

重组腺病毒介导 hCGPx 转染致血管内皮细胞产生抗氧化损伤作用的研究

项和立, 薛武军, 侯军, 田普训, 滕琰, 潘晓鸣, 丁小明, 冯新顺(西安交通大学医学院第一附属医院肾移植科, 陕西西安, 710061)

摘要:目的 研究重组腺病毒介导的人胞浆型谷胱甘肽过氧化物酶(hCGPx)转染对血管内皮细胞 ECV304 氧化损伤保护作用。方法 将含 hCGPx cDNA 的质粒 pGEM-T-hCGPx 和重组腺病毒载体 pACCMV-pLpA 穿梭质粒进行基因重组, 构建成 pACCMV-hCGPx 穿梭质粒后, 与包装质粒 pJM17 共转染 293 细胞, 构建成重组腺病毒 AdCMV-hCGPx。用 AdCMV-hCGPx 转染体外培养的 ECV304 细胞并分为转染 24、48 和 72 h 组, 以转染空载体的细胞为对照组, 检测转染细胞的基因表达水平。各组 ECV304 细胞经 H₂O₂ 氧化损伤处理后, 分别对细胞的活力和凋亡进行检测分析。结果 各转染组细胞转染基因表达率均显著高于对照组 ($P < 0.01$)。经 H₂O₂ 氧化损伤处理后, AdCMV-hCGPx 转染组细胞活力较对照组明显增强, 凋亡受到抑制。结论 重组腺病毒介导的 hCGPx 转染可保护 ECV304 细胞抵抗氧化损伤, 具有明确的细胞保护作用, 其具体保护机制可能与抗氧化和抑制细胞凋亡有关。

关键词: 人胞浆型谷胱甘肽过氧化物酶; 基因转染; 血管内皮细胞; 氧化损伤

中图分类号: R363.22 文献标识码: A 文章编号: 1673-4254(2006)10-1417-04

Recombinant adenovirus-mediated human cytosolic glutathione peroxidase gene transfection protects vascular endothelial cells from oxidative damage

XIANG He-li, XUE Wu-jun, HOU Jun, TIAN Pu-xun, TENG Yan, PAN Xiao-ming, DING Xiao-ming, FENG Xin-shun

Department of Kidney Transplantation, First Affiliated Hospital, Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

Abstract: **Objective** To study the protective effect of recombinant adenovirus-mediated human cytosolic glutathione peroxidase (hCGPx) gene transfection on vascular endothelial cells ECV304 from oxidative damage. **Methods** pGEM-T Easy Vector containing hCGPx cDNA and recombinant adenovirus shuttle plasmid pACCMV-pLpA were used to construct the shuttle plasmid pACCMV-hCGPx for cotransfection of 293 cells with pJM17, thereby to obtain the recombinant adenovirus AdCMV-hCGPx. Cultured ECV304 cells were transfected with AdCMV-hCGPx for 24, 48 and 72 h, respectively, with the cells transfected with the empty vector serving as control, and hCGPx gene expression was then examined in the transfected cells. The transfected cell viability and apoptotic cell ratio were evaluated after treatment of the cells with H₂O₂. **Results** The expression ratio of hCGPx gene was significantly higher in the AdCMV-hCGPx-transfected cells than in those with empty vector transfection ($P < 0.01$). The hCGPx gene-transfected cells showed significantly higher viability and significantly lower apoptotic ratio than the control cells following challenge with H₂O₂-induced oxidative damage. **Conclusion** hCGPx gene transfer mediated by recombinant adenovirus protects the vascular endothelial cells from oxidative damage *in vitro*, possibly due to the antioxidative and apoptosis-inhibiting effect of hCGPx.

Key words: human cytosolic glutathione peroxidase; gene transfection; vascular endothelial cells; oxidative damage

人体内的抗氧化防御系统的作用是清除氧自由基, 而谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GPx) 是抗氧化防御系统的主要组成部分^[1,2]。GPx 在防治缺血再灌注损伤中的起重要作用。目前对应用何种方法可诱导 GPx 高效表达以保护缺血再灌注活性氧自由基对血管内皮的损伤, 国内外研究尚无定论。本研究应用腺病毒介导的基因转染技术, 将人胞浆型

谷胱甘肽过氧化物酶 (hCGPx)cDNA 导入体外培养的人血管内皮细胞株 ECV304, 观察 hCGPx 高表达对氧化损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

重组腺病毒载体 pACCMV-pLpA 穿梭质粒, pJM17 质粒由西安华广生物工程公司提供, 含 hCGPx cDNA 的质粒 pGEM-T-hCGPx 由法国 Limoges 大学 Faucher 教授惠赠。限制性内切酶、hCGPx 抗体由美国罗氏公司提供。人胚肾 293 细胞和 ECV304 细胞株购自美国 ATCC 公司, PCR 引物由上海生工生物公司合成。Annexin-v-FITC 和 PI 双标记细胞凋亡检测试剂盒为北京宝赛生物技术有限

收稿日期: 2006-02-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30271640)

Supported by National Natural Science Foundation of China (30271640)

作者简介: 项和立 (1972-), 男, 主治医师, 在读博士研究生, 电话: 029-85324033, E-mail: hlxiang@163.com

通讯作者: 薛武军 (1961-), 教授, 博士生导师, 电话: 029-85324133, E-mail: xw5886@pub.xaonline.com

公司产品。TUNEL 原位细胞凋亡检测试剂盒由华美生物公司提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 ECV304 细胞在含 10% 小牛血清、100 $\mu\text{g/ml}$ 青霉素、100 UI/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养基中培养, 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 孵育。每 1-2 d 换液, 0.25% 胰蛋白酶消化传代。

1.2.2 hCGP α 重组腺病毒构建、鉴定、纯化 pGEM-T-hCGP α 质粒经 *Bam*H I 和 *Hind*III 双酶切后, 琼脂凝胶电泳回收 780 bp 左右的 hCGP α cDNA 片段。pACCMVpLpA 复制缺陷型腺病毒穿梭质粒经 *Bam*H I 和 *Hind*III 双酶切回收质粒大片段, 将两回收片段连接, hCGP α cDNA 定向克隆入腺病毒穿梭质粒, 提取质粒, 酶切鉴定挑选阳性克隆 pACCMV-hCGP α 。应用磷酸钙-DNA 共沉淀法将穿梭质粒 pACCMV-hCGP α 及包装质粒 pJM17 (约 40 kb) 共转染 293 细胞 (含腺病毒 E1 区编码基因), 在 293 细胞内同源重组, 构建重组腺病毒 AdCMV-hCGP α 。7 d 后收取噬菌斑并用其感染已培养至对数生长期的 293 细胞, 5 d 后收集脱落的细胞, 冻融 3 次后离心取上清备用。从病毒液中提取病毒 DNA, 应用 PCR 法鉴定病毒是否为重组子 AdCMV-hCGP α 。PCR 反应体系为上游引物 (5' CGGGATCCTGGCTTCTTGACAA TTGC 3') 和下游引物 (5' CGAAGCTTCACCCATC TCGAGGTGGTAT 3') 各 50 pmol, dNTP 20 μmol , 模板 10 μg , Taq DNA 聚合酶 3 U, 10 \times Taq DNA 聚合酶缓冲液 10 μl , 去离子水定容至 100 μl 。94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 51 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s, 循环 30 次, 并于 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。用含有重组腺病毒的病毒液再次感染 293 细胞, 进行扩增后收集脱落的细胞, 冻融后用梯度氯化铯高速离心法进行 AdCMV-hCGP α 的提取和纯化。以空斑形成单位 (PFU) 测定 AdCMV-hCGP α 转染液的滴度并保存于 -70 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.2.3 病毒转染和分组 取 96 孔板培养至 70%-100% 融合的 ECV304 细胞, 弃去培养液, 滴加低温保存的病毒液 5 μl , 加 0.5 ml 含 100 nmol/L 的硒 (Se) RPMI 1640 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵育, 每 15 min 摇 1 次, 使病毒均匀分布, 1 h 后添加正常培养基。培养的人 ECV304 细胞分为 AdCMV-hCGP α 转染 24 h、48 h、72 h 组及对照组 (转染空病毒载体)。用间接免疫荧光方法标记各处理组和对照组细胞 hCGP α 表达后, 以流式细胞仪检测 AdCMV-hCGP α 的转染表达率。

1.2.4 H_2O_2 诱导 ECV304 细胞氧化损伤实验 AdCMV-hCGP α 转染 ECV304 细胞 (实验组) 和转染空病毒载体 ECV304 细胞 (对照组) 应用含 100 nmol/L Se 的 RPMI 1640 培养基于 96 孔板培养 5 d

后, 弃掉培养基, 用 PBS 洗细胞 1 次, 之后在含 0 或 250 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 的完全培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵育 4 h。孵育结束后弃掉含 H_2O_2 的培养基, PBS 洗细胞 1 次后加 1 ml 含 100 nmol/L Se 的 RPMI 1640 培养基继续培养。

1.2.5 细胞增殖活力的检测 采用四唑盐 (MTT) 比色法。消化对数生长期细胞, 调整细胞浓度为 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 分别接种于 4 个 96 孔板, 每孔 200 μl , 继续培养到细胞单层铺满孔底。根据实验分组进行处理后各孔加入 MTT 溶液 (5 mg/ml) 20 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 继续孵育 4 h; 吸弃培养上清液, 每孔加入 150 μl 二甲基亚砜 (DMSO), 振荡 10 min, 在酶标仪上于波长 490 nm 测定各孔吸光度值 (A490)。氧化应激后保存的细胞活力计算公式: 细胞活力 = (应激后细胞 A490 - 未掺入细胞 A490) / (未经应激处理的细胞 A490 - 未掺入细胞 A490) $\times 100\%$ 。

1.2.6 细胞凋亡检测 采用 TUNEL 和 Annexin-v-FITC/PI 双标记细胞凋亡检测相结合的方法。实验组和对照组经 H_2O_2 处理后, TUNEL 法按试剂盒说明操作, 光学生物显微镜检测。Annexin-v-FITC 和 PI 双标记细胞凋亡检测法按试剂盒说明操作, 流式细胞仪检测。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS11.5 统计软件进行统计学处理, 组间差异显著性检验采用 Student's *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有显著意义。

2 结果

2.1 重组腺病毒 AdCMV-hCGP α 的构建

同源重组法构建复制缺陷型腺病毒载体, 纯化后用 PCR 鉴定, 反应产物行 1% 琼脂凝胶电泳, 短波紫外线分析仪下进行观察, 见约 780 bp 大小的特异性条带 (图 1)。此条带即为 hCGP α cDNA, 包括 5' 端部分非翻译区、全部 hCGP α 201 个氨基酸编码序列以及位于 3' 端非翻译区 Se-Cys 的 SECIS^[3], 确定为 AdCMV-hCGP α 。纯化后的重组腺病毒测定滴度为 1×10^{11} pfu/ml。

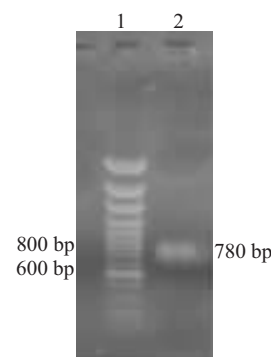


图 1 重组腺病毒 AdCMV-hCGP α 的 PCR 鉴定

Fig.1 PCR identification of recombinant AdCMV-hCGP α

Lane 1: DNA marker; Lane 2: PCR product of AdCMV-hCGP α

2.2 hCGP α 转染表达率

转染空载体的对照组细胞 hCGP α 轻度表达 hCGP α 蛋白[(7.2 \pm 2.9)%],转染 24 h 组 hCGP α 表达明显高于对照组[(63.2 \pm 9.8)%]并随时间延长其表达率不断增加,48 h 达峰值[(91.8 \pm 6.3)%],72 h 仍维持较高表达率[(77.0 \pm 10.7)%]。各转染组与对照组的表达率之间有显著差异($P < 0.01$)。

2.3 重组 hCGP α 腺病毒转染对 H₂O₂ 处理后 ECV304 细胞活力的影响

通过 MTT 比色法检测 A 值可间接反映细胞活力。H₂O₂ 氧化损伤后,AdCMV-hCGP α 转染 24、48、

72 h 组细胞 A490 值分别为 0.28 \pm 0.07、0.39 \pm 0.07、0.34 \pm 0.07,各转染组细胞活力明显高于对照组(0.15 \pm 0.05, $P < 0.01$)。其中转染 48 h 组细胞抗氧化损伤能力最为明显。

2.4 TUNEL 法检测 H₂O₂ 诱导的 ECV304 细胞凋亡

图 2 显示了经 H₂O₂ 处理的空载体转染(图 2A)和 hCGP α 重组腺病毒转染的 ECV304(图 2B)细胞凋亡光镜检测结果,A 图中可见有较多的细胞核棕色着色颗粒的凋亡细胞。

2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡结果(图 3)

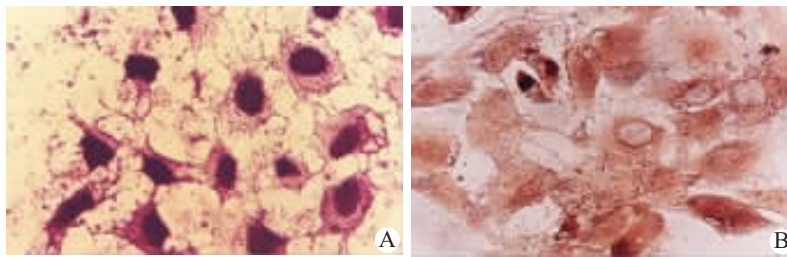


图 2 TUNEL 法检测 H₂O₂ 诱导 ECV304 细胞凋亡光镜检测结果

Fig.2 TUNEL assay for hydrogen peroxide-induced apoptosis (Original magnification: $\times 200$)

A:ECV304 cells transfected with empty vector (control group) after H₂O₂ oxidative damage; B: ECV304 transfected with AdCMV-hCGP α after H₂O₂ oxidative damage

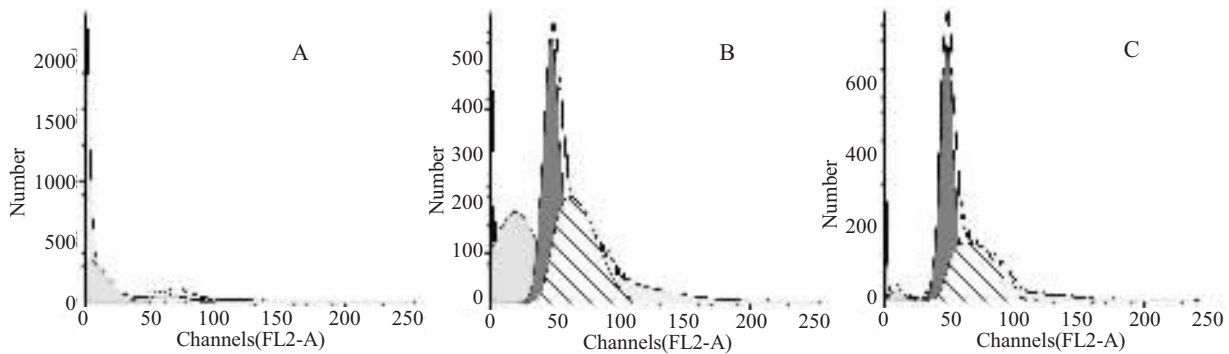


图 3 流式细胞仪法检测 H₂O₂ 诱导 ECV304 细胞凋亡结果

Fig.3 FCM assay for hydrogen peroxide-induced apoptosis

A: ECV304 cells transfected with empty vector (control group) after H₂O₂ oxidative damage (apoptosis rate 35.16 %); B: ECV304 transfected with AdCMV-hCGP α after H₂O₂ oxidative damage (apoptosis rate 25.13 %); C:ECV304 cells transfected with AdCMV-hCGP α (apoptosis rate 1.93 %)

2.6 hCGP α 重组腺病毒转染对氧化损伤后细胞存活和凋亡影响

细胞增殖活力由 MTT 比色法测得,细胞凋亡由 Annexin-v-FITC 和 PI 双标记流式细胞仪检测。从表 1 中可以看出,hCGP α 重组腺病毒转染各组的活细胞率均显著高于对照组;hCGP α 重组腺病毒转染的各组细胞凋亡率显著低于对照组。

表 1 hCGP α 重组腺病毒对 ECV304 细胞氧化损伤的保护作用

Tab.1 Protective effect of recombinant adenovirus-mediated hCGP α gene transfection on ECV304 cells from oxidative damage (n=12 Mean \pm SD, %)

Group	Survival rate	Apoptotic rate
Control	19.9 \pm 4.7	35.3 \pm 5.1
24-h transfection	50.5 \pm 8.5**	25.8 \pm 6.4*
48-h transfection	63.9 \pm 10.5**	23.1 \pm 6.7**
72-h transfection	56.9 \pm 9.4**	24.6 \pm 7.3**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

3 讨论

缺血再灌注损伤时释放的氧自由基和各种细胞成分(膜磷脂、蛋白、核酸)发生反应,使其活性丧失,结构改变,导致整个细胞丧失功能^[4,5]。GPx 是人体内抗氧化防御系统的重要组成部分,主要还原可溶性的氢过氧化物(H_2O_2)和一些有机氢过氧化物(氢过氧化脂肪酸)^[6],并抑制体内细胞凋亡的发生^[7]。

重组腺病毒载体能简便有效的将目的基因导入靶细胞,并使其有效表达^[8]。腺病毒为 DNA 病毒,极少发生插入突变,载体操作方便,且宿主广泛、容易增殖,并具有携带外源基因容量大,可表达接近翻译后成熟水平蛋白质等特点,已被广泛用于多种疾病的基因转导^[9]。

本研究在构建好 pACCMV-hCGPx 穿梭质粒后,应用磷酸钙-DNA 共沉淀法将穿梭质粒 pACCMV-hCGPx 及包装质粒 pJMI7(约 40 kb,作为辅助病毒)共转染 293 细胞(含腺病毒 E1 区编码基因),进行同源重组,从而成功构建了重组腺病毒 AdCMV-hCGPx,为目的基因转导提供了物质基础。本研究利用含 hCGPx 基因的重组腺病毒载体转染体外培养的人血管内皮细胞 ECV304,经基因表达水平的检测,证实重组腺病毒载体转染 hCGPx 在体外培养的 ECV304 细胞中有高水平的表达,并且转导了 hCGPx 的 ECV304 细胞能够拮抗 H_2O_2 引起的细胞凋亡。高表达 hCGPx 的细胞在氧化打击之后,能够更迅速的恢复生长增殖能力。这表明 hCGPx 不但在器官移植方面有减轻移植器官缺血再灌注损伤、保护移植器官的重要作用^[10],而且在治疗心脑血管等器官缺血再灌注损伤性疾病上也有重要价值^[11]。除此之外,动物实验证明 CGPx 可以通过抑制病毒突变来保护小鼠免受病毒导致的心肌损伤。虽然这只是动物实验得出的结论,但低硒地区人群平均 GPx 活性低于非病区人群,以致在遭受病毒感染时容易发生病毒性心肌炎(克山病),这可能与该动物实验有类似的发病机制。Erexson 等^[12]发现 GPx 可以恢复转基因大蓝鼠和鼠成纤维细胞中姐妹染色单体的互换,进而保护 DEB

诱导的 DNA 损伤,抑制基因突变,对相关疾病的预防有重要意义。因此,重组腺病毒介导的 hCGPx 转染 ECV304 可保护细胞抵抗氧化损伤,具有明确的细胞保护作用,其具体保护机制可能与抗氧化和抑制细胞凋亡有关。CGPx 在临床抗氧化损伤治疗中有良好的应用前景。

参考文献:

- [1] Zhang Y, Handy DE, Loscalzo J. Adenosine-dependent induction of glutathione peroxidase 1 in human primary endothelial cells and protection against oxidative stress[J]. *Circ Res*, 2005, 96(8): 831-7.
- [2] Hollander JM, Lin KM, Scott BT, et al. Overexpression of PHGPx and HSP60/10 protects against ischemia/reoxygenation injury. *Free Radic Biol Med*[J], 2003, 35(7): 742-51.
- [3] Ramos A, Lane AN, Hollingworth D, et al. Secondary structure and stability of the selenocysteine insertion sequences (SECIS) for human thioredoxin reductase and glutathione peroxidase [J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(5): 1746-55.
- [4] Chen JK, Chow SE. Antioxidants and myocardial ischemia: reperfusion injuries[J]. *Chang Gung Med J*, 2005, 28(6):369-77.
- [5] Lee WY, Lee SM. Ischemic preconditioning protects post-ischemic oxidative damage to mitochondria in rat liver[J]. *Shock*, 2005, 24(4):370-5.
- [6] Jozanov-Stankov O, Demajo M, Djucic I, et al. Selenium intake as a modulator of responsiveness to oxidative stress[J]. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 1998, 17(3-4): 251-7.
- [7] Brigelius-Flohe R, Flohe L. Is there a role of glutathione peroxidases in signaling and differentiation [J]? *Biofactors*, 2003, 17(1-4): 93-102.
- [8] Mizuguchi H, Hayakawa T. Targeted adenovirus vectors[J]. *Hum Gene Ther*, 2004, 15(11): 1034-44.
- [9] Kamen A, Henry O. Development and optimization of an adenovirus production process[J]. *J Gene Med*, 2004, 6 Suppl 1: S184-92
- [10] Cesaratto L, Vascotto C, Calligaris S, et al. The importance of redox state in liver damage[J]. *Ann Hepatol*, 2004, 3(3): 86-92.
- [11] Dhalla NS, Elmoselhi AB, Hata T, et al. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury [J]. *Cardiovasc Res*, 2000, 47(3): 446-56.
- [12] Erexson GL, Tindall KR. Reduction of diepoxybutane-induced sister chromatid exchanges by glutathione peroxidase and erythrocytes in transgenic Big Blue mouse and rat fibroblasts[J]. *Mutat Res*, 2000, 447(2): 267-74.