

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00491

微囊化血管内皮细胞生长因子基因修饰 NIH3T3 细胞的制备及体外培养

韩焱福¹, 宋建星^{1*}, 刘 军^{1*}, 尹东锋², 陈玉林³, 吕 川¹, 杨硕成¹, 姜晓莉¹

1. 第二军医大学长海医院整形外科, 上海 200433
2. 第二军医大学药学院药剂学教研室, 上海 200433
3. 第二军医大学长海医院烧伤科, 上海 200433

[摘要] **目的:**制备微囊化血管内皮细胞生长因子(VEGF)基因修饰 NIH3T3 细胞,并研究微囊化技术对 VEGF 基因修饰 NIH3T3 细胞增殖及其分泌 VEGF 功能的影响。**方法:**应用海藻酸钠-氯化钡技术制备微囊化 VEGF 基因修饰 NIH3T3 细胞,并与未微囊化 VEGF 基因修饰 NIH3T3 细胞对照培养,在倒置相差显微镜下观察微囊及细胞形态,用 MTT 法和 PI 染色流式细胞术检测细胞的增殖及活性情况。每 48 h 收集微囊化及未微囊化基因修饰 NIH3T3 细胞培养上清, -20℃ 保存, ELISA 法检测培养上清 VEGF 的含量。**结果:**微囊形态较圆整,其内细胞生长良好;两组细胞增殖与活性及培养上清中 VEGF 含量无统计学差异。**结论:**微囊化并不影响基因修饰细胞的生长代谢功能,与对照组比较,在体外培养时生物学特性无明显差异,为研究微囊化基因修饰细胞体内移植奠定了基础。

[关键词] 血管内皮细胞生长因子; NIH3T3 细胞; 微囊; 细胞培养

[中图分类号] Q 78 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)05-0491-04

Preparation and culture of NIH3T3 cells harboring microencapsulated VEGF gene

HAN Yan-fu¹, SONG Jian-xing^{1*}, LIU Jun^{1*}, YIN Dong-feng², CHEN Yu-lin³, LÜ Chuan¹, YANG Shuo-cheng¹, LOU Xiao-li¹

1. Department of Plastic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433
3. Department of Burns, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** To prepare NIH3T3 cells harboring microencapsulated VEGF gene and investigate the proliferation, activity and metabolic function of the modified cells. **Methods:** Microencapsulated VEGF modified NIH3T3 cells were prepared through an alginate-BaCl₂ process. Morphological appearance of the microencapsulation and the cell morphology were observed under inverted phase microscope; untreated NIH3T3 cells served as control. The concentrations of VEGF in the culture supernatant (collected every 48 hours) were measured by ELISA; the proliferation and vitality of the cells were examined by MTT assay and flow cytometry with PI staining. **Results:** The microcapsules were round in shape and the cells grew well. There was no significant difference in the concentrations of VEGF, MTT values and vitalities of cells between the 2 groups. **Conclusion:** The growth and metabolic functions of NIH3T3 cells are not influenced by microencapsulated NIH3T3 cells harboring VEGF gene. The bio-properties of modified cells are similar to those of the control cells, which lays a foundation for transplantation of microencapsulated VEGF modified NIH3T3 cells *in vivo*.

[KEY WORDS] vascular endothelial growth factor; NIH3T3 cells; microencapsulation; cell culture

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(5): 491-494]

1980 年加拿大学者 Lim 和 Sun^[1] 利用海藻酸钠-多聚赖氨酸-聚乙烯亚胺微囊技术包裹大鼠胰岛细胞治疗实验性糖尿病, 标志着微囊化细胞移植技术的确立。该技术通过微囊的免疫隔离作用, 提高了移植体在异体的存活率。微囊具有透过性, 可以

保证囊内细胞分泌产生的特定因子通过囊膜进入细胞外间隙。随着基因转染技术的成熟, 已初步开展了微囊化基因转染细胞移植的实验及应用研究, 并取得了一些成就^[2]。该技术不需要对基因产物进行化学提纯, 减少了中间环节, 降低了工作量; 而且微

[收稿日期] 2007-12-21 **[接受日期]** 2008-02-20

[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 authors). Tel: 021-25074896, E-mail: drsong@163.com; Tel: 021-25074618, E-mail: Ljun523@163.com

囊移植本身不会改变受体的基因组,一次性注入,安全可靠;还可以根据不同的病情需要,调整移植微囊细胞的数量。

血管内皮细胞生长因子(VEGF)是机体内促进血管生长最主要的生长因子,临床上 VEGF 基因治疗促进血管生成已得到认可^[3]。小鼠 NIH3T3 细胞是来源于小鼠胚胎的成纤维细胞,易于转染,适宜作为外源基因的载体,转染 VEGF 基因的小鼠 NIH3T3 细胞具有促进组织血管形成的生物活性^[4]。本实验应用海藻酸钠和氯化钡为材料,采用气体吹喷法制备微囊化 VEGF 基因修饰的 NIH3T3 细胞,观察微囊化后 VEGF 基因修饰的 NIH3T3 细胞在囊内是否仍正常生长并能维持其目的基因的蛋白表达功能,以及是否影响 VEGF 的释放,为进一步研究微囊化 VEGF 基因修饰的 NIH3T3 细胞的体内移植奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 VEGF₁₆₅重组腺病毒载体由本室构建;兔抗人 VEGF 抗体 hVEGF 购自 Santa Cruz 公司;DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶和 EDTA 均为 Gibco 公司产品;二甲基亚砜(DMSO)、四甲基偶氮唑盐(MTT)购自美国 Sigma 公司;ELISA 试剂盒购自晶美公司;碘化丙啶(PI,北京鼎国生物技术有限公司);化学纯海藻酸钠(美国),25 mmol/L 的氯化钡溶液(自制)。倒置显微镜(日本奥林巴斯),MS-353 酶联免疫检测仪(Labsystems Co. Ltd,芬兰);FACSscort 型流式细胞仪(美国 BD 公司)。NIH3T3 细胞购自中国科学院上海细胞研究所。

1.2 细胞培养 将细胞接种 12 孔培养板,培养至 90%融合时,弃去培养上清。按最佳的感染复制数(multiplicity of infection, MOI)用 VEGF₁₆₅重组腺病毒感染 NIH3T3 细胞,获取 VEGF 基因修饰细胞,置于 5%CO₂、37℃ 条件培养箱中培养。

1.3 VEGF 基因修饰细胞的微囊化 首先配制海藻酸钠溶液,称取 2 g 海藻酸钠,加入 100 ml 蒸馏水溶解。并配制 25 mmol/L 氯化钡溶液 250 ml,将上述溶液及实验器具 121℃ 高压灭菌 50 min 后,将 VEGF 基因修饰 NIH3T3 细胞消化浓缩成 0.5 ml,细胞密度为 3×10⁶/ml,加入到 2 ml 海藻酸钠溶液中,经双腔喷头喷入氯化钡溶液中,静置 15 min,离心收集,用灭菌生理盐水洗涤 3 次,移入培养瓶中,加 5 ml DMEM 培养液,放入培养箱中培养。

1.4 微囊化细胞的体外培养 微囊化及未微囊化

基因修饰细胞初始密度均为 1×10⁴/ml,分装于 6 孔板中,每孔分装 0.1 ml 并加入 DMEM 培养液 2 ml。两组均用 DMEM (含 20% 胎牛血清、青霉素 1×10⁵U/g、链霉素 100 mg/L),置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养,每 2 d 换培养液并收集培养上清于 -20℃ 保存,每组 6 孔重复。

1.5 培养上清 VEGF 含量的测定 每 48 h 取各孔培养液 1 ml,3 000 r/min(r=10 cm)离心 3 min,弃沉渣。ELISA 法测定培养上清中 VEGF 的含量,参照 ELISA 试剂盒说明操作。在 96 孔板待检孔内加入 50 μl 检测稀释液,每孔中加入 200 μl 标准品或待检标本,室温下孵育 2 h,吸出检测孔内液体,使用冲洗缓冲液清洗 3 次,每孔内加入 200 μl hVEGF 抗体,室温孵育 2 h,吸出检测孔内液体,使用冲洗缓冲液清洗 3 次,每孔加入 200 μl 底物溶液,室温下避光孵育 20 min,每孔内加入 50 μl 终止液,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,绘制标准曲线,计算被检测培养上清内 VEGF 的含量。

1.6 MTT 法观察微囊化细胞的生长 对培养的微囊化 VEGF 基因修饰细胞与未微囊化细胞每日取样进行细胞活性的测定。在 24 孔板的每孔中加入 100 μl MTT 溶液,继续培养 24 h,待结晶完全后将微囊筛出,用 1 ml DMSO 将微囊内细胞形成的结晶充分溶解,吸取 200 μl 溶解液,加入 96 孔板,用酶联检测仪检测波长 570 nm 下的 D 值(630 nm 为参考波长)。绘制生长曲线。

1.7 PI 染色流式细胞术检测细胞死亡率 加入 0.01 mmol/L NaOH 溶液 100 μl,待微囊膜溶解后立即加入细胞培养液中中和,破囊时间不超过 1 min。离心收集细胞,胰酶消化,加 PI 荧光染液(5 μg/ml PI)于 4℃ 冰箱中放置 45 min,300 目尼龙网过滤,流式细胞仪检测,计算细胞死亡率,再推算出微囊化细胞的活力,同样检测相同剂量的未微囊化细胞的死亡率及活力。

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

2 结果

2.1 微囊化重组细胞的形态观察 光镜下观察,微囊为较理想的对称球体,大小较均一,囊壁光滑,无粘连,囊内细胞呈圆形,折光性强,直径 300~500 μm,每个囊中含细胞 50~80 个,体外培养 7 d,细胞在囊内分化发育,边界逐渐模糊不清,部分细胞相互

聚集并分裂生长, 形成大小不等的细胞团, 囊外未见纤维细胞生长(图 1)。

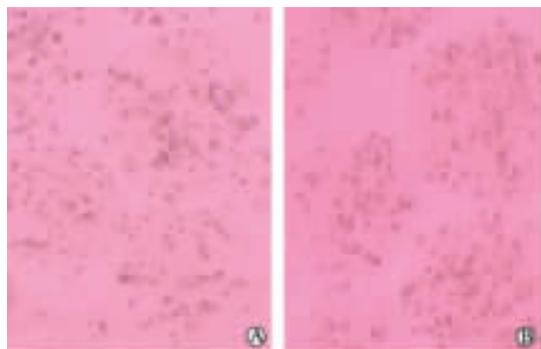


图 1 微囊化重组细胞的形态

Fig 1 Morphological appearance of microencapsulated VEGF-modified NIH3T3 cells

A, B: Post-microencapsulation 1 and 7 d, respectively. Original magnification: $\times 100$

2.2 细胞活力的测定 PI 流式细胞术检测结果(图 2)表明微囊化与未微囊化细胞的死亡率分别为 $(8.90 \pm 0.35)\%$ 、 $(8.64 \pm 0.25)\%$, 两组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 两组细胞的活力无明显差异。

2.3 ELISA 法检测培养上清 VEGF 的表达情况 自微囊化 VEGF 基因修饰 NIH3T3 细胞和未微囊化细胞体外培养第 1 日开始, 每 48 h 收集培养上清液, 直至第 13 日, ELISA 法检测 VEGF 表达。结果(表 1)显示: 两组 NIH3T3 细胞均释放一定量的 VEGF, 且两组细胞培养 24 h 后, VEGF 就已经有了显著表达, 至第 7 日达到高峰, 此后随着时间的推移, VEGF 表达逐渐下降, 但仍保持在一个可检测水平之上, 并持续至 13 d 以后。两组比较无统计学差异。

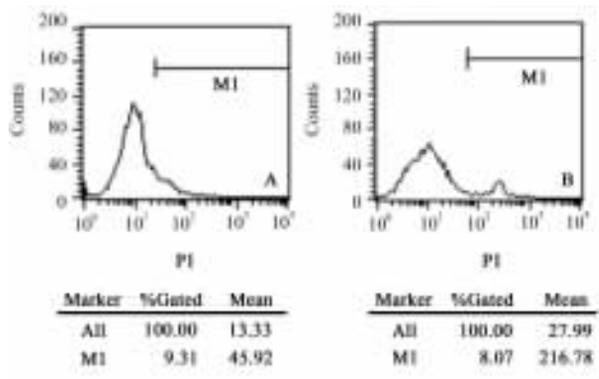


图 2 PI 流式细胞术检测结果

Fig 2 Result of PI flow cytometry testing

A: Non-microencapsulated group; B: Microencapsulated group

表 1 两组 VEGF 分泌情况比较

Tab 1 Comparison of VEGF secretion in 2 groups

Group	[$n=6, \bar{x} \pm s, \rho_B / (\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1})$]						
	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d	11 d	13 d
Non-microencapsulated	198 \pm 9	312 \pm 42	499 \pm 30	1 052 \pm 58	610 \pm 46	490 \pm 25	251 \pm 13
Microencapsulated	192 \pm 12	304 \pm 36	496 \pm 12	1 040 \pm 60	596 \pm 63	480 \pm 19	244 \pm 37
<i>t</i>	2.13	1.43	0.62	1.91	2.26	2.61	1.79
<i>P</i>	0.10	0.23	0.57	0.13	0.08	0.06	0.18

2.4 微囊化对 VEGF 基因修饰 NIH3T3 细胞增殖的影响 在微囊化后 2 周内用 MTT 法动态检测基因修饰 NIH3T3 细胞的增殖情况, 与相同浓度未微囊化基因修饰细胞 MTT 值比较。结果(图 3)显示微囊化对 VEGF 基因修饰 NIH3T3 细胞的增殖没有明显影响。

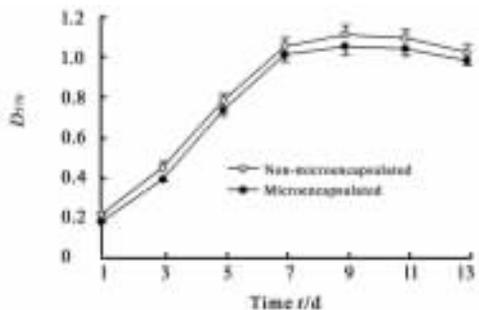


图 3 VEGF 基因修饰 NIH3T3 细胞生长曲线

Fig 3 Growth curve of VEGF modified NTH3T3 cells

$n=6, \bar{x} \pm s$

3 讨论

微囊化细胞技术是由 Lim 等^[1]发明, 首次采用微囊免疫隔离技术进行胰岛细胞微囊化移植研究。1986 年, O'Shea 等^[5]在此基础上做了改进, 用海藻酸钠替换了外层聚乙烯亚胺, 制成了海藻酸钠-聚赖氨酸-海藻酸钠膜, 经过处理后膜成凝胶状, 具有较好的生物相容性。近年来, 这一技术逐渐被许多异体或异种移植所采用。该技术已较为成熟, 已有实验证实^[6]应用海藻酸钠-氯化钡技术可取得较好的效果, 用该法制备微囊化细胞发现微囊的稳定性较好、不易破裂, 且操作步骤相对简单, 制成的微囊属于生物半透膜。微囊膜不允许大分子物质通过, 其截隔的相对分子质量为 70 000, 在理论上能阻止大分子物质进入膜内, 但又不影响小分子物质的转运,

O₂、CO₂、小分子营养物质等可以自由通过微囊膜。已有研究^[7]表明,白蛋白、尿素、凝血因子、结合胆红素、生长因子等生物活性物质可通过微囊膜,但免疫细胞、免疫球蛋白等因相对分子质量大而无法进入膜内。我们的实验证实:在体外培养期间,应用海藻酸钠-氯化钡技术制备的微囊具有较好的形态,微囊化 VEGF 基因修饰的 NIH3T3 细胞具有表达并释放 VEGF 的能力。同时,与游离细胞比较,检测结果差异没有统计学意义。说明微囊膜对 VEGF 有良好的通透性,这也是微囊细胞植入机体后既能保持其分泌活性又能保持免疫隔离状态的前提条件。

在制囊材料方面,大多采用海藻酸钠-聚赖氨酸制成 APA 微囊,对 APA 微囊的研究也比较多。20 世纪 80 年代末,Iwata 等^[8]开始以琼脂糖作为微囊材料之后,各种材料制成的微囊逐渐开展起来。有文献报道^[9]海藻酸钠纯化与否(纯度)也会影响微囊的生物相容性等性能。张武杰等^[10]的研究结果表明,纯化海藻酸钠可应用于间充质干细胞的微囊化中,且制得的微囊生物相容性优于相同工艺条件下制备的非纯化海藻酸钠组分的微囊。本实验是以纯化海藻酸钠、氯化钡为材料制成微囊,制囊方法和材料不同于 Lim 和 Sun 发明的 APA 微囊,而是采用“一步法”海藻酸钠与 BaCl₂ 交联成囊^[6]。即将细胞悬浮于 2.0% 海藻酸钠液,流经一双腔喷嘴内腔,经外腔气流的吹力滴入 BaCl₂ 溶液中成囊。这种方法在凝胶形成时用 BaCl₂ 代替 CaCl₂,不使用聚赖氨酸。它简化了制囊步骤,一步固化成囊,易于在实验中操作。近年对微囊材料的研究证实,500 μm 左右直径的 APA 微囊有良好的机械耐力,表面光滑,摩擦力小,在体内生物相容性好^[11]。本实验通过海藻酸钠-氯化钡一步成囊技术,获得的重组细胞微囊直径为 0.3~0.6 mm,囊壁完整呈圆形,与文献报道^[11]一致。实验中将微囊化基因修饰细胞与未微囊化的基因修饰细胞培养 13 d,检测 1、3、5、7、9、11、13 d 培养上清液中 VEGF 的含量,两组对应时间点比较,无显著性差异,说明微囊化与未微囊化的基因修饰细胞均具有良好的体外分泌功能,且海藻酸钠-氯化钡微囊对 VEGF 有良好的渗透性,不影响微囊化细胞 VEGF 的分泌与释放。MTT 法及 PI 流式细胞术检测结果显示微囊化并不影响基因修饰细胞的增殖及活性。本研究结果说明基因修饰细胞微囊化后不仅能正常分泌及释放 VEGF,而且在短期内也不影响细胞的生长代谢,这将为下一步的基因修饰细胞异体或异种移植奠定实验基础,也将为临床基因治疗开辟一条新的途径。

近年来,微囊化基因修饰细胞移植的实验研究在国内外均取得了很大进展,特别是在视网膜、侏儒症、家族遗传病、肿瘤等治疗领域^[2]。研究^[12]表明,因微囊具有免疫隔离作用,微囊化肝细胞在受体内存活的时间明显长于游离细胞。微囊化细胞移植与传统的细胞移植相比有较大的优越性。VEGF 基因治疗可促进血管生成,将 NIH3T3 细胞移植和 VEGF 基因治疗紧密结合,可用于缺血创面及组织移植,但异种细胞的移植在体内存在免疫排斥,细胞微囊化技术可解决免疫排斥问题,故微囊化基因修饰细胞为基因治疗提供了新的思路及途径。但由于本实验仅对微囊化基因修饰细胞进行短期培养观察,结论仍有待长期培养观察的结果来进一步验证。

[参考文献]

- [1] Lim F, Sun A M. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas[J]. *Science*, 1980, 210: 908-910.
- [2] Cirone P, Potter M, Hirte H, Chang P. Immuno-isolation in cancer gene therapy[J]. *Curr Gene Ther*. 2006, 6: 181-191.
- [3] Kusumanto Y H, Weel V V, Mulder N H, Smit A J, Dunqen J J, Hooymans J M, et al. Treatment with intramuscular vascular endothelial growth factor gene compared with placebo for patients with diabetes mellitus and critical limb ischemia: a double-blind randomized trial[J]. *Hum Gene Ther*. 2006, 17: 683-691.
- [4] 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.
- [5] O'Shea G M, Sun A M. Encapsulation of rat islets of Langerhans prolongs xenograft survival in diabetic mice[J]. *Diabetes*, 1986, 35: 943-946.
- [6] Zhang W J, Laue C, Hyder A, Schrenzenmeier J. Purity of alginate affects the viability and fibrotic overgrowth of encapsulated porcine islet xenografts[J]. *Transplant Proc*, 2001, 33: 3517-3519.
- [7] Sarkis R, Benoist S, Honiqer J, Baudrimont M, Delelo R, Balladur P, et al. Transplanted cryopreserved encapsulated porcine hepatocytes are as effective as fresh hepatocytes in preventing death from acute liver failure in rats[J]. *Transplantation*, 2000, 70: 58-64.
- [8] Iwata H, Takagi T, Amemiya H. Agarose microcapsule applied in islet xenografts (hamster to mouse) [J]. *Transplant Proc*. 1992, 24: 952.
- [9] Orive G, Tam S K, Pedraz J L, Halle J P. Biocompatibility of alginate-poly-lysine microcapsules for cell therapy[J]. *Biomaterials*, 2006, 27: 3691-3700.
- [10] 张武杰, 李保国, 谢鑫荟, 汤亭亭. 纯化海藻酸钠在间充质干细胞微囊化中的应用[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2007, 27: 673-676.
- [11] Uludag H, DeVos P, Tresco P A. Technology of mammalian cell encapsulation[J]. *Adv Drug Deliv Rev*. 2000, 42: 29-64.
- [12] Mai G, Huy N T, Morel P, Mei J, Bosco D, Berney T, et al. Treatment of fulminant liver failure by transplantation of microencapsulated primary or immortalized xenogeneic hepatocytes[J]. *Transplant Proc*, 2005, 37: 527-529.