

# 血管内皮生长因子基因修饰诱导多能干细胞生物学特性的研究

高冠群 方婧 王岩 张卓伯 邵海艳

**【摘要】 目的** 探讨血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)基因修饰诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS)的生物学特性。**方法** 将培养好的 iPS 细胞分为 3 组,即 N0(纯 iPS 培养)组、N1(空腺病毒载体转染 iPS)组、N2(转染 VEGF 基因的 iPS)组;3 组细胞分别进行传代培养,并采用 MTT 方法检测转染 VEGF 基因对细胞增殖的影响;采用酶联免疫(ELISA)方法检测细胞培养上清液中 VEGF 的表达水平。**结果** 转染 VEGF 基因对 iPS 细胞增殖没有明显影响;N2 组 iPS 细胞分泌的 VEGF 蛋白表达水平较 N1 组显著增加( $P < 0.05$ )。**结论** 经 VEGF 基因转染的 iPS 可正常存活生长,并可稳定表达该基因。

**【关键词】** 诱导多能干细胞 血管内皮生长因子 转染 基因表达

**【中图分类号】** R741 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2020)01-0024-05

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1007-0478.2020.01.005

**Biological characteristics of the induced pluripotent stem cells modified by vascular endothelial growth factor gene** Gao Guanqun, Fang Jing, Wang Yan, et al. Department of Neurology, The Fourth affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001

**【Abstract】 Objective** To explore biological characteristics of the induced pluripotent stem cells(iPS) modified by vascular endothelial growth factor(VEGF) gene. **Methods** The cultured iPS cells were divided into three groups: N0(pure iPS culture) group, N1(empty adenovirus vector transfection iPS) group, N2(iPS group transfected with VEGF gene) group. Three groups of cells were subcultured respectively, and MTT method was determined to detect transfection VEGF gene effects on cell proliferation. The enzyme-linked immune (ELISA) method was used to detect the expression level of VEGF in cell culture supernatant on content. **Results** The cell proliferation of the transferred iPS was similar to those of the N0(pure iPS culture) group, N1(empty adenovirus vector transfection iPS)group. The level of VEGF protein in supernatant after VEGF gene transfection was significantly higher than that of the N1(empty adenovirus vector transfection iPS) group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** VEGF gene transfection iPS could grow normally and stably express the gene.

**【Key words】** Induced pluripotent stem cells Vascular endothelial growth factor Transfection Gene expression

诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS)由日本京都大学山中伸弥(Shinya Yamanaka)实验室于 2006 年报道。2006 年 Yamanaka<sup>[1]</sup>利用 4 种逆转录因子(Oct4/Sox2/c-Myc/Klf)通过逆转录病毒诱导小鼠成纤维细胞,产生的 iPS 细胞在形态、基因和蛋白表达、表观遗传修饰状态、细胞增殖能力、类胚体和畸形瘤生成能力、分化能力

等方面都与胚胎干细胞极为相似。2007 年 11 月美国的托马斯(Thompson)实验室和山中伸弥实验室报道,利用 iPS 技术可以诱导人皮肤纤维母细胞转化成为几乎与胚胎干细胞完全一样的多能干细胞<sup>[2]</sup>,但是到目前为止并未有相关研究表明 iPS 具有促血管内皮细胞生长的作用。VEGF 是一种可以促进血管生成的关键细胞因子<sup>[3]</sup>。近年来的研究发现,VEGF 除具有促血管新生(angiogenesis)的作用外,还有直接的神经保护和促神经发生的作用。因此,若采用基因修饰的策略将具有血管发生作用的 VEGF 基因与小鼠 iPS 细胞相结合,可能会使经 VEGF 基因转染的 iPS 持续表达该基因,并使其具

基金项目:黑龙江省教育厅资助项目(编号为 12541539)

作者单位:150001 哈尔滨医科大学附属第四医院神经内科[高冠群(硕士研究生) 方婧 王岩 张卓伯];哈尔滨市第一医院神经内科[邵海艳(硕士研究生,通信作者)]

有 VEGF 的作用。

## 1 材料与方法

1.1 材料 C57 小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)及小鼠 iPS 细胞系均购自上海 SiDanSai 生物公司。胎牛血清、DMEM 溶液(高糖)、PBS 溶液购自 HyClone,  $\beta$ -巯基乙醇购自天津 TBD, 牛血清白蛋白购自 BIOSHARP。

### 1.2 方法

1.2.1 饲养层细胞 MEF 的制备 用适量的明胶均匀全部覆盖 60 mm 皿底部, 置于 37 °C 培养箱至少 20 min, 自培养箱中取出培养皿, 放置在无菌台上轻轻来回推送确保明胶完全覆盖培养皿, 然后将明胶吸弃; 向其加入 5 mL MEF 完全培养基, 并置于 37 °C 培养箱中孵育 10 min; 自液氮中取出冻存的已经失活的 MEF 细胞, 在 1 min 以内迅速 37 °C 水浴解冻; 将饲养层细胞加到之前已经准备好的培养皿上, 其密度为 6 万 cells/cm<sup>2</sup>, 将接种的培养皿盖好皿盖并放置于培养箱中培养; 换液, 在超净工作台用吸引器轻轻吸弃培养皿中的 MEF 细胞培养液, 然后加入约 2 mL PBS 溶液洗涤 1 次, 然后吸弃 PBS 溶液, 为避免将贴壁细胞吹起, 最后用移液枪缓慢地向培养皿中加入 5 mL MEF 培养液, 将培养皿置于 37 °C 培养箱中继续培养。

1.2.2 小鼠 iPS 细胞的培养 首先解冻小鼠 iPS 细胞, 取出液氮中小鼠 iPS 细胞冻存管后立即投入 37 °C 水浴锅中, 并在 1 min 以内迅速解冻, 注意不要使水浴锅中的水没过冻存管的管盖, 当看到冻存管中只含有 1 片小冰晶时迅速取出冻存管; 将解冻后的 iPS 细胞转移到 1 个预装有 2 mL 小鼠 iPS 细胞完全培养液的离心管中混匀, 放入离心机 1000 r/min 离心 5 min; 取出离心管, 弃上清, 并用 2 mL 小鼠 iPS 细胞完全培养液重悬细胞沉淀; 再次以 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 并用 4 mL 的小鼠 iPS 细胞完全培养液重悬细胞沉淀; 将细胞重悬液转移至预铺有饲养层细胞的培养皿中, 在此之前先将培养皿中原来的 MEF 细胞培养液吸弃, 然后以 1 mL 的小鼠 iPS 细胞完全培养液冲洗该培养皿, 最后补加 4 mL 小鼠 iPS 细胞完全培养液. 将该培养皿放入 37 °C 的 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中, 并每天观察细胞的生长情况; 培养的 iPS 细胞每天均需换液, 用吸引器吸弃培养皿中的培养液, 之后以 PBS 溶液清洗 1 次, 吸弃 PBS 溶液, 再用移液管补充 5 mL 新鲜小鼠

iPS 完全培养液, 之后置于培养箱中继续培养。

1.2.3 小鼠 iPS 细胞的传代 将小鼠 iPS 细胞培养至 4~7 d, 将其置于显微镜下观察, 若见培养皿中的 iPS 克隆团体积过大或者克隆团过多时, 需要对其进行传代培养, 在传代之前 2~3 d 需提前准备饲养层 MEF 细胞, 方法同上; 用吸引器吸弃培养皿中旧的小鼠 iPS 细胞培养液, 以 2 mL PBS 溶液冲洗细胞 1 次; 吸弃冲洗后的 PBS 溶液, 立即加入 0.5~1 mL 的 0.25% trypsin-EDTA 溶液, 轻轻来回推送培养皿使之完全覆盖培养皿; 将培养皿放回 37 °C 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中, 计时放置约 5 min; 在细胞消化期间准备用于传代的预铺了饲养层细胞的新培养皿, 处理如下: 吸弃 MEF 细胞培养液, 加入 1 mL PBS 溶液冲洗, 吸弃 PBS 溶液, 然后加入 4~5 mL 新鲜小鼠 iPS 细胞完全培养液, 以备传代; 5 min 后取出培养皿, 轻轻摇晃培养皿, 并置于显微镜下观察细胞, 确定将细胞克隆团完全消化下来后将培养皿中的细胞悬浮液转移至 15 mL 离心管里; 并加入 2 mL 的小鼠 iPS 细胞完全培养液混匀; 用移液器来回吹打细胞混合液, 直至形成单细胞悬浮液; 置于离心机中 1000 r/min 离心 5 min 后弃上清, 并用小鼠 iPS 培养液洗涤 1 次后再次离心, 弃上清; 加入 2 mL 新鲜的小鼠 iPS 细胞培养液使细胞重悬, 并用移液枪吹打数次, iPS 的密度按 1:3 或 1:4 或 1:2 的比例传代至新的饲养层细胞上; 轻轻摇匀培养皿, 置于 37 °C 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 并每天换液, 当 iPS 细胞克隆团过大或过密时再次传代培养, 方法同上。

1.2.4 VEGF 基因转染小鼠 iPS 细胞 按上述细胞传代方法取第 3 代 iPS 细胞, 消化细胞, 接种于 6 孔板, 细胞密度为 5×10<sup>5</sup> 个细胞/孔, 放置于 37 °C 培养箱内培养过夜; 第 2 d 观察细胞状态良好, 细胞密度适中; 将 1 孔细胞消化计数; 以 MOI 值 400 计算所需病毒载体量; 将所需 Ad5-hVEGF-EGFP 腺病毒的体积与纯的培养液混匀, 使终体积为 800  $\mu$ L; 用纯的培养液轻柔地洗 24 孔板的细胞 2 次; 将 Ad5-hVEGF-EGFP 腺病毒与纯培养液的混合液加到相应的细胞孔内; 37 °C, 5%CO<sub>2</sub> 的培养箱培养; 24、48 和 72 h 分别荧光显微镜下观察转染率; 将上述培养方法培养好的细胞分为 3 组, 分别为 N0 组: 纯 iPS 培养组; N1 组: 空腺病毒载体转染 iPS 组; N2 组: 转染 VEGF 基因的 iPS 组。

### 1.2.5 检测指标

1.2.5.1 噻唑蓝(MTT)法检测细胞增殖 分别

取转染后培养 24、48、72 h 的 iPS 按每孔  $1 \times 10^4$  个/mL 接种于 96 孔板,用 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液 37℃,5%CO<sub>2</sub> 孵育,细胞长至 60%~70% 融合后按照前述方法对细胞进行转染,每组设 6 个复孔;转染成功后每个孔加入 20  $\mu$ L 新鲜配制的 MTT 溶液(5 mg/mL),孵育 4 h,吸去培养液,每孔加入 100  $\mu$ L 二甲基亚砷,震荡 10 min 后全自动酶标仪测定 490 nm 处吸光度(A)值,依照公式计算出细胞增殖抑制率:细胞增殖抑制率(%)=(1-实验组 A/对照组 A)×100%。实验重复 3 次,取平均值。

1.2.5.2 ELISA 法检测细胞培养上清液中 VEGF 表达水平 细胞上清液 VEGF 水平测量按照 ELISA 试剂盒上说明进行操作。其试剂盒组成为 VEGF 标准品(2 ng/管)、包被抗人 VEGF 抗体微孔板、25×洗涤缓冲液、显色剂 A、B 各 12.5 mL、辣根过氧化物酶标记的抗 VEGF 单克隆抗体、标准品稀释液 21 mL、分析用稀释液 11 mL、反应终止缓冲液 6 mL。

病毒载体转染细胞后 3 组细胞分别每 2 d 全量换液至 21 d,每次换液留取上清液 200  $\mu$ L, -70℃ 保存。用 ELISA 试剂盒分析细胞培养上清液中 VEGF 水平:实验前 20 min 从冰箱中取出试剂盒,以平衡至室温;取出所需数量的板条,其余密封放回;首先配置标准 VEGF 样品,设 8 个标准孔,其中第 8 孔作为空白对照,向每孔中各加入样品稀释液 100  $\mu$ L,第 1 孔加入 100  $\mu$ L 标准品,混匀后用移液器吸出 100  $\mu$ L 加入至第 2 孔,如此连续等倍稀释至第 7 孔,最后弃去在第 7 孔中吸出的 100  $\mu$ L,使每孔的体积均为 100  $\mu$ L;将 A、B 显色液等体积混合,并避光保存,15 min 后备用;在 VEGF 微孔板中每孔分别加入 50  $\mu$ L 的分析缓冲液,并同时加入 200  $\mu$ L 经过稀释的标准品及样本,用胶纸封好后 37℃ 孵育 2 h;吸去液体后加入洗涤缓冲液冲洗 3 次,然后每孔分别加入 200  $\mu$ L 辣根过氧化物酶标记的 VEGF 抗体,封胶后 37℃ 下孵育 2 h;吸尽液体后再次用洗涤缓冲液冲洗 3 次;在暗处避光条件下在每孔中加入 200  $\mu$ L 显色剂置于 37℃ 反应 5~10 min,每孔加入 50  $\mu$ L 终止液并混匀;最后用酶标仪测定在 450 nm 处吸光度值。

#### 1.2.6 统计学处理

使用 SPSS15.0 统计软件,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间均数比较行方差分析。以  $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 2 结果

### 2.1 MEF 细胞的形态特点

小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)是一种贴壁生长的细胞,经过 3 h 左右即可贴壁,用完全培养基培养 24 h 后可见细胞伸展,大多数呈圆梭形,胞浆透亮丰富,经过 48 h 后细胞进一步伸展,胞体细长,形态规则,均匀铺满整个皿中,可以进行 iPS 细胞接种(图 1)。

### 2.2 小鼠 iPS 细胞的生长特点

接种 iPS 细胞后呈典型的集落样生长,为圆形或者椭圆形的克隆球,边界清晰,随时间增长,细胞克隆球体积逐渐增大,数量增多,球内细胞排列紧密,核仁清晰,高倍镜下观察犹如鸟巢的结构。细胞增殖能力强,生长速度快,一般 4~5 d 传代。

图 2 为 20 倍镜下所示,接种后的第 1 d 可以看到在 MEF 细胞上散在许多已经贴壁生长的细胞团;接种 3 d 后可以看到细胞团已经成为球形克隆,镜下有立体结构感;第 5 d,可以看到克隆球进一步变大,球形结构中间有少量细胞颜色呈褐色,已经铺满培养皿。

### 2.3 转染后的细胞形态及转染率分析

在显微镜下 3 组细胞的形态基本一致,并没有明显差异,而且随着培养时间的逐渐延长,iPS 细胞复制形成多个细胞团,而转染 VEGF 基因后 24 h 在荧光显微镜下观察,见少量 iPS 出现绿色荧光,72 h 后 iPS 细胞团则基本全部显示绿色荧光,同时保持其原有形状,未发现诸如梭形、长条形等异常形态,说明转染效率较高,并且经基因转染的细胞可保持其未分化状态,即无异常分化。

### 2.4 转染 VEGF 基因对 iPS 活性的影响

VEGF 基因转染组、空载体转染组及空白对照组之间 iPS 细胞的增殖活性无显著差异( $P > 0.05$ ),即 VEGF 基因转染 iPS 细胞对维持其未分化状态及其生长无显著影响(表 1)。

### 2.5 细胞上清液中 VEGF 的表达水平

VEGF 基因转染组的表达水平较空载体转染组明显增高( $P < 0.05$ ),随着培养时间的延长,细胞上清液中 VEGF 的表达水平逐渐增高,至 5~7 d 达到高峰,体外培养至第 20 d 细胞上清液中的蛋白分泌水平较之前无明显变化( $P > 0.05$ )(表 2),即经 VEGF 基因转染后的 iPS 可以持续稳定地表达该基因蛋白。

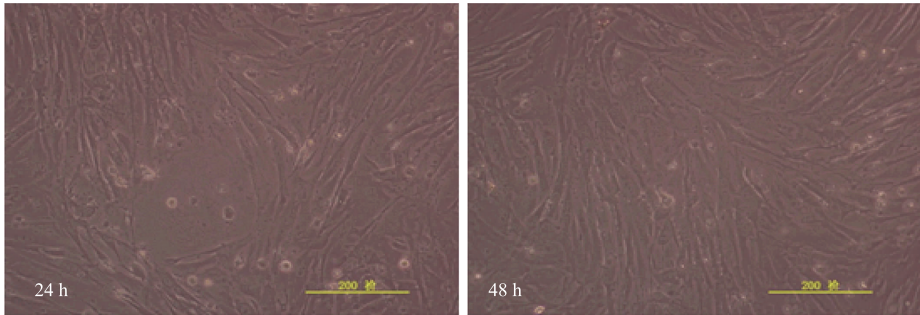


图 1 胚胎成纤维细胞的形态特点

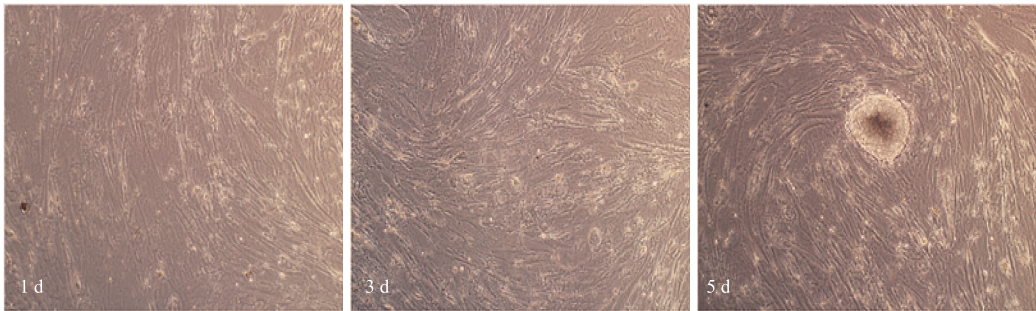


图 2 诱导多能干细胞不同时间的形态特点

表 1 转染 VEGF 基因对 iPS 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )			
培养时间	OD 值		
	VEGF 转染组	空载体转染组	对照组
24 h	0.36 ± 0.042	0.41 ± 0.064	0.37 ± 0.062
48 h	0.58 ± 0.013	0.63 ± 0.014	0.63 ± 0.009
72 h	0.91 ± 0.071	0.89 ± 0.067	0.88 ± 0.047

表 2 细胞上清液中 VEGF 的表达水平 ( $\bar{x} \pm s$ )				
组别	不同时间的 VEGF 表达水平			
	3~4 d	5~7 d	7~14 d	15~21 d
空载体转染组	13.31 ± 0.21	15.27 ± 0.28	14.84 ± 0.15	14.46 ± 0.11
VEGF 基因转染组	66.25 ± 0.32*	120.35 ± 0.55*	118.99 ± 0.4*	119.06 ± 0.3*

注:与空载体转染组比较,\* $P<0.05$

3 讨 论

诱导多能干细胞(iPS)在 2006 年被山中伸弥实验室报道以来,以其与胚胎干细胞及其相似的生物学特性避免了长久以来的伦理争议问题等优点,受到医学界的广泛关注。VEGF 作为一种细胞因子,它能够促使内皮细胞生长、增殖并诱导其与相应的受体结合并表达,还可提高细胞粘附分子的水平,增加内皮细胞表面受体的表达等以促进新生血管形成。近些年的研究显示,其在神经保护及神经再生等方面均发挥着重要的作用,在海马齿状回颗粒下层以及脑室下层区域 VEGF 和 KDR/Flk-1 基因的表达水平较高,表明了细胞增殖很可能是直接受 VEGF 的影响;或者说通过

VEGF 使细胞增殖,进而导致神经祖细胞向相应靶细胞分化,其作用于内皮细胞后可诱导其产生一些神经生长因子如 BDNF 等作用于中枢神经系统,从而刺激神经发生。

为使 iPS 细胞具备 VEGF 的相应生物学特性,本实验以重组腺病毒作为载体,与 VEGF 基因结合后对 iPS 细胞进行转染,并检测不同时间下细胞增殖的情况以及对不同培养时间下 iPS 细胞中的蛋白水平进行检测。如若可行,则基因水平的治疗方法以及干细胞治疗的方法就可以结合使用,但如果经基因修饰后 iPS 表现出细胞增殖抑制或分化异常,就无疑不利于其进一步应用研究。

本实验结果表明 iPS 细胞经 VEGF 基因转染后具有分泌 VEGF 的能力,获得了具有 VEGF 基因的 iPS 细胞,并且其增殖活性未受明显影响,为未来在医学研究甚至是临床治疗上进一步应用 iPS 细胞提供了理论基础和数据支持,为研究 VEGF 基因技术又跨出了重要的一步。

参 考 文 献

[1] Takahashi K,Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. Cell,2006,126(4):663-676.

[2] Yu JY,Vodyanik MA,Smuga-Otto KA,et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells[J]. Science (80- ),2007,318(5858):1917-1920.