DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.02.028
第22卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 2
166 2000年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)02-0166-04

大鼠颌下腺血管内皮生长因子 cDNA 的转移及表达

张从纪[1],李慧增[1],杨 军[1],黄庆愿[2],孙 远[1],史文进[1] (第三军医大学:[1]附属西南医院口腔科;[2]高原军事医学系高原医学研究室、病理生理学教研室;重庆 400038)

提 要 目的:探讨以颌下腺为靶器官,进行血管内皮生长因子(VEGF)基因治疗后,颌下腺中 VEGF 含量变化。方法:构建了 VEGF 基因表达的真核细胞表达载体,以阳离子脂质体为介质,向大鼠颌下腺转染外源性的 VEGF 基因,应用 RT-PCR 技术观察 VEGF 基因的表达,ELISA 方法检测颌下腺中 VEGF 的含量变化。结果:转 pBKCMV-$VEGF_{121}$ 基因后第 1 天,大鼠颌下腺内 VEGF 的表达及涎液中 VEGF 的含量即开始增高,术后 2~3 d 达到高峰,之后逐渐下降,但高水平表达持续 5 d 左右,与同期对照组相比,二者差别显著。结论:以颌下腺为靶器官,阳离子脂质体为载体进行 VEGF 基因转染,可使外源基因在颌下腺内稳定持续表达,改变了涎液中细胞因子的含量,为临床上促进口内伤口的愈合提供了新的途径和依据。

关键词 颌下腺;血管内皮生长因子;基因治疗
中图法分类号 R392.2;R781.7 文献标识码 A

Expression of vascular endothelial growth factor transferred into salivary glands in rats

ZHANG Cong-ji, LI Hui-zeng, YANG Jun, HUANG Qing-yuan, SUN Yuan, SHI Wen-jin (Department of Stomatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract Objective: To study the feasibility of using vascular endothelial growth factor (VEGF) gene therapy for salivary glands and observe the changes in content of VEGF in spittle. Methods: VEGF cDNA was cloned into eukaryotic expression vector pBKCMV and the VEGF gene was transferred into rat maxillary glands mediated by lipotect AMINE. The expression of VEGF gene was investigated by RT-PCR and the content of VEGF in spittle was observed by ELISA. Results: The expression of VEGF gene and the content of VEGF were significantly higher in the experimental group than in the control. It reached its peak from the 2nd to 3rd d after treatment and remained high for 5 d. Conclusion: After being mediated by lipotect AMINE, the VEGF gene can express steadily and constantly. The content of VEGF in spittle becomes higher. It provides a new way for promoting oral wound healing in clinical practice.

Key words salivary gland; vascular endothelial growth factor; gene therapy

口腔粘膜的损伤是口腔科的常见病症。与其它组织相比,具有明显的愈合快的特点,目前认为这与涎液对维持口腔内环境的稳定性有关[1]。随着分子生物学的发展及对细胞因子认识的深入,将细胞因子直接作为促进创伤愈合的药物已用于实验及临床,并取得一定的疗效,但也存在有费用高和药物持续时间短的缺点[2]。本研究应用基因工程技术,将血管再生相关因子:血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor; VEGF)的 DNA 转染到颌下腺中,增强其在颌下腺中的表达,提高涎液中 VEGF 的含量,为进一步促进口内创伤愈合的临床治疗提供基础。

1 材料与方法

1.1 动物与手术

Wistar 大鼠 48 只,由本校动物所提供,体重 200~220 g,雌雄不拘,分为实验组(24 只),和对照组(24 只)。以 2%戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉,在颈部中央沿身体长轴方向切开皮肤、皮下组织,暴露颌下腺囊膜,用 6 号针在直视下注入 DNA-脂质体复合物,对照组动物,以等量的空白脂质体注射。分层缝合伤口,术后常规换药。各组动物分别于术前和术后 1、2、3、4、5、7 d,在麻醉下用消毒的 1 cm×1 cm×1 cm 的聚乙烯醇(Polyvinyl alco-

作者简介:张从纪(1968.2),男,河北省永年县人,硕士,住院医师,主要从事颌面部创伤及修复方面的研究,发表论文 7 篇。电话:(023)68754135

收稿日期:1999-10-06;修回日期:1999-12-22

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

hol, PVA) 海绵收集口腔涎液, 取出后离心, 取上清, －70℃保存。之后, 分离和切取颌下腺, 液氮中保存[3]。

1.2　VEGF 真核表达质粒的构建与扩增

以 *EcoR* Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切 pUC19-$VEGF_{121}$ 载体, (本校黄庆愿博士提供) 0.8%琼脂糖凝胶电泳分离回收全长大鼠 $VEGF_{121}$ cDNA 片段, 与同样酶切的 pBKCMV(Stratagene 公司产品) 连接, 构建成真核表达载体 pBKCMV-$VEGF_{121}$, 其中目的基因可编码 121 个氨基酸的 $VEGF_{121}$, 含有信号肽序列, 其上游有巨细胞病毒启动子 (CMV) 及其增强子, 酶切鉴定正确后, 碱裂解法大量制备, 纯化后, 存－20℃备用[4]。

1.3　质粒注射液的制备

将保存的 pBKCMV-$VEGF_{121}$ 质粒 DNA 溶入含 5%等渗葡萄糖 PBS 中, 配制成 1g/ L 浓度。再加入到 Lipofectin AMINE (GIBCO BRL)中, 脂质体与质粒 DNA 溶液的体积比为 10 ∶1, 静置 30 min。每只颌下腺注入 0.5 ml 的脂质体-DNA 复合物。

1.4　颌下腺中 VEGF mRNA 的含量

采用 RT-PCR 法检测颌下腺中 VEGF mRNA 的含量[5]。

RNA 的提取: 从液氮中取出各标本组织 100 mg, 用总 RNA 提取试剂盒 (美国 Promega 公司) 提取组织总 RNA, 经紫外分光光度计测定总 RNA 浓度和纯度, 计算样品总 RNA 浓度。定量 RNA 并调成 1 μg/μl。

1.4.1　逆转录　在 20 μl 的反应体系中加入 RNA 2 μl, 5× buffer 4 μl, DTT (Promega) 0.5 μl, dNTPs (25 mmol/ L) 0.5 μl (Promega), Rnasin (Promega) 0.5 μl, Moloney 鼠白血病病毒 (M-MLV)逆转录酶 (200 U/μl) 1 μl, 寡 (dT) 12～18 引物 2 μl, 加水至 20 μl, 混匀, 37℃作用 60 min, 95℃作用 5 min, 灭活逆转录酶, 立即冰浴冷却。

1.4.2　PCR 反应　将逆转录产物进行扩增[4]。VEGF 正义引物 5′-TTGCTGCTCTACCTCCAC-3′, 反义引物 5′-AATGCTTTCTC-CGCTCTG-3′, 内参照 β-肌动蛋白 (β-actin) 5′端引物序列为 5′-AAGGTGACCCAGAT- CATGTTTGAG-3′, 3′端引物序列为 5′-AGGAGGAGCAATGATCTTGATCTT-3′。20 μl 的反应体系中加入: 10× buffer 2 μl, 25 mmol/ L mcl 21.6 μl, 25 mmol/ L dNTPs 1.5 μl, β-actin 引物各 0.4 μl, VEGF 引物各 0.4 μl, 2 U/μl Tag 酶 0.4 μl, 反转录产物 1.5 μl, 加去离子水至 20 μl。将反应管置于 PCR 仪 (美国 Perkin-Elmer 9600 型) 上, 94 ℃ 30 s, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 共 30 个循环。最后 72℃延伸 7 min。

1.4.3　电泳及定量分析　8 μl PCR 产物经 1.2%的普通琼脂糖凝胶电泳后, 溴化乙啶染色, 电泳完毕后在紫外灯下观察照相, 密度扫描分析 PCR 产物带。将 VEGF 与 β-actin 比值作为 VEGF 表达水平的参数, 对 VEGF PCR 产物相对定量。

1.5　涎液中 VEGF 含量

涎液中 VEGF 含量采用 ELISA 试剂盒 (R&D systems, Minneapolis, MN) 检测, 测定标本时先解冻, 10 000× g 离心 10 min, 去除杂质。按试剂盒说明书进行操作, 以微量滴定板读数仪测定 450 nm 的光密度, 进行定量检测, 结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。所有检测的 *OD* 值减去标准 VEGF 含量为 0 的平均 *OD* 值, 以 VEGF 的含量对其 *OD* 数的 log 值制图, 求得标准曲线, 据此取得各标本中 VEGF 的含量。

2　结果

2.1　pBKCMV-$VEGF_{121}$ 表达质粒载体的酶切鉴定

pUC19-$VEGF_{121}$ 载体及 pBKCMV 经 *EcoR* Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切后分别回收 499 b_p 的目的基因片段和 4.5 kb 的载体片段, 两者经 T4 DNA 连接酶作用, 构建成 pUC19-$VEGF_{121}$ 质粒, 进一步酶切鉴定, 见图 1、2, 可见片段大小与理论值相符, 证明载体构建正确。



图 1　**pUC19-$VEGF_{121}$ 酶切鉴定**

Fig 1　Identification of pUC19-$VEGF_{121}$ by digest enzyme

M: Marker (λDNA *Hind* Ⅲ); A: pUC19-$VEGF_{121}$; B: pUC19-$VEGF_{121}$ digested by *EcoR* Ⅰ and *Sal* Ⅰ; C: $VEGF_{121}$ DNA

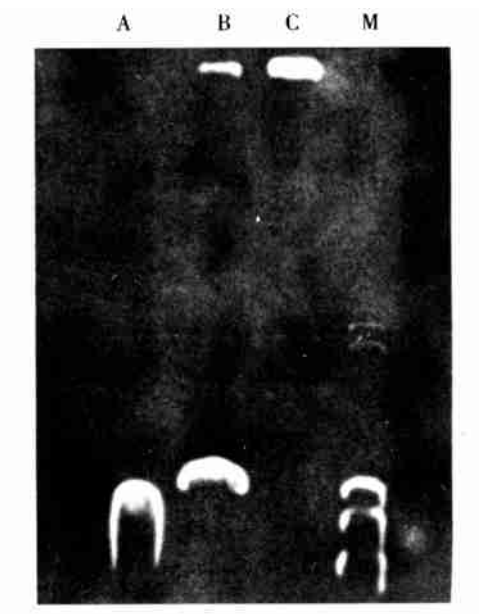


图 2　**pBKCMV-$VEGF_{121}$ 酶切鉴定**

Fig 2　Identification of pBKCMV-$VEGF_{121}$ by digest enzyme

M: Marker (λDNA Hind Ⅲ); A: pBKCMV-$VEGF_{121}$; B: pBKCMV-$VEGF_{121}$ digested by *EcoR* Ⅰ and *Sal* Ⅰ; C: $VEGF_{121}$ DNA

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.2 VEGF 基因的表达

由于β-actin几乎存在于所有细胞中，并且含量相对稳定，VEGF的基因表达程度以 VEGF mRNA 相对于β-actin mRNA 取得。大鼠颌下腺 VEGF 基因转染前后腺体中 VEGF mRNA 含量见表 1。

表 1 大鼠颌下腺 VEGF 基因转染前后颌下腺中 VEGF mRNA 含量

Tab 1 Content of VEGF mRNA in submaxillary gland before and after VEGF gene transfection

	Pre-operation	Post-operation(d)					
		1	2	3	4	5	7
Gene therapy	0.531 ± 0.061	0.732 ± 0.032*	1.372 ± 0.2**##	1.14 ± 0.11**##	0.875 ± 0.21*#	0.716 ± 0.3*#	0.731 ± 0.22*#
Control	0.524 ± 0.121	0.726 ± 0.1*	0.686 ± 0.12	0.574 ± 0.34	0.533 ± 0.2	0.590 ± 0.11	0.552 ± 0.2

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* pre-operation；#：$P<0.05$，##：$P<0.01$ *vs* control

2.3 颌下腺转染 VEGF 基因后涎液中 VEGF 的水平变化见表 2

表 2 大鼠涎液中 VEGF 的含量(pg/ml)

Tab 2 Content of VEGF in rat spittle (pg/ml)

	Pre-operation	Post-operation(d)					
		1	2	3	4	5	7
Gene therapy	66.0 ± 29.6	167.25 ± 45.2*	214.48 ± 66.7**#	201.03 ± 47.8**##	177.46 ± 42.3**##	128.45 ± 25.4*#	130.12 ± 50.4*#
Control	74.5 ± 36.3	135.44 ± 51.1*	122.98 ± 67.0*	80.67 ± 44.5	92.35 ± 34.4	88.79 ± 52.2	75.68 ± 40.8

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* pre-operation；#：$P<0.05$，##：$P<0.01$ *vs* control

3 讨论

VEGF 是近年来新发现的一种特异性促进血管内皮细胞增殖的有丝分裂原，它在血管发生，维持血管内皮完整性和通透性，以及在胚胎发育，肿瘤的生成和生长，炎症和创伤愈合等方面均有重要意义[5]。Taichman 等[1]发现涎液中也存在有 VEGF，并初步证实 VEGF 单独或和涎液中其它因子协同作用，保护口腔粘膜[1,4]，VEGF 的这些特性表明，VEGF 在创伤愈合过程中具有重要作用，将 VEGF 用于促进伤口的愈合研究也日益受到关注。

以创伤组织为靶器官进行基因转移，在治疗过程中难免在接近伤口的区域产生新的物理、化学、生物等因素的刺激，并诱导免疫功能改变等一系列反应，在促伤口愈合的同时，也增加了新的负面影响。而以涎腺为靶器官进行口内创伤的治疗，可以克服上述缺陷，更为安全，可行，便利[6,7]。

本研究中采用的 Lipofect AMINE 系多聚阳离子脂质体，具有较多的正电荷，增强了与 DNA 及靶细胞的亲合能力，并使其能在形成较多复合体颗粒的前题下携带较多的 DNA 分子进入靶细胞，因此较其它阳离子脂质体具有更理想的转染效率[8]。另外，为进一步提高 VEGF 基因的转染率，本实验将原核的 VEGF 表达质粒改建为以 CMV 为启动子的真核表达质粒－pBKCMV-VEGF$_{121}$，全长约 5.0 kb，其中位于 *EcoR* Ⅰ和 *Sal* Ⅰ位点间为 499 b_p 的 VEGF cDNA 序列，故用 *EcoR* Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切 pBKCMV-VEGF$_{121}$ 表达质粒可得约 4.5 kb 和 0.5 kb 2 个片段，本实验的酶切结果与之相符，表明质粒及 VEGF 基因插入正确。

由实验结果可见，大鼠颌下腺经外源性 VEGF 基因转染后，于术后第 1 天，即表现出 VEGF mRNA 含量的升高，提示 VEGF 合成的增加，于术后 2～3 d 达到高峰，并在高水平表达持续一周的时间，与术前及对照组相比，差异显著。说明外源性的 VEGF 已成功转染到颌下腺体内，并得以正常表达。同样涎液中的 VEGF 含量的动态变化也得以再次证实，涎液中 VEGF 含量的变化与 VEGF mRNA 的含量变化基本相符。

另外，对照组虽然未进行 VEGF 基因的转染，但其术后 1～2 d 内颌下腺中 VEGF mRNA 水平及涎液中 VEGF 含量均有所升高，且差异显著，这是由于本实验在大鼠进行基因转染的当天，即又进行口内创伤模型的制备，在外伤的刺激下，使涎腺合成和分泌 VEGF 的量有所增加，这与文献报道相一致[1,9]。但这并未影响到作为对照组与基因转染组的对比，从结果可见，二者的差异仍然显著。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

VEGF 是主要的血管再生刺激因子, 调节血管生长, 促进创伤愈合过程中肉芽组织的生成[4], 在体外实验中已得到证实, 然而在体内实验中, 由于给药方式的不同, 疗效差异很大。创伤愈合需要在各阶段细胞因子的持续刺激下完成[10], 在伤口中直接给予重组的细胞因子治疗, 存在有给药不便, 药物半衰期短等不利因素, 难以达到持续作用的效果。基因治疗无疑是克服上述缺陷的首选方法, 本实验结果表明, 通过以颌下腺为靶器官进行细胞因子的基因转移, 可使涎液中该因子的含量明显提高, 并持续 5 d 左右的时间, 足以达到伤口愈合所需时间。

总之, 颌下腺是进行基因转染的理想的靶器官, 利用其内分泌腺和外分泌腺的特点, 可以将促进创伤愈合的细胞生长因子等, 通过基因工程技术, 将其 DNA 转染入腺体内, 使外源基因得以表达, 从而改变口腔及上消化道的内环境, 为临床上进行口内组织损伤的治疗提供了新的途径和依据。

参考文献

[1] Taichman N S, Cruchley A T, Fletcher L M, *et al*. Vascular endothelial growth factor in normal human salivary glands and saliva: a possible role in the maintenance of mucosal homeostasis [J]. Laboratory Investigation, 1998, 78(7): 869—875.

[2] Winn D M, Diehl S R, Horowitz A M, *et al*. Scientific progress in understanding oral and pharyngeal cancers[J]. J Am Dent Assoc, 1998, 129(6): 713—718.

[3] Nissen N N, Polverini P J, Koch A E, *et al*. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing[J]. Am J Pathol, 1998, 152(6): 1 445—1 452.

[4] Ilan N, Mahooti S, Madri J A. Distinct signal transduction pathways are utilized during the tube formation and survival phases of *in vitro* angiogenesis[J]. J Cell Sci, 1998, 111 (Pt 24): 3 621—3 631.

[5] Gille J, Khalik M, Konig V, *et al*. Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) induces vascular permeability factor (VPF/VEGF) expression by cultured keratinocytes[J]. J Invest Dermatol, 1998, 111(6): 1 160—1 175.

[6] He X, Goldsmith C M, Mamary Y, *et al*. Systemic action of human growth hormone following adenovirus-mediated gene transfer to rat submandibular glands[J]. Gene Ther, 1998, 5(4): 537—541.

[7] O'Connell B C, Lillibridge C D, Ambudkar I, *et al*. Somatic gene transfer to salivary glands[J]. Ann N Y Acad Sci, 1998, 842(2): 171—180.

[8] Kagami H, Atkinson J C, Michalek S M, *et al*. Repetieive adenovirus administration to the parotid gland: Role of immunological barriers and induction of oral tolerance[J]. Hum Gene Ther, 1998, 9(3): 305-313.

[9] Yasushi F, Kenneth W. Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner[J]. J Biol Chem, 1999, 274(23): 16 349—16 354.

[10] Oxford G O, Nguyen K H, Alford C E, *et al*. Elevated salivary EGF levels stimulated by periodontal surgery[J]. J Periodontol, 1998, 69(4): 479—484.

(编辑　王　红)

(上接 165 页)

析时, 抗坏血酸用 2.4-二硝苯肼法, 硫胺素用硷性铁氰化钾法, 核黄素用过柱荧光法, 于美国 BECKMAN 3600 型氨基酸分析仪上上机分析 2 种茶饮料的氨基酸含量。

1.2.2　耐力实验[2]　取体重在 25～30g 的雄性小鼠 30 只, 分为对照组(Ⅰ), 山楂茶组(Ⅱ), 红姜茶组(Ⅲ), 每组 10 只动物, 均喂颗粒饲料, 对照组饮蒸馏水, Ⅱ, Ⅲ组动物每天各饮体重 10%量的饮料, 连续 14 d, 在未次给予后 1 h 进行游泳时间测定。实验前每只小鼠距尾根部 2.5 cm 处系 1 g 重物, 在水温 26℃～27℃, 水深 30 cm 的水槽中进行游泳。

2　结果

急性毒实验表明, 2 种茶饮料无毒。山楂茶含 11 种氨基酸, 含 VC、VB1、VB2 分别为: 10 mg/100 ml、0.177 μg/100 ml、15 μg/100 ml; 红姜茶含 13 种氨基酸, 含 VC、VB_1、VB_2 分别为: 6 mg/100 ml; 0.08 μg/100 ml; 20 μg/100 ml; 小鼠游泳时间分别为: ①(41.2±2.5)s, ②(65.3±1.2)s, ③(66.0±2.8)s。

3　讨论

实验结果表明: 山楂茶, 红姜茶均含 11 种以上的氨基酸, 并富含 VB1、VB2 及 VC, 动物分别饮用 2 种饮料后, 能显著提高其耐力及抗疲劳能力(与对照组比较 $P<0.05$)。且成本低、饮用方便风、味独特。随着物质文明的不断进步, 人们对自身的保健意识已大大加强, 由于茶叶含有对人体健康有益的营养成份和保健功能, 21 世纪将是茶叶的黄金时代, 茶饮料将是一种时尚饮料, 市场对它的需要量会越来越大, 因此, 开发茶饮料将具有良好的经济效益的社会效益。

关键词　茶; 营养评价
中图法分类号　R151.3　　文献标识码　B

参考文献

[1] 崔锐谦 . 21 世纪饮料——茶饮料 . 食品科学, 1995, 16(8): 13—18.

[2] 于守洋, 崔鸿斌, 石　华, 等 . 中国保健食品指南 . 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1996. 236—237.

(编辑　王　红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net