

基础研究

PcDNA3.1-VEGF165 质粒转染神经母细胞瘤细胞后 VEGF165 的表达

王 冰, 吕国华, 尹刚辉

(中南大学湘雅二医院脊柱外科 410011 湖南省长沙市)

【摘要】目的:观察 PcDNA3.1-VEGF165 质粒转染神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)后 VEGF165 在体外的表达。**方法:**将 PcDNA3.1-VEGF165 质粒应用脂质体介导的方法转染到 SH-SY5Y (I 组),同时建立空白对照组(II 组),两组其他试验条件均保持一致。脂转 48h 后,用 ELISA 和 Western-blot 定量检测 VEGF165 可溶性产物。应用 RT-PCR 对 SH-SY5Y 产生的 mRNA 进行定性检测。对两组 ELISA 的定量结果进行统计学分析比较。**结果:**脂转组(I 组)PcDNA3.1-VEGF165 质粒转染 48h 后神经母细胞瘤细胞即有 VEGF165 高效表达,RT-PCR 可扩增到一条特异性的泳带,Western-blot 显示转基因神经母细胞瘤细胞上清液中有一分子量为 23kD 的特异性条带。空白对照组(II 组)有微量的 VEGF165 表达($84.14 \pm 33.89 \text{ ng/ml}$),脂转组的 VEGF165 表达量($1005.15 \pm 185.50 \text{ ng/ml}$)明显高于对照组,两组比较差异有显著性($P < 0.05$)。**结论:**神经母细胞瘤细胞体外培养有微量 VEGF165 表达,PcDNA3.1-VEGF165 质粒可通过脂质体转染体外培养的神经母细胞瘤细胞,被转染的神经母细胞瘤细胞能够高效表达 VEGF165。

【关键词】 血管内皮生长因子(VEGF);基因表达;质粒;基因治疗

中图分类号:Q813.1 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2008)-04-0294-04

Expression of vascular endothelial growth factor-165 in neuroblastoma cells(SH-SY5Y) transfected with PcDNA3.1-VEGF165 plasmid/WANG Bing, LÜ Guohua, YIN Ganghui//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2008, 18(4): 294~297

【Abstract】 Objective: To study the expression of recombinant human vascular endothelial growth factor-165 (VEGF165) in neuroblastoma (SH-SY5Y) cells transfected with PcDNA3.1-VEGF165 plasmid. **Method:** The SH-SY5Y cells were divided into two groups, group I was transfected with the PcDNA3.1-VEGF165 plasmid via lipofectamine 2000, group II was control without transfected. The conditions of the test had no differences. The supernatant and cells were collected after 48 hours. The transcription and the expression of VEGF165 in two groups were tested by RT-PCR, ELISA and Western-blot. The statistic analysis (t' -test) was taken to compare the difference between the two groups. **Result:** Group I: RT-PCR, ELISA and Western-blot proved that there was transcription of VEGF165 gene in transfected cells and expression of VEGF165 in supernatant of the transfected cells. Group II: The expression of VEGF165 in nontransfected group's supernatant could also be detected by RT-PCR and ELISA test. But the expression of VEGF165 of transfected group (group I) was higher than that of the nontransfected group (group II). The t' test of the two group's ELISA results had significant differences ($P < 0.05$). **Conclusion:** There is small amount of VEGF165 expression in SH-SY5Y cells in vitro, and PcDNA3.1-VEGF165 plasmid can transfect the SH-SY5Y cells successfully by means of liposome transfecting technique, so as to increase the expression of VEGF165.

【Key words】 Vascular endothelial growth factor-165 (VEGF165); Gene expression; Plasmid; Gene therapy

【Author's address】 Department of Spine Surgery, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan, 410011, China

血管内皮生长因子 165 (vascular endothelial growth factor 165, VEGF165) 是血管内皮细胞特

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。本研究根据现代分子生物学和组织工程学原理,将能在哺乳动物细胞有效表达 VEGF165 的 PcDNA3.1-

第一作者简介:男(1972-),副主任医师,研究方向:脊柱外科
电话:(0731)5295825 E-mail:bingwang20021972@yahoo.com.cn

VEGF165 质粒转入神经母细胞瘤细胞 (SH-SY5Y) 中, 观察其在体外能否产生 VEGF165 蛋白, 为后期缺血性脊髓损伤动物模型的基因治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料及来源

均由中国医学遗传学国家重点实验室提供, 主要包括: 含 PcDNA3.1-VEGF165 质粒大肠杆菌菌种及 SH-SY5Y 细胞; 质粒抽提试剂盒 (荷兰 QIAGEN 公司); 人 VEGF 酶联定量试剂盒 (深圳晶美生物工程公司); 逆转录试剂盒 (美国 Promega 公司) 和鼠抗人内皮抑素 (Endostatin, 美国 CHEMICON 公司) 等。

1.2 实验方法

1.2.1 质粒抽提、酶切及测序鉴定 含 PcDNA3.1-VEGF165 质粒的大肠杆菌菌种增殖培养后, 用大量质粒抽提试剂盒抽提质粒, 用 HindⅢ、BamH I 双酶切体系于 37℃ 进行质粒酶切, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 同时取未酶切的 PcDNA3.1-VEGF165 质粒作为自身对照。电压 120V, 电泳时间 40min, 溴化乙锭 (EB) 液染色 15min 后凝胶成像系统摄像。利用载体通用测序引物 T7、BGH 进行 PcDNA3.1-VEGF165 质粒测序, 用 DNASTar 软件分析。

1.2.2 神经母细胞瘤细胞培养 神经母细胞瘤细胞株 (SH-SY5Y) 在 37℃、5%CO₂、90%湿度条件下于含 15% FBS 的 1640 培养基中开放培养, 经一次 1:1 与一次 1:3 传代后转入 6 孔板中, 按上述条件继续培养。

1.2.3 PcDNA3.1-VEGF165 质粒脂转 神经母细胞瘤细胞生长汇合率为 80%~90% 时收获细胞, 转入 6 孔板, 分成两组, 转染组 (脂转 PcDNA3.1-VEGF165 质粒入神经母细胞瘤细胞): 6 孔板中随机抽取 4 孔, 分别标记为第①、②、③和④孔, 每孔加 1640 培养基 2ml、含脂质体 2000 10μl 的 1640 培养基 250μl、含 VEGF 质粒 4.0μg 的 1640 培养基 250μl; 空白对照组: 6 孔板中余下的 2 孔分别标记为第⑤和⑥孔, 每孔加 1640 培养基 2.25ml、含 lipofectamine 2000 脂质体 10μl 的 1640 培养基 250μl。6 孔板置于 37℃、5%CO₂、90%湿度条件下脂转 4h。

1.2.4 VEGF165 基因表达 培养 48h 后, 每组随

机取 4 孔细胞培养上清液, 共 24 份。采用人 VEGF 酶联定量试剂盒进行 VEGF 检测。先用从 2000ng/ml~62.5ng/ml 依次对倍稀释标准品制作标准曲线。用含 15% FBS 的 1640 培养基作为完全空白对照 (⑦)。将标准品及样品 (稀释 10 倍) 进行检测, 在微孔板比色仪上测量 OD450 值, 计算 VEGF 浓度。

6 孔板中的②、③、⑥孔去培养液, 用 Trizol 抽提细胞总 RNA, 完全空白对照⑦仅用去离子水, 利用逆转录试剂盒合成第一链 cDNA, 用 PE9600 型 PCR 仪将第一链 cDNA 的合成混合物。PCR 扩增 VEGF165, 通过美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 设计的 PCR 引物, 从 GeneBank 中查找人 VEGF165mRNA 序列 (基因信息号: 4996350)。上游引物为 mRNA 起始 21bp 序列, 下游引物为 mRNA 结尾 21bp 的互补序列。上游引物: 5'-ATg, AAC, TTT, CTg, CTg, TCT, Tgg -3' (代号: AW15866); 下游引物: 5'-TCA, CCg, CCT, Cgg, CTT, gTC, ACA-3' (代号: AW15867)。PE9600 型 PCR 仪将 VEGF165 PCR 扩增试剂混合物进行合成反应。看家基因 GAPDH 作为内对照, 约 280bp 大小。反应结束后, 取第②、③和⑥孔 PCR 产物, 每孔分别取 2 份样本, 完全空白对照⑦取 1 份样本, 进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 电压 60V, 电泳时间 100min, EB 液染色 15min 后凝胶成像系统摄像。

取第②、③和⑥孔上清液 200μl 浓缩后, 120V 的电压下 15% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转 PVDF 膜, 封闭过夜, 依次加一抗 (鼠抗人 VEGF, 1:200 稀释)、二抗耦联辣根过氧化物酶的山羊抗鼠 (1:10000 稀释) 室温下孵育 1h。洗膜 3 次, 结束后加化学发光检测试剂盒 (ECL) 试剂作用 5min, X 线片曝光, 显影, 定影。根据蛋白质 Marker 检测蛋白质大小。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 10.0 统计软件包对数据进行两样本均数比较的 *t'* 检验, *P* < 0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 质粒抽提、酶切及测序鉴定结果

未酶切自身对照组质粒电泳带约 5~6kb 大小, 酶切质粒电泳带分别为 5.4kb 和 600bp 左右。PcDNA3.1-VEGF165 质粒中 VEGF 片断序列与

标准序列完全吻合(图 1)。

2.2 VEGF165 可溶性表达产物 ELISA 定量检测

VEGF 从 2000~62.5ng/ml 对倍稀释标准品曲线见图 2。其直线回归方程为: $y=365.1x-33.924$ 。

依方程计算转染组中有 3 份样品数据远离统计学分析剔除,13 个样本计算,VEGF165 含量为 $1005.15 \pm 185.50 \text{ ng/ml}$;对照组 8 个样本的平均含量为 $84.14 \pm 33.89 \text{ ng/ml}$ 。完全空白对照组基本未检出 VEGF165 表达。对照组与脂转组比较有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳检测

1%的琼脂糖凝胶电泳后扫描进行光密度比值分析(图 3),完全空白对照⑦没有出现电泳带。第⑥孔可见微弱的电泳带位于 500bp 与 600bp 带间,约 576bp 大小,说明神经母细胞瘤细胞自身可分泌微量 VEGF165。第②和③孔电泳带较强,位于 500bp 与 600bp 带间,约 576bp 大小。

2.4 Western-blot 分析

见图 4。第②和③孔电泳曝光带于 20~31kD 间,约 23kD 大小,与文献记录基本符合。第⑥孔未见电泳曝光带。表明 PcDNA3.1-VEGF165 质粒转染神经母细胞瘤细胞 48h 后,Western-blot 可检测出神经母细胞瘤细胞明显表达 VEGF165,而对照组未检测出 VEGF165。说明对照组神经母细胞瘤细胞自身分泌出的 VEGF165 量极少。

3 讨论

SCI 后缺血是其继发性损伤的主要病理机制^[1]。SCI 后果严重,自我修复效果不良^[2],其原因

不单是因为神经干细胞的数量不足,更重要的是损伤局部微环境抑制了神经元细胞的新生^[3]。目前对 SCI 进行转基因研究所选择的目的基因主要包括神经生长因子、脑源性神经营养因子和睫状神经营养因子等^[4,5]。但由于缺少适宜的微环境,多数生长因子在细胞外环境中会迅速失活,而良好的微环境能促进神经纤维生长、延伸、连接及功能重建。研究表明^[6],通过转基因技术应用 VEGF165 治疗肢体缺血症,有促进缺血肢体侧支循环形成的作用。受此启发,为使局部血运增加,减少缺血和缺氧带来的继发性损害,国外学者尝试应用 VEGF 进行改善脊髓血运和促进脊髓皮质脊髓束神经元再生的实验研究^[7]。结果表明,基因转移血管生成因子可有效增加侧支循环和改善缺血状况,为 SCI 伤后治疗提供了一个新的途径。

转基因治疗主要包括目的基因、载体和靶细胞选择。VEGF 于 1989 年由 Freeaar 等^[8]首先从牛垂体滤泡星状细胞体外培养液中纯化出来,以 VEGF165 的生物学活性最强,是体内重要的血管生长因子,具有促进血管内皮细胞增殖、增强血管通透性、改变细胞外基质和促进血管生长的作用。但 VEGF 的生物半衰期非常短,仅为 6min。必须选用合适载体,通过转基因方法才能达到其在缺血组织中表达并维持一定时间、有效达到建立侧支循环和缓解组织缺血的目的^[9]。本研究所选目的基因 VEGF165 表达无种族特异性^[10],转基因载体为已编码了 VEGF165 的人工构建的 PcDNA3.1+VEGF165 质粒。该质粒是由 PcDNA3 演变而来的高效真核表达质粒载体,全长 5.4kb。

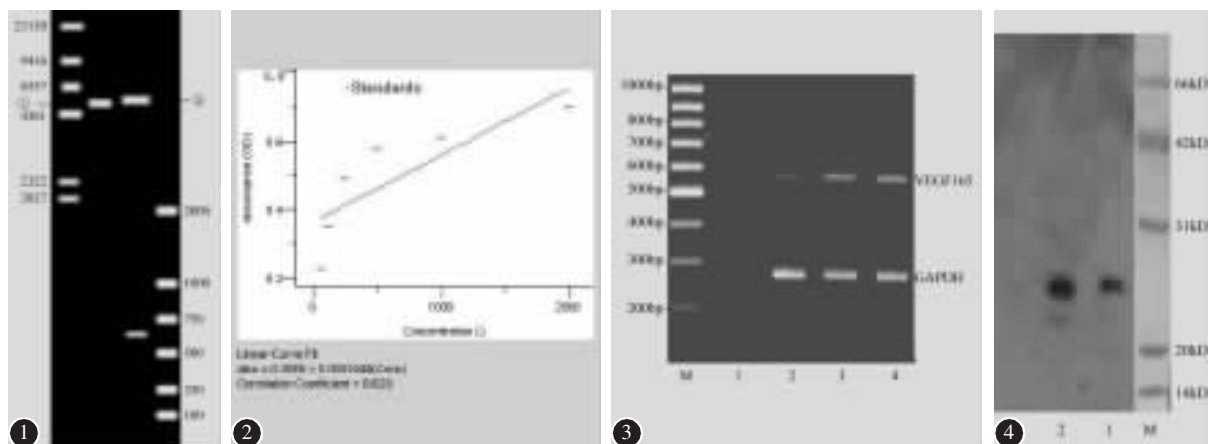


图 1 质粒酶切鉴定电泳扫描图(①为未酶切质粒,②为酶切质粒) 图 2 VEGF ELISA Kit 2000pg/ml~62.5pg/ml 对倍稀释标准品标准曲线 图 3 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果(M 为 1000bp marker,1 为空白对照⑦,2 为第⑥孔,3 为第③孔,4 为第②孔) 图 4 Western-blot 分析结果(M 为蛋白质 Marker,1、2 为转染组,3 为空白对照组)

正向(+)和反向(-)PcDNA3.1 均具有合适的多克隆位点。其编码区包含氨苄青霉素和新霉素抗性基因,便于进行氨苄青霉素和 G418 筛选^[11]。PcDNA3.1(+/-)质粒是一种成熟的、已经商业化的优良的 DNA 空载体,带有高效表达所需的巨细胞病毒增强子 2 启动子序列,具有源于牛生长激素基因(BGH)的多聚腺苷酸信号和转录终止序列,能够提高 RNA 的稳定性,更高效地转录和表达外源基因,目前已被大量用于各种不同基因研究。由于 SCI 涉及到大量神经细胞损害,以神经细胞作为基因转染靶细胞可以更为合理地评价转基因表达效率。大多数研究均选择非神经元原代细胞作为转染细胞,主要包括星形胶质细胞、肾上腺嗜铬细胞、成肌细胞、成纤维细胞和 Schwann 细胞,但神经元原代细胞较难繁殖和筛选。研究表明,来源于人神经母细胞瘤的细胞具有分化程度较低,繁殖快,细胞形态、生理和系列化功能与正常神经细胞相似等特点^[12],被广泛应用于神经损伤的分子机制的研究。本研究尝试选择来源于神经母细胞瘤的细胞(SH-SY5Y)作为转染细胞,验证转基因 VEGF165 的可行性,为缺血性脊髓损伤转基因治疗提供依据。

本研究结果显示,转染组转染目的基因 48h 后,受体细胞可分泌出较多量的 VEGF165。RT-PCR 结果显示转基因细胞含有 VEGF165 的 mRNA,从转录水平证实 VEGF165 的表达。ELISA 显示转基因神经母细胞瘤细胞能分泌 VEGF165。Western-blot 实验在 23kD 处有一条特异性的阳性杂交带,也证明转基因细胞能分泌 VEGF165 蛋白质。以上结果均表明本研究建立了稳定表达 VEGF165 的真核表达系统。空白对照组中神经母细胞瘤细胞体外培养可有微量 VEGF165 表达,ELISA 及 RT-PCR 均能检出其表达,但 Western-blot 分析未能证实该蛋白的表达。其主要原因可能为神经母细胞瘤细胞体外培养可分泌出微量的 VEGF165,实验方法的敏感度直接影响对表达的观察。ELISA 定量结果的统计学分析表明,转染组 VEGF165 的表达强于空白组。说明 PcDNA3.1-VEGF165 质粒转染类神经元细胞的神经母细胞瘤细胞后可使其分泌出大量的 VEGF165,较其基础分泌量明显增加。

总之,类神经元细胞可被 PcDNA3.1-VEGF165 质粒转染,并高效表达 VEGF165 蛋白,

为后期缺血性脊髓损伤动物模型基因治疗提供了实验依据。

4 参考文献

1. Ohashi T, Morimoto T, Kawata K, et al. Correlation between spinal cord blood flow and arterial diameter following acute spinal cord injury in rats[J]. *Acta Neurochir (Wien)*, 1996, 138(3): 322.
2. Bartholdi D, Rubin BP, Schwab ME, et al. VEGF mRNA induction correlates with changes in the vascular architecture upon spinal cord damage in the rat[J]. *Eur J Neurosci*, 1997, 9(12): 2549-2560.
3. Biering-Sorensen F, Hartkopp A. Spinal cord lesions[J]. *Curr Opin Neurol*, 1995, 8(6): 451-455.
4. Tuszynski MH, Peterson DA, Ray J, et al. Fibroblasts genetically modified to produce nerve growth factor induce robust neuritic ingrowth after grafting to the spinal cord[J]. *Exp Neurol*, 1994, 126(1): 1-14.
5. Senut MC, Tuszynski MH, Raymon HK, et al. Regional differences in responsiveness of adult CNS axons to grafts of cells expressing human neurotrophin 3[J]. *Exp Neurol*, 1995, 135(1): 36-55.
6. Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, et al. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia[J]. *Circulation*, 1998, 97(1): 1114-1123.
7. Francesco F, Eduardo F, Salvatore M, et al. Promotion of regeneration of corticospinal tract axons in rats with recombinant vascular endothelial growth factor alone and combined with adenovirus coding for this factor [J]. *J Neurosurg*, 2002, 97(1): 161-168.
8. Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, 161(2): 851-858.
9. Blits B, Bunge MB. Direct gene therapy for repair of the spinal cord[J]. *J Neurotrauma*, 2006, 23(3-4): 508-520.
10. Widenfalk J, Lipson A, Jubran M, et al. Vascular endothelial growth factor improves functional outcome and decreases secondary degeneration in experimental spinal cord contusion injury[J]. *Neuroscience*, 2003, 120(4): 951-960.
11. Frank S, Hubner G, Breier G, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(21): 12607-12613.
12. 陈文东, 李雅莉, 李林. 氯化钾或谷氨酸对人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞钙离子通透性的影响 [J]. *细胞生物学杂志*, 2000, 22(4): 206-209.

(收稿日期: 2007-07-23 修回日期: 2007-11-23)

(英文编审 陆宁)

(本文编辑 卢庆霞)