

血管内皮生长因子165基因促进人脂肪间充质干细胞的增殖

王钰¹, 朱志图², 陈峻江³(辽宁医学院附属第一医院, ¹临床生物样本中心, ²肿瘤科, ³学科科研处, 辽宁省锦州市 121000)

文章亮点:

实验采用基因转染技术, 将血管内皮生长因子 165 基因转染脂肪间充质干细胞, 建立稳定表达血管内皮生长因子 165 基因的脂肪间充质干细胞, 研究该基因在脂肪移植过程中所发挥的作用, 进而发挥血管内皮生长因子 165 和脂肪间充质干细胞的双重促进脂肪移植成活率作用, 并从细胞因子角度阐明影响脂肪移植成活率的分子生物学机制, 为提高颗粒脂肪移植成活率提供新方法和理论依据。

关键词:

干细胞; 脂肪干细胞; 血管内皮生长因子 165; 脂肪间充质干细胞; 重组腺病毒载体; 脂肪移植; 病毒包装; 血管生成; 成活率; 增强型绿色荧光蛋白; 细胞增殖; 组织缺损

主题词:

组织工程; 干细胞; 细胞增殖; 病毒

基金资助:

辽宁省科技厅科技计划项目(2013225305)

缩略语:

血管内皮生长因子: vascular endothelial growth factor, VEGF

摘要

背景: 目前自体脂肪移植已广泛运用于美容整形和修复创伤导致的软组织缺损的修复, 有研究表明, 移植后 1 年移植脂肪存活率为 20%-80%, 因此, 在移植后的早期及时、充分的血供建立, 对于移植脂肪的存活是非常重要的。

目的: 观察血管内皮生长因子 165 转染人脂肪间充质干细胞的增殖情况。

方法: 体外传代培养人脂肪间充质干细胞, 将重组血管内皮生长因子 165 基因入腺病毒液和空病毒液转染至脂肪间充质干细胞内, 分别设为实验组和对照组, 另设正常培养的细胞为空白组。

结果与结论: RT-PCR, Western blot, MTT 检测显示, 与对照组和空白组相比, 实验组血管内皮生长因子 165 mRNA 和蛋白的表达及细胞增殖均增高($P < 0.05$)。结果证实, 腺病毒承载的血管内皮生长因子 165 基因转染脂肪间充质干细胞后不仅可以持续的表达目的蛋白, 同时也能显著促进脂肪间充质干细胞的增殖。

王钰, 朱志图, 陈峻江. 血管内皮生长因子 165 基因促进人脂肪间充质干细胞的增殖[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(28): 4485-4492.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.28.011

Vascular endothelial growth factor 165 promotes proliferation of human adipose-derived mesenchymal stem cells

Wang Yu¹, Zhu Zhi-tu², Chen Jun-jiang³ (¹Biobank, ²Oncology Department, ³Subject Research Department, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Autologous fat transplantation has been widely used in soft tissue defect repair and cosmetic surgery, and the 1-year transplant survival rate is 20%-80%. Therefore, the establishment of timely and adequate blood supply at early period after transplantation is very important for the survival of transplanted fat tissues.

OBJECTIVE: To observe the proliferation of human adipose-derived mesenchymal stem cells transfected with vascular endothelial growth factor 165.

METHODS: Human adipose-derived mesenchymal stem cells were subcultured *in vitro*. Recombinant adenovirus carrying vascular endothelial growth factor 165 and blank virus were respectively transferred into adipose-derived mesenchymal stem cells. Cells cultured normally served as blank group.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the control and blank groups, the expressions of vascular endothelial growth factor 165 mRNA and protein were higher in the experimental group ($P < 0.05$). Experimental findings suggest that the recombinant adenovirus carrying vascular endothelial growth factor 165 transferred into adipose-derived mesenchymal stem cells cannot only maintain the expression of target protein but also obviously promote the proliferation of adipose-derived mesenchymal stem cells.

Subject headings: Tissue Engineering; Stem Cells; Cell proliferation; Viruses

Funding: the Science and Technology Plan of Liaoning Science and Technology Department, No. 2013225305

王钰, 女, 汉族, 1979 年生, 辽宁省辽阳市人, 2013 年辽宁医学院毕业, 医学硕士。

通讯作者: 陈峻江, 博士, 主治医师, 辽宁医学院附属第一医院学科科研处, 辽宁省锦州市 121000

中图分类号:R394.2

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2015)28-04485-08

稿件接受: 2015-06-01

http://www.crter.org

Wang Yu, Master, Biobank, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China

Corresponding author: Chen Jun-jiang, M.D., Attending physician, Subject Research Department, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121000, Liaoning Province, China

Accepted: 2015-06-01

Wang Y, Zhu ZT, Chen JJ. Vascular endothelial growth factor 165 promotes proliferation of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(28): 4485-4492.

0 引言 Introduction

临床上因先天性畸形、创伤、肿瘤切除和美容需求等各种原因所造成的软组织缺损和不足的修复是整形修复外科面临的最常见问题^[1-2]。为解决上述难题,胶原注射剂、真皮移植、人工合成材料以及游离脂肪组织移植等方式都被广泛应用于临床工作中。目前临床上常用的软组织缺损修复填充剂有许多种,如胶原蛋白、透明质酸、聚丙烯酰胺水凝胶、聚乳酸等,均是异体人工材料填充修复,由于填充材料不能成为人体组织的一部分,移植后可出现较强的排斥反应,而且容易感染及移位并穿破皮肤,极大的限制其使用。作为能够完全为人体所接受,不产生排异反应,并能够大量获得的组织填充材料,没有一种能够和人体自身的脂肪组织相媲美^[3-4]。

自体脂肪组织游离移植已经有100多年的历史,目前自体脂肪移植已广泛运用于美容整形和修复创伤导致的软组织缺损的修复。根据长时间的随访观察,移植脂肪组织的存活率报道不一致,移植后1年移植脂肪存活率为20%-80%。在移植的早期,移植脂肪和受区之间尚未建立血供,脂肪组织只能靠周围组织渗出的组织液提供营养,渗出距离仅为100-200 μm。此时移植脂肪处于急性缺氧缺血的状态,移植脂肪中央区出现大量脂肪的坏死,随后坏死的脂肪组织被纤维结缔组织取代^[5-7]。由此可见,在自体脂肪移植中,在移植后的早期及时、充分的血供建立,对于移植脂肪的存活是非常重要的。

为解决这一问题提高移植脂肪组织的存活率,人们把研究的焦点放于细胞疗法上,特别是细胞辅助的脂肪移植^[8-9]。目前为止,脂肪间充质干细胞辅助自体脂肪游离移植,被证实可以有效提高移植脂肪的存活率。相对于骨髓基质来源干细胞,脂肪间充质干细胞被认为是作为细胞辅助脂肪移植的最佳选择,因为通过抽脂术就可以获得大量的脂肪间充质干细胞。脂肪间充质干细胞作为脂肪组织的一种前体细胞,参与各种脂肪组织重建,包括生长发育、病理性肥胖、损伤后或缺氧后的修复,以及机械力诱导的组织扩张。

脂肪组织重建的过程是脂肪细胞坏死或凋亡和脂肪再生之间的平衡,并且这个过程总是伴随着毛细血管的重建。脂肪间充质干细胞在脂肪重建的过程中,通过分化成脂肪细胞或血管内皮细胞,以及释放促血管生成生长因子,主要发挥着脂肪再生和血管生成的作用^[10-12]。

研究表明,提高颗粒脂肪移植存活率与许多的因子作用密切相关^[13-15]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是最重要的促血管生成因子之一,在血管的再生中发挥重要作用。VEGF具有促进血管内皮细胞增殖和迁移、促进血管形成、延长血管内皮细胞寿命、

增强血管通透性和改变细胞外基质等作用,与创伤组织修复愈合、炎症和肿瘤发生密切相关,而VEGF₁₆₅是其家族中作用性最强的因子。在脂肪移植中可促进移植物的血运重建,提高成活率^[16-17]。

综上,文章拟采用基因转染技术,将VEGF₁₆₅基因转染脂肪间充质干细胞,建立稳定表达VEGF₁₆₅基因的脂肪间充质干细胞,研究该基因在脂肪移植过程中所发挥的作用,进而发挥VEGF₁₆₅和脂肪间充质干细胞的双重促进脂肪移植成活率作用,并从细胞因子角度阐明影响脂肪移植成活率的分子生物学机制,为提高颗粒脂肪移植成活率提供新方法和理论依据。

1 材料和方法 Materials and methods

设计:细胞学实验。

时间及地点:于2013年12月至2014年12月在辽宁医学院附属第一医院临床生物样本中心完成。

材料:

脂肪组织:样本来自于腹部脂肪抽脂术患者,性别不限,无传染病及内分泌疾病,取脂肪抽吸物液体部分,冻存于辽宁医学院附属第一医院生物样本库。

细胞:HEK293A细胞和DH5α感受态细胞均由辽宁医学院附属第一医院临床生物样本中心提供。

VEGF₁₆₅基因转染脂肪间充质干细胞实验相关主要实验试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
含人 VEGF ₁₆₅ 基因供体质粒	美国 ATCC 公司
腺病毒 pAdEasy-1 系统、病毒滴度检测试剂盒	美国 Stratagene 公司
DNA 连接试剂盒、凝胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒、DNA/RNA Marker、RT-PCR 试剂盒、限制性内切酶	日本 TaKaRa 公司
超纯质粒提取试剂盒	德国 QIAGEN 公司
Lipofectamine 2000, OPTI-MEM, Trizol 试剂	美国 Invitrogen 公司
兔抗人 VEGF ₁₆₅ 单克隆抗体	美国 Santa Cruz 公司
DMEM 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清	美国 Gibco 公司
SW-CJ-1Cμ 型双人单面净化工作台	苏州净化设备有限公司
Western blot 电泳仪、电泳槽、转膜仪、C1000 型 PCR 仪	Bio-Rad 公司
荧光倒置显微镜	Olympus 公司
Labworks 凝胶成像分析系	UVP 公司
GSKP-01B II 型电热恒温隔水式培养箱	湖北省黄石市医疗器械厂
TGL-16G 型冷冻台式离心机	上海安亭科学仪器厂

实验方法:PCR引物设计、合成及基因测序由日本 TaKaRa公司完成。

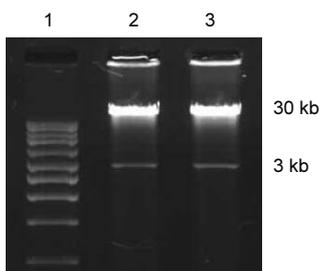


图 1 两组重组腺病毒载体酶切电泳鉴定图
Figure 1 Gel electrophoresis identification of recombinant adenovirus vectors

图注: 1 泳道为 Marker; 2 泳道为实验组 VEGF₁₆₅ 腺病毒载体 (Ad-VEGF₁₆₅-IRES-EGFP-1) 经 Pac I 酶切后电泳条带; 3 泳道为空白对照组腺病毒载体 (Ad-IRES-EGFP-1) 经 Pac I 酶切后电泳条带。

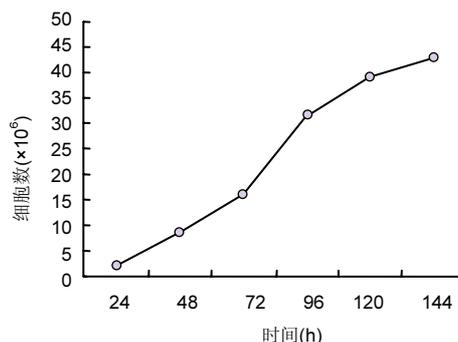


图 5 脂肪间充质干细胞生长增殖曲线
Figure 5 Proliferation curve of adipose-derived mesenchymal stem cells
图注: 培养的第 6 天 (144 h) 细胞数量最多。

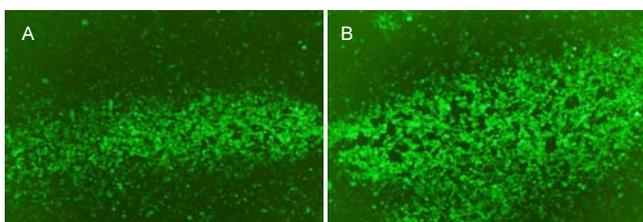


图 2 腺病毒载体转染 HEK293A 细胞后绿色荧光分布图 (免疫荧光染色, ×40)
Figure 2 Green fluorescence distribution of adenovirus vector-transfected HEK293A cells (immunofluorescent staining, ×40)
图注: 图中 A, B 分别为构建成功的实验组 VEGF₁₆₅ 腺病毒载体及空病毒载体转染 HEK293A 细胞后观察到的绿色荧光表达情况。荧光显微镜激发绿光表达示踪因子 EGFP。

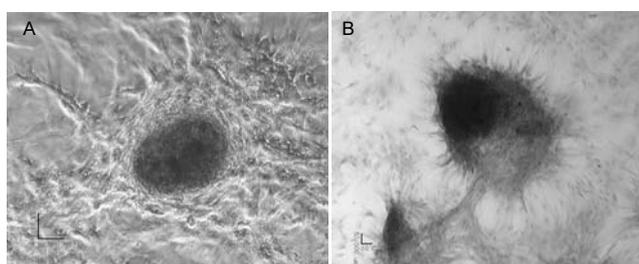


图 8 脂肪间充质干细胞成骨诱导情况 (茜素红染色, ×1 000)
Figure 8 Osteogenic induction of adipose-derived mesenchymal stem cells (alizarin red staining, ×1 000)
图注: 图中 A 为成骨诱导 12 d 后细胞内出现钙沉积; B 为茜素红染色阳性, 红色为细胞内出现的典型的钙结节。

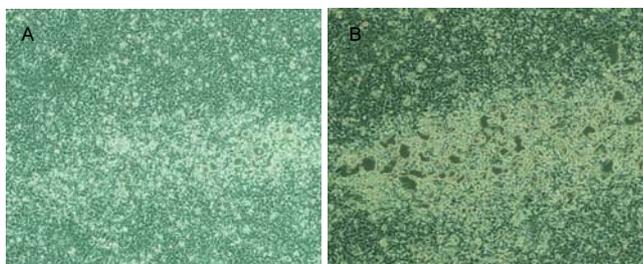


图 3 腺病毒载体转染 HEK293A 细胞后病毒包装图 (×40)
Figure 3 Virus packaging after gene transfection of HEK293A cells (×40)
图注: 图中 A, B 分别为构建成功的实验组 VEGF₁₆₅ 腺病毒载体及空病毒载体转染 HEK293A 细胞进行包装时均出现相似的细胞病变效应。

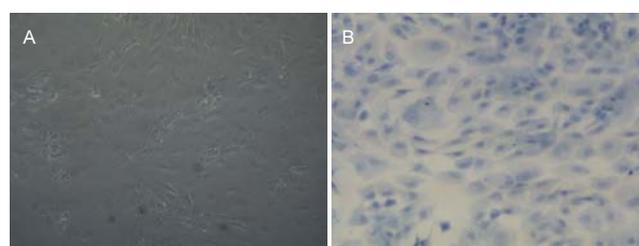


图 9 脂肪间充质干细胞成软骨诱导情况 (甲苯胺蓝染色, ×400)
Figure 9 Chondrogenic induction of adipose-derived mesenchymal stem cells (toluidine blue staining, ×400)
图注: 图中 A 为成软骨诱导 14 d 后细胞呈软骨样生长; B 为细胞核甲苯胺蓝染色阳性。

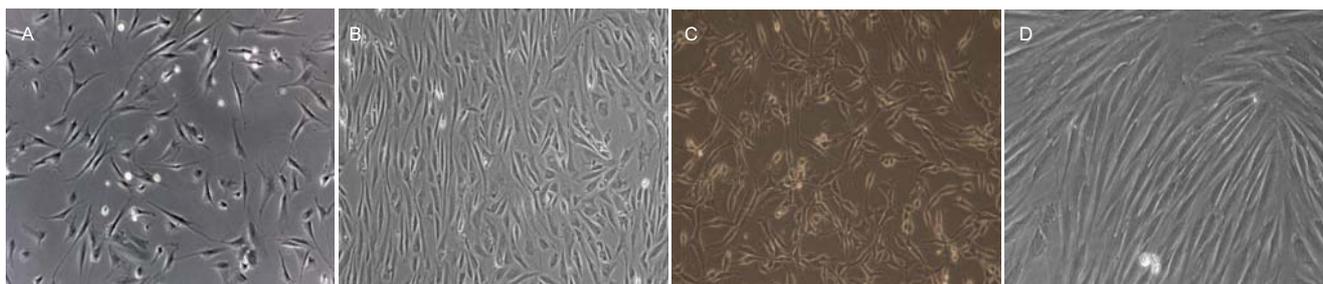


图 4 原代及第 3 代脂肪间充质干细胞培养基本形态 (×200)
Figure 4 Primary and passage 3 adipose-derived mesenchymal stem cells (×200)
图注: 图中 A 为原代脂肪间充质干细胞, 有粗大的突起或膨出; B 为原代脂肪间充质干细胞融合成单层簇状细胞分布; C 为第 3 代脂肪间充质干细胞贴壁梭形生长; D 为第 3 代脂肪间充质干细胞生长至浓度为 80%。

PCR引物序列:

名称	序列(5'-3')	片段长度
VEGF ₁₆₅	正义: GAC GGA TCC ATG AAC TTT CTG	34 bp
	CTC TCT TGG GTG C	
	反义: TGA AAG CTT TCA CCG CCT TGG	29 bp
	CTT GTC AC	
β-actin	正义: GGG ACC TGA CTG ACT ACC TC	20 bp
	反义: TCA TAC TCC TGC TTG CTG AT	20 bp

重组腺病毒载体的构建及包装: 利用引物以含人 VEGF₁₆₅ 基因供体质粒为模版进行 PCR 扩增, 反应条件: 98 °C 10 s, 55 °C 10 s, 72 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C、10 min, 1 个循环。回收约 580 bp 产物片段后利用 Sal I / Pst I 行双酶切, 经乙醇沉淀纯化后保存备用。以 pAdEasy-1 中 pShuttle 载体为底物建立双酶切反应体系, 回收约 8.9 kb 的 pShuttle 载体片段, 将上述保存片段与之相连接, 重组后筛选阳性克隆进行测序鉴定, 构建成腺病毒穿梭重组体 (pShuttle-VEGF₁₆₅-IRES-EGFP-1); 将上述产物经 Pme I 酶切后与 pAdEasy-1 中 BJ5183 感受态细胞混合于电穿孔仪中以 200 Ω, 2.5 kV, 25 μF 为条件电击 1 次, 构建成 pAd-VEGF₁₆₅-IRES-EGFP-1 重组体; 超纯提取该重组体后经 Pac I 酶切提纯大片段, 通过 Lipofectamine 2000 转染 HEK293A 细胞 7 d 进行病毒包装, 利用示踪因子 EGFP 观察转染效果, 反复冻融 3 次获得 Ad-VEGF₁₆₅-IRES-EGFP-1 病毒液, 检测病毒滴度后 -80 °C 保存备用。同理包装对照病毒 Ad-IRES-EGFP-1。

人脂肪间充质干细胞的培养及传代: 将抽脂所得的脂肪组织用 PBS 反复冲洗 3 次, 再用体积分数 0.25% I 型胶原酶于 37 °C 水浴消化 30 min, 期间反复震荡 3 次, 使胶原酶溶液与脂肪组织充分混合接触。用与胶原酶消化后的混悬液等体积的完全培养液 (高糖 DMEM + 体积分数 10% 胎牛血清 + 1% 青链霉素) 终止胶原酶的消化, 200 目滤网过滤混悬液, 以去除未消化的纤维结缔组织, 1 200×g 离心 5 min 以去除悬浮的脂肪细胞和脂滴等, 去上清。将细胞沉淀用 1 mL 的完全培养基重悬后, 加入 6 倍体积的红细胞裂解液, 混匀后室温下解育 6 min, 1 200×g 离心 5 min, 去上清, 显微镜下计数细胞数, 再以适量完全培养基重悬沉淀, 以 1×10⁶/皿的密度接种于直径为 10 cm 的培养皿, 再加入适量完全培养基培养。细胞每隔 3 d 换 1 次培养基, 每周以 1:3 的比例传代。传代时, 吸走培养皿中的完全培养基, 用 PBS 冲洗 2 次, 加入适量胰酶溶液在显微镜下观察, 待 80%–90% 的细胞变圆后, 加入含有胎牛血清的完全培养基以终止消化, 用加样枪反复吹打培养皿的底部, 使贴壁的细胞脱落, 将细胞混悬液移入离心管中, 1 200×g 离心 5 min, 去上清, 以适量完全培养基重悬沉淀, 接种于培养皿, 再加入适量完全培养基培养。实验用的脂肪间充质干细胞均为第 3 代细胞。

脂肪间充质干细胞的免疫组织化学染色鉴定: 选取第 3 代细胞, 用体积分数 2% 胰酶消化细胞, 接种于置有盖玻

片的 6 孔板, 37 °C, 体积分数 5% CO₂ 培养箱培养至贴壁。PBS 漂洗培养基 3 次; 加入 40 g/L 多聚甲醛 1 mL, 室温下固定 20 min (勿摇); 1 mL 含体积分数 0.5% Triton X-100 的 PBS 渗透 5 min (勿摇); 加入用体积分数 3% 过氧化氢 50–100 μL, 静止 10 min; 加入体积分数 5% BSA 液 50–100 μL, 封闭 30 min; 加入按 1:300 比例稀释的一抗 (CD45 检测造血干/祖细胞及成纤维细胞, CD106 排除骨髓干细胞), 4 °C 湿盒中过夜; 加入 1:300 比例稀释的二抗, 室温静置 30 min, 37 °C 温箱内静置 30 min; 加入新鲜配制的 DAB 显色试剂 (三抗), 室温静置 20 min; 苏木精复染, 封固, 光学显微镜下观察。

脂肪间充质干细胞成脂诱导分化鉴定: 选取培养的第 3 代脂肪间充质干细胞, 用胰液消化后, 接种到置有盖玻片的 6 孔培养板上, 每孔 10⁵ 个细胞, 在 37 °C、体积分数 5% CO₂ 条件下培养过夜。待细胞贴壁后, 将培养基更换为成脂诱导培养基, 每周换液 2 次, 并设立只加入对照培养基的孔为对照组。继续培养 2 周后, 分别取对照组和诱导组细胞进行油红 O 染色以证实细胞中是否有脂滴形成。

脂肪间充质干细胞成骨诱导分化鉴定: 选取培养并冻存的第 3 代脂肪间充质干细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞后制成混和悬液, 按 1×10⁵/皿进行细胞接种, 37 °C、体积分数 5% CO₂ 条件下解育 2 d 后更换为成骨诱导的 DMEM 培养基, 并设立 2 个只加入完全培养基的孔作为对照组, 每隔 3 d 更换 1 次诱导培养基, 成骨定向分化诱导后每天继续倒置显微镜下实时观察, 于诱导 12 d 后行茜素红染色鉴定。用 PBS 冲洗两三次无菌培养皿, 再用体积分数 95% 乙醇溶液固定细胞 10 min, 再继续超纯水冲洗 3 次, 使用体积分数 1% 茜素红染液-Tris-HCl (pH 8.3) 于 37 °C 下染色 30 min, 超纯水冲洗后倒置显微镜下继续观察成骨诱导情况。

脂肪间充质干细胞成软骨诱导分化鉴定: 选取培养完成并冻存的第 3 代脂肪间充质干细胞, 用体积分数 0.25% 的胰蛋白酶溶液进行消化制成混悬液, 按 1×10⁷/培养皿进行无菌接种, 37 °C、体积分数 5% CO₂ 条件下培养 2 d 后更换为成软骨诱导的 DMEM 溶液, 以 2 孔完全培养基组培养作为阴性对照组, 每隔 3 d 更换 1 次诱导培养基以保证细胞诱导分化充足的养分, 成软骨定向分化诱导后每天于倒置显微镜下实时观察细胞形态, 于诱导 14 d 后进行甲苯胺蓝染色鉴定。一次性无菌培养皿用 PBS 溶液冲洗两三次, 使用 40 g/L 多聚甲醛溶液继续固定 15 min, 再继续 PBS 清洗两三次, 使用体积分数 1% 甲苯胺蓝染液-Tris-HCl (pH 1.0) 于 37 °C 的温度下染色过夜, 0.1% HCl 溶液漂洗 5 min, 再用蒸馏水冲洗 3 遍, 倒置显微镜下观察染色鉴定情况。

分组及干预: 实验分 3 组, 实验组将含 VEGF₁₆₅ 基因病毒液 (Ad-VEGF₁₆₅-IRES-EGFP-1) 15 μL 转染脂肪间充质干细胞, 对照组将空病毒液 (Ad-IRES-EGFP-1) 17 μL 转染脂肪间充质干细胞, 将上述 2 种病毒液分别以最佳感染复数 (Multiplicity of infection, MOI)=100 转染; 空白组为未转

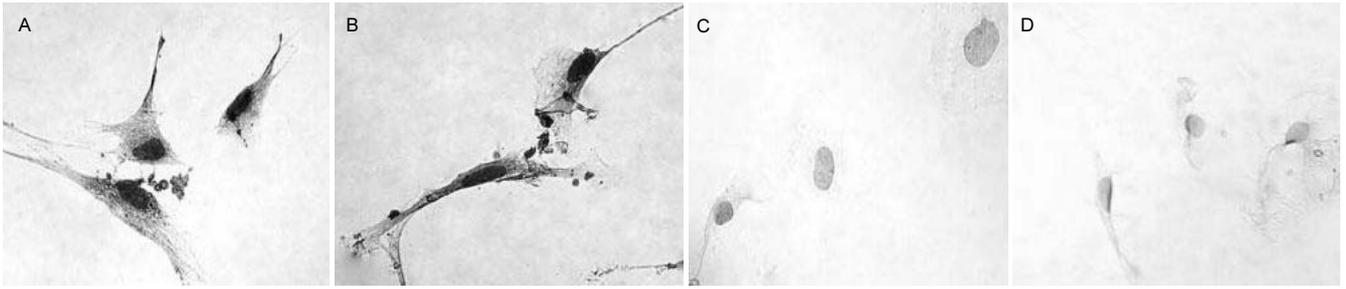


图 6 脂肪间充质干细胞的免疫组织化学鉴定结果(×400)

Figure 6 Immunohistochemical identification of adipose-derived mesenchymal stem cells (×400)

图注: 图中 A 为 CD44 抗原阳性表达; B 为 CD49 抗原阳性表达; C 为 CD45 抗原阴性表达; D 为 CD106 抗原阴性表达。

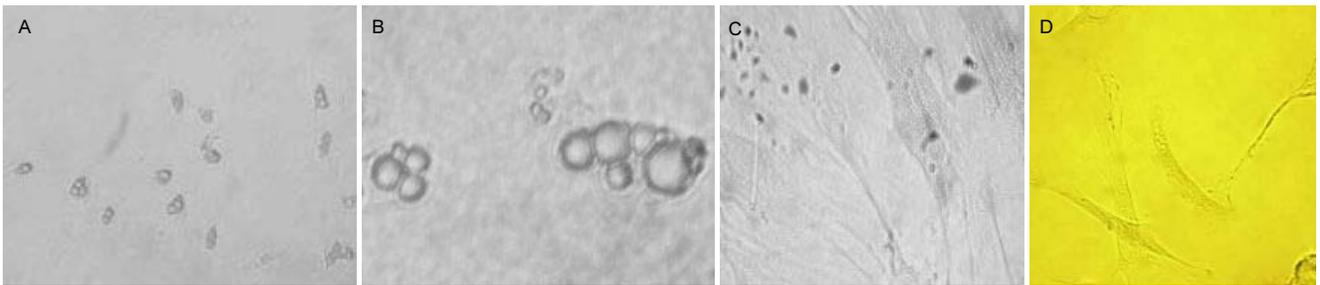


图 7 脂肪间充质干细胞成脂诱导情况(油红 O 染色)

Figure 7 Adipogenic induction of adipose-derived mesenchymal stem cells (oil red O staining)

图注: 图中 A 为成脂诱导 2 周后胞内见脂滴形成(×200); B 为细胞内脂滴形态(×1 000); C 为成脂诱导 2 周后细胞油红 O 染色阳性(×400); D 为对照组细胞油红 O 染色阴性(×400)。

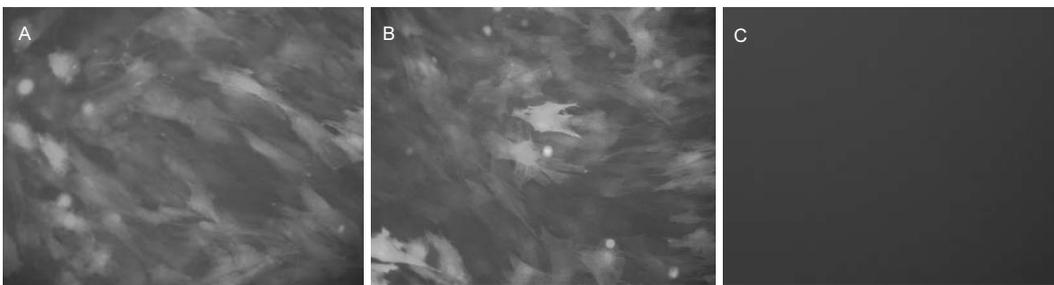


图 10 转染病毒液的脂肪间充质干细胞形态(×200)

Figure 10 Adipose-derived mesenchymal stem cells transfected with virus liquid (×200)

图注: 图中 A, B 分别为实验组病毒液、对照组病毒液分别转染脂肪间充质干细胞后观察到的绿色荧光表达情况; C 为未转染任何病毒液的脂肪间充质干细胞在荧光显微镜下的观察效果。

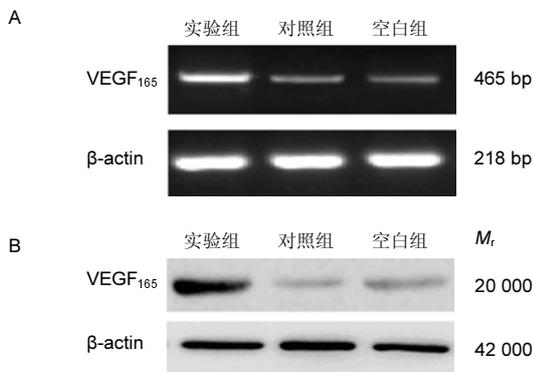


图 11 各组细胞 VEGF₁₆₅ 基因和蛋白表达检测情况

Figure 11 mRNA and protein expression of vascular endothelial growth factor 165

图注: 图中 A, B 分别为实验组 VEGF₁₆₅ mRNA 和蛋白的表达均高于对照组和空白组。

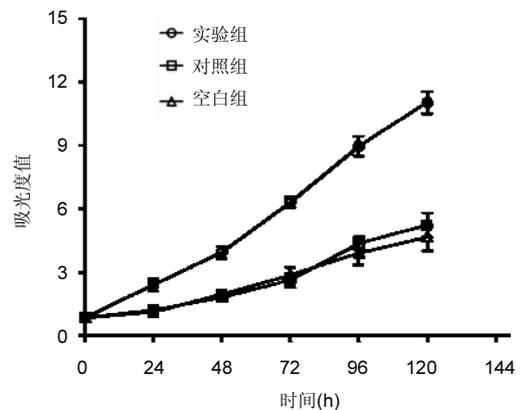


图 12 转染病毒后各组各时间段脂肪间充质干细胞增殖生长曲线

Figure 12 Proliferation curves of transfected adipose-derived mesenchymal stem cells at different time

图注: 与对照组和空白组相比, 实验组转染后脂肪间充质干细胞增殖程度显著增加($P < 0.05$)。

染任何病毒液的脂肪间充质干细胞, 每组6孔。各组转染72 h后在倒置荧光显微镜下观察转染效果。

RT-PCR检测各组细胞中VEGF₁₆₅ mRNA的表达:

利用Trizol分别提取3组细胞的总RNA, 检测吸光度值($A_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$), 其比值均在1.8–2.0之间。配制反应液后进行RT-PCR反应, 反应条件: 50 °C 30 min, 94 °C、2 min, 1个循环, 待94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30个循环。反应结束后取反应液5 μL 直接进行1%琼脂糖凝胶电泳, 设 β -actin为内参照。采用凝胶成像系统分析各条带A值, 重复实验3次, 分别计算相对A值。

Western blot检测各组细胞中VEGF₁₆₅蛋白的表达:

通过细胞蛋白裂解液提取各组细胞总蛋白, 利用BCA试剂盒检测各组蛋白浓度; 配制5%浓缩胶与8%分离胶, 60 V \times 30 min, 150 V \times 1 h进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳结束后取下分离胶洗涤3次放入转膜仪, 以100 mA \times 30 min进行转膜, 转膜后孵育一抗(兔抗人VEGF₁₆₅单克隆抗体, 1:1 500), 4 °C摇摆过夜, 洗膜后继续孵育二抗(山羊抗兔多克隆抗体, 1:1 000)及显影液, 室温避光孵育30 min, 洗脱液洗涤3次终止显色反应, 凝胶成像系统分析膜上目的条带与内参照A值。重复实验3次, 计算相对A值。

MTT法检测各组脂肪间充质干细胞的增殖: 培养24 h后胰酶消化各组细胞, 以 2×10^3 /孔接种于96孔培养板上, 每组细胞设10个复孔, 培养24 h待细胞贴壁后每孔加入20 μL (15 g/L)MTT溶液, 继续培养4 h, 弃上清液, 然后每孔加200 μL DMSO, 振荡10 min, 用酶标仪测定490 nm处各孔的吸光度值, 并计算细胞增殖率。

主要观察指标: 腺病毒包装及在HEK293中表达情况; 脂肪间充质干细胞免疫组织化学鉴定结果; 脂肪间充质干细胞诱导鉴定结果; 各组病毒转染后VEGF₁₆₅ mRNA和蛋白的表达及脂肪间充质干细胞增殖情况。

统计学分析: 计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用SPSS 20.0软件对所得结果进行统计学分析, 实验所得所有数据均符合正态分布, 两组间数据比较采用 t 检验, 多组间数据比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 重组腺病毒载体构建及包装结果 通过基因测序显示VEGF₁₆₅基因完全连入重组腺病毒载体, 凝胶电泳成像显示Ad-VEGF₁₆₅-IRES-EGFP-1及Ad-IRES-EGFP-1经Pac I酶切后均出现30 kb和3 kb两个条带, 提示两组重组腺病毒载体均构建成功(图1)。经2种病毒重组体转染的HEK293A细胞在荧光显微镜下均观察到有大量绿色荧光蛋白表达(图2), 同时均出现相似的细胞病变效应: 细胞触角回收、肿胀变圆, 一部分细胞脱落, 悬浮于视野中(图3); 病毒滴度检测结果依次为 2.0×10^{11} pfu L⁻¹和 1.9×10^{11} pfu L⁻¹, 符合后续转染实验要求。

2.2 脂肪间充质干细胞常规培养形态 脂肪间充质干

细胞原代细胞接种时, 初始成分中含有大量的脂滴、少量的成纤维细胞和红细胞以及其他杂质细胞, 随着细胞贴壁后培养时间的逐渐深入, 换液次数的逐渐增多, 这些杂质及其他细胞成分基本被清除干净。

在原代细胞接种24 h后, 可观察到少数较大的细胞开始贴壁, 倒置显微镜下观察到细胞为扁平而大的单层样细胞形态, 其中有的部分细胞体细而长, 形似成纤维细胞状态。培养48 h后大多数细胞均逐渐贴壁生长, 并开始主动向四周伸展, 进行分裂, 并呈梭形继续生长, 有粗大的突起或膨出(图4A)。培养七八天后, 细胞逐渐分裂完成、融合成单层簇状细胞分布状态(图4B)。

经过3次传代后可见脂肪间充质干细胞于24 h内贴壁梭形生长(图4C), 待到细胞生长至80%浓度即可冻存备用(图4D), 每代细胞平均扩增时间约为60 h。

2.3 体外培养脂肪间充质干细胞增殖变化 原代贴壁培养的脂肪间充质干细胞生长速度均比较缓慢, 细胞密度生长不均。传代培养后, 细胞形态及密度变化十分均匀, 数小时内即可贴壁成功并伸展成为多角形或梭形的形态。传代培养的前两天为生长的相对抑制期, 随后呈指数形式快速分裂并增殖, 在培养的第6天细胞浓度达到80%–90%的融合, 之后进入平台期。根据不同培养时间的细胞生长数量绘制出脂肪间充质干细胞生长增殖曲线(图5)。

2.4 脂肪间充质干细胞免疫组织化学鉴定结果 对所选取的第3代脂肪间充质干细胞进行免疫组织化学染色鉴定结果显示: 文章所培养的细胞内均有CD44, CD49两种抗原的阳性表达(图6A, B), 而不表达CD45, CD106的抗原(阴性表达)(图6C, D)。

2.5 脂肪间充质干细胞成脂诱导分化鉴定结果 文章选取的文化的第3代细胞脂肪间充质干细胞进行成脂分化诱导, 成脂诱导组培养2周后, 细胞内开始有部分脂滴出现(图7A, B), 同时进行油红O染色鉴定。油红O染色鉴定结果显示: 成脂诱导组脂肪间充质干细胞油红O染色阳性, 对照组为阴性(图7C, D)。

2.6 脂肪间充质干细胞成骨诱导分化鉴定结果 脂肪间充质干细胞从成骨诱导的第5天开始, 在倒置相差显微镜下可观察到一些脂肪间充质干细胞形态由梭形逐渐转变为多角形或立方状, 体积逐渐变大。在成骨诱导的第10天则有一些细小的点状钙化斑块开始出现, 在成骨诱导的第14–28 d, 通过茜素红染色鉴定可以观察到着红色的典型钙化结节形态。而与此同时对照组的细胞形态仍为成纤维细胞样继续生长, 细胞大小基本无变化, 偶而也可见圆形或多角形的细胞形态, 茜素红染色均不着色或着色极为虚弱(图8)。

2.7 脂肪间充质干细胞成软骨诱导分化鉴定结果 细胞接种的最初, 细胞呈圆形生长, 在成软骨诱导培养后, 脂肪间充质干细胞的细胞形态逐渐由梭形向多边形或多角形而转变。诱导14 d后多数细胞呈密集生长, 软骨细胞结构清晰, 细胞核被染成蓝色, 胞核染色清晰, 胞浆几乎不

着色, 基质呈淡蓝紫色(图9), 对照组不着色或极弱。

2.8 病毒转染脂肪间充质干细胞表达的鉴定结果 两种包装成功的病毒液(实验组和对照组)在荧光显微镜下均观察到较强绿色荧光蛋白表达并且表达绿色荧光蛋白的脂肪间充质干细胞也较多, 转染效率较高; 而未转染任何病毒液的脂肪间充质干细胞(空白组)在荧光显微镜下并未显现出任何荧光效应(图10)。

2.9 转染病毒液后各组 VEGF₁₆₅ mRNA 和蛋白的表达 RT-PCR 检测结果显示, 对照组、空白组两组细胞内 VEGF₁₆₅ mRNA 表达相对吸光度值分别为 0.43 ± 0.04 , 0.39 ± 0.04 , 两组之间差异无显著性意义($P > 0.05$); 实验组 VEGF₁₆₅ mRNA 的表达量相对吸光度值为 0.76 ± 0.05 , 高于其他2组($P < 0.05$)(图11A); 而实验组 BEGF₁₆₅ 蛋白表达也高于其他2组(图11B)。

2.10 转染后脂肪间充质干细胞增殖检测结果 各组脂肪间充质干细胞分别在培养 24, 48, 72, 96, 120 h 后用 MTT 法检测细胞吸光度值, 并根据酶标仪检测的吸光度值绘制细胞增殖曲线。结果表明, 对照组及空白组的脂肪间充质干细胞生长速度较慢, 两组相比较差异无显著性意义($P > 0.05$); 与另外2组相比, 实验组转染后脂肪间充质干细胞增殖程度显著增加($P < 0.05$), 说明 VEGF₁₆₅ 可以显著提高脂肪间充质干细胞的生长增殖速度(图12)。

3 讨论 Discussion

3.1 种子细胞的筛选 基因治疗的关键是种子细胞的选择。目前治疗组织缺损的方法存在诸多缺点, 如发生坏死和吸收, 组织量不足和供区瘢痕等, 因此很多类型的组织缺损尚未找到最佳的治疗方法, 而组织工程的发展, 为治疗带来了希望。随着目前基因转染、细胞移植和组织工程等技术的飞速进展, 基因治疗在促进缺血组织血管新生的研究中已取得了较大的进展。组织工程学的核心是建立由种子细胞和支架构成的三维空间复合体, 其中种子细胞的选择非常重要^[18-20]。

脂肪间充质干细胞在组织工程领域具有重要的作用。随着现代医学的发展, 人们已成功分离培养了多种干细胞, 这为人类探索干细胞生物学调控机制和评价其治疗人类许多疾病的潜能打开了方便之门。干细胞总体上可分为胚胎干细胞和成体干细胞。胚胎干细胞在理论上虽具有最理想的效果, 但其自身的免疫原性、取材困难以及宗教伦理道德等问题, 限制了它在临床上的应用。成体干细胞在分化能力上不及胚胎干细胞, 但由于其可避免社会伦理之争, 逐渐成为研究的热点。研究已证实从骨髓中分离得到的成体干细胞, 在体外条件下可大量扩增并表现出广泛的多向分化潜能。鉴于脂肪组织与骨髓同属于中胚层组织, 因此有学者就认为脂肪组织中也应该含有类似的干细胞, 该假设被随后一系列的实验所证实。

脂肪间充质干细胞具有很强大的功能。目前已证实脂

肪间充质干细胞能向脂肪细胞、软骨细胞、成骨细胞、肌肉细胞及心肌细胞定向诱导转化, 可作为多种组织工程的种子细胞。鉴于脂肪间充质干细胞具有易获得性、可迅速扩增及多向分化潜能等特点, 其将成为具有广阔治疗应用前景的一类成体干细胞。近来研究证实, 脂肪间充质干细胞易于外源性基因导入, 可作为基因治疗的目的基因载体细胞, 无论是腺病毒载体、质粒载体还是反转录病毒载体, 均可携带目的基因转染脂肪间充质干细胞, 并且在体内能够长期高效地表达, 而不影响其干细胞特性。

3.2 生长因子的选择 生长因子的选择在组织工程领域十分关键。细胞生长因子作为构建组织工程的3大要素之一, 在促进组织修复过程中发挥重要的作用, 而促进局部血运重建的细胞因子显得尤其重要。充足的血供不仅有利于种子细胞的存活、增殖和分化, 同时还可加快组织缺损的修复。近年来, 关于血管生成因子机理的认识有了很大进展, 发现和克隆了一系列可促进血管新生, 加速侧支循环建立的细胞因子。在已发现的促组织血管新生的细胞因子中, VEGF 是作用最强的血管形成因子。VEGF 家族有4种亚型, 由于 mRNA 差异剪接所致, VEGF 有4种不同变体, 分别为 VEGF₁₂₁、VEGF₁₆₅、VEGF₁₈₉、VEGF₂₀₆, 只是它们氨基酸残基数目, 其中 VEGF₁₆₅ 活性最强, 分布范围广, 是体内发挥作用的主要形式。

VEGF 在血管新生中具有极其重要的作用。VEGF₁₆₅ 通过旁分泌机制特异地作用于血管内皮细胞, 促进其分裂, 抑制其凋亡, 促进新的血管形成。首先, 血管内皮细胞生长因子通过肝素样分子的调节, 与相应受体结合引起受体自身磷酸化, 激活丝裂原活化的蛋白激酶, 选择性增强内皮细胞有丝分裂, 刺激内皮细胞增殖并促进血管生成; 此外, 升高血管尤其是微小血管的通透性, 为细胞的生长和新生毛细血管网的建立提供营养。综合以上考虑, 实验选用 VEGF₁₆₅ 促进脂肪组织的血管形成。

外源性 VEGF 在组织工程领域应用的可行性。由于 VEGF 特异的促血管再生作用, 许多学者考虑用 VEGF 治疗组织缺血性疾患。也有部分学者试图直接应用 VEGF 蛋白来促进组织愈合, 并显示了一定的疗效, 但若单纯介入 VEGF 蛋白, 因其半衰期很短, 故发挥治疗作用必须连续不断地进行 VEGF 蛋白介入, 既昂贵又不便利, 病人耐受性差, 使其蛋白剂用于体内治疗受到限制。若将外源基因导入细胞并使其在细胞内异位表达的间接应用方法可望避免上述缺点。因此, 多数学者提出应用局部组织表达 VEGF 蛋白的基因治疗来达到促进组织的再生, 加速坏死组织的修复。

3.3 重组腺病毒载体 VEGF₁₆₅ 联合脂肪间充质干细胞的共赢 腺病毒作为载体在实验中起到了很好的桥梁作用。实验通过腺病毒把目的基因转染到脂肪间充质干细胞内, 再移植入体内, 这样就可避免排斥反应的发生。实验结果显示, 转染腺病毒载体后, 脂肪间充质干细胞中 VEGF₁₆₅

mRNA和蛋白水平就已经有了显著表达, 可保持在一个可检测水平之上, 由此可以推测, 目的基因在体内的表达时间持续数周或数月后消失, 虽不适合于遗传病及慢性病的治疗, 但对于组织修复来说比较合理, 在一段时限内所表达的细胞因子对组织修复已足够, 而又不必担心持续的过度表达引起组织过度再生, 改建异常以及可能出现的致瘤性。

同样, 当转染腺病毒24 h后, 就可发现脂肪间充质干细胞的增殖水平相对于对照组以及空白组来说有了一个明显的飞跃, 可以由此推测出腺病毒承载的VEGF₁₆₅基因转染脂肪间充质干细胞后不仅可以持续的表达该目的蛋白, 同时也能促进脂肪间充质干细胞的显著增殖, 达到一种双赢的效果, 为文章后期将VEGF₁₆₅联合脂肪间充质干细胞移植治疗组织缺损奠定了良好的体外实验基础。

致谢: 感谢朱志图教授及辽宁医学院附属第一医院临床生物样本中心对本项研究的大力支持。

作者贡献: 实验设计、资料收集和成文为王钰。实验实施为王钰和陈峻江。实验评估为朱志图。陈峻江审核并对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 所有脂肪供者对实验过程完全知情同意, 在充分了解本研究的前提下签署了“知情同意书”; 实验获得辽宁医学院附属第一医院伦理委员会批准。

学术术语: 血管内皮生长因子促血管生成的重要性? 血管内皮生长因子在血管的再生中发挥重要作用。血管内皮生长因子具有促进血管内皮细胞增殖和迁移、促进血管形成、延长血管内皮细胞寿命、增强血管通透性和改变细胞外基质等作用, 与创伤组织修复愈合、炎症和肿瘤发生密切相关。血管内皮生长因子 165 是其家族中作用性最强的因子, 在脂肪移植中可促进移植物的血运重建, 提高成活率。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Verseijden F, Posthumus-van Sluijs SJ, van Neck JW, et al. Comparing scaffold-free and fibrin-based adipose-derived stromal cell constructs for adipose tissue engineering: an in vitro and in vivo study. *Cell Transplant*. 2012;21(10):2283-2297.
- [2] Gao W, Qiao X, Ma S, et al. Adipose-derived stem cells accelerate neovascularization in ischaemic diabetic skin flap via expression of hypoxia-inducible factor-1 α . *J Cell Mol Med*. 2011;15(12):2575-2585.
- [3] Lin RZ, Moreno-Luna R, Li D, et al. Human endothelial colony-forming cells serve as trophic mediators for mesenchymal stem cell engraftment via paracrine signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(28):10137-10142.
- [4] Kim H, Choi K, Kweon OK, et al. Enhanced wound healing effect of canine adipose-derived mesenchymal stem cells with low-level laser therapy in athymic mice. *J Dermatol Sci*. 2012; 68(3):149-156.
- [5] Paek HJ, Kim C, Williams SK. Adipose stem cell-based regenerative medicine for reversal of diabetic hyperglycemia. *World J Diabetes*. 2014;5(3):235-243.
- [6] Donaldson EE, Ko JM, Kuiper JJ, et al. Fat in the ventricular septum. *Proc Bayl Univ Med Cent*. 2014;27(3):231-232.
- [7] Zografou A, Tsigris C, Papadopoulos O, et al. Improvement of skin-graft survival after autologous transplantation of adipose-derived stem cells in rats. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2011;64(12):1647-1656.
- [8] Lin CY, Chang YH, Sung LY. Long-term tracking of segmental bone healing mediated by genetically engineered adipose-derived stem cells: focuses on bone remodeling and potential side effects. *Tissue Eng Part A*. 2014;20(9-10):1392-1402.
- [9] Bahn JJ, Chung JY, Im W, et al. Suitability of autologous serum for expanding rabbit adipose-derived stem cell populations. *J Vet Sci*. 2012;13(4):413-417.
- [10] Uysal CA, Tobita M, Hyakusoku H, et al. The Effect of Bone-Marrow-Derived Stem Cells and Adipose-Derived Stem Cells on Wound Contraction and Epithelization. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2014;3(6):405-413.
- [11] Shen T, Pan ZG, Zhou X, et al. Accelerated healing of diabetic wound using artificial dermis constructed with adipose stem cells and poly (L-glutamic acid)/chitosan scaffold. *Chin Med J (Engl)*. 2013;126(8):1498-1503.
- [12] Chua KH, Raduan F, Wan Safwani WK, et al. Effects of serum reduction and VEGF supplementation on angiogenic potential of human adipose stromal cells in vitro. *Cell Prolif*. 2013;46(3): 300-311.
- [13] Strassburg S, Nienhueser H, Stark GB, et al. Human adipose-derived stem cells enhance the angiogenic potential of endothelial progenitor cells, but not of human umbilical vein endothelial cells. *Tissue Eng Part A*. 2013;19(1-2):166-1674.
- [14] Ni X, Sun W, Sun S, et al. Therapeutic potential of adipose stem cells in tissue repair of irradiated skeletal muscle in a rabbit model. *Cell Reprogram*. 2014;16(2):140-150.
- [15] Joo HH, Jo HJ, Jung TD, et al. Adipose-derived stem cells on the healing of ischemic colitis: a therapeutic effect by angiogenesis. *Int J Colorectal Dis*. 2012;27(11):1437-1443.
- [16] Nauta A, Seidel C, Deveza L, et al. Adipose-derived stromal cells overexpressing vascular endothelial growth factor accelerate mouse excisional wound healing. *Mol Ther*. 2013; 21(2):445-455.
- [17] Kim KI, Park S, Im GI. Osteogenic differentiation and angiogenesis with cocultured adipose-derived stromal cells and bone marrow stromal cells. *Biomaterials*. 2014;35(17): 4792-4804.
- [18] Cianfarani F, Toietta G, Di Rocco G, et al. Diabetes impairs adipose tissue-derived stem cell function and efficiency in promoting wound healing. *Wound Repair Regen*. 2013; 21(4):545-553.
- [19] Chung E, Nam SY, Ricles LM, et al. Evaluation of gold nanotracers to track adipose-derived stem cells in a PEGylated fibrin gel for dermal tissue engineering applications. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:325-336.
- [20] Ferraro GA, De Francesco F, Nicoletti G, et al. Human adipose CD34+ CD90+ stem cells and collagen scaffold constructs grafted in vivo fabricate loose connective and adipose tissues. *J Cell Biochem*. 2013;114(5):1039-1049.