

慢病毒 Hoxa3 载体的构建及其对人脐静脉内皮细胞迁移和血管新生的影响

毕雪飞, 陶贵周, 黄建华

(锦州医科大学附属第一医院心内科, 辽宁省锦州市 121000)

[关键词] 慢病毒载体; Hoxa3; 人脐静脉内皮细胞; 细胞迁移; 血管新生

[摘要] **目的** 构建慢病毒 Hoxa3 载体, 观察其对入脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 的转染效率, 研究其对细胞迁移和血管新生的影响, 并探讨 Hoxa3 促进血管新生的机制。 **方法** 以基因合成法从聚合酶链式反应文库获取人 Hoxa3 基因, 酶切后插入慢病毒骨架载体, 以三质粒联合转染 293T 细胞获得慢病毒 Hoxa3 载体, 并进行滴度测定。转染 HUVEC, 获取最大转染效率。转染 HUVEC 后分对照组和慢病毒 Hoxa3 转染组, 进行 HUVEC 迁移实验和小管形成实验, 观察 Hoxa3 对 HUVEC 迁移和小管形成的影响。Western blot 检测慢病毒 Hoxa3 载体转染 HUVEC 后尿激酶型纤溶酶原激活物受体 (uPAR) 和基质金属蛋白酶 14 (MMP-14) 蛋白表达的变化。 **结果** 成功构建慢病毒 Hoxa3 载体, 病毒的滴度为 8×10^{11} TU/L; 30 MOI 慢病毒载体对 HUVEC 的转染效率达到 99% 以上。Western blot 结果显示慢病毒 Hoxa3 载体转染 HUVEC 后 Hoxa3 能够有效在 HUVEC 中表达。与对照组比较, 慢病毒 Hoxa3 载体转染 HUVEC 后显著增强 HUVEC 的迁移和小管形成, 显著增加 uPAR 和 MMP-14 蛋白的表达 ($P < 0.05$)。 **结论** 成功构建的慢病毒 Hoxa3 载体可促进 HUVEC 的迁移和小管形成, 其作用机制可能为上调 HUVEC 的 uPAR 和 MMP-14 蛋白表达。

[中图分类号] R541

[文献标识码] A

Construction of lentiviral Hoxa3 vector and its effect on migration and angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells

BI Xuefei, TAO Guizhou, HUANG Jianhua

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121000, China)

[KEY WORDS] lentiviral vector; Hoxa3; human umbilical vein endothelial cell; cell migration; angiogenesis

[ABSTRACT] **Aim** To construct lentiviral Hoxa3 vector, observe its transfection efficiency to human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), study its effect on cell migration and angiogenesis, and explore the mechanism of Hoxa3 promoting angiogenesis. **Methods** Human Hoxa3 gene was obtained from the polymerase chain reaction library by gene synthesis, after being inserted into the bone plasmid, the lentiviral Hoxa3 vector was obtained by transfecting three plasmids into 293T cells, and the titer of lentiviral Hoxa3 vector was determined. Transfection of lentiviral Hoxa3 vector to HUVEC was performed to obtain the maximum transfective efficiency. HUVECs were divided into the control group and lentiviral Hoxa3 transfection group. HUVECs migration and tubule formation experiments were carried out to observe the effects of Hoxa3 on HUVEC migration and tubule formation. Western blot was used to detect the changes of urokinase-type plasminogen activator receptor (uPAR) and matrix metalloproteinase-14 (MMP-14) protein expression in HUVECs transfected with lentiviral Hoxa3 vector. **Results** The lentiviral Hoxa3 vector was successfully constructed, and the titer of the virus was 8×10^{11} TU/L. The transfection efficiency of 30 MOI lentiviral vector to HUVEC was over 99%. Western blot results showed that Hoxa3 could be effectively expressed in HUVEC after transfection of lentiviral Hoxa3 vector into HUVEC. Compared with the control group, transfection of HUVEC with lentiviral Hoxa3 vector significantly enhanced the migration and tubule formation of HUVEC, and significantly increased the expressions of uPAR and MMP-14 proteins ($P <$

[收稿日期] 2018-09-01

[修回日期] 2018-10-11

[基金项目] 国家自然科学基金(81470388)

[作者简介] 毕雪飞, 硕士研究生, 主要研究方向为冠状动脉硬化性心脏病的治疗, E-mail 为 bixuefei2018dl@163.com。通讯作者陶贵周, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病的诊断与治疗, E-mail 为 taoguizhou2018@163.com。

0.05). **Conclusion** Successfully constructed lentiviral Hoxa3 vector can promote migration and tubule formation of HUVEC, and its mechanism may be related to its up-regulation of uPAR and MMP-14 proteins in HUVEC.

对于缺血性心脏病治疗,基因治疗亦为热点探索领域之一^[1-4]。例如通过载体携带促进血管生长的基因如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、血管生成素 1(angiotensin-1, Ang-1)^[5]等经局部注射于缺血部位后释放生长因子,这些因子通过增加血管新生改善血供。近年来,人们运用基因增加血管新生的试验获得了成果^[6-8]。但也发现了一些不良作用如 VEGF 可增加血管通透性,引起心肌水肿^[9-10],因此寻找新的基因是当前的研究热点之一。Hox (homeobox) 基因全称为同源基因,近来有研究提示, Hoxa 基因在人类发育过程中影响造血干细胞的归宿^[11];内皮细胞含有 Hox 家族,其中 Hoxa3 和血管新生密切相关^[12]。本研究通过构建慢病毒 Hoxa3 载体(lentiviral Hoxa3 vector, Lenti-Hoxa3 vector),体外转染人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC),观察其对 HUVEC 的转染效率。然后观察 Hoxa3 慢病毒载体转染内皮细胞后对其迁移及血管生成的影响,并进一步探讨 Hoxa3 促进血管新生的机制,为慢病毒介导 Hoxa3 治疗缺血性心脏病提供实验理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

DMEM F-12、胎牛血清、胰蛋白酶、DNA 引物合成、DNA 测序试剂购于美国 Invitrogen 公司, Polyfectine、JM109 感受态细胞购于深圳百恩维生物科技有限公司,小量质粒抽提试剂盒 EM101、Trans2K Plus II DNA Marker BM121 购于北京全式金生物公司,琼脂糖凝胶回收试剂盒 D2500 购于 Omega 公司, T4 DNA Ligase M0202L 购于美国 NEB 公司, Qiagen 大规模质粒抽提试剂盒购于德国 Qiagen 公司, ViraBind 腺病毒纯化试剂盒购于美国 Cell Biolabs 公司, Anti-uPAR、Anti-MMP-14、Anti-Hoxa3 抗体购于 Cell Signaling 公司, HUVEC、293T 细胞均购自中国科学院细胞库。

1.2 慢病毒 Hoxa3 载体构建

以 Age I 消化酶切慢病毒骨架载体 GV358, 将酶切产物确定后,收集纯化。以 Hoxa3 上游引物 GAGGATCCCCGGGTACCGGTCGCCACCATGCAAAA

AGCGACCTACTAC 和 Hoxa3 下游引物 TCCTGTAGTCCATACCCAGGTGGGTGAGCTTGGGTG 以 PCR 在基因文库中钓取 Hoxa3 序列,经琼脂糖电泳证实条带大小。PCR 反应条件:94 °C 5 min;94 °C 30 s、55 °C 30 s、72 °C 30 s,30 个循环;72 °C 10 min。连接线性慢病毒骨架载体和 Hoxa3 PCR 产物并转化感受态大肠杆菌,将转化的大肠杆菌继续培养,行 PCR 鉴定。上游引物为:GGGTCAATATGTAATTTTCAGTG,下游引物为:CCTTATAGTCCTATCATCGTC,阳性转化子的 PCR 产物大小应该为 1524 bp,将获取阳性克隆进行基因测序。

1.3 慢病毒包装

准备 293T 细胞,在转染前 2 h 将细胞培养基更换为无血清培养基。均匀滴加转染复合物(DNA 溶液和 Lipofectamine 2000 溶液),孵育 8 h 后,换成正常培养基后再培养 48 h。48 h 后吸取上清液进行浓缩,并进行滴度测定。

1.4 划痕实验

HUVEC 进行消化、计数后,每孔加 2000 μ L 完全培养基, 4.0×10^5 个细胞置于 6 孔板中培养。待细胞长满时,用 200 μ L 枪头在皿底垂直划一道后,将原培养基吸掉,加 PBS 冲洗细胞碎片。实验分为 2 组:对照组:转染慢病毒增强绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP);实验组:转染慢病毒 Hoxa3;每组 6 孔,分别在 0、24 h 用显微镜进行拍照。采用 Image-Pro Plus 软件进行分析。根据公式计算, HUVEC 伤口大小(%) (相对于 0 h) = 24 h 划痕宽度/0 h 划痕宽度 $\times 100\%$ 。

1.5 小管形成实验

实验 24 h 前,将所需材料放置于 4 °C 冰箱过夜;待 Matrigel 基质胶溶解成透明液体状时,吸取 200 μ L 缓缓铺在 24 孔板中,防止产生气泡影响实验结果,置于培养箱中 30 min。实验分为 2 组:对照组:转染慢病毒 EGFP;实验组:转染慢病毒 Hoxa3;每组 6 孔, HUVEC 细胞进行消化、计数后,每孔加 1.0×10^5 个细胞,及 1 000 μ L 完全培养基。置于孵育箱中 6~8 h,期间用倒置显微镜进行跟踪拍照,记录小管的形成情况。随机选 5 个视野,计数小管形成分叉点,进行方差分析。

1.6 Western blot 检测

取慢病毒 Hoxa3 转染的 HUVEC, Western blot 检测 Hoxa3 及其对尿激酶型纤溶酶原激活物受体(uro-

kinase-type plasminogen activator receptor, uPAR) 及基质金属蛋白酶 14 (matrix metalloproteinase-14, MMP-14) 的影响, 每组实验重复 3 次。

1.7 统计学分析

使用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间两两比较采用 SNK-*q* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 慢病毒 Hoxa3 载体的构建

根据基因库序列, 运用合成法合成人 Hoxa3 基因序列, 插入到 pCDNA3 质粒中, 用 Age I 分别酶切慢病毒骨架载体和 pCDNA3-Hoxa3, 连接慢病毒骨架载体片段和 Hoxa3, 转染大肠杆菌, 培养获取单个大肠杆菌克隆, PCR 鉴定慢病毒骨架载体片段和 Hoxa3 连接成功。基因测序验证 Hoxa3 序列正确, 用转染复合物转染 293T 细胞, 获得慢病毒 Hoxa3 载体; 病毒的滴度为 8×10^{11} TU/L, 30 MOI 为最佳滴度 [MOI: 感染复数 (multiplicity of infection)] (图 1)。

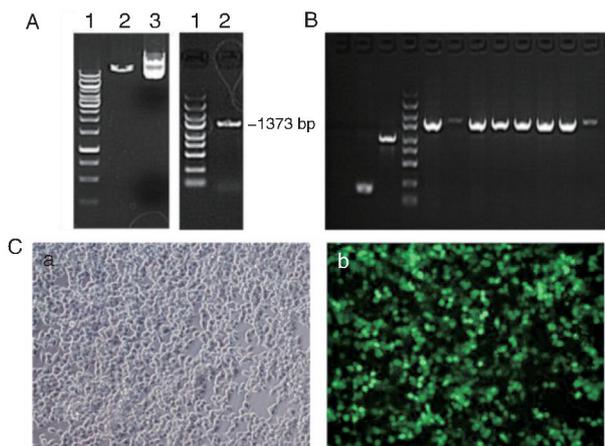


图 1. 慢病毒 Hoxa3 载体的构建 A: 左图, 用 Age I 分别酶切慢病毒骨架载体; 泳道 1: Marker; 泳道 2: 慢病毒骨架载体 Age I 酶切后; 泳道 3: 慢病毒骨架载体未酶切; 右图, Hoxa3 片段凝胶电泳, 泳道 1: Marker; 泳道 2: Hoxa3 片段。B: 慢病毒骨架载体和 Hoxa3 连接后转化大肠杆菌, 克隆形成后挑选 8 个克隆行 PCR 鉴定, 结果证明所选克隆全部连接成功。C: 慢病毒骨架载体和 Hoxa3 连接后产物和 Help1 及 Help2 辅助质粒共转染 293T 细胞, 放大倍数为 40 倍; a: 普通光下的 293T 细胞; b: 绿色荧光下的 293T 细胞; 表明 Lenti-Hoxa3-EGFP 包装成功。

Figure 1. The construction of lenti-Hoxa3 vector

2.2 慢病毒 Hoxa3 载体转染 HUVEC 的效率及 Hoxa3 的表达检测

培养 HUVEC, 50% 丰度时以 30 MOI 转染, 4 天

后在荧光显微镜下观察, 随机选择 5 个视野, 转染效率达到 99% 以上 (图 2A)。Western blot 结果显示慢病毒 Hoxa3 载体转染 HUVEC 后 Hoxa3 能够在 HUVEC 中有效表达 (图 2B)。

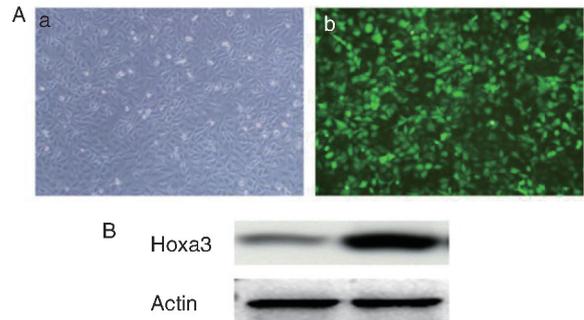


图 2. 慢病毒 Hoxa3 载体转染 HUVEC 及 Hoxa3 的表达检测 A: a: PBS 处理的 HUVEC; b: Lenti-Hoxa3-EGFP 处理的 HUVEC; 放大倍数为 40 倍。B: 左侧泳道: PBS 处理的 HUVEC; 右侧泳道: Lenti-Hoxa3-EGFP 处理的 HUVEC。表明 Lenti-Hoxa3-EGFP 有效介导 Hoxa3 在 HUVEC 中的表达。

Figure 2. The expression detection of Hoxa3 after transfection by lenti-Hoxa3 vector in HUVEC

2.3 慢病毒 Hoxa3 载体转染对 HUVEC 迁移的影响

慢病毒 Hoxa3 载体转染 HUVEC 后, HUVEC 生长至 99% 丰度时以 200 μ L 枪头划痕, 24 h 后记录 HUVEC 的迁移情况。结果显示, 与对照组比较, 慢病毒 Hoxa3 载体转染 HUVEC 显著增强 HUVEC 的迁移 ($P < 0.05$; 图 3)。

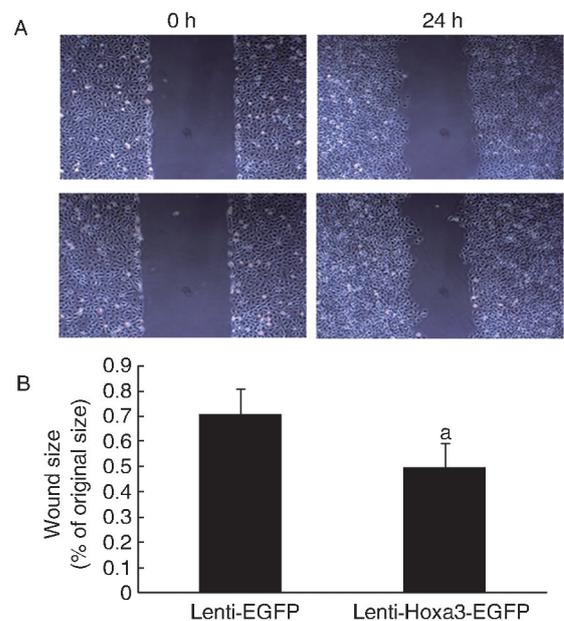


图 3. 慢病毒 Hoxa3 载体对 HUVEC 迁移的影响 A: 上图: 转染 Lenti-EGFP 的 HUVEC; 下图: 转染 Lenti-Hoxa3-EGFP 的 HUVEC; 放大倍数为 40 倍。B: Lenti-Hoxa3-EGFP 转染显著促进 HUVEC 的迁移; a 为 $P < 0.05$, 与 Lenti-EGFP 组比较。

Figure 3. The effect of lenti-Hoxa3 vector on HUVEC migration

2.4 慢病毒 Hoxa3 载体转染对 HUVEC 小管形成的影响

以 Matrigel 铺板,慢病毒 Hoxa3 载体转染 HUVEC,接种于 Matrigel 上培养,6 h 后记录 HUVEC 的小管形成情况。结果显示,与对照组比较,慢病毒 Hoxa3 载体转染 HUVEC 显著增强内皮细胞的小管形成($P<0.01$;图 4)。

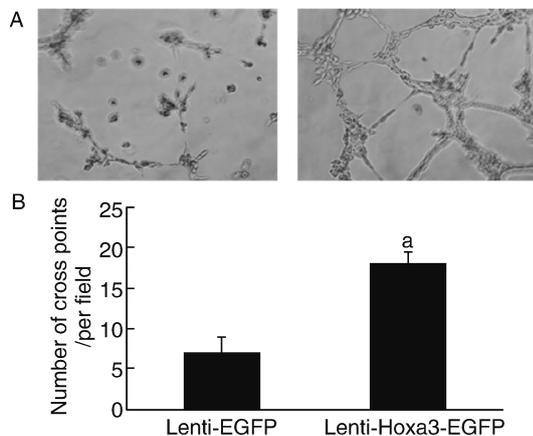


图 4. 慢病毒 Hoxa3 载体对 HUVEC 小管形成的影响 A: 左图: Lenti-EGFP 转染的 HUVEC; 右图: Lenti-Hoxa3-EGFP 转染的 HUVEC; 放大倍数为 200 倍。B: Lenti-Hoxa3-EGFP 转染显著促进 HUVEC 的小管形成; a 为 $P<0.01$, 与 Lenti-EGFP 组比较。

Figure 4. The effect of lenti-Hoxa3 vector on the formation of HUVEC tubules (200 \times)

2.5 慢病毒 Hoxa3 载体转染对 HUVEC uPAR 和 MMP-14 蛋白表达的影响

取转染慢病毒载体后稳定表达 Hoxa3 的 HUVEC,培养 24 h 后 Western blot 检测 uPAR 和 MMP-14 蛋白的表达情况。结果显示,与对照组比较,慢病毒 Hoxa3 载体转染 HUVEC 显著增加 uPAR 和 MMP-14 蛋白的表达($P<0.01$;图 5)。

3 讨论

基因治疗的载体包括质粒、腺病毒载体、腺相关病毒载体、慢病毒载体等。研究表明慢病毒载体的安全性和转染效率均较好。在本研究中,我们成功构建携带 Hoxa3 基因的慢病毒载体,转染血管内皮细胞时,在 30 MOI 的条件下获得 99% 以上的转染效率。

Hox 基因在胚胎发育过程中编码转录调节因子^[13]。研究发现成人血管内皮细胞表达许多 Hox 基因,包括 Hoxb3、Hoxd3、Hoxa9 和 Hoxd10,许多血

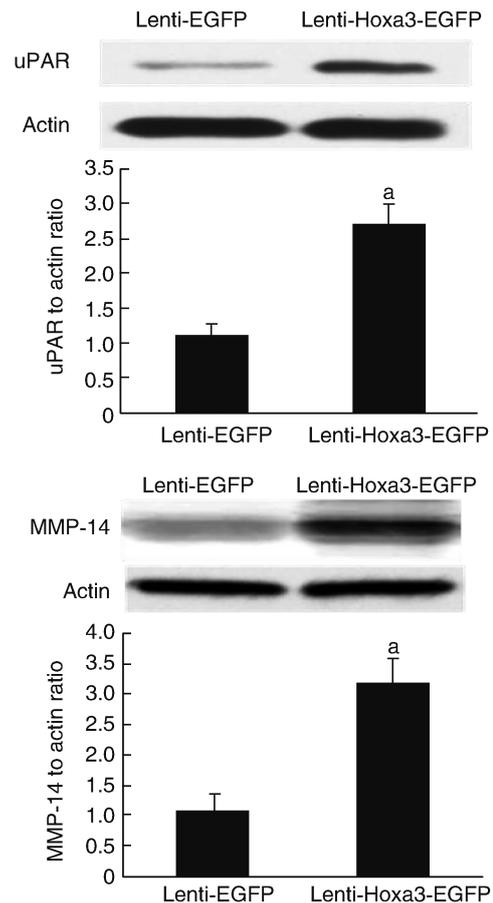


图 5. 慢病毒 Hoxa3 载体转染 HUVEC 后对 uPAR 和 MMP-14 蛋白表达的影响 a 为 $P<0.01$, 与 Lenti-EGFP 组比较。

Figure 5. The effect of lenti-Hoxa3 vector transfection on the expressions of uPAR and MMP-14 protein in HUVEC

管生长因子如 bFGF、TNF- α 和 VEGF 可调节其表达^[14]。Hoxd3 在体内静止的血管内皮细胞中不高度表达,但在创伤后 24 h 内皮肤毛细血管中的表达显著升高^[15]。Hoxd3 可上调基质降解丝氨酸蛋白酶、尿激酶型纤溶酶原激活物 (urokinase-type plasminogen activator, uPA) 以及 $\alpha v \beta 3$ 整合素的 $\beta 3$ 亚基和 $\alpha 5 \beta 1$ 整合素的 $\alpha 5$ 亚基的表达, Hoxd3 旁系同源物 Hoxb3 可在体促进血管新生^[16]。

Hoxa3 为 Hoxd3 和 Hoxb3 的旁系同源物。研究证明在胚胎发生期间,当在适当的位置和时间表达时, Hoxd3 和 Hoxa3 基因可以在功能上互换^[17]。Mace 等^[12]研究发现 Hoxa3 可诱导血管内皮细胞和表皮细胞的迁移,促进血管新生,增强糖尿病伤口的愈合。我们通过慢病毒介导在 HUVEC 上过表达 Hoxa3,发现 Hoxa3 促进 HUVEC 的迁移及小管形成,提示慢病毒介导 Hoxa3 在血管内皮细胞上表达可作为治疗缺血性心脏病的一个潜在的疗法。

我们研究发现 Hoxa3 通过 uPAR 和 MMP-14 促

进 HUVEC 迁移,此结果和文献报道^[12]一致。uPAR 除了促进 uPA 依赖性蛋白水解,还具有其他功能,包括与整合素的共定位和结合,增强下游的信号通路^[18]。MMP-14 可以促进纤维蛋白溶解,协助细胞侵入纤维蛋白。最近发现在富含胶原环境中,MMP-14 对于血管内皮细胞侵入和新血管形成是不可缺少的^[19]。以上提示 Hoxa3 诱导的 uPAR 和 MMP-14 在血管内皮细胞迁移和血管新生中起重要作用。Hoxa3 上调 uPAR 和 MMP-14 表达的调控机制目前不是十分清楚,有研究提示 uPAR 和 MMP-14 的增强子/启动子区域有 Hoxa3 的结合区域,Hoxa3 通过影响 uPAR 和 MMP-14 的转录调控 uPAR 和 MMP-14 的表达^[12]。这些需要进一步行染色质免疫共沉淀实验进行验证。

综上所述,本研究成功构建了 Hoxa3 慢病毒载体,并高效转染 HUVEC,在 HUVEC 过表达 Hoxa3 可促进其迁移和小管形成。其作用机制可能为 Hoxa3 上调 uPAR 和 MMP-14 的表达,从而促进迁移和血管新生。这为慢病毒载体介导 Hoxa3 治疗缺血性心脏病提供了实验理论依据。

[参考文献]

- [1] 刘洪光,陶贵周,李俊,等. RNA 干扰 LOX-1 表达对氧化型低密度脂蛋白诱导人脐静脉内皮细胞损伤的保护机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22(9): 891-896.
- [2] 欧翔,周志姣,皮银珍. RagB 过表达慢病毒载体的构建及应用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2016, 24(7): 715-719.
- [3] Yin ZQ, Xing WH. Progress in gene therapy for chronic heart failure [J]. Heart Surg Forum, 2018, 21(2): E075-E083.
- [4] Renaud-Gabardos E, Tatin F, Hantelys F, et al. Therapeutic benefit and gene network regulation by combined gene transfer of Apelin, FGF2, and SERCA2a into ischemic heart[J]. Mol Ther, 2018, 26(3): 902-916.
- [5] Zhou L, Ma W, Yang Z, et al. VEGF165 and angiopoietin-1 decreased myocardium infarct size through phosphatidylinositol-3 kinase and Bcl-2 pathways[J]. Gene Ther, 2005, 12(3): 196-202.
- [6] Segers VF, Lee RT. Stem-cell therapy for cardiac disease [J]. Nature, 2008, 451(7181): 937-942.
- [7] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium [J]. Nature, 2001, 410(6829): 701-705.
- [8] Nascimento DS, Mosqueira D, Sousa LM, et al. Human umbilical cord tissue-derived mesenchymal stromal cells attenuate remodeling after myocardial infarction by proangiogenic, antiapoptotic, and endogenous cell-activation mechanisms[J]. Stem Cell Res Ther, 2014, 5(1): 5.
- [9] Korpisalo P, Hytönen JP, Laitinen JT, et al. Capillary enlargement, not sprouting angiogenesis, determines beneficial therapeutic effects and side effects of angiogenic gene therapy[J]. Eur Heart J, 2011, 32(13): 1664-1672.
- [10] Vajanto I, Rissanen TT, Rutanen J, et al. Evaluation of angiogenesis and side effects in ischemic rabbit hindlimbs after intramuscular injection of adenoviral vectors encoding VEGF and LacZ[J]. J Gene Med, 2002, 4(4): 371-380.
- [11] Dou DR, Calvanese V, Sierra MI, et al. Medial hoxa genes demarcate haematopoietic stem cell fate during human development[J]. Nat Cell Biol, 2016, 18(6): 595-606.
- [12] Mace KA, Hansen SL, Myers C, et al. Hoxa3 induces cell migration in endothelial and epithelial cells promoting angiogenesis and wound repair[J]. J Cell Sci, 2005, 118(Pt 12): 2567-2577.
- [13] 张燕军,李金泉,尹俊,等. Homeobox 基因对毛囊生长发育作用机制的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(3): 75-78.
- [14] Boudreau NJ, Varner JA. The homeobox transcription factor Hox D3 promotes integrin alpha 5 beta 1 expression and function during angiogenesis[J]. J Biol Chem, 2004, 279(6): 4862-4868.
- [15] Uyeno LA, Newman-Keagle JA, Cheung I, et al. Hox D3 expression in normal and impaired wound healing [J]. J Surg Res, 2001, 100(1): 46-56.
- [16] Myers C, Charboneau A, Boudreau N. Homeobox B3 promotes capillary morphogenesis and angiogenesis[J]. J Cell Biol, 2000, 148(2): 343-351.
- [17] Greer JM, Puetz J, Thomas KR, et al. Maintenance of functional equivalence during paralogous Hox gene evolution[J]. Nature, 2000, 403(6770): 661-665.
- [18] Blasi F, Carmeliet P. uPAR: a versatile signalling orchestrator[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002, 3(12): 932-943.
- [19] Chun TH, Sabeh F, Ota I, et al. MT1-MMP-dependent neovessel formation within the confines of the three-dimensional extracellular matrix [J]. J Cell Biol, 2004, 167(4): 757-767.

(此文编辑 曾学清)