

# 与转染 Endostatin 基因的角朊细胞共培养时 内皮细胞增殖特性变化

梁晚益\* 唐辉 张琼 刘旭盛 黄跃生

(第三军医大学附属西南医院烧伤研究所, 重庆 400038)

**摘要** 构建含 Endostatin 基因的腺病毒载体, 将 Endostatin 基因导入培养的角朊细胞, 并采用套皿法共培养角朊细胞与内皮细胞, 测定培养液中 Endostatin 含量、内皮细胞增殖周期各时相比比例、内皮细胞凋亡及细胞抑制率。结果表明转染 Endostatin 基因的角朊细胞可有效表达并分泌 Endostatin, 连续培养 3 天后, 培养液中 Endostatin 含量可达 226 ng/ml; 与转基因角朊细胞共培养的内皮细胞凋亡百分数与抑制率分别为(32.7±7.1)%、(60.5±8.3)%, 均显著高于对照组[(7.3±2.0)%、(13.8±1.6)%], 且 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期比例明显高于对照组, 而 S 期、G<sub>2</sub>/M 期比例及增殖指数显著低于对照组。因此, 转染 Endostatin 基因角朊细胞与内皮细胞共培养时, 角朊细胞可通过分泌 Endostatin 促进内皮细胞凋亡, 并抑制其增殖。

**关键词** Endostatin; 角朊细胞; 内皮细胞; 增殖

瘢痕增生是烧伤临床的常见问题, 也是迄今为止尚未解决的医学难题之一。近年来, 随着细胞生物学和分子生物学的迅猛发展, 瘢痕增生机制研究取得了一些进展。研究表明: 角朊细胞与内皮细胞增殖都是创面愈合的重要条件, 但角朊细胞完全覆盖创面后, 内皮细胞仍过度增殖可能是瘢痕增生的重要原因之一<sup>[1]</sup>。本研究用含 Endostatin 基因的真核表达载体转染角朊细胞, 并将其与内皮细胞共培养, 观察角朊细胞 Endostatin 分泌表达情况及其对内皮细胞增殖的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

DMEM 培养基, 无血清培养基(Keratinocyte-SFM), 胎牛血清, 分散酶购自美国 Gibco BRL 公司, Endostatin 检测试剂盒为 Oncogene 公司产品, 膜联蛋白 V-FITC 凋亡检测试剂盒购自美国 R&D 公司。

### 1.2 质粒构建

按唐辉等<sup>[2]</sup>的方法构建含 Endostatin 基因的腺病毒载体 Ad/hEnd。

### 1.3 细胞分离培养

取流产婴儿皮肤或者小儿包皮, PBS 冲洗, 除去皮下组织, 剪成 2 mm×4 mm 的皮片, 放入 0.25%

分散酶(disypase)中, 4 °C 消化 18~24 h 后, 揭下表皮层, 置于 DMEM (15% 胎牛血清, 青霉素 100 u/ml, 链霉素 100 μg/ml)吹打, 过筛, 离心后以无血清培养基调整细胞悬液密度 3×10<sup>5</sup> 个/ml, 活细胞率 95%, 接种至 25 ml 培养瓶中, 待其生长达 80% 左右汇合时, 收获角朊细胞, 加 Ad/hEnd 病毒使之感染。按姜笃银等<sup>[3]</sup>的方法分离、培养人真皮微血管内皮细胞。按王培勇等<sup>[4]</sup>的方法将 Ad/hEnd 病毒感染的角朊细胞或未转染的角朊细胞(对照)与内皮细胞分别接种于微孔滤膜套皿和 24 孔培养板中共培养, 培养在套皿上的角朊细胞所产生的可溶性物质可自由通过套皿的微孔滤膜, 作用于培养在 24 孔培养板内皮细胞。

### 1.4 指标检测

1.4.1 培养液中 Endostatin 检测 采用 ELISA 法(具体按 Oncogene 公司试剂盒说明书)。

1.4.2 内皮细胞增殖周期各时相比比例检测 收集共培养 3 天后的内皮细胞, 加 70% 冷乙醇固定, RNase A 消化 10 min, 0.25% 碘化丙啶常温避光染色 30 min, 用流式细胞仪进行检测, 每例检测 1×10<sup>4</sup> 个细胞。根据 DNA 染色荧光强度的不同, 将细胞

收稿日期: 2005-04-12 接受日期: 2005-01-11

国家自然科学基金资助项目(No.30100196)

\* 通讯作者。Tel: 023-65426343, E-mail: lwy@mail.tmmu.com.cn

分为  $G_0/G_1$ 、S、 $G_2/M$ ，并计算出各期细胞的百分比及细胞增殖指数(proliferative index, PI),  $PI = (S+G_2/M)/(G_0/G_1+S+G_2/M) \times 100\%$ 。

1.4.3 内皮细胞凋亡检测<sup>[5]</sup> 用膜联蛋白 V-FITC 标记, 流式细胞仪检测。

1.4.4 细胞抑制率测定 采用 MTT 法。在培养瓶中培养内皮细胞, 待其生长达 60% 左右汇合时, 收获内皮细胞, 接种于 96 孔培养板(每孔  $6 \times 10^3$  个细胞), 分别与 Ad/hEnd 病毒感染的角朊细胞和未转染的角朊细胞(对照) 共培养(角朊细胞培养于微孔底膜套皿)。48 h 后向 96 孔培养板中加入 20  $\mu$ l/孔 MTT 溶液, 继续培养 4 h, 各孔加入酸化的异丙醇 100 L, 37  $^{\circ}$ C 温浴 1 h, 取出微孔底膜套皿。将各孔充分混匀并去除气泡后置酶标仪检测 595 nm 的光吸收值, 计算抑制率, 抑制率(%)=(对照组 A 值 - 实验组 A 值)/ 对照组 A 值  $\times 100\%$ 。

## 2 结果

### 2.1 质粒构建

成功构建了含了 Endostatin 基因的腺病毒载体 Ad/hEnd。

### 2.2 细胞分离培养

倒置显微镜下角朊细胞呈梭形, 内皮细胞呈梭形或圆形(图 1, 图 2)。

### 2.3 培养液中 Endostatin 浓度变化

转染角朊细胞可有效表达 Endostatin, 并将其分泌入培养液中, 连续培养 3 天, 培养液中 Endostatin 含量可达 226 ng/ml; 未转染角朊细胞(对照) 培养液未检测出 Endostatin。

### 2.4 内皮细胞增殖周期各时相比例

见表 1。

### 2.5 内皮细胞凋亡检测结果

由于凋亡细胞 DNA 发生降解, 用碘化丙啶(PI) 染色后经流式细胞仪可以检测细胞凋亡峰(图 3), 经换算后可计算出凋亡细胞百分数。结果表明, 与 Ad/hEnd 病毒感染的角朊细胞共培养的内皮细胞凋亡百分数为  $(32.7 \pm 7.1)\%$ , 显著高于对照组  $(7.3 \pm 2.0)\%$ 。

### 2.6 细胞抑制率

结果表明, 与 Ad/hEnd 病毒感染的角朊细胞共

培养的内皮细胞抑制率为  $(60.5 \pm 8.3)\%$ , 显著高于对照组  $(13.8 \pm 1.6)\%$ 。

## 3 讨论

本研究主要是从细胞水平探讨转基因方法防治烧伤后瘢痕增生的可行性。实验先构建含 Endostatin 基因的腺病毒表达载体, 利用该载体将 Endostatin 基因转入角朊细胞, 并将转基因角朊细胞培养于微孔套皿中, 再置微孔套皿于培养皮肤微血管内皮细胞

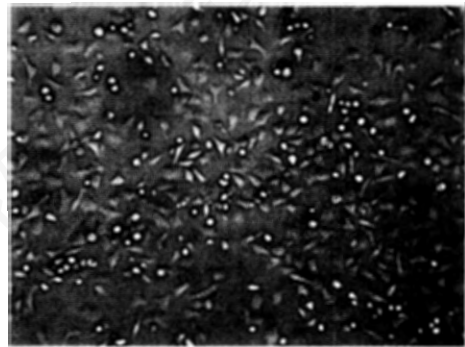


图 1 培养角朊细胞( $\times 40$ )

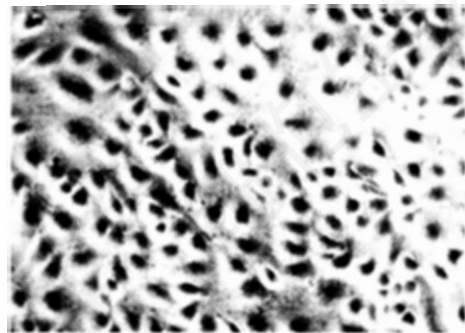


图 2 培养内皮细胞( $\times 100$ )

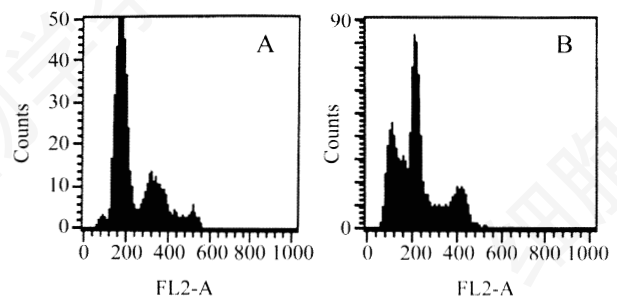


图 3 PI 染色后流式细胞仪检测内皮细胞凋亡

A: 对照组; B: 与 Ad-hEnd 病毒感染的角朊细胞共培养组。

表 1 与转染 Ad/hEnd 的角朊细胞共培养, 内皮细胞增殖周期各时相比例(%,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

	$G_0/G_1$	S	$G_2/M$	PI
与正常角朊细胞共培养的内皮细胞(对照组)	$50.4 \pm 6.2$	$24.6 \pm 2.5$	$25.0 \pm 2.3$	$49.6 \pm 4.2$
与转染 Ad/hEnd 的角朊细胞共培养的内皮细胞	$68.3 \pm 8.5^*$	$16.9 \pm 2.8^\Delta$	$11.8 \pm 1.6^\Delta$	$28.7 \pm 3.1^\Delta$

与对照组相比, \*  $P < 0.01$ ; 与对照组相比,  $\Delta P < 0.01$ 。

的 24 孔培养板内, 模拟创面愈合过程中角朊细胞对皮肤微血管内皮细胞的作用。采用此法可使转基因角朊细胞分泌的 Endostatin 通过微孔作用于与之共培养的皮肤微血管内皮细胞。实验结果表明, 转染 Endostatin 基因的角朊细胞可有效表达并分泌 Endostatin, 连续培养 3 天, 培养液中 Endostatin 含量可达 226 ng/ml。目前研究已知, Endostatin 的重要作用 是抑制血管内皮细胞增殖<sup>[6]</sup>。本实验中, 与 Ad/hEnd 病毒感染的角朊细胞共培养的内皮细胞凋亡百分数与抑制率分别为(32.7±7.1)%、(60.5±8.3)%, 均显著高于对照组[(7.3±2.0)%、(13.8±1.6)%]。同时, 内皮细胞增殖周期各时相比比例检测结果表明, 内皮细胞与 Ad/hEnd 病毒感染角朊细胞共培养后, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期比例明显高于对照组, 而 S 期、G<sub>2</sub>/M 期比例及增殖指数显著低于对照组, 说明 Ad/hEnd 病毒感染角朊细胞与内皮细胞共培养时, 转基因角朊细胞可通过分泌 Endostatin 促进内皮细胞凋亡, 并抑制其增殖。

角朊细胞与内皮细胞增殖都是创面愈合的重要条件。在创面开始愈合之初, 伤口成纤维细胞与内皮细胞等增殖形成肉芽组织填充伤口是创面愈合的前提<sup>[6,7]</sup>。但是炎性细胞和受损内皮细胞释放血管内皮生长因子(VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF), 强烈刺激内皮细胞增殖和迁移形成新的毛细血管。Whitby 等<sup>[8]</sup>报道胎儿伤口因内皮细胞增殖减少, 愈

合后组织血管类型与临近正常组织相似, 且瘢痕少。Mast 等<sup>[9]</sup>进一步指出, 与胎儿相比成人伤口强烈的血管化反应是导致其愈合后瘢痕增生的直接原因。另一方面, 在创面愈合后期, 微血管因内皮细胞的过度增殖而堵塞, 导致瘢痕组织内持续的低氧状态, 刺激成纤维细胞胶原蛋白合成<sup>[10]</sup>。可见, 内皮细胞增殖在瘢痕增生中具有重要作用。

本研究针对内皮细胞过度增殖是瘢痕增生重要原因这一机制, 利用 Endostatin 可抑制血管内皮细胞增殖的原理, 将 Endostatin 基因导入角朊细胞, 采用微孔套皿法将其与内皮细胞共培养研究。结果表明, 转基因角朊细胞可通过分泌 Endostatin 促进内皮细胞凋亡, 并抑制其增殖。由此, 采用大规模角朊细胞培养, 结合基因转染后自体移植技术, 有可能发展为加速严重烧伤患者创面封闭, 抑制愈合后瘢痕形成的有效治疗手段。

#### 参考文献 (References)

- [1] 钱利等. 中国现代医学杂志, 2004, 14: 21
- [2] 唐辉等. 第三军医大学学报, 待发表
- [3] 姜笃银等. 第四军医大学学报, 2000, 21: 1359
- [4] 王培勇等. 生理学报, 1998, 50: 199
- [5] Meintieres S et al. *Mutat Res*, 2004, 560: 101
- [6] Mendoza L et al. *Cancer Res*, 2004, 64: 304
- [7] Berger AC et al. *J Surg Res*, 2000, 91: 26
- [8] Whitby DJ et al. *J Cell Sci*, 1991, 99: 583
- [9] Mast BA et al. *Surg Gynecol Obstet*, 1992, 174: 441
- [10] Zhang Q et al. *J Invest Dermatol*, 2003, 121: 1005

## Effects of Co-cultured with Endostatin Gene Transfected Keratinocytes on Proliferative Characteristics of the Human Dermal Microvascular Endothelial Cells

Wan-Yi Liang\*, Hui Tang, Qiong Zhang, Xu-Sheng Liu, Yue-Sheng Huang

(Institute of Burn Research, Southwest Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract** Constructed a recombinant endostatin adenovirus expression vectors and transformed these vectors into keratinocytes, co-cultured the keratinocytes with human dermal microvascular endothelial cells, then determined the content of endostatin in the supernate, the phase percent of the proliferative cycle, apoptosis and the cell inhibition ratio of the endothelial cells. The endostatin expression by keratinocytes reached 226 ng/ml after 3 days of co-culture. The apoptosis percentage and the cell inhibition ratio of the endothelial cells co-cultured with gene-transfected keratinocytes were significantly higher than those in control group. In addition, the proportion of G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> period was higher than that in control group, while the the proportion of S and G<sub>2</sub>/M period were on the other way round. Therefore, co-cultured gene-transfected keratinocytes could promote apoptosis and inhibit the proliferation of the endothelial cells through excretion of endostatin.

**Key words** endostatin; keratinocyte; endothelium; proliferation

Received: April 12, 2005

Accepted: July 3, 2005

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30100196)

\*Corresponding author. Tel: 86-23-65426343, E-mail: lwy@mail.tmmu.com.cn