

## · 实验研究 ·

腺病毒介导的重组 *Tum5* 基因对生理状态下脐静脉血管内皮细胞生物学行为的抑制作用

贾育蓉 杨伟 张红 张琰 孙靖

300384 天津医科大学眼科医院 天津医科大学眼科研究所 天津医科大学眼视光学院

通信作者:张琰,Email:yanzhang04@tmu.edu.cn;孙靖,Email:jingsun09@tmu.edu.cn

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2017.08.002

**【摘要】** 背景 肿瘤抑素是迄今发现活性最强的内源性血管生成抑制因子,对病理性新生血管形成有明显抑制作用。*Tum5* 片段为肿瘤抑素的抗血管生成活性片段。目的 研究腺病毒介导的 *Tum5* 重组基因过表达对生理状态下人脐静脉内皮细胞(HUVECs)增生、迁移及管腔形成的影响。方法 构建表达绿色荧光蛋白的空载体腺病毒(rAd-GFP)和携带重组 *Tum5* 基因的腺病毒载体(rAd-*Tum5*)。将 HUVECs 分为正常对照组、空载体组(rAd-GFP 组)和 *Tum5* 基因组(rAd-GFP-*Tum5* 组)。将 rAd-GFP 和 rAd-*Tum5* 病毒颗粒( $1 \times 10^{10}$ /ml)各 20  $\mu$ l 分别加入 rAd-GFP 组和 rAd-GFP-*Tum5* 组培养液以感染培养的细胞 48 h,倒置荧光显微镜下观察各组细胞中 GFP 的表达,并计算病毒的感染效率;采用细胞计数试剂盒(CCK)-8 检测各组细胞在波长为 450 nm 处的吸光度(A)值并计算细胞增生率;采用 Transwell 小室实验测定各组的迁移细胞数目;采用基质胶(Matrigel)实验检测各组细胞的管腔形成数;采用人血管内皮生长因子(VEGF)ELISA 试剂盒检测细胞感染后 24、48 和 72 h 各组细胞培养上清液中 VEGF 质量浓度。结果 倒置荧光显微镜下可见 rAd-GFP 组和 rAd-GFP-*Tum5* 组 HUVECs 中呈绿色荧光,rAd-GFP 组和 rAd-GFP-*Tum5* 组的感染效率分别为 55.13% 和 50.31%。细胞感染后 24 h 和 48 h,正常对照组、rAd-GFP 组和 rAd-GFP-*Tum5* 组细胞增生率比较差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ );细胞感染后 72 h,rAd-GFP-*Tum5* 组细胞增生率明显低于正常对照组和 rAd-GFP 组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )。细胞感染后 48 h,正常对照组、rAd-GFP 组和 rAd-GFP-*Tum5* 组迁移细胞数分别为(2 260.25 $\pm$ 930.44)、(2 370.00 $\pm$ 441.06)和(723.75 $\pm$ 363.80)个,总体比较差异有统计学意义( $F = 8.524, P = 0.008$ ),rAd-GFP-*Tum5* 组迁移细胞数量较正常对照组和 rAd-GFP 组均明显减少,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )。正常对照组、rAd-GFP 组和 rAd-GFP-*Tum5* 组平均每张图片中管腔形成数目分别为(95.67 $\pm$ 5.86)、(88.00 $\pm$ 4.58)和(20.67 $\pm$ 3.51)个,总体比较差异有统计学意义( $F = 226.498, P < 0.01$ ),其中 rAd-GFP-*Tum5* 组细胞管腔形成数量较正常对照组和 rAd-GFP 组明显减少,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )。细胞感染后 24、48 和 72 h,各组细胞培养上清液中 VEGF 蛋白质量浓度总体比较差异均有统计学意义( $F_{\text{分组}} = 73.260, P < 0.01; F_{\text{时间}} = 73.477, P < 0.01$ );其中感染后 48 h 和 72 h,rAd-GFP-*Tum5* 组 VEGF 质量浓度均明显低于 rAd-GFP 组,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ )。结论 腺病毒介导的重组 *Tum5* 基因的过表达可抑制生理状态下 HUVECs 的增生、迁移及管腔形成,这可能与 *Tum5* 下调 VEGF 在细胞上清液中的含量有关。

**【关键词】** 肿瘤抑素;血管生成抑制因子;重组蛋白/药理;血管内皮细胞;增生;迁移;管腔形成;人  
基金项目:天津市高等学校科技发展计划项目(20120128)

### Inhibition of adenovirus-mediated recombinant *Tum5* gene overexpression on human umbilical vein endothelial cells in physiological status

Jia Yurong, Yang Wei, Zhang Hong, Zhang Yan, Sun Jing

Tianjin Medical University Eye Hospital, Tianjin Medical University Eye Institute, College of Optometry and Ophthalmology, Tianjin Medical University, Tianjin 300384, China

Corresponding authors: Zhang Yan, Email:yanzhang04@tmu.edu.cn; Sun Jing, Email:jingsun09@tmu.edu.cn

**【Abstract】** **Background** Tumstatin is the most active endogenous angiogenesis inhibitor, which has a marked inhibitory effect on pathological neovascularization, and *Tum5* is an angiogenesis inhibitors fragment of full-length tumstatin. **Objective** This study was to investigate the effects of adenovirus-mediated overexpression of recombinant *Tum5* gene on the proliferation, migration and tube formation of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in physiological status. **Methods** The empty adenoviral vector expressing green fluorescent protein

(rAd-GFP) and the viral vector expressing recombinant *Tum5* gene were constructed. The HUVECs cultured in RPMI1640 medium were divided into normal control group, empty vector group (rAd-GFP group) and *Tum5* gene infection group (rAd-GFP-*Tum5* group). The rAd-GFP and rAd-GFP-*Tum5* adenoviral particles at the density of  $1 \times 10^{10}$ /ml were added into the medium to infect the cells for 48 hours. The proliferation of the cells was assayed at 24, 48 and 72 hours by cell counting kit-8 (CCK-8) to evaluate the proliferative rate; the migration number of the cells was detected at 48 hours after infection by Transwell chamber; the tube formation number of the cells were detected by Matrigel method. The concentration of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cell supernatants was assayed by ELISA at 24, 48, and 72 hours following adenoviral infection.

**Results** The cultured cells showed green fluorescence in the rAd-GFP group and rAd-GFP-*Tum5* group under the inverted fluorescence microscope, and the infection efficiency of rAd-GFP and rAd-GFP-*Tum5* was 55.13% and 50.31%, respectively. No significant difference was found in cell proliferative rate among normal control group, rAd-GFP group and rAd-GFP-*Tum5* group both at 24 and 48 hours after infection (both at  $P > 0.05$ ), and the cell proliferative rate was significantly lower in the rAd-GFP-*Tum5* group than that in the normal control group and rAd-GFP group at 72 hours after infection (both at  $P < 0.01$ ). The migration number of the cells at 48 hours after infection was  $2\,260.25 \pm 930.44$ ,  $2\,370.00 \pm 441.06$  and  $723.75 \pm 363.80$  in the normal control group, rAd-GFP group and rAd-GFP-*Tum5* group, showing a significant difference among the groups ( $F = 8.524$ ,  $P = 0.008$ ), and the migrated cells were evidently decreased in the rAd-GFP-*Tum5* group compared with the rAd-GFP group and the normal control group (both at  $P < 0.01$ ). The tube number at 48 hours after infection was  $95.67 \pm 5.86$ ,  $88.00 \pm 4.58$  and  $20.67 \pm 3.51$  in the normal control group, rAd-GFP group and rAd-GFP-*Tum5* group, showing a significant difference among the groups ( $F = 226.498$ ,  $P < 0.01$ ), and the tube number in the rAd-GFP-*Tum5* group was significantly reduced in comparison with the normal control group and rAd-GFP group (both at  $P < 0.01$ ). The considerable differences in VEGF concentration in the cell supernatants were found in different groups and various time points ( $F_{\text{group}} = 73.260$ ,  $P < 0.01$ ;  $F_{\text{time}} = 73.477$ ,  $P < 0.01$ ), and VEGF concentration in the cell supernatants was significantly decreased in the rAd-GFP-*Tum5* group compared with the rAd-GFP group at both 48 hours and 72 hours (both at  $P < 0.01$ ).

**Conclusions** The overexpression of the recombinant *Tum5* can inhibit the proliferation, migration and tube formation of the HUVECs in physiological status, which may be associated with *Tum5*-mediated down-regulation of VEGF protein in the cell supernatant.

**[Key words]** Tumstatin; Angiogenesis inhibitors; Recombinant proteins/pharmacology; Endothelium, vascular; Cell proliferation; Cell migration; Tube formation; Humans

**Fund program:** Tianjin Science and Technology Development Plan Project (20120128)

肿瘤抑素是近年来发现的内源性血管抑制因子,来源于肾脏、胚胎和睾丸基底膜中被基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)降解的IV型胶原片段,IV型胶原可促进细胞的黏附、迁移、分化和生长,在血管的形成中起着重要作用<sup>[1]</sup>。IV型胶原由6条 $\alpha$ 链组成,每条链都包含N端的7S区、中间的3螺旋胶原区和C端的非胶原区3个区域<sup>[2]</sup>,IV型胶原的 $\alpha 3$ 链是最早被发现的引起肺肾出血综合征的自身抗原<sup>[3]</sup>。肿瘤抑素位于 $\alpha 3$ 链,相对分子质量为28 000,由244个氨基酸残基组成,包括IV型胶原 $\alpha 3$ 链非胶原区的232个氨基酸残基和中间3螺旋区的12个氨基酸残基,具有抑制肿瘤血管生成和肿瘤细胞活性的作用<sup>[2]</sup>,其中位于肿瘤抑素第54~132位氨基酸残基的*Tum5*片段是肿瘤抑素抗新生血管生成的活性片段,且不包含潜在的致病性抗原部分<sup>[4]</sup>。我们之前的研究表明,*Tum5*可以抑制氧诱导的视网膜新生血管和高糖诱导的RF6A细胞的增生、迁移及管腔形成<sup>[5-6]</sup>,

但*Tum5*对生理状态下人血管内皮细胞的影响尚不清楚,推测将外源性具有治疗作用的基因片段导入眼内,进而在眼内持久而高效地表达外源基因编码的蛋白质产物可达到治疗眼部疾病的目的。腺病毒载体具有装载外源基因片段容量大、感染能力强、表达效率高、安全性好等优点,作为基因载体已广泛用于基础及临床研究<sup>[7-11]</sup>。本研究以腺病毒为载体,用携带*Tum5*蛋白的重组腺病毒感染人脐静脉血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs),观察*Tum5*对生理状态下HUVECs的增生、迁移及管腔形成的影响及其可能的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 细胞来源** HUVECs购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

**1.1.2 主要试剂及仪器** 含体积分数10%胎牛血清

(fetal bovine serum, FBS)、质量分数 1% 青链霉素和质量分数 1% 谷氨酰胺的 RPMI1640 培养液(美国 Hyclone 公司);鼠源抗 HA-Tag 单克隆抗体、抗  $\beta$ -tubulin 抗体(美国 BD 公司);细胞蛋白提取试剂盒、BCA 试剂盒(北京康为世纪公司);细胞计数试剂盒(cell counting kit, CCK)-8(日本 Dojindo 公司);Quantikine 人血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) ELISA 试剂盒(美国 R&D 公司)。基质胶(Matrigel, 美国 BD 公司);Transwell 小室、细胞培养板(美国 Corning 公司);倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 构建携带 *Tum5* 基因的重组腺病毒** 以 BamH I 和 EcoR I 酶切下 pCMV-Tum5-MCS 质粒中含有 HA-Tag 和 Gluc 信号肽的 *Tum5* 基因序列,并连接到经 BamH I 和 EcoR I 双酶切开的腺病毒载体中,得到重组 *Tum5* 基因腺病毒表达载体(pHBAd-MCMV-Tum5-GFP)(本部分在天津医科大学第二医院构建完成)。然后将携带绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)的空载体(rAd-GFP)或 pHBAd-MCMV-Tum5-GFP 载体与腺病毒 Admax 大骨架(pHBAd-BHG)质粒共同转染人胚肾细胞(293A 细胞),进行腺病毒包装,获得 rAd-GFP 和 rAd-GFP-Tum5 病毒(与上海汉恒科

技生物有限公司合作完成)。  
**1.2.2 细胞培养与腺病毒感染** 用含体积分数 10% FBS、1% 青链霉素混合液和 1% 谷氨酰胺的 RPMI1640 培养液常规培养 HUVECs 至对数生长期,将 rAd-GFP 和 rAd-Tum5 病毒颗粒( $1 \times 10^{10}$ /ml)各 20  $\mu$ l 分别加入空载体组(rAd-GFP 组)和 rAd-GFP-Tum5 组的培养基中,正常对照组细胞进行常规培养。感染病毒后 2 h 更换为完全培养基,继续培养 48 h,倒置荧光显微镜下直接观察感染后细胞中 GFP 的表达及定位。任意选取 100 倍荧光显微镜下图片,计算病毒的感染效率。感染效率 = GFP 阳性细胞数/细胞总数  $\times 100\%$ 。

**1.2.3 Western blot 法检测各组细胞中 *Tum5* 蛋白的表达** 腺病毒感染后 48 h,采用常规胰蛋白酶消化法消化细胞并收集各组 HUVECs,用细胞蛋白提取试剂盒提取总蛋白,BCA 试剂盒测定蛋白质量浓度。各组培养细胞中取 30  $\mu$ g 蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转膜至 PVDF 膜,用质量分数 5% 脱脂牛奶封闭;分别以鼠源抗 HA-Tag 单克隆抗体和抗  $\beta$ -tubulin 抗体 4  $^{\circ}$ C 下孵育过夜;TBST 缓冲液(含 0.1% Tween 20)洗膜 3 次,每次 10 min;添加辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠二抗,室温下孵育 2 h, TBST 缓冲液洗膜 3 次,每

次 10 min;多光谱成像系统(美国 UVP 公司)显影、定影并拍照。采用 QUANTITY ONE 软件计算蛋白条带的灰度值,以  $\beta$ -tubulin 为内参,计算各组 *Tum5* 蛋白的相对表达量。 $Tum5$  蛋白相对表达量 = *Tum5* 蛋白条带灰度值/ $\beta$ -tubulin 蛋白条带灰度值。

**1.2.4 CCK-8 细胞计数法检测各组 HUVECs 增殖情况** 腺病毒感染后 48 h,用常规胰蛋白酶消化细胞并收集各组细胞,将细胞以  $8 \times 10^3$ /孔的密度接种于 96 孔板,每组设 6 个复孔。分别在细胞接种后 24、48 和 72 h 加入 CCK-8,每孔 10  $\mu$ l, 37  $^{\circ}$ C 下孵育 2 h,酶标仪检测波长为 450 nm 处的吸光度(A)值。细胞增生率 = 各组细胞 A 值/正常对照组 A 值  $\times 100\%$ 。

**1.2.5 Transwell 小室迁移实验检测各组 HUVECs 的迁移能力** 于腺病毒感染后 48 h 常规胰蛋白酶消化并收集细胞,根据文献[12]的方法进行 Transwell 迁移实验,每组设 5 个复孔,以  $1 \times 10^5$ /孔的密度接种于 Transwell 上层小室中,用含 1% FBS 的 RPMI1640 培养基培养细胞。下层小室加入收集的细胞培养上清液,继续培养 6 h,对上层小室底部外侧的细胞行结晶紫染色,10 倍显微镜下观察并拍照,计数迁移细胞数量。

**1.2.6 Matrigel 实验检测各组 HUVECs 管腔形成情况** 于腺病毒感染后 48 h 常规胰蛋白酶消化并收集细胞,根据文献[13-14]中的方法进行 Matrigel 实验,每组设 5 个复孔,以  $5 \times 10^5$ /孔的密度接种于铺有 Matrigel 的 24 孔板中继续培养 8 h,于光学显微镜下观察管腔形成的情况并拍照。

**1.2.7 ELISA 试剂盒检测各组细胞上清液中 VEGF 的质量浓度** 将 HUVECs 以  $1 \times 10^6$ /孔的密度接种到 6 孔板中,参照 1.2.2 步骤处理各组细胞;分别于腺病毒感染后 24、48 和 72 h 收集正常对照组、rAd-GFP 组以及 rAd-GFP-Tum5 组细胞培养上清液,并用 VEGF ELISA 试剂盒按说明书检测不同时间点各组细胞培养上清液中 VEGF 的质量浓度。

## 1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件(IBM SPSS Statistics Inc., Chicago, IL, USA)进行统计分析。各组数据资料经 Shapiro-Wilk 检验呈正态分布,以  $\bar{x} \pm s$  表示,各组数据经 Levene 检验方差齐。采用均衡分组单因素干预多水平分组的研究设计,正常对照组、rAd-GFP 组和 rAd-GFP-Tum5 组细胞增生率、迁移细胞数、管腔形成数的总体差异比较均采用单因素方差分析,不同培养时间点各组细胞培养上清液中 VEGF 蛋白质量浓度的总体比较采用两因素方差分析,组间多重比较采用



Tukey 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 腺病毒感染效率及细胞中 Tum5 蛋白的表达

倒置荧光显微镜下 rAd-GFP 组和 rAd-GFP-Tum5 组 HUVECs 中可见 GFP 绿色荧光,提示腺病毒感染细胞成功(图 1)。rAd-GFP 组和 rAd-GFP-Tum5 组的感染效率分别为 55.13% 和 50.31%。Western blot 检测结果显示,rAd-GFP-Tum5 组细胞可见清晰的 Tum5 蛋白表达条带,位于相对分子质量 14 000 处;正常对照组和 rAd-GFP 组在相应的相对分子质量处均未见 Tum5 蛋白表达条带(图 2)。

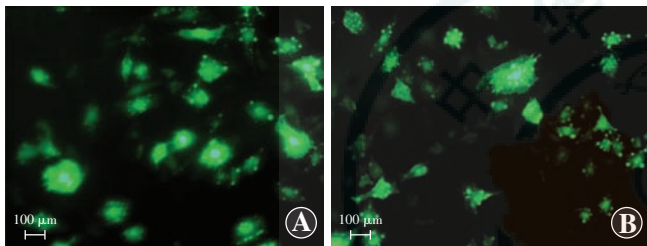


图 1 各组倒置荧光显微镜下细胞中腺病毒感染情况(标尺 = 100 μm, ×100) A: rAd-GFP 组细胞中可见 GFP 绿色荧光 B: rAd-GFP-Tum5 组细胞中可见 GFP 绿色荧光

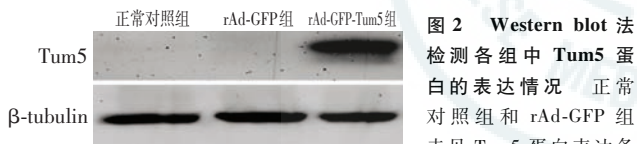


图 2 Western blot 法检测各组中 Tum5 蛋白的表达情况 正常对照组和 rAd-GFP 组未见 Tum5 蛋白表达条带,rAd-GFP-Tum5 组细胞中可见清晰的 Tum5 蛋白表达条带 rAd: 重组腺病毒;GFP:绿色荧光蛋白

### 2.2 各组细胞增殖情况比较

腺病毒感染后 48 h 进行细胞接种,细胞接种后 24 h 正常对照组、rAd-GFP 组和 rAd-GFP-Tum5 组细胞增殖率分别为(100.00±0.00)%、(140.47±17.40)% 和(129.65±36.07)% ,总体比较差异无统计学意义(F=3.591,P=0.053)(图 3A)。细胞接种后 48 h,正常对照组、rAd-GFP 组和 rAd-GFP-Tum5 组细胞增殖率分别为(100.00±0.00)%、(156.19±15.86)% 和(156.01±17.04)% ,总体比较差异无统计学意义(F=14.812,P=0.055)(图 3B)。细胞接种后 72 h,正常对照组、rAd-GFP 组和 rAd-GFP-Tum5 组细胞增殖率分别为(100.00±0.00)%、(108.77±5.25)% 和(79.28±2.51)% ,总体比较差异有统计学意义(F=78.914,P=0.001),其中 rAd-GFP-Tum5 组细胞增殖率显著低于正常对照组和 rAd-GFP 组,差异均有统计学意义(均 P<0.01)(图 3C)。

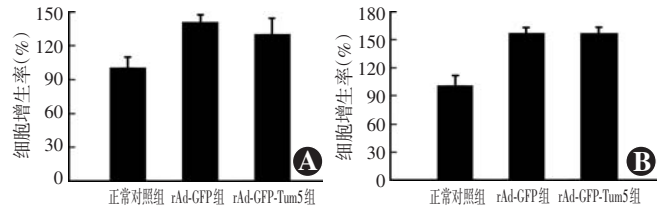


图 3 腺病毒感染后不同时间点各组细胞增殖率量化比较 A: 细胞接种后 24 h 各组细胞增殖率量化比较 F=3.591,P=0.053(单因素方差分析) B: 细胞接种后 48 h 各组细胞增殖率量化比较 F=14.812,P=0.055(单因素方差分析) C: 细胞接种后 72 h 各组细胞增殖率量化比较 F=78.914,P=0.001 与 rAd-GFP-Tum5 组比较,\*P<0.01(单因素方差分析,Tukey 检验,n=6) rAd: 重组腺病毒;GFP:绿色荧光蛋白

### 2.3 各组 HUVECs 的迁移情况比较

Transwell 小室迁移实验结果显示,正常对照组和 rAd-GFP 组迁移细胞数较多,呈紫色染色,rAd-GFP-Tum5 组结晶紫染色的细胞数明显减少(图 4A~C)。正常对照组、rAd-GFP 组和 rAd-GFP-Tum5 组迁移细胞数分别为(2 260.25±930.44)、(2 370.00±441.06) 和(723.75±363.80)个,组间迁移细胞数的总体比较差异有统计学意义(F=8.524,P=0.008),其中正常对照组与 rAd-GFP 组迁移细胞数量的比较差异无统计学意义(P>0.05),rAd-GFP-Tum5 组迁移细胞数较正常对照组和 rAd-GFP 组显著减少,差异均有统计学意义(均 P<0.01)(图 4D)。

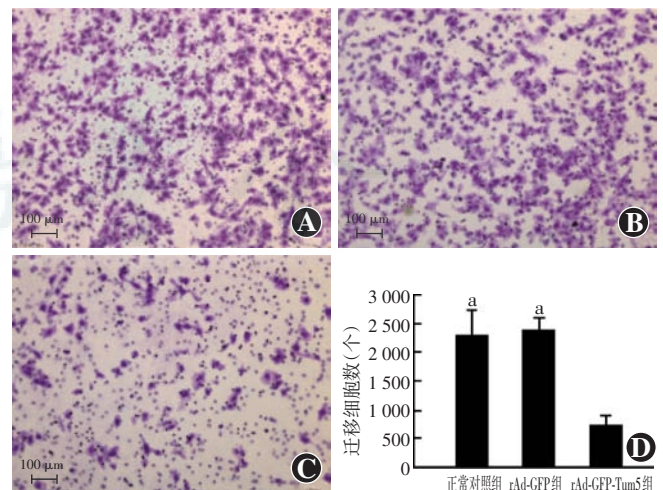


图 4 各组迁移细胞数比较 A: 正常对照组迁移细胞数量较多,细胞呈紫色染色(结晶紫 标尺 = 100 μm, ×100) B: rAd-GFP 组迁移细胞较多(结晶紫 标尺 = 100 μm, ×100) C: rAd-GFP-Tum5 组迁移细胞数明显减少(结晶紫 标尺 = 100 μm, ×100) D: 各组迁移细胞数量的量化比较 F=8.524,P=0.008. 与 rAd-GFP-Tum5 组比较,\*P<0.01(单因素方差分析,Tukey 检验,n=4) rAd: 重组腺病毒;GFP:绿色荧光蛋白

### 2.4 各组细胞管腔形成数量比较

Matrigel 实验结果显示,正常对照组和 rAd-GFP 组管腔形成数量较多且较完整,rAd-GFP-Tum5 组仅有少量管腔形成,且管腔不完整(图 5A~C)。正常对照组、rAd-GFP 组和 rAd-GFP-Tum5 组平均每张图片中管腔形成数目分别为(95.67±5.86)、(88.00±4.58)和(20.67±3.51)个,总体比较差异有统计学意义( $F=226.498, P<0.01$ ),其中正常对照组与 rAd-GFP 组细胞管腔形成数量的比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),rAd-GFP-Tum5 组细胞管腔形成数量较正常对照组和 rAd-GFP 组明显减少,差异均有统计学意义(均  $P<0.01$ )(图 5D)。

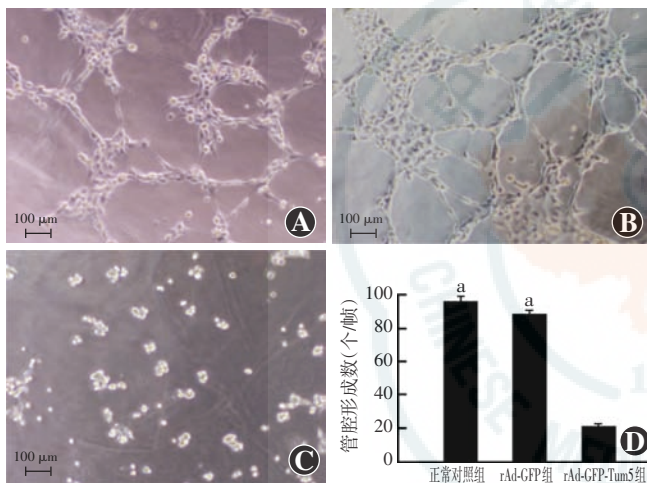


图 5 各组细胞管腔形成情况比较 A: 正常对照组管腔形成数较多,且管腔较完整(标尺=100 μm,×100) B: rAd-GFP 组管腔形成情况接近正常对照组(标尺=100 μm,×100) C: rAd-GFP-Tum5 组管腔形成明显较少,管腔不完整(标尺=100 μm,×100) D: 各组细胞管腔形成数量的量化比较  $F=226.498, P<0.01$ 。与 rAd-GFP-Tum5 组比较, $^*P<0.01$ (单因素方差分析,Tukey 检验, $n=3$ ) rAd: 重组腺病毒;GFP:绿色荧光蛋白

### 2.5 各组细胞上清液中 VEGF 蛋白质量浓度比较

腺病毒感染后 24、48 和 72 h 各组细胞培养上清液中 VEGF 蛋白质量浓度的总体比较差异均有统计学意义( $F_{\text{分组}}=73.260, P<0.01; F_{\text{时间}}=73.477, P<0.01$ );腺病毒感染后 24 h,正常对照组、rAd-GFP 组和 rAd-GFP-Tum5 组细胞培养上清液中 VEGF 质量浓度分别为(2.00±0.11)、(1.98±0.07)和(1.63±0.25) μg/ml,腺病毒感染后 48 h 分别为(5.27±0.73)、(6.10±0.28)和(4.77±0.13) μg/ml,感染后 72 h 分别为(7.72±0.93)、(8.89±0.64)和(6.53±0.76) μg/ml,其中感染后 48 h 和 72 h,rAd-GFP-Tum5 组 VEGF 质量浓度均明显低于 rAd-GFP 组,差异均有统计学意义(均  $P<0.01$ )(图 6)。

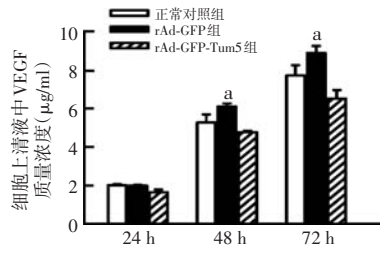


图 6 腺病毒感染后不同时间点各组细胞培养上清液中 VEGF 质量浓度的比较  $F_{\text{分组}}=73.260, P<0.01$ ;  $F_{\text{时间}}=73.477, P<0.01$ 。与各自时间点 rAd-GFP-Tum5 组比较, $^*P<0.01$ (两因素方差分析,Tukey 检验, $n=6$ ) VEGF:血管内皮生长因子;rAd:重组腺病毒;GFP:绿色荧光蛋白

### 3 讨论

肿瘤抑素的抗血管活性主要是通过与血管内皮细胞表面的精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(Arg-Gly-Asp, RGD)依赖性 $\alpha V \beta 3$ 整合素结合,进而抑制血管内皮细胞内特异性蛋白质的合成而实现的<sup>[15-16]</sup>。目前,肿瘤抑素主要用于肿瘤的治疗<sup>[17-18]</sup>,而在眼科领域的研究报道较少,且由于其相对分子质量大、潜在的免疫原性及可溶性低等特性限制了其临床应用<sup>[19-20]</sup>。本研究在 Tum5 基因的前端加入优化的分泌型荧光素酶(Glu)信号肽片段,使感染的细胞表达分泌型 Tum5 肽<sup>[21-22]</sup>,从而以自分泌和旁分泌的形式发挥作用。已有研究证实 Tum5 对病理性视网膜血管新生过程有抑制作用,但其对生理性血管内皮细胞的生物学活性是否发挥作用受到关注。本实验中以 5 型腺病毒为载体,将重组 Tum5 基因片段导入 HUVECs 中,发现细胞增生数量、细胞迁移数量及管腔形成数量均低于常规培养的 HUVECs 和导入空载体细胞,而常规培养的 HUVECs 与导入空载体的细胞间细胞增生数量、细胞迁移数量及管腔形成数量接近。本研究结果还显示,各组细胞培养上清液中 VEGF 质量浓度随培养时间的延长而增加,病毒感染后 24 h 正常培养细胞、空载体导入细胞和导入 Tum5 的细胞上清液中 VEGF 质量浓度无明显变化,但病毒感染后 48 h 和 72 h 导入 Tum5 的细胞上清液中 VEGF 质量浓度明显低于正常培养细胞和空载体导入细胞。以往的研究显示,给予小鼠生理浓度的 Tum5 可抑制病理性新生血管的生成,但对正常的血管发育和修复组织中的血管形成过程无明显影响,这主要是由于 $\alpha V \beta 3$ 在病理性的血管内皮上呈高表达,而在正常的血管内皮细胞上的表达量很低所致<sup>[23]</sup>。本研究结果与上述文献报道结果并不矛盾,因为本实验利用腺病毒载体使 Tum5 在 HUVECs 中过表达,使 Tum5 在 HUVECs 中的表达远高于生理状态下的表达量,说明超过生理含量的 Tum5 会抑制正常血管内皮细胞的增生、迁移和管腔形成。

Tum5 对 HUVECs 生物学行为的抑制作用可能是通过抑制 VEGF 的表达而实现的,因为细胞移行和管



腔形成是在腺病毒感染后 54 ~ 56 h 进行的,这与细胞在感染 Tum5 腺病毒后 48 ~ 72 h 细胞培养上清液中 VEGF 质量浓度显著下降的结果一致。下一步,我们拟对转染了 rAd-Tum5 的细胞给予外源性 VEGF 后是否可以抵消 Tum5 对 HUVECs 的抑制作用进行研究。

综上所述,本研究结果表明腺病毒介导的 Tum5 重组基因的过表达对生理状态下 HUVECs 的增生、迁移及管腔形成具有显著的抑制作用,这些作用可能是通过 Tum5 下调血管内皮细胞中 VEGF 的表达和分泌来实现的。本研究结果为用腺病毒介导的 Tum5 治疗眼部新生血管性疾病及其最佳剂量的选择提供了参考依据。

### 参考文献

- [1] Grant MA, Kalluri R. Structural basis for the functions of endogenous angiogenesis inhibitors[J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2005, 70:399-410. DOI:10.1101/sqb.2005.70.017.
- [2] Maeshima Y, Colorado PC, Torre A, et al. Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane[J]. J Biol Chem, 2000, 275 (28) : 21340 - 21348. DOI: 10.1074/jbc.M001956200.
- [3] Saus J, Wieslander J, Langeveld JP, et al. Identification of the Goodpasture antigen as the alpha 3 (IV) chain of collagen IV [J]. J Biol Chem, 1988, 263 (26) : 13374 - 13380.
- [4] Esipov R, Beyrakhova K, Likhvantseva V, et al. Antiangiogenic and antivascular effects of a recombinant tumstatin-derived peptide in a corneal neovascularization model[J]. Biochimie, 2012, 94 (6) : 1368 - 1375. DOI:10.1016/j.biochi.2012.03.007.
- [5] 孙靖, 杨伟, 张琰, 等. 腺病毒介导的重组 Tum5 基因抑制视网膜新生血管的实验研究[J]. 中华眼底病杂志, 2015, 31 (4) : 371 - 376. DOI:10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2015.04.015.  
Sun J, Yang W, Zhang Y, et al. Adenovirus-mediated intravitreal delivery of Tum5 inhibits retinal neovascularization in a mouse model of oxygen-induced retinopathy [J]. Chin J Ocul Fundus Dis, 2015, 31 (4) : 371 - 376. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2015.04.015.
- [6] 杨伟, 张琰, 孙靖, 等. 腺病毒介导 Tum5 重组基因对高糖刺激下恒河猴视网膜血管内皮细胞增生、迁移及管腔形成的影响[J]. 中华眼底病杂志, 2015, 31 (5) : 467 - 471. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2015.05.014.  
Yang W, Zhang Y, Sun J, et al. The effect of adenovirus-mediated recombinant Tum5 gene expression on Rhesus retinal vascular endothelial cells under high glucose [J]. Chin J Ocul Fundus Dis, 2015, 31 (5) : 467 - 471. DOI:10.3760/cma.j.issn.1005-1015.2015.05.014.
- [7] Ginn SL, Alexander IE, Edelstein ML, et al. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012-an update[J]. J Gene Med, 2013, 15 (2) : 65 - 77. DOI:10.1002/jgm.2698.
- [8] McClements ME, MacLaren RE. Gene therapy for retinal disease [J]. Transl Res, 2013, 161 (4) : 241 - 254. DOI:10.1016/j.trsl.2012.12.007.
- [9] Li Z, He T, Du K, et al. Inhibition of oxygen-induced ischemic retinal neovascularization with adenoviral 15-lipoxygenase-1 gene transfer via up-regulation of PPAR- $\gamma$  and down-regulation of VEGFR-2 expression [J/OL]. PLoS One, 2014, 9 (1) : e85824 [2016-10-14]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24465728. DOI: 10.1371/journal.pone.0085824.
- [10] MacLaren RE, Groppe M, Barnard AR, et al. Retinal gene therapy in patients with choroideremia: initial findings from a phase 1/2 clinical trial [J]. Lancet, 2014, 383 (9923) : 1129 - 1137. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)62117-0.
- [11] Ameri H, Liu H, Liu R, et al. TWEAK/Fn14 pathway is a novel mediator of retinal neovascularization [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014, 55 (2) : 801 - 813. DOI:10.1167/iovs.13-12812.
- [12] Bai YJ, Huang LZ, Xu XL, et al. Polyethylene glycol-modified pigment epithelial-derived factor: new prospects for treatment of retinal neovascularization [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2012, 342 (1) : 131 - 139. DOI:10.1124/jpet.112.192575.
- [13] Yu W, Bai Y, Han N, et al. Inhibition of pathological retinal neovascularization by semaphorin 3A [J]. Mol Vis, 2013, 19 : 1397 - 1405.
- [14] Ding Q, Tian XG, Li Y, et al. Carvedilol may attenuate liver cirrhosis by inhibiting angiogenesis through the VEGF-Src-ERK signaling pathway [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21 (32) : 9566 - 9576. DOI: 10.3748/wjg.v21.i32.9566.
- [15] Maeshima Y, Colorado PC, Kalluri R, et al. Two RGD independent  $\alpha\beta 3$  integrin binding sites on tumstatin regulate distinct antitumor properties [J]. J Biol Chem, 2000, 275 (31) : 23745 - 23750.
- [16] Sudhakar A, Sugimoto H, Yang C, et al. Human tumstatin and human endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by  $\alpha v\beta 3$  and  $\alpha 5\beta 1$  integrins [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100 (8) : 4766 - 4771. DOI:10.1073/pnas.0730882100.
- [17] Maeshima Y, Colorado PC, Torre A, et al. Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane [J]. J Biol Chem, 2000, 275 (28) : 21340 - 21348. DOI: 10.1074/jbc.M001956200.
- [18] Sudhakar A, Boosani CS. Inhibition of tumor angiogenesis by tumstatin: insights into signaling mechanisms and implications in cancer regression [J]. Pharm Res, 2008, 25 (12) : 2731 - 2739. DOI:10.1007/s11095-008-9634-z.
- [19] Schellekens H. The immunogenicity of therapeutic proteins [J]. Discov Med, 2010, 9 (49) : 560 - 564.
- [20] Boosani CS, Varma AK, Sudhakar A. Validation of different systems for tumstatin expression and its *in-vitro* and *in-vivo* activities [J]. J Cancer Sci Ther, 2010, 2009 : 8 - 18. DOI:10.4172/1948-5956.1000002.
- [21] Wurdinger T, Badr C, Pike L, et al. A secreted luciferase for *ex vivo* monitoring of *in vivo* processes [J]. Nat Methods, 2008, 5 (2) : 171 - 173. DOI:10.1038/nmeth.1177.
- [22] Tannous BA, Kim DE, Fernandez JL, et al. Codon-optimized Gaussia luciferase cDNA for mammalian gene expression in culture and *in vivo* [J]. Mol Ther, 2005, 11 (3) : 435 - 443. DOI:10.1016/j.yithe.2004.10.016.
- [23] Hamano Y, Zeisberg M, Sugimoto H, et al. Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin [J]. Cancer Cell, 2003, 3 (6) : 589 - 601.

(收稿日期:2017-03-26)

(本文编辑:尹卫靖 张宇)