

β-神经生长因子基因转染对人脐静脉内皮细胞功能的影响

潘黎明¹, 盛梦婷¹, 黄子瑞¹, 李俊明²

(1. 三峡大学人民医院心血管内科, 2. 三峡大学附属第一人民医院心血管内科, 湖北省宜昌市 443002)

[关键词] 内皮细胞; β-神经生长因子; 基因转染; 细胞增殖; 细胞迁移

[摘要] 目的 研究 β-神经生长因子(β-NGF)基因转染人脐静脉内皮细胞(HUVEC)对细胞增殖、单克隆形成、细胞周期、细胞凋亡、细胞迁移相关功能的影响。方法 将人源 β-NGF 基因重组的真核表达质粒(pEGFP-N1/β-NGF)转染至 HUVEC,同时设置 pEGFP-N1 空载组、正常组(未转染质粒)、酪氨酸激酶受体 A(TrkA)抑制剂组(β-NGF 基因转染组加入 1:1000 的 K252a)。观察转染前后细胞形态学变化,利用 real-time PCR 和 Western blot 检测 β-NGF 基因转染表达效果,MTT 法检测 β-NGF 基因转染对细胞增殖的影响,平板单克隆实验检测 β-NGF 基因转染对细胞单克隆形成能力的变化,流式细胞术检测 β-NGF 基因转染对细胞周期和细胞凋亡率的影响,Transwell 方法检测转染前后细胞迁移能力的变化,Western blot 检测 β-NGF 基因转染前后 TrkA 和血管内皮生长因子(VEGF)的表达变化。结果 β-NGF 基因成功转染 HUVEC 48 h 后能够显著提高 β-NGF mRNA 和蛋白的表达水平($P < 0.05$),同时促进细胞增殖、单克隆形成、细胞迁移能力,并影响细胞周期抑制细胞凋亡率($P < 0.05$)。β-NGF 基因转染 HUVEC 后 TrkA 和 VEGF 表达水平也随之显著上升($P < 0.05$),但受到 TrkA 抑制剂的抑制。结论 β-NGF 基因能够成功转染 HUVEC 并显著表达,进而促进细胞增殖、单克隆形成、细胞迁移能力,并影响细胞周期抑制细胞凋亡率,而其发挥作用与 TrkA 结合诱导 VEGF 表达上调有关。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

Influence of β-NGF Gene Transfection on Cell Functions of Human Umbilical Vein Cells

PAN Li-Ming¹, SHENG Meng-Ting¹, HUANG Zi-Rui¹, and LI Jun-Ming²

(1. Department of Cardiology, People's Hospital, China Three Gorges University, Yichang, Hubei 443002, China; 2. Department of Cardiology, People's Hospital, The First Clinical Medical School of China Three Gorges University, Yichang, Hubei 443002, China)

[KEY WORDS] Endothelial Cells; β-Nerve Growth Factor; Gene Transfection; Cell Proliferation; Cell Migration

[ABSTRACT] Aim To investigate the effect of β-nerve growth factor (β-NGF) gene transfected human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) on cell function related to proliferation, monoclonal formation, cell cycle, apoptosis, migration.

Methods The recombination human β-NGF gene expression eukaryotic plasmid with EGFP (pEGFP-N1) was transfected into HUVEC, HUVEC without transfected plasmid as the normal control group, HUVEC with empty vector (pEGFP-N1) as the negative control group, and-NGF gene transfection with the 1:1000 K252a as the tyrosine receptor kinase A (TrkA) inhibition group. The morphology of HUVEC was detected by the fluorescence microscope after β-NGF gene transfection. The changes of β-NGF mRNA and protein expression were detected by real-time PCR and Western blot after transfection of 48 h with recombination β-NGF expression plasmid. The effects of β-NGF gene trasfection on proliferation, monoclonal formation, cycle, apoptosis, migration of the HUVEC were determined by MTT assay, tablet monoclonal experiments, flow cytometry and transwell experiments, respectively. The expression of TrkA, vascular endothelial growth factor (VEGF) were detected by Western blot after β-NGF gene trasfection on HUVEC. Results The β-NGF gene was successfully transfected into HUVEC. The levels of β-NGF mRNA and protein expression were significantly increased at 48 h after transfection with recombination β-NGF expression plasmid ($P < 0.05$). Compared to the control group, the proliferation, monoclonal formation, migration of HUVEC were promoted after

β -NGF gene transfection, which also affected the cell cycle and apoptosis rate, and showed a statistically significant difference ($P < 0.05$). Meanwhile, the expression of TrkA and VEGF were significantly induced ($P < 0.05$), but were inhibited by TrkA inhibitor. **Conclusions** β -NGF gene could successfully transfect HUVEC and express significantly, promote the ability of cell proliferation, clone formation, migration, affect the cell cycle and inhibit the apoptosis rate, which function was related to combination with TrkA and inducing the expression of VEGF.

神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 是目前最先发现且研究较为清楚的一个神经营养因子, 而 β -NGF 是其中具有生物活性的亚基成分^[1]。近来研究发现 β -NGF 可以在体外作用于血管内皮促进血管新生, 表明其在血管损伤修复中发挥积极作用^[2]。王中京等^[3] 构建 β -NGF 腺病毒转染, 发现其在小鼠内皮祖细胞中具有促分化功能。因此, 利用分子生物学方法使外源性 β -NGF 在血管内皮相关细胞中大量表达, 将有利于研究其对内皮细胞功能的影响, 从而揭示 β -NGF 在血管损伤修复中的作用及机制^[4]。本研究将人 NGF 的生物活性部分 β -NGF 通过真核表达质粒重组转染到人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 中, 并检测 β -NGF 转染前后的表达情况, 进而观察 β -NGF 基因转染对细胞增殖、单克隆形成、细胞周期、细胞凋亡、细胞迁移等细胞功能的影响及其作用机制, 为 β -NGF 在血管损伤修复中的应用及研究提供新的方向和思路。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂

HUVEC 和 pEGFP-N1 质粒由第三军医大学基础医学部生物化学教研室提供; 本实验室成功构建人 β -NGF 重组表达质粒 pEGFP-N1/ β -NGF。RPMI1640 培养基、EDTA 胰酶购自美国 Hyclone 公司; 胎牛血清购自美国 Gibco 公司; LipofectamineTM2000 购自上海 Invitrogen 公司; 酪氨酸激酶受体 A (tyrosine receptor kinase A, TrkA) 抑制剂 K252a 购自美国 R&D 公司; real-time PCR 试剂盒购自大连 TaKaRa 公司; Transwell Permeable Supports 购自美国 Corning 公司; 蛋白提取试剂盒、MTT 试剂、各种引物购自上海生工公司; 红色荧光素罗丹明标记 β -NGF 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; Annexin-V/PI 细胞凋亡检测试剂盒、细胞周期检测试剂盒购自北京鼎国生物技术公司; 兔抗人 β -NGF、TrkA、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、肌动蛋白 (β -actin) 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司; HRP 标记山羊抗兔二抗购自北京中山金桥公司。

1.2 β -NGF 基因转染 HUVEC

参照文献[5] 将人 β -NGF 基因片段 (Genbank: NM_002506) 连接到 pEGFP-N1 载体上, 成功构建人 β -NGF 重组表达质粒 pEGFP-N1/ β -NGF, 经 PCR 测序鉴定正确后将其转染 HUVEC。复苏的 HUVEC 用 RPMI1640 培养基培养, 待生长状态良好后将其接种于 24 孔板中, 24 h 后, 细胞生长至 80% ~ 90% 时进行 β -NGF 基因转染实验, 即先用 50 μ L Opti-MEM 稀释混匀 1 μ g 重组质粒, 再用 50 μ L Opti-MEM 将 2 μ L LipofectamineTM2000 稀释并混匀, 分别在室温中孵育 5 min 后将其混合, 室温再孵育 20 min, 均匀加入到细胞培养板中, 共培养 6 h 后吸去原培养基换新完全培养基培养。同时设置阴性对照组: 转染 pEGFP-N1 空载质粒及不进行质粒转染 (正常组)。

1.3 β -NGF 基因转染 HUVEC 后细胞形态变化及其表达检测

在 pEGFP-N1/ β -NGF 质粒转染 48 h 后, 在倒置荧光显微镜下观察各组细胞形态和绿色荧光表达情况, 并在 β -NGF 基因转染组中制备细胞爬片, 4% 甲醛固定后, 孵育红色荧光素罗丹明标记的 β -NGF 抗体, 利用免疫荧光检测 β -NGF 在转染细胞中的表达。同时消化收集细胞, 加入适量 RNAiso Plus 提取液匀浆提取细胞总 RNA, 反转录合成 cDNA。根据 β -NGF 和内参 β -actin 基因序列设计引物, β -NGF 上游为 5'-CAA GGG CAA GGA GGT GAT-3', 下游为 5'-GTG AGT CGT GGT ACA ATA TGA G-3'; β -actin 上游为 5'-CTG GGA CGA CAT GGA GAA AA-3', 下游为 5'-AAG GAA GGC TGG AAG AGT GC-3'。利用 Bio-Rad 公司的 IQ5TM real-time PCR 系统进行实时荧光 PCR 检测 pEGFP-N1/ β -NGF 质粒转染前后各组细胞中 β -NGF 基因的表达情况。另外利用蛋白提取试剂盒提取各组细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。各组上样 30 μ g 总蛋白进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳 1.5 h 后, 半干转 PVDF 膜, 封闭, 分别孵育 β -NGF 和 β -actin 一抗 (1: 1000), 4 $^{\circ}$ C 过夜, TBST 洗涤 3 次后, HRP 标记二抗 (1: 5000) 孵育 2 h, ECL 显影, 曝光拍照。用 Quantity One 软件分析各组 β -NGF 条带相对吸光度值, 并用内参 β -actin 进行校正。

1.4 MTT 检测细胞增殖

分别收集 β -NGF 基因转染 HUVEC 前后的各组细胞,设置正常组、EGFP 空载组、 β -NGF 基因转染组、TrkA 抑制剂组(在 β -NGF 基因转染组中加入 1:1000 的 K252a)(分组下同)。利用各组培养基稀释细胞浓度为 10^7 Cells/L,分别种植于 96 孔板,每孔加入 200 μ L。放置于 CO_2 培养箱中分别培养至 12 h、24 h 后,每孔中加入 20 μ L MTT 溶液(浓度为 5 g/L), 37°C 培养箱中继续培养 4 h,吸弃培养基,每孔加入二甲基亚砷 150 μ L,振荡 10 min 后,置于酶标仪测定 492 nm 处各孔的吸光度值。每组设置 5 个重复孔,各进行 3 个重复实验。

1.5 平板单克隆形成实验

取各组处于对数生长期的细胞,消化后收集并用培养基重悬成单细胞悬液。在细胞培养皿中分别加入含 200 个细胞的单细胞悬液,置于 37°C 、5% CO_2 饱和培养箱中培养至可以直接看到细胞团为止,弃培养基,PBS 洗涤 3 次,4% 多聚甲醛固定 30 min,分别加入 1 mL 结晶紫染色 30 min,PBS 洗涤。在显微镜下拍照计数,各组单克隆形成率 = 各组单克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

1.6 流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡

将各组细胞进行同步化后接种于 6 孔板中,每孔为 5×10^7 Cells/L,置于 37°C 、5% CO_2 细胞培养箱中培养 24 h。各组细胞消化离心后收集,弃上清,并用 70% 预冷乙醇在 4°C 固定 12 h 以上后,离心弃上清并洗去乙醇,用 500 μ L PBS 重悬细胞加入 PI 和 RNaseA (50 mg/L) 孵育后室温避光,经流式细胞仪检测各组细胞周期,并计算各组细胞周期细胞百分比。同时收集各组细胞,分别加入 5 μ L FITC 标记的 Annexin-V 及 10 μ L PI 细胞凋亡检测试剂,经 BD FACS Canto TMII 六色流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

1.7 细胞迁移能力的检测

用 0.25% 含 EDTA 的胰酶分别消化各组细胞,

用含血清的完全培养基调整细胞浓度为 5×10^8 Cells/L。往 Transwell 板的培养孔上室中分别加入各组细胞悬液 200 μ L,下室中加入 500 μ L 含 10 $\mu\text{g/L}$ VEGF 的 1640 完全培养基。在 CO_2 培养箱中继续培养 24 h 后,用 PBS 清洗两遍,在室温下用 4% 多聚甲醛固定小室 30 min,再用 0.1 mg/L 结晶紫染色上室小皿 30 min,用 PBS 洗涤 3 遍。用棉签轻轻擦去上室的贴壁细胞,在显微镜下拍照并计数从 Transwell 上室迁移至微孔膜下层的细胞。

1.8 Western blot 检测 TrkA 和 VEGF 表达

收集各组细胞,PBS 洗涤后利用蛋白提取试剂盒提取各组细胞的总蛋白。BCA 法测定蛋白浓度。上样等量的 30 μg 总蛋白,12% SDS-PAGE 凝胶电泳 1.5 h,转膜,封闭后,分别孵育 TrkA、VEGF 一抗(1:1000)及 α -actin 抗体(1:1000), 4°C 过夜,TBST 洗涤后二抗(1:5000)孵育 2 h,ECL 显影,曝光拍照。用 Quantity One 软件分析目的条带相对吸光度值,并用内参 β -actin 进行校正。

1.9 统计学分析

所有数据使用 SPSS 13.0 软件进行分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。不同组间比较采用 One-way ANOVA 单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 β -NGF 基因转染 HUVEC 后细胞形态变化

HUVEC 未转染质粒时,细胞呈梭形且不发荧光。在空载 pEGFP-N1 质粒和 pEGFP-N1/ β -NGF 质粒转染 HUVEC 48 h 后,大部分细胞变圆且发出绿色荧光,说明 HUVEC 有 EGFP 表达,重组质粒转染成功,且转染成功率达 80% 以上。免疫荧光检测发现,可见红色荧光,有 β -NGF 表达(图 1)。

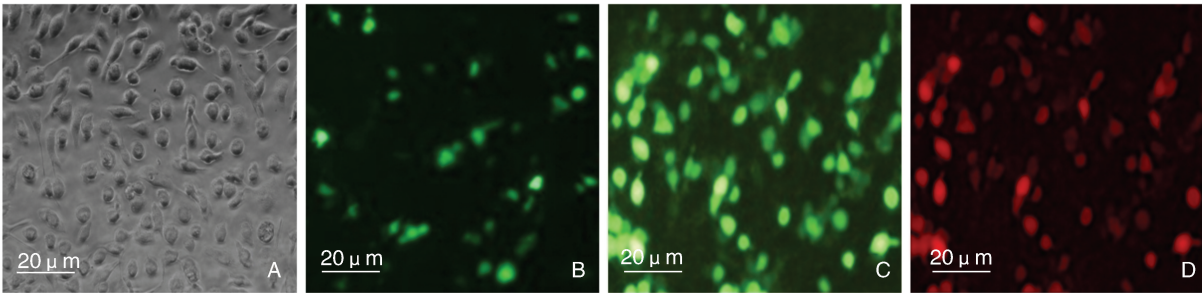


图 1. β -NGF 基因转染 HUVEC 后细胞形态及荧光变化 A 为正常组,B 为 EGFP 空载组,C 为 β -NGF 基因转染组,D 为 β -NGF 免疫荧光表达。

Figure 1. The changes of morphology and fluorescence in HUVEC transfected with β -NGF

2.2 β-NGF 基因转染 HUVEC 后的表达

real-time PCR 检测发现,β-NGF 基因转染 HUVEC 48 h 后,β-NGF mRNA 的表达水平显著提高。与正常组和 EGFP 空载组相比,β-NGF 基因转染组 mRNA 相对表达量上升约 20 倍($P < 0.05$)。Western blot 检测发现,β-NGF 基因转染 HUVEC 48 h 后,β-NGF 的蛋白表达量约提高 7 倍($P < 0.05$)。说明 β-NGF 基因成功转染到 HUVEC 中,并得到大量表达(表 1 和图 2)。

2.3 β-NGF 基因转染 HUVEC 对细胞增殖能力的影响

与正常组和 EGFP 空载组相比,24 h、48 h 时 β-NGF 基因转染组细胞的吸光度值显著上升($P < 0.05$),而 TrkA 抑制剂组细胞吸光度值显著降低($P < 0.05$),说明 TrkA 抑制剂抑制了 β-NGF 对 HUVEC 的增殖作用(表 2)。

2.4 β-NGF 基因转染 HUVEC 对细胞单克隆形成能力的影响

与正常组和 EGFP 空载组相比,β-NGF 基因转染组细胞单克隆形成率显著增加($P < 0.05$),但 Tr-

kA 抑制剂组细胞单克隆数形成率显著低于 β-NGF 基因转染组($P < 0.05$;表 2 和图 3)。

表 1. β-NGF 基因转染 HUVEC 后基因和蛋白的表达情况($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1. The expression of protein and gene in HUVEC after transfected with β-NGF($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分 组	β-NGF mRNA	β-NGF 蛋白
正常组	1.05 ± 0.04	0.26 ± 0.03
EGFP 空载组	1.64 ± 1.05	0.21 ± 0.06
β-NGF 基因转染组	32.10 ± 1.75 ^a	1.82 ± 0.13 ^a

a 为 $P < 0.05$,与正常组和 EGFP 空载组比较。

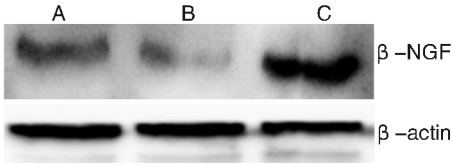


图 2. Western blot 检测 β-NGF 蛋白表达 A 为正常组,B 为 EGFP 空载组,C 为 β-NGF 基因转染组。

Figure 2. The expression of β-NGF protein were detected by Western blot

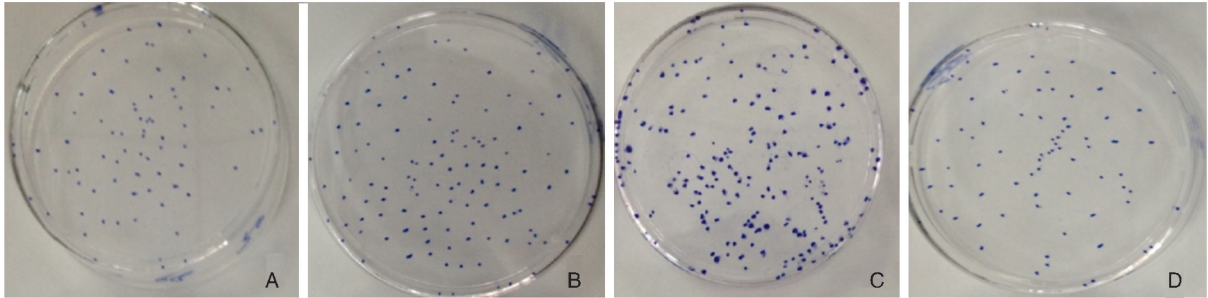


图 3. 平板实验检测细胞单克隆形成 A 为正常组,B 为 EGFP 空载组,C 为 β-NGF 基因转染组,D 为 TrkA 抑制剂组。

Figure 3. The monoclonal formation of HUVEC

表 2. β-NGF 基因转染 HUVEC 对细胞增殖和单克隆形成率的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2. The effect of cell proliferation and monoclonal formation in HUVEC transfected with β-NGF gene($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分 组	24 h 吸光度值	48h 吸光度值	单克隆形成率
正常组	0.38 ± 0.03	0.45 ± 0.02	31.00% ± 2.94%
EGFP 空载组	0.41 ± 0.02	0.47 ± 0.02	34.67% ± 2.49%
β-NGF 基因转染组	0.52 ± 0.03 ^a	0.68 ± 0.01 ^a	61.67% ± 3.86% ^a
TrkA 抑制剂组	0.35 ± 0.02 ^b	0.32 ± 0.02 ^b	32.33% ± 2.25% ^b

a 为 $P < 0.05$,与正常对照组和 EGFP 空载组比较;b 为 $P < 0.05$,与 β-NGF 基因转染组比较。

2.5 β-NGF 基因转染 HUVEC 对细胞周期的影响

与正常组和 EGFP 空载组相比,β-NGF 基因转染组 G0/G1 期细胞百分率显著降低($P < 0.05$),而

S 期和 G2/M 期细胞百分率则显著上升($P < 0.05$),TrkA 抑制剂组细胞周期变化不明显(表 3 和图 4)。

表 3. β-NGF 基因转染 HUVEC 后细胞周期的变化($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3. The cell cycle changes of HUVEC transfected with β-NGF($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分 组	G0/G1(%)	S(%)	G2/M(%)
正常组	76.53 ± 7.28	17.30 ± 8.57	9.89 ± 2.45
EGFP 空载组	74.45 ± 8.25	19.20 ± 6.33	4.56 ± 2.13
β-NGF 基因转染组	52.63 ± 6.80 ^a	29.55 ± 5.87 ^a	16.78 ± 5.54 ^a
TrkA 抑制剂组	68.83 ± 5.57 ^b	20.80 ± 5.78 ^b	6.33 ± 1.89 ^b

a 为 $P < 0.05$,与正常组和 EGFP 空载组比较;b 为 $P < 0.05$,与 β-NGF 基因转染组比较。

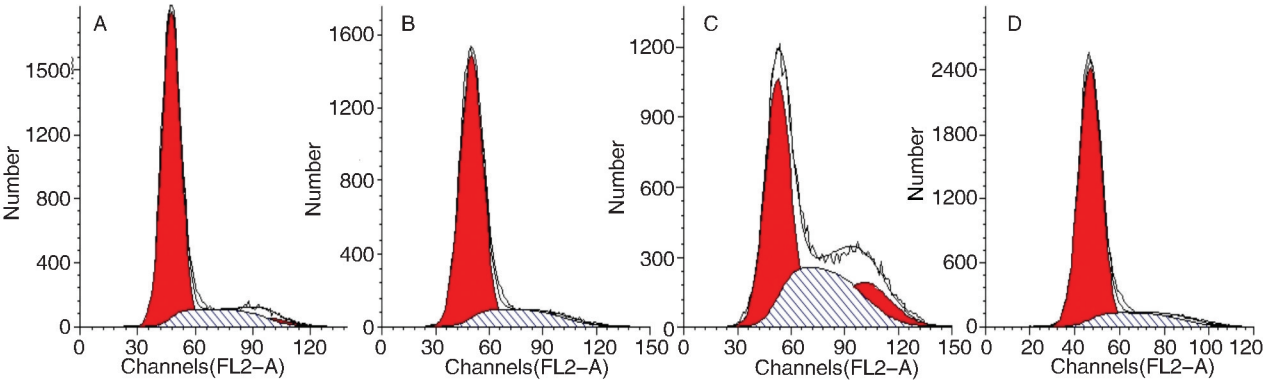


图 4. 流式细胞术检测细胞周期变化 A 为正常组,B 为 EGFP 空载组,C 为 β -NGF 基因转染组,D 为 TrkA 抑制剂组。

Figure 4. The cell cycle changes of HUVEC were detected by flow cytometry

2.6 β -NGF 基因转染 HUVEC 对细胞凋亡率的影响

与正常组和 EGFP 空载组相比, β -NGF 基因转染组细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$)。而 TrkA 抑制剂组细胞凋亡率显著高于 β -NGF 基因转染组 ($P < 0.05$;表 4 和图 5)。

2.7 β -NGF 基因转染 HUVEC 对细胞迁移能力的影响

正常组和 EGFP 空载组细胞迁移数目均较少,

β -NGF 基因转染组细胞迁移数目显著增加 ($P < 0.05$),而 TrkA 抑制剂组细胞迁移数显著低于 β -NGF 基因转染组 ($P < 0.05$;表 4 和图 6)。

2.8 β -NGF 基因转染 HUVEC 对细胞 TrkA 和 VEGF 表达的影响

与正常组和 EGFP 空载组相比, β -NGF 基因转染组 TrkA 和 VEGF 相对表达量显著升高 ($P < 0.05$),而 TrkA 抑制剂组 TrkA 和 VEGF 相对表达量低于 β -NGF 基因转染组 ($P < 0.05$;表 5 和图 7)。

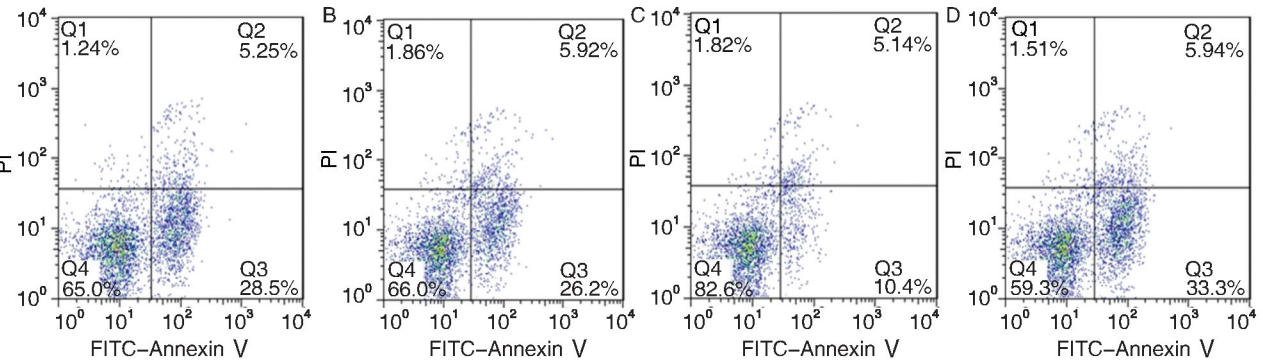


图 5. 流式细胞术检测细胞凋亡 A 为正常组,B 为 EGFP 空载组,C 为 β -NGF 基因转染组,D 为 TrkA 抑制剂组。

Figure 5. The apoptosis of HUVEC were detected by flow cytometry

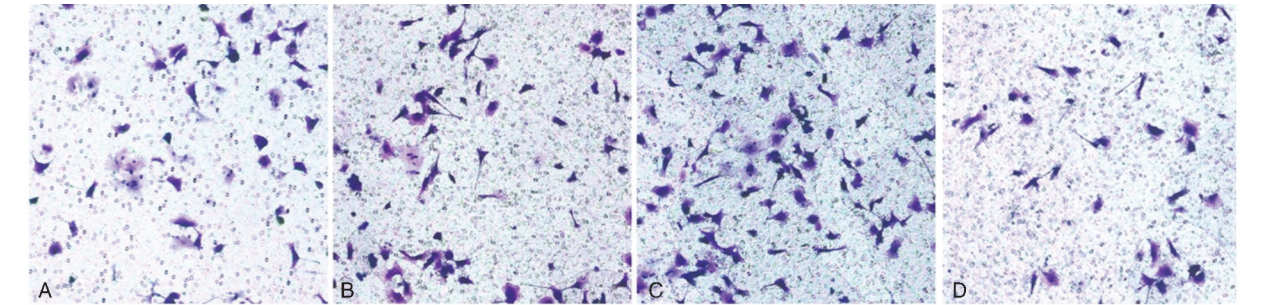


图 6. Transwell 方法检测细胞迁移 A 为正常组,B 为 EGFP 空载组,C 为 β -NGF 基因转染组,D 为 TrkA 抑制剂组。

Figure 6. The effect of cell migration in HUVEC were detected by Transwell

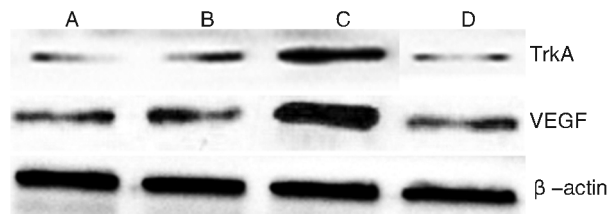


图 7. Western blot 检测细胞 TrkA 和 VEGF 的表达 A 为正常组,B 为 EGFP 空载组,C 为 β -NGF 基因转染组,D 为 TrkA 抑制剂组。

Figure 7. The TrkA and VEGF protein expression of HUVEC were detected by Western blot

表 4. β -NGF 基因转染 HUVEC 对细胞凋亡率和细胞迁移的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4. The effect of apoptosis rate and cell migration in HUVEC transfected with β -NGF($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分 组	细胞凋亡率	细胞迁移数
正常组	27.15% \pm 1.48%	40.33 \pm 6.65
EGFP 空载组	25.81% \pm 1.26%	51.67 \pm 4.16
β -NGF 基因转染组	10.18% \pm 1.16% ^a	98.33 \pm 5.68 ^a
TrkA 抑制剂组	33.94% \pm 1.45% ^b	28.05 \pm 2.56 ^b

a 为 $P < 0.05$,与正常组和 EGFP 空载组比较;b 为 $P < 0.05$,与 β -NGF 基因转染组比较。

表 5. β -NGF 基因转染 HUVEC 对细胞 TrkA 和 VEGF 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5. The TrkA and VEGF protein expression of HUVEC transfected with β -NGF($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分 组	TrkA 蛋白	VEGF 蛋白
正常组	0.19 \pm 0.02	0.37 \pm 0.03
EGFP 空载组	0.19 \pm 0.03	0.43 \pm 0.04
β -NGF 基因转染组	0.82 \pm 0.06 ^a	1.38 \pm 0.06 ^a
TrkA 抑制剂组	0.16 \pm 0.02 ^b	0.30 \pm 0.02 ^b

a 为 $P < 0.05$,与正常组和 EGFP 空载组比较;b 为 $P < 0.05$,与 β -NGF 基因转染组比较。

3 讨 论

血管内皮细胞在血管损伤后的修复、抑制血栓形成、抑制平滑肌病理增殖及分泌各种血管活性因子中都有极其重要的作用。而在生物体内血管与神经常常是相伴而行,它们具有相同的迁移路线,提示构成血管的细胞生理活动和功能也受神经的调节^[6,7]。 β -NGF 作为神经生长因子中具有生物活性的亚基成分,是神经营养因子中最具有代表性的多功能因子之一,在组织炎症反应、伤口愈合及损伤组织的再生和功能修复等非神经细胞生物学效

应中均能发挥重要作用^[8]。齐岩梅等^[9]研究发现,NGF 可以作用于血管内皮直接促进血管新生,但是其具体在血管损伤修复中的作用及其对血管构成细胞功能的作用研究尚少。因此,本研究中将成功构建的人 β -NGF 重组真核表达质粒 pEGFP-N1/ β -NGF 转染至 HUVEC,进而观察 β -NGF 在 HUVEC 中的表达情况及其对细胞增殖、单克隆形成能力、细胞周期、细胞凋亡率及细胞迁移能力等细胞功能的影响,为进一步研究 NGF 在血管生成和功能中的作用提供新方法及依据。

β -NGF 基因通过真核质粒转染到 HUVEC 中后通过免疫荧光能够观察到其有效表达,同时 real-time PCR 和 Western blot 检测到 β -NGF mRNA 及蛋白均显著表达,说明通过基因转染的方法能够使 β -NGF 基因在 HUVEC 中大量表达。利用 MTT 实验和细胞单克隆形成实验检测发现 β -NGF 基因转染可以显著促进细胞增殖及单克隆形成能力,说明 β -NGF 基因转染可以提升细胞活力,与 Kim 等^[10]研究 NGF 在视网膜血管细胞中作用结果一致。利用流式细胞术检测 β -NGF 基因转染对细胞周期的变化,发现其可以显著促进细胞由 G0/G1 期进入 S 期及 G2/M 期,说明 β -NGF 基因转染后的表达能够增加细胞的 DNA 合成、促进有丝分裂进而促进细胞增殖。同时流式细胞术检测 β -NGF 基因转染对细胞凋亡的影响,发现 β -NGF 基因转染表达显著抑制细胞凋亡率,验证了 Kishi 等^[11]关于 NGF 作为旁分泌因子或自分泌因子可增加细胞存活,降低凋亡率的结论。Transwell 实验同样检测到 β -NGF 基因转染组内皮细胞迁移能力大大增强,进一步说明 β -NGF 基因转染能够促进 HUVEC 的细胞功能。王中京等^[3]将 β -NGF 基因转染到大鼠内皮祖细胞,发现 β -NGF 基因能够促进内皮祖细胞分化,提示 β -NGF 在血管损伤修复中有积极作用。Zeng 等^[12]利用 β -NGF 在体外构建 NGF 修饰的组织工程血管,可以提高血管的通畅率。本文构建的重组 pEGFP-N1/ β -NGF 质粒能够转染 HUVEC 并大量表达,从而促进细胞增殖、单克隆形成、细胞迁移,缩短细胞周期并降低细胞凋亡率,说明 β -NGF 基因转染能够提升细胞功能,可应用于血管损伤修复和构建新型组织工程血管。

TrkA 是 NGF 的特异性高亲和力受体,被认为可以介导 NGF 的信号转导^[13]。研究表明 NGF 能够结合 TrkA 导致细胞内的信号转导,从而引起一系列酶反应导致神经细胞的增殖和存活^[14]。而 K252a 作为 TrkA 受体抑制剂,可以抑制 NGF 与 TrkA 结

合,影响 TrkA 信号通路的作用^[15]。本研究中当 TrkA 抑制剂 K252a 同时加入到 β -NGF 基因转染组中时发现细胞增殖、单克隆形成、细胞迁移能力都受抑制,细胞凋亡率和细胞周期变化也不大,说明 TrkA 抑制剂影响了 β -NGF 基因转染发挥的作用,而 β -NGF 基因转染影响细胞功能与 TrkA 信号通路有关。随着 β -NGF 转染至 HUVEC 后,细胞中 TrkA 表达显著增加,进一步表明 β -NGF 可以通过与 TrkA 受体结合进而激活 TrkA 受体通路,发挥促进血管内皮细胞增殖和迁移的作用,与国外 Park 等^[16]的研究具有一致性。VEGF 作为内皮特异性分裂原,可以直接促进内皮细胞的分裂、增殖、迁移等细胞功能,进而促进血管损伤修复和新生^[17]。同时有研究表明当抑制血管 VEGF 表达或发挥作用时血管相关内皮细胞凋亡会显著增加,而促进 VEGF 表达利于内皮细胞的存活率,说明 VEGF 能够发挥抑制内皮细胞凋亡的作用^[18]。但王雯霞等^[19]研究关于 β -NGF 促进血管新生的作用是直接作用还是通过 VEGF 分泌的间接作用仍存在争议。本研究中,Western blot 检测发现 β -NGF 基因转染后 HUVEC 中 TrkA 表达显著上升,而 VEGF 表达也随之显著增加并受到 TrkA 抑制剂的抑制作用,说明 β -NGF 基因转染影响细胞增殖、单克隆形成、细胞周期、细胞凋亡及细胞迁移等功能可能通过 β -NGF 与 TrkA 结合进而诱导 VEGF 表达发挥作用。

综上所述,本研究将构建 pEGFP-N1/ β -NGF 表达质粒转染 HUVEC,发现其能显著诱导细胞增殖、单克隆形成及细胞迁移功能并影响细胞凋亡和细胞周期,并通过结合 TrkA 诱导 VEGF 的表达来发挥作用。 β -NGF 基因转染为血管损伤修复研究和构建新型组织工程血管提供了新的思路和方向,但其具体的分子机制仍需要进一步研究。

[参考文献]

[1] 王向鹏,杨智勇,王廷华,等. 神经生长因子和脑源性神经营
养因子在脑胶质瘤内的表达[J]. 国际神经病学神经外科学杂
志, 2006, 33 (2): 99-102.

[2] Lazarovici P, Marcinkiewicz C, Lelkes P I. Cross talk between the
cardiovascular and nervous systems; neurotrophic effects of vascular
endothelial growth factor (VEGF) and angiogenic effects of nerve
growth factor (NGF)-implications in drug development[J]. Curr
Pharm Design, 2006, 12 (21): 2 609-622.

[3] 王中京,赵 湜,丁 胜,等. β -神经生长因子转染的大鼠内皮祖
细胞分化功能的变化[J]. 中国糖尿病杂志, 2013, 21 (9):
841-844.

[4] Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering-current challenges and

expanding opportunities [J]. Science, 2002, 295 (5557): 1
009-014.

[5] 李甫强,王廷华,董 坚,等. 人 β -神经生长因子基因真核细胞
表达载体的构建与鉴定[J]. 四川解剖学杂志, 2005, 13 (1):
2-5.

[6] Nowacka MM, Obuchowicz E. Vascular endothelial growth factor
(VEGF) and its role in the central nervous system; a new element
in the neurotrophic hypothesis of antidepressant drug action[J].
Neuropeptides, 2012, 46 (1): 1-10.

[7] 范书霞,韩战营,邱春光. 血管外膜原位干/祖细胞研究现状及
进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21 (8): 758-762.

[8] Jadhao CS, Bhatwadekar AD, Jiang Y, et al. Nerve growth factor
promotes endothelial progenitor cell-mediated angiogenic responses
[J]. Invest Ophth Vis Sci, 2012, 53 (4): 2 030-037.

[9] 齐岩梅,韩雅玲,康 建,等. 神经生长因子对体外培养的小鼠
主动脉环血管新生的影响及 TrkA 的关键作用[J]. 心脏杂志,
2009, 21 (1): 33-37.

[10] Kim YS, Jo DH, Lee H, et al. Nerve growth factor-mediated vas-
cular endothelial growth factor expression of astrocyte in retinal vas-
cular development[J]. Biochem Bioph Res Co, 2013, 431 (4):
740-745.

[11] Kishi S, Shimoke K, Nakatani Y, et al. Nerve growth factor atten-
uates 2-deoxy-d-glucose-triggered endoplasmic reticulum stress-me-
diated apoptosis via enhanced expression of GRP78[J]. Neurosci
Res, 2010, 66 (1): 14-21.

[12] Zeng W, Yuan W, Li L, et al. The promotion of endothelial pro-
genitor cells recruitment by nerve growth factors in tissue-engi-
neered blood vessels [J]. Biomaterials, 2010, 31 (7): 1
636-645.

[13] Harrington AW, St Hillaire C, Zweifel LS, et al. Recruitment of
actin modifiers to TrkA endosomes governs retrograde NGF signal-
ing and survival[J]. Cell, 2011, 146 (3): 421-434.

[14] Kishibe K, Yamada Y, Ogawa K. Production of nerve growth fac-
tor by mouse hepatocellular carcinoma cells and expression of TrkA
in tumor-associated arteries in mice[J]. Gastroenterology, 2002,
122 (7): 1 978-986.

[15] Perez-Pinera P, Hernandez T, Garcia-Suarez O, et al. The Trk
tyrosine kinase inhibitor K252a regulates growth of lung adenocarci-
nomas[J]. Mol Cell Biochem, 2007, 295 (1-2): 19-26.

[16] Park HJ, Kim MN, Kim JG, et al. Up-regulation of VEGF expres-
sion by NGF that enhances reparative angiogenesis during thymic
regeneration in adult rat [J]. BBA-Mol Cell Res, 2007, 1773
(9): 1 462-472.

[17] Eichmann A, Simons M. VEGF signaling inside vascular endothe-
lial cells and beyond[J]. Curr Opin Cell Biol, 2012, 24 (2):
188-193.

[18] Franco M, Roswall P, Cortez E, et al. Pericytes promote endothe-
lial cell survival through induction of autocrine VEGF-A signaling
and Bcl-w expression[J]. Blood, 2011, 118 (10): 2 906-917.

[19] 王雯霞,胡新央,谢小洁,等. 神经生长因子促进骨髓间充质
干细胞血管新生能力[J]. 上海医学, 2011, 34 (1): 58-61.

(此文编辑 文玉珊)