

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00929

腺病毒介导人血管内皮细胞生长因子基因感染 NIH3T3 细胞的实验研究

韩焱福¹, 刘 军¹, 宋建星^{1*}, 潘银根², 黄盛东³, 龚德军³

1. 第二军医大学长海医院整形外科, 上海 200433

2. 江苏省启东市人民医院烧伤科, 启东 226200

3. 第二军医大学长海医院胸心外科, 上海 200433

[摘要] 目的: 探讨腺病毒介导人血管内皮细胞生长因子(hVEGF)基因感染 NIH3T3 细胞后目的基因表达情况及其对细胞增殖分化的影响, 并观察体内移植后的表达情况及其血管生成效应。方法: 构建含 hVEGF 基因重组腺病毒 Ad. hVEGF, 体外感染 NIH3T3 细胞, 采用荧光显微镜和流式细胞术检测其转染效果和转染率, 采用免疫组化、RT-PCR 和 ELISA 法分别检测转染后的 NIH3T3 细胞 VEGF 的表达情况。将转染后的 NIH3T3 细胞移植于小鼠背部皮肤缺损模型上, 1 周后取创面覆盖的脱细胞真皮组织标本, 免疫组化检测组织 VEGF 的表达, 并行组织新生血管计数。结果: 携带 hVEGF 基因的重组腺病毒对于 NIH3T3 细胞具有较高的转染效率, 转染效率与病毒感染复制数(multiplicities of infection, MOI)具有量效关系。MOI 为 100 倍时, 转染效率达 95%。RT-PCR 和免疫组化检测到, Ad. hVEGF 感染 NIH3T3 细胞 24 h 后即可在基因和蛋白质水平表达, ELISA 法检测到 VEGF 第 3 日表达分泌较高, 7 d 时达到表达高峰(1 052 pg/ml), 13 d 后仍可检测到 VEGF 的表达。2 周内 MTT 法动态检测 D 值, 转染组细胞与未转染组细胞比较无显著性差异($P>0.05$)。转染细胞体内种植后在组织中亦可明显表达 VEGF, 实验组新生血管数显著高于对照组($P<0.01$)。结论: 腺病毒介导的 VEGF 基因可有效转染 NIH3T3 细胞, 体内外均可有效表达目的基因, 并可促进移植组织血管新生。

[关键词] 血管内皮细胞生长因子; NIH3T3 细胞; 腺病毒; 细胞增殖; 细胞分化

[中图分类号] R 329.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)08-0929-05

Adenovirus-mediated VEGF expression in NIH3T3 cells

HAN Yan-fu¹, LIU Jun¹, SONG Jian-xing^{1*}, PAN Yin-gen², HUANG Sheng-dong³, GONG De-jun³

1. Department of Plastic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Burn Surgery, the People's Hospital of Qidong, Qidong 226200

3. Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate VEGF expression in NIH3T3 cells infected by adenovirus containing hVEGF₁₆₅ gene and its influence on proliferation of NIH3T3 cells, and to observe the expression of hVEGF and its angiogenic effect *in vivo*.

Methods: Adenoviral vector containing hVEGF₁₆₅ gene was constructed and was used to infect NIH3T3 cells. The infection efficiency of adenovirus vector was examined by immunofluorescence and flow cytometry. Expression of VEGF in NIH3T3 cells and its levels in the culture medium were examined by immunohistochemical (IHC) staining, RT-PCR, and ELISA. The infected NIH3T3 cells were implanted in skin defect at rat back and the acellular dermis on the wound was obtained one week later; the expression of hVEGF was detected by IHC in the dermis and the density of vessels was determined under microscope. **Results:** NIH3T3 cells were effectively transfected by adenovirus containing VEGF gene *in vitro*, the transfection efficiency was in a dose-effect manner with multiplicities of infection (MOI) of the adenovirus. When MOI was 100, the infection efficiency was more than 95%. The expression of VEGF mRNA and protein was detected by RT-PCR and IHC 24 h after transfection. ELISA result showed that the high level of VEGF on the 3rd day after transfection and the level reached its peak 7 d after infection

[收稿日期] 2008-01-11 **[接受日期]** 2008-05-20

[基金项目] 上海市卫生局青年科研基金(2006Y41). Supported by the Youth Scientific Research Foundation of Shanghai Health Bureau (2006Y41).

[作者简介] 韩焱福, 博士生. E-mail: dochyf@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-25070597, E-mail: drsong@163.com

(1 052 pg/ml); VEGF expression was detectable 13 d after transfection. MTT assay demonstrated no significant difference in cellular proliferation between the transfection and non-transfection group. Expression of hVEGF was also detected *in vivo* in mice, and the density of vessels in the experimental group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$).

Conclusion: Adenoviral vector can effectively transfect VEGF gene into NIH3T3 cells; VEGF gene can be detected *in vitro* and *in vivo*; and it can promote neovascularization in the transplanted tissues.

[KEY WORDS] vascular endothelial growth factor; NIH3T3 cells; adenovirus; cell proliferation; cell differentiation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(8): 929-933]

血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是一种特异的与血管生长有关的因子, 特异地作用于血管内皮细胞, 具有强烈的促有丝分裂作用, 其表达与组织中微血管的密度及新生血管的数量密切相关^[1]。基因工程细胞治疗优于传统的蛋白质及基因治疗。小鼠 NIH3T3 细胞是来源于小鼠胚胎的成纤维细胞, 易于转染, 适于作为外源基因修饰细胞^[2]。基因治疗中选择安全高效的载体是关键, 目前用于介导血管生长因子基因的载体种类较多, 如裸质粒、脂质体和腺病毒等。而与裸质粒、脂质体相比较, 腺病毒载体能高效感染多种细胞, 因而被广泛用于基因转移的研究中^[3-5]。

本研究通过构建 VEGF 腺病毒载体, 感染 NIH3T3 细胞, 拟探讨腺病毒介导人 VEGF 基因感染 NIH3T3 细胞后目的基因表达情况及其对细胞增殖分化的影响, 并观察体内移植后的表达情况及其血管生成效应, 为进一步应用 VEGF 基因工程细胞治疗提供实验和理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料及试剂 DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、EDTA、脂质体和细胞转染试剂盒均为 Gibco 公司产品; 二甲亚砜 (DMSO)、四甲基偶氮唑盐 (MTT) 购于美国 Sigma 公司; ELISA 试剂盒购于晶美公司; 免疫组化试剂盒及兔抗人 VEGF 抗体购于 Santa Cruz 生物制品公司; RT-PCR 试剂盒购于 TaKaRa 公司; pAxCawt. VEGF 系统由第二军医大学长海医院胸心外科研究所惠赠, 昆明小鼠由第二军医大学实验动物中心提供, 脱细胞猪真皮由江苏启东市医疗用品研究所提供。

1.2 Ad. hVEGF 腺病毒载体的构建及鉴定 采用脂质体转染法, 将 pAxCawt. VEGF 与 DNA-TPC 共转染人胚肾 293 细胞, 扩增后获得载 hVEGF 基因的复制缺陷型重组腺病毒。使用 PCR 酶切实证重组腺病毒中的目的基因。具体实验见文献^[6]。

1.3 NIH3T3 细胞培养 将 NIH3T3 细胞接种于

60 mm 平皿中 (悬于 100 μ l 含 100 ml/L 胎牛血清和双抗液的 DMEM 高糖培养基内), 单层培养 36 h 到达 90% 融合时进行转染。

1.4 Ad. GFP 转染 NIH3T3 细胞的效率测定 将细胞接种 12 孔培养板, 培养至 90% 融合时, 弃去培养上清。为获得最佳的病毒感染 NIH3T3 细胞, 调整病毒感染复制数 (multiplicities of infection, MOI, 又称为感染复数) 范围为 5~200。按 MOI 分别为 5、25、50、100、150、200 加入纯化的 Ad. GFP 液 (1.2×10^9 pfu), 进行感染培养。转染 48 h 后在荧光显微镜下观察绿色荧光强度, 消化细胞, 用 DMEM 培养液洗细胞 1 次, 重悬于 20 g/L 多聚甲醛中, 采用流式细胞仪检测转染细胞比例。

1.5 RT-PCR 检测 NIH3T3 细胞 VEGF 基因 mRNA 的表达 转染 24 h 后, 提取细胞 RNA, 调整质量浓度为 1 μ g/ μ l。以 VEGF 基因 497 bp 长度序列为模板合成引物, 正向引物为 5'-AAG CTT ACC ATG AAC TTT CTG CTG TCT TG-3' 和反向引物为 5'-GAA TTC AAA CCC TGA GGG AGG CTC-3'。参照 RT-PCR 试剂盒说明操作, 以凝胶成像系统对 DNA 扩增带进行分析。

1.6 免疫组化法检测 Ad. VEGF 转染 NIH3T3 后 VEGF 蛋白的表达情况 NIH3T3 细胞传 2 代后, 胰酶消化, 铺盘于事先放置盖玻片的 6 孔板内, 每孔细胞数量为 5×10^5 , 2 d 后细胞贴壁生长于盖玻片上。在 MOI 为 100 的条件下, 用 Ad. VEGF 及 Ad. GFP 转染 NIH3T3 细胞。细胞转染 24 h 后, 用 SABC 免疫组化法检测 hVEGF 在细胞内的表达。以 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.7 ELISA 法测定培养上清中 VEGF 的含量 两组细胞初始密度均为 1×10^4 /ml。自转染后 24 h 开始, 将转染细胞与未转染细胞分装于 6 孔板中, 每隔 1 d 换培养液并收集培养上清于 -20°C 保存, 每组 3 孔重复。参照 ELISA 试剂盒说明进行检验操作, 在检测波长为 450 nm、校正波长 570 nm 酶联仪上读取光密度值 (D), 根据标准品测定结果, 计算被检测

培养上清内 VEGF 含量。

1.8 MTT 法检测转染 Ad. VEGF 对细胞增殖的影响 将细胞接种于 96 孔培养板,每孔 100 μ l IMDM 培养液,24 h 后将 Ad. VEGF 和 Ad. GFP 转染细胞,48 h 后每孔加入 MTT 10 μ l,弃培养液,每孔加入 DMSO 150 μ l,振荡 10 min,570 nm 波长测定 *D* 值。

1.9 体内移植实验 雄性昆明小鼠 12 只,体质量约 26 g,随机分为 2 组。在腹腔注射 2.5%戊巴比妥钠(35 mg/kg)麻醉下,在小鼠背部制作 2 cm \times 2 cm 皮肤全层缺损模型,创面再覆盖脱细胞真皮,实验分成 2 组:实验组创面脱细胞真皮下注射 0.2 ml 感染后的 NIH3T3 细胞(3×10^6 /ml),对照组仅注射 0.2 ml DMEM 培养基。1 周后在过量麻醉下,切取脱细胞真皮标本,进行组织学和免疫组织化学检查,观察 VEGF 的表达,并计算高倍视野下新生血管数。

1.10 统计学处理 SPSS 10.0 统计软件对数据进行分析,所有数据用 $\bar{x}\pm s$ 形式表示,统计学处理采用 *t* 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ad. hVEGF 的鉴定 所制备腺病毒抽提 DNA 后进行 PCR 反应,产物凝胶电泳分析可见在 743 bp 处有高度特异性条带,而 293 细胞不出现此条带。对 PCR 的产物进行 *Nco* I 酶切鉴定,得到 597 bp、146 bp 两个片段,与 GeneTool 软件理论上计算的结果完全一致。

2.2 Ad. GFP 转染 NIH3T3 细胞的效率测定 在 Ad. GFP 转染培养细胞 48 h 后,GFP 的表达明显增强。见图 1。在 5、25、50、100、150、200 这 6 个不同 MOI 条件下,转染效率分别为 30%、69%、80%、95%、96%、98%。结果显示:当 MOI \leq 100 时,腺病毒的转染效率与病毒剂量呈明显正相关,当 MOI 在 100 以上时,转染率趋于稳定,均在 95% 以上。

2.3 VEGF 转染 NIH3T3 细胞后的表达情况

2.3.1 RT-PCR 检测 细胞转染 24 h 后,各组均出现 β -actin 条带,实验组出现 497 bp 条带,对照组和空白转染组则无相应条带出现。见图 2。

2.3.2 ELISA 法检测 Ad. VEGF 转染上清中 VEGF 的表达情况 转染组第 3 日表达分泌较高,7 d 时达到表达高峰(1 052 pg/ml),13 d 后仍可检测

到 VEGF 的表达,且转染组上清中 VEGF 的分泌水平明显高于空白对照组($P<0.01$)。见表 1。

图 1 Ad. GFP 转染 NIH3T3 细胞后荧光显微镜下形态

Fig 1 Morphology of NIH3T3 cells transfected with Ad. GFP

Original magnification: $\times 200$

图 2 NIH3T3 细胞经转染后 RT-PCR 结果

Fig 2 VEGF mRNA expression in NIH3T3 cells as detected by RT-PCR

1:Control group;2:Blank transfection group;3:Experimental group;4:Negative control group;M:Marker

2.3.3 免疫组化检查 细胞培养 24 h 后,可见 Ad. VEGF 转染组细胞呈明显阳性反应,NIH3T3 细胞胞质内充满棕褐色颗粒。而 Ad. GFP 转染及对照组为阴性。见图 3。

2.4 转染对细胞增殖的影响 在转染 Ad. VEGF 24 h 后用 MTT 法检测 NIH3T3 细胞的增殖情况,Ad. VEGF 组 D_{570} 为 (0.113 ± 0.010),Ad. GFP 组为 (0.115 ± 0.011),未转染对照组为 (0.120 ± 0.013),均无显著性差异($P>0.05$)。说明 VEGF 基因转染对 NIH3T3 细胞的增殖没有明显影响。

2.5 体内转染细胞 hVEGF 的表达情况及其新生血管化效应 1 周后通过从创面切取脱细胞真皮组织标本,免疫组化检查显示,实验组脱细胞真皮中 hVEGF 阳性表达,可见有散在明显的棕褐色阳性产物,而实验组阴性表达。见图 4。观察病理组织切片,计算 1 周后每 200 倍高倍镜视野血管数,实验组

为(6.2±1.4)/HPF,对照组为(3.5±1.1)/HPF, 实验组较对照组明显增多($t=4.12, P<0.01$)。

表 1 两组 VEGF 分泌情况比较

Tab 1 Comparison of VEGF secretion in two groups

[$n=6, \bar{x} \pm s, \rho_B / (\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1})$]

Group	Time after transfection						
	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d	11 d	3 d
Transfection	198±9	312±42	499±30	1 052±58	610±46	490±25	251±13
Control	55±6	56±4	51±4	54±9	54±6	56±2	56±7
<i>t</i>	63.40	64.74	131.59	210.13	132.46	143.67	75.52
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

图 3 NIH3T3 细胞转染后 VEGF 免疫组化染色结果

Fig 3 VEGF immunohistochemistry in NIH3T3 cells transfected by Ad. VEGF

A: Ad. VEGF group; B: Ad. GFP group. Original magnification: ×400

图 4 1 周后创面脱细胞真皮组织 VEGF 免疫组化染色结果

Fig 4 VEGF Immunohistochemistry in acellular dermal matrix one week later

A: Experimental group; B: Control group. Original magnification: ×200

3 讨论

VEGF 是机体内促进血管生长最主要的生长因子,它特异性地作用于内皮细胞,促进其增殖和血管

生成。因此,以 VEGF 为基础的治疗性血管生成的研究备受关注。在 VEGF 基因成功应用于治疗肢体缺血^[4]后,近年来人们尝试用 VEGF 基因治疗加速创面愈合及缺血皮肤、皮瓣的血管再生^[5,7]。小鼠 NIH3T3 细胞是来源于小鼠胚胎的成纤维细胞,易于转染,已有研究表明,NIH3T3 细胞经体外 pcDNA3.1(-)/VEGF₁₆₅质粒的导入和表达,可被用于基因载体增强缺血性皮瓣的血管生成,是一种理想的外源基因转移的靶细胞^[8]。基因治疗中选择安全高效的载体是关键,目前用于介导血管生长因子基因的载体种类较多,如裸质粒、脂质体和腺病毒等。而腺病毒载体能高效感染多种细胞,因而被广泛用于基因转移的研究中^[9-10],国内徐宇宇等^[11]报道的腺病毒转染效率十分理想。而 VEGF 重组腺病毒感染 NIH3T3 细胞的相关研究报道较少。

本实验通过腺病毒载体成功的将 GFP 报告基因和 VEGF 基因分别转入了 NIH3T3 细胞内,我们观察到用 Ad. GFP 转染 NIH3T3 细胞后在荧光显微镜下绿色荧光显示的各种形态的细胞与光镜下见到的形态结构相似。本实验结果显示,应用携带报告基因 GFP 的腺病毒载体 Ad. GFP 体外转染 NIH3T3 细胞,在 50~200 的 MOI 范围内可以获得比较稳定的转染效率,转染效率都大于 95%,并且 MOI 为 100 是较为合适的转染倍数,这说明 NIH3T3 细胞对于腺病毒是易感细胞。我们采用的腺病毒介导 GFP 在 NIH3T3 细胞表达为基因功能的研究提供一个理想的模型。在我们的实验中,通过 RT-PCR 检测到实验组出现 497 bp 条带,表明在 Ad. VEGF 转染细胞中有人源化 VEGF 基因表达,免疫组化检测发现,转染了 Ad. VEGF 基因的 NIH3T3 细胞可以稳定表达外源性 VEGF 蛋白。ELISA 检测显示,腺病毒转染 NIH3T3 细胞 24 h 后,培养上清中已经开始有 VEGF 的产生,以后逐

渐升高,到第7日时表达达到高峰,此后表达水平逐渐下降,但仍能维持在一定水平的 VEGF 表达,并持续至转染后 13 d 左右,这与华平等^[12]检测的结果基本一致。因此,我们推断:如果保证在转染后 3~5 d 将靶细胞移植至创面,将可以保证 VEGF 的分泌高峰期位于宿主体内。我们观察到 VEGF 转染 NIH3T3 细胞效率较高,转染后的 NIH3T3 细胞增殖力和活力也不受影响,且体内移植实验显示,NIH3T3 基因修饰细胞在移植组织中 VEGF 表达明显,且发挥了其促进血管新生的作用。这与郑岩等^[8]报道的实验结果是一致的,他们采用 VEGF 质粒转染小鼠 NIH3T3 细胞后皮下移植,可促进缺血皮瓣的血管新生。因腺病毒具有对多种细胞高效的感染率^[10],因而 VEGF 重组腺病毒感染的 NIH3T3 细胞可发挥出较好基因治疗效果。

最近 Dickens 等^[13]认为先体内后体外基因转移 VEGF,可以诱导创面血管化,加快全层缺损创面组织修复。本实验成功采用基因转染的方法将 VEGF 导入 NIH3T3 细胞,且细胞转染后目的基因表达稳定,目的基因产物发挥了其促血管生成的生物效应。因此,将 NIH3T3 细胞移植和 VEGF 基因治疗紧密结合,通过有效转染靶细胞并移植于创面,有利于创面移植组织的成活,从而提高创面愈合质量。这将为进一步的创面实验打下基础,亦将为临床基因治疗缺血性创面提供有效措施。当然如何适时调控 VEGF 基因表达以及如何解决腺病毒引起的免疫排斥反应等问题还需要大量深入研究,也将是今后的研究方向。

[参考文献]

- [1] Tse H F, Kwong Y I, Chan J K, Lo G, Ho C L, Lau C P. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation[J]. *Lancet*, 2003, 361:47-49.
- [2] 贾 勇, 初同伟, 周 跃. Ad-huVEGF₁₂₁ 在 NIH3T3 细胞中的

表达及其生血管活性[J]. *免疫学杂志*, 2005, 21:386-387.

- [3] 张裕东, 张宝仁, 黄盛东, 梅 举, 吴红萍, 李林芳, 等. 腺病毒介导的血管内皮生长因子体外转染心肌细胞的研究[J]. *第二军医大学学报*, 2004, 25:485-488.
- [4] Ohara N, Koyama H, Miyata T, Hamada H, Miyatake S I, Akimoto M, et al. Adenovirus-mediated *ex vivo* gene transfer of basic fibroblast growth factor promotes collateral development in a rabbit model of hind limb ischemia[J]. *Gene Ther*, 2001, 8: 837-845.
- [5] Bates D O, Jones R O. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing[J]. *Int J Low Extrem Wounds*, 2003, 2:107-120.
- [6] 韩焱福, 宋建星, 刘 军. 血管内皮细胞生长因子 165 基因重组腺病毒的构建及其鉴定[J]. *中国组织工程研究及临床康复*, 2008, 24:4651-4654.
- [7] Odorisio T, Cianfarani F, Failla C M, Zambruno G. The placenta growth factor in skin angiogenesis[J]. *J Dermatol Sci*, 2006, 41:11-19.
- [8] 郑 岩, 易成刚, 何丽洁, 王映梅, 冯少清, 刘 丹, 等. 转染血管内皮生长因子基因的小鼠 NIH3T3 细胞移植促进皮瓣早期血运重建的研究[J]. *中华外科杂志*, 2007, 45:203-206.
- [9] Henry T D, Annex B H, Mckendall G R, Azrin M A, Lopez J J, Giordano F J, et al. The VIVA trial: vascular endothelial growth factor in ischemia for vascular angiogenesis[J]. *Circulation*, 2003, 107:1359-1365.
- [10] Dulak J, Schwarzacher S P, Zwick R H, Alber H, Millionig G, Weiss C, et al. Effects of local gene transfer of VEGF on neointima formation after balloon injury in hypercholesterolemic rabbits[J]. *Vasc Med*, 2005, 10:285-291.
- [11] 徐驯宇, 黄盛东, 陆方林, 崔 勇, 鲍春荣, 张宝仁, 等. Ad-VEGF 转染自体骨髓基质细胞移植治疗猪慢性缺血性心脏病[J]. *第二军医大学学报*, 2005, 26:381-385.
- [12] 华 平, 陈 炬, 张慧忠, 杨淞然, 杨艳旗, 熊利华, 等. 腺病毒介导血管内皮细胞生长因子基因体外转染骨髓间充质干细胞[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2007, 28:1-5.
- [13] Dickens S, Vermeulen P, Hendrickx B, Van den Berge S, Vranckx J J. Regulable vascular endothelial growth factor(165) overexpression by *ex vivo* expanded keratinocyte cultures promotes matrix formation, angiogenesis, and healing in porcine full-thickness wounds[J]. *Tissue Eng Part A*, 2008, 14:19-27.

[本文编辑] 曹 静