

重组 hFGF-7 腺病毒对角质形成细胞的生物学效应

吴晓萍, 曾耀英

(暨南大学生命科学技术学院组织移植与免疫实验中心, 广东 广州 510632)

[摘要] 目的:研究重组腺病毒导入人成纤维细胞生长因子7(hFGF-7)对人皮肤角质形成细胞(HaCat)的生物学效应。方法:通过倍比稀释和感染实验,测定重组腺病毒 rAd-hFGF-7 的滴度;流式细胞术检测重组腺病毒感染 HaCat 细胞的感染效率;MTT 法检测 rAd-hFGF-7 对 HaCat 细胞增殖的影响;重组腺病毒对 HaCat 细胞周期的影响通过流式细胞术进行检测。结果:高滴度重组腺病毒可高效感染 HaCat 细胞,其促细胞增殖作用随着重组腺病毒 MOI 值的增加而增强,当 MOI 值为 50 时,感染细胞进入 S 期和 G₂ 期的细胞比率显著增加。结论:重组腺病毒 rAd-hFGF-7 可促进 HaCat 细胞的增殖,改变 HaCat 细胞周期。

[关键词] 成纤维细胞生长因子7; 腺病毒; 细胞增殖; 细胞周期

[中图分类号] Q786 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1000-9965(2009)06-0636-04

The biological effects of recombinant hFGF-7 adenovirus on keratinocytes

WU Xiao-ping, ZENG Yao-ying

(Institute of Tissue Transplantation and Immunology, College of Life Science and Technology,
Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[Abstract] **Aim:** To investigate the biological effects of recombinant adenovirus rAd-hFGF-7 on keratinocytes. **Methods:** The titer of recombinant adenovirus was assessed by doubling dilutions and infection experiments. Flow cytometry was applied to detect the infection efficacy of recombinant adenovirus infecting HaCat cells. The influences of the recombinant adenovirus on the proliferation and cell cycle of HaCat cells were checked by MTT and flow cytometry respectively. **Results:** The recombinant adenovirus rAd-hFGF-7 could effectively infect HaCat cells. Enhanced stimulation to cell proliferation was observed in HaCat cells infected with increasing MOI of recombinant adenovirus. Cell ratio in S phase and G₂ phase was increased when HaCat cells was infected with rAd-hFGF-7 (MOI of 50). **Conclusion:** The recombinant adenovirus rAd-hFGF-7 could promote cell proliferation and change cell cycle of HaCat cells.

[Key words] fibroblast growth factor 7; adenovirus; proliferation; cell cycle

[收稿日期] 2009-09-09

[基金项目] 国家高技术研究发展计划项目 863 计划项目(2007AA02Z110);广东省自然科学基金项目(9151064001000031)

[作者简介] 吴晓萍(1971-),女,副研究员,研究方向:细胞因子的构效关系及其作用机制

通讯作者:曾耀英,男,研究员,博士生导师,Tel: 020-85220732;E-mail: tzengy@jnu.edu.cn

根据不同的序列同源性和系统发育规律,成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factors, FGFs)可分为6类亚家族,FGF-7是其中由FGF-3、FGF-7、FGF-10和FGF-22组成的一类亚家族成员之一^[1]。FGFs通过结合和激活酪氨酸激酶受体家族,发挥促进有丝分裂、细胞保护、促血管生成和内分泌调节作用,调控一系列的生长和发育过程,与机体的生理和病理过程密切相关^[2]。FGF-7也称角质细胞生长因子,特异地表达在间充质细胞中,与上皮细胞细胞膜上的受体作用,特异性促进上皮细胞的增殖、分化和迁移^[3-4]。由于FGF-7对多种组织的上皮细胞如肺泡上皮细胞,肝实质细胞,胃肠细胞,尿道上皮细胞和各种鳞状上皮的角化细胞等具有促增殖作用,因此对机体上皮组织的损伤具有重要的修复作用,具有潜在的临床应用前景^[5-6]。本研究小组前期采用AdEasy系统构建了分泌表达型重组hFGF-7腺病毒^[7],证实获得的重组腺病毒颗粒感染HaCat细胞后可分泌表达重组hFGF-7,本研究进一步探讨重组腺病毒导入hFGF-7对人皮肤角质形成细胞的生物学效应。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

重组腺病毒 rAd-hFGF-7 由本室构建;含空载体的腺病毒 Ad 由暨南大学季煜华博士惠赠;HEK-293 和 HaCat 细胞株购自武汉大学保藏中心;Dulbecco 改良 Eagle 培养基(dulbecco's modified eagle media, DMEM)(高糖)和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 Gibco 公司;胰酶、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)、碘化丙锭(propidium iodide, PI)为 Sigma 公司产品。二氧化碳培养箱为 Sheldon LKB 产品;自动酶标分析仪购自伯乐(Bio-Rad)公司;流式细胞仪为美国 BD(Becton, Dickinson and Company)公司产品。

1.2 方法

(1)重组腺病毒滴度的测定 将 HEK-293 细胞按每孔 1.0×10^4 /100 μ L 悬液接种于 96 孔板;用含体积分数 2% FBS 的高糖 DMEM 对重组腺病毒进行系列稀释至 1.0×10^{-12} ;在已接种细胞悬液的 96 孔板中,每行 12 个孔检测 1 个稀释度,设置对照孔,其

他稀释度的加样依此类推;培养 10 d 后在荧光倒置显微镜下观察并计算每行出现细胞病变效应(Cytopathic effect, CPE)的孔数和阳性孔的比率;按 KÄRBER 计算公式: $T = 10^{1+d(S-0.5)-0.7}$,其中 d 为 Log 10, S 为各稀释度阳性孔的比率之和,计算待测重组腺病毒的滴度 T 。

(2)重组腺病毒感染 HaCat 细胞的感染效率检测 HaCat 细胞按每孔 1.0×10^5 接种于 12 孔板中,待细胞 80% 融合时,用新鲜培养基洗 1 次,分别加入 500 μ L 用新鲜培养基稀释的感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 10、25 和 50 的空载体腺病毒 Ad 和重组腺病毒 rAd-hFGF-7;培养 48 h 后,将细胞重悬于 300 μ L PBS,用流式细胞仪通过检测绿色荧光蛋白(GFP)的荧光强度以分析重组腺病毒感染 HaCat 细胞的感染效率。

(3)重组腺病毒对角质形成细胞增殖的影响 用含体积分数 5% FBS 的 DMEM 培养液培养角质形成细胞 HaCat,按每孔 1.0×10^4 细胞铺 96 孔板;培养 24 h 后,饥饿培养 24 h;以空载体腺病毒 Ad 和重组腺病毒 rAd-hFGF-7 分别感染 HaCat 细胞,各设 3 组不同的 MOI 感染组和 1 组空白对照组,每 3 孔为 1 平行组;继续培养 72 h,加入 20 μ L MTT(质量分数为 5 mg/mL),培养 4 h 后弃去培养液,每孔加入 150 μ L 的二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO),室温放置 20 min 后,在 570 nm 波长下测 A 值。

(4)重组腺病毒感染对 HaCat 细胞周期的影响 HaCat 细胞按每孔 1.0×10^5 接种于 12 孔板中,待细胞 80% 融合时,以含 MOI 为 50 的空载体腺病毒 Ad 和带有目的基因的重组腺病毒 rAd-hFGF-7 分别感染 HaCat 细胞;培养 48 h 后,将细胞重悬于 300 μ L PBS 中;用 700 μ L 预冷的体积分数为 70% 乙醇固定 30 min, PBS 洗 2 次,用配好的 PI 重悬细胞,避光 15 min,流式细胞仪检测细胞周期。

1.3 统计学分析

实验结果以(均数 \pm 标准差)($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 10.0 医学统计软件进行 one-way ANOVA 分析, $P < 0.05$ 具有统计学差异。

2 结果

2.1 重组腺病毒滴度的测定

通过倍比稀释和感染实验,测得空载体腺病毒

Ad 和重组腺病毒 rAd-hFGF-7 各稀释度的阳性孔比率之和(S)后,分别代入公式 $T = 10^{1+d(S-0.5)-0.7}$, 计算得到空载体腺病毒 Ad 和重组腺病毒 rAd-hFGF-7 的滴度分别为 7.94×10^{10} PFU/L 和 5.01×10^{10} PFU/L。

2.2 重组腺病毒感染 HaCat 细胞的感染效率

由于重组腺病毒表达 GFP, 可通过流式细胞仪检测不同 MOI 值的重组腺病毒感染 HaCat 细胞的效率。检测结果显示, 重组腺病毒感染 HaCat 细胞 48 h, 随着 MOI 值的增加, GFP 阳性细胞数增加, 当 MOI 为 50 时, 空载体腺病毒 Ad 和重组腺病毒 rAd-hFGF-7 感染组的感染效率分别为 $(55.78 \pm 3.72)\%$ 和 $(57.03 \pm 2.98)\%$ (图 1)。

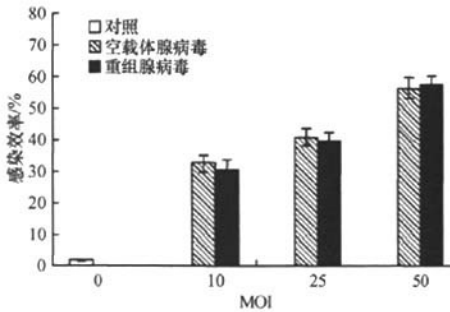


图 1 重组腺病毒感染 HaCat 细胞的感染效率

2.3 重组腺病毒对 HaCat 细胞增殖的影响

MTT 结果显示, 重组腺病毒 rAd-hFGF-7 感染 HaCat 细胞后, 可促进 HaCat 细胞的增殖, 其促增殖作用随着重组腺病毒 MOI 值的增加而增强, 与对照组和空载体腺病毒 Ad 感染组相比, 差异显著 ($P < 0.01$, 图 2)。

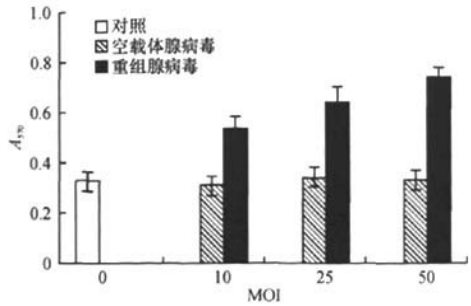


图 2 重组腺病毒感染对 HaCat 细胞增殖的影响

2.4 重组腺病毒感染对 HaCat 细胞周期的影响

采用 PI 染色检测 MOI 值为 50 的重组腺病毒 rAd-hFGF-7 感染对 HaCat 细胞周期的影响 (图 3), 显示导入的 hFGF-7 改变了 HaCat 的细胞周期, G_1 期的细胞比率较对照组和空载体腺病毒 Ad 感染组的显著减少, 进入 S 期和 G_2 期的细胞比率较对照组和空载体腺病毒 Ad 感染组显著增加 ($P < 0.05$)。用 ModFit 软件进行细胞周期分析的结果 (图 4)。

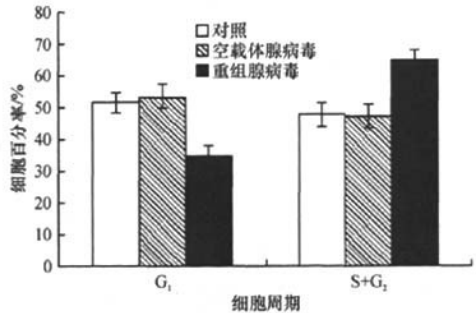
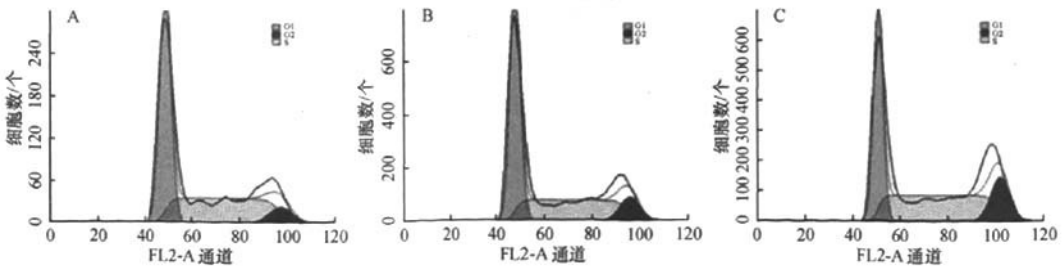


图 3 重组腺病毒感染对 HaCat 细胞周期的影响



A: 对照组; B: 空载体腺病毒感染组; C: 重组腺病毒感染组

图 4 Modfit 分析细胞周期

3 讨论

FGF-7 所具有的独特的功能特性包括对特异硫酸肝素和在上皮细胞上表达的成纤维细胞生长因子受体异构体 FGFR2IIIb 的专一性^[8-9],赋予其更优越的用药安全性,使其成为人们感兴趣的药物分子。目前成功研发 FGF-7 的仅有美国 Amgen 公司,其研发的静脉注射液 Kevance 含重组 hFGF-7,于 2004 年和 2005 年先后获美国 FDA 和欧盟批准上市,用于减少正在进行放疗以准备骨髓移植的恶性血液病患者患口腔粘膜炎的几率,或缩短该疾病的发病时间,是目前世界上唯一 1 种获准适于该适应症治疗的 FGFs 家族蛋白药物^[10-11]。

除采用基因工程的方法获得重组蛋白用于治疗外,另一种新兴的治疗途径是通过一些载体系统将治疗基因导入细胞内进行基因治疗。本研究采用复制缺陷型的腺病毒载体,将 hFGF-7 基因导入靶细胞 HaCat 中,结果显示重组腺病毒高效感染 HaCat 细胞后表达的 hFGF-7 不仅显著促进 HaCat 细胞的增殖,其促增殖作用随着重组腺病毒 MOI 值的增加而增强,而且改变了 HaCat 的细胞周期, G_1 期的细胞比率显著减少,进入 S 期和 G_2 期的细胞比率增加,表明所构建的重组腺病毒感染靶细胞后可产生具有生物学活性的细胞因子 hFGF-7,为应用 hFGF-7 进行基因治疗等研究提供实验依据。

[参考文献]

- [1] BEENKEN A, MOHAMMADI M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2009, 8 (3): 235 - 253.
- [2] DAILEY L, AMBROSETTI D, MANSUKHANI A, et al. Mechanisms underlying differential responses to FGF signaling[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005, 16(2): 233 - 247.
- [3] RAY P. Protection of epithelial cells by keratinocyte growth factor signaling[J]. *Proc Am Thorac Soc*, 2005, 2(3): 221 - 225.
- [4] AUF DEMKELLER U, KRAMPERT M, KÄMIN A, et al. Keratinocyte growth factor: effects on keratinocytes and mechanisms of action[J]. *Eur J Cell Biol*, 2004, 83 (11 - 12): 607 - 612.
- [5] FINCH P W, RUBIN J S. Keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor 7, a homeostatic factor with therapeutic potential for epithelial protection and repair[J]. *Adv Cancer Res*, 2004, 91: 69 - 136.
- [6] SLONINA D, HOINKIS C, DÖRR W. Effect of keratinocyte growth factor on radiation survival and colony size of human epidermal keratinocytes in vitro[J]. *Radiat Res*, 2001, 156(6): 761 - 766.
- [7] 吴晓萍, 曾耀英, 贺芳. 腺病毒介导重组 hKGF 基因转染 HaCat 细胞及其表达[J]. *中国生物工程杂志*, 2007, 27(3): 1 - 5.
- [8] RUBIN J S, OSADA H, FINCH P W, et al. Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86(3): 802 - 806.
- [9] RUBIN J S, BOTTARO D P, CHEDID M, et al. Keratinocyte growth factor as a cytokine that mediates mesenchymal-epithelial interaction[J]. *EXS*, 1995, 74: 191 - 214.
- [10] RADTKE M L, KOLESAR J M. Palifermin (Kevance) for the treatment of oral mucositis in patients with hematologic malignancies requiring hematopoietic stem cell support[J]. *J Oncol Pharm Pract*, 2005, 11(3): 121 - 125.
- [11] MCDONNELL A M, LENZ K L. Palifermin: role in the prevention of chemotherapy- and radiation-induced mucositis[J]. *Ann Pharmacother*, 2007, 41(1): 86 - 94.

[责任编辑:朱颖娜]