension, 2002; 39: 375.

[7] Morris B J, Markus A, Glenn CL, et al. Association of a functional inducible nitric oxide synthase promoter variant with complications in type 2 diabetes[J]. J Mol Med, 2002; 80(2): 96－104.

[8] Kumaramanickavel G, Sripriya S, Vellanki RN, et al. Inducible nitric oxide synthase gene and diabetic retinopathy in Asian Indian patients[J]. Clin Genet, 2002; 61(5): 344－348.

[9] Oates JC, Levesque MC, Hobbs MR, et al. Nitric oxide synthase 2 promoter polymorphisms and systemic lupus erythematosus in african－americans[J]. J Rheumatol, 2003; 30(1): 60－67.

[10] Lu X, Lu P, Xing RY, et al. A short tandem repeat polymorphism in the inducible nitric oxide synthase gene in Chinese population. Yi Chuan Xue Bao, 2002; 29(4): 290－293.

[11] Kun JF, Mordmuller B, Perkins DJ, et al. Nitric oxide synthase 2(Lambarene) (G－954C), increased nitric oxide production, and protection against malaria[J]. J Infect Dis, 2001; 184(3): 330－336.

[12] Hobbs MR, Udhayakumar V, Levesque MC, et al. A new NOS2 promoter polymorphism associated with increased nitric oxide production and protection from severe malaria in Tanzanian and Kenyan children[J]. Lancet, 2002; 360(9344): 1468－1475.

(上接第 29 页)

[8] Soker S, Machado M, Atala A. Systems for therapeutic angiogensis in tissue engineering[J]. World J Urol, 2000; 18(1): 10－18.

[9] Johan Street, Min Bao, Leode Guzman, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repaier by promoting angiogenese and bone[J], turnover. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2002; 19(15)9656－9661.

[10] Claffey K P, Abrams S C, Brown L F, et al. 2001; Lab. Invest. 81, 61－75.

[11] Decders M M, van Bezooijen R L, van der Horst G, et al. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast－derived vascular endothelial growth factor. (2002) Endocrinology 143(4): 1545－1553.