

- 4 Yan J, Wu K, Tang R, *et al.* Effect of maternal age on the outcomes of in vitro fertilization and embryo transfer (IVF - ET) [J]. *Sci China Life Sci*, 2012, 5(8): 694 - 698
- 5 Ku SY, Kim SD, Jee BC, *et al.* Clinical efficacy of body mass index as predictor of in vitro fertilization and embryo transfer outcomes [J]. *J Korean Med Sci*, 2006, 21(2): 300 - 303
- 6 Martin JR, Mahutte NG, Arici A, *et al.* Impact of duration and dose of gonadotrophins on IVF outcomes [J]. *Reprod Biomed Online*, 2006, 13(5): 645 - 650
- 7 Chuang M, Zapantis A, Taylor M, *et al.* Prolonged gonadotropin stimulation is associated with decreased ART success [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2010, 27(12): 711 - 717
- 8 Yeung WS, Li RH, Cheung TM, *et al.* Frozen - thawed embryo transfer cycles [J]. *Hong Kong Med J*, 2009, 15(6): 420 - 426
- 9 杨硕, 陈新娜, 乔杰, 等. GnRH 拮抗剂固定方案和 GnRH 激动剂长方案在卵巢储备功能正常的不孕患者初次 IVF - ET 中的疗效比较 [J]. *中华妇产科杂志*, 2012, 47(4): 245 - 249
- 10 Loutradis D, Drakakis P, Vomvolaki E, *et al.* Different ovarian stimulation protocols for women with diminished ovarian reserve [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2007, 24(12): 597 - 611
- 11 O'Dea L, O'Brien F, Currie K, *et al.* Follicular development induced by recombinant luteinizing hormone (LH) and follicle - stimulating hormone (FSH) in anovulatory women with LH and FSH deficiency: evidence of a threshold effect [J]. *Curr Med Res Opin*, 2008, 24(10): 2785 - 2793
- 12 Gougeon A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses [J]. *Endocr Rev*, 1996, 17(2): 121 - 155
- 13 Lekamge DN, Lane M, Gilchrist RB, *et al.* Increased gonadotrophin stimulation does not improve IVF outcomes in patients with predicted poor ovarian reserve [J]. *J Assist Reprod Genet*, 2008, 25(11 - 12): 515 - 521
- 14 李洁, 刘倍余. 识别促性腺激素释放激素激动剂对垂体卵巢轴调节抑制程度及意义 [J]. *生殖医学杂志*, 2011, 20(1): 17 - 21
- 15 Heijnen EM, Eijkemans MJ, Hughes EG, *et al.* A meta - analysis of outcomes of conventional IVF in women with polycystic ovary syndrome [J]. *Hum Reprod Update*, 2006, 12(1): 13 - 21
- (收稿日期: 2013 - 09 - 01)
(修回日期: 2013 - 10 - 07)

VEGF165 基因重组腺相关病毒构建及转染猪骨髓间充质干细胞的研究

夏利龙 朱成楚 陈保富 张 波 陈 宇 胡炳川 张 健

摘 要 **目的** 构建携带人血管内皮细胞生长因子(hVEGF)的重组腺相关病毒载体,在体外转染猪骨髓间充质干细胞并观察其表达。**方法** 细胞 AAV 包装质粒 pAAV - IRES - ZsGreen 及含 hVEGF 的质粒经 EcoR I + BamH I 双酶切、连接,构建 pAAV - hVEGF165 - IRES - ZsGreen 载体,采用磷酸钙法转染 293AAV 细胞系,获得 rAAV2 - hVEGF165 及对照重组腺相关病毒,real - time PCR 法测定病毒效价。Western blot 检测重组 rAAV2 - hVEGF165 在猪骨髓间充质干细胞的表达,MTS 法检测 VEGF 蛋白活性。**结果** 成功构建 rAAV2 - hVEGF165 重组腺相关病毒载体,rAAV2 - hVEGF165 经双酶切和测序鉴定正确,real - time PCR 法测定病毒效价为 5×10^{12} vg/ml。转染 rAAV2 - hVEGF165 的猪骨髓干细胞能够有效表达 VEGF 蛋白,并能促进血管内皮细胞的增殖。**结论** 成功构建 rAAV2 - hVEGF165 重组腺相关病毒载体,并能在猪骨髓间充质干细胞中有效转染和表达,为进一步探索 rAAV2 - hVEGF165 对治疗缺血性心肌疾病的研究提供实验基础。

关键词 血管内皮生长因子 腺相关病毒 心肌缺血 骨髓间充质干细胞

[中图分类号] R541 [文献标识码] A

Construction of Recombinant Adeno - associated Viruse Vector Carrying Human Vascular Endothelial Growth Factor Gene and Its Expression in Porcine Mesenchymal Stem Cells. Xia Lilong, Zhu Chengchu, Chen Baofu, *et al.* Department of Thoracic Surgery, Taizhou Hospital Affiliated to Wenzhou Medical University, Zhejiang 317000, China

Abstract Objective To construct recombinant adeno - associated viruse vector carrying human vascular endothelial growth factor gene, and assess its expression in porcine mesenchymal stem cells in vitro. **Methods** AAV packaging plasmid pAAV - IRES - ZsGreen

基金项目:浙江省公益技术应用研究基金资助项目(2011C37083)

作者单位:317000 临海,温州医科大学附属台州医院

通讯作者:朱成楚,电子信箱:xialilong1987@sina.com

and plasmid containing hVEGF were digested by EcoR I + BamH I. The digestion products were connected. And pAAV - hVEGF165 - IRES - ZsGreen vector was generated. After transfecting into 293AAV cells by calcium phosphate method, rAAV2 - hVEGF165 and the control recombinant adeno - associated virus were obtained, viral titer was determined by real - time PCR. The expression of recombinant rAAV2 - hVEGF165 in porcine mesenchymal stem cells was detected by western blot and MTS assay. **Results** rAAV2 - hVEGF165 recombinant adeno - associated virus vector was successfully constructed and was verified by double digestion and DNA sequencing. The purified recombinant virus had a high titer of 5×10^{12} vg/ml. VEGF can be efficiently expressed and the proliferation of vascular endothelial cell was promoted after porcine mesenchymal stem cells transfected with AAV2 - hVEGF165. **Conclusion** rAAV2 - hVEGF165 was constructed successfully, which had an effectively transfection and high expression in porcine mesenchymal stem cells. It provided an experimental basis to further explore the effect of rAAV2 - hVEGF165 in the therapy of ischaemic heart disease.

Key words VEGF; Adeno - associated virus; Myocardial ischemia; MSCs

VEGF (vascular endothelial growth factor) 是一种重要的促血管生成因子, VEGF 基因治疗冠心病心肌梗死的研究目前也进入临床试验阶段。由于腺相关病毒 (AAV) 具有目的基因表达持久、免疫反应小、无致癌性等优点, 成为近年来基因治疗中最为常用的病毒载体之一^[1]。利用促血管生成因子修饰的干细胞可以促进缺血心肌的血管形成, 本研究旨在构建含 VEGF 基因的重组腺相病毒载体, 观察其对猪骨髓间充质干细胞感染效率及转染后表达情况, 为下一步的研究工作提供实验基础。

材料与方法

1. 主要试剂: 细胞 AAV 包装质粒 pAAV - IRES - ZsGreen、JM109 感受态细菌、HET 转染试剂盒 (深圳百恩维生物科技有限公司), pUC57 - hVEGF165 真核表达质粒、293AAV 细胞系、血管内皮细胞 VEC (由本实验室保存), EcoR I、BamH I 限制性内切酶 (美国 NEB 公司), Qiagen 质粒抽提试剂盒 (德国 Qiagen 公司), DNA 测序 (美国 Invitrogen 公司), VEGF 兔抗人抗体 (Abcam 公司), MTS 试剂盒 (Promega 公司)。

2. pAAV - hVEGF165 - IRES - ZsGreen 载体的构建: 将质粒 pAAV - IRES - ZsGreen 和 pUC57 - hVEGF165 用限制性内切酶 EcoR I 和 BamH I 双酶切后, 将酶切产物连接, 转化 JM109 感受态细菌, 于 Ampicillin 抗性的 LB 平板上挑取单菌落、培养, 用小量质粒抽提试剂盒抽提质粒, 并分别用 EcoR I + BamH I 做酶切鉴定。鉴定正确后, 再行测序鉴定。

3. pAAV - hVEGF165 - IRES - ZsGreen 转染 293AAV 细胞: 用胰酶消化收集 293AAV 细胞, 以适当完全培养基稀释细胞至 2×10^6 /ml, 接种 2.5ml 细胞稀释液至 10cm 培养皿, 当细胞贴壁后即可开始转染。采用磷酸钙法高效 HET 转染试剂盒转染目的质粒到细胞, 方法按试剂盒说明书操作。转染 48h 后, 用吸管将细胞从培养皿中吹下来收集到离心管中, 置于 -80℃ 和 37℃ 水浴锅中反复冻融 3 次, 收集上清, 浓缩, 即获得 rAAV2 - hVEGF165 病毒。

4. rAAV2 - hVEGF165 病毒效价测定: 取 20μl 浓缩病毒液, 加入 1μl RNase - free DNase, 混匀, 37℃ 水浴反应 30min。

4℃、12000r/min 离心 10min, 取 10μl 上清至另一个无菌的 1.5ml EP 管中。加入 90μl Dilution Buffer, 混匀, 100℃ 金属浴反应 10min。自然冷却至室温, 加入 1μl 蛋白酶 K, 37℃ 水浴反应 1h。100℃ 金属浴反应 10min, 自然冷却至室温。将上述样品稀释后用做 Q - PCR 模板, 利用实时荧光定量 PCR 法对病毒效价进行测定^[2]。

5. 猪 MSCs 的纯化与体外培养: 按照文献^[3]采用密度梯度离心法获取纯化的乳猪骨髓单个核细胞, 混匀接种于含 10% 胎牛血清培养瓶中, 置于 37℃ 含体积分数 5% 的 CO₂ 孵箱中培养, 待细胞 90% 融合时, 用胰酶消化后按 1:3 的比例传代。

6. Western blot 检测 VEGF 蛋白的表达: 以 1×10^{12} v. g/ml 的浓度转染猪 MSCs, 收集细胞, 取 30μg 总蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜, 一抗为 1:2000 稀释的兔抗人 VEGF 抗体, 二抗为 1:5000 稀释的鼠抗兔 IgG - HRP, 与 ECL 化学发光检测试剂反应, X 线曝光, 以 GAPDH 为内参照, 用 Quantity one 软件对电泳结果进行灰度分析。

7. MTS 法检测 VEGF 蛋白活性水平: 转染 rAAV2 - hVEGF165 后猪 MSCs 继续培养 72h, 保留细胞上清液。以每孔 10^4 个血管内皮细胞接种于 96 孔培养板中, 至细胞达 60% ~ 80% 融和后, 将含有 VEGF 蛋白的细胞上清液按 0、20、40、60、80、100μl 加入各孔中, 继续培养 24h, 加入 MTS (20 微升/孔) 液体, 再培养 2h 后, 酶标仪检测各孔 A 值 ($\gamma = 490\text{nm}$)。

结 果

1. pAAV - hVEGF165 - IRES - ZsGreen 载体的构建: 以质粒 pAAV - IRES - ZsGreen 和 pUC57 - hVEGF165 经限制性内切酶 EcoR I 和 BamH I 双酶切, 用 T4 DNA 连接酶连接后转化 JM109 感受态, Ampicillin 抗性筛选, 选取阳性克隆进行菌落 PCR 和酶切鉴定, 阳性克隆可酶切到 495bp 的条带 (图 1), 经测序显示与目的序列完全匹配。继续将重组腺相关病毒 pAAV - hVEGF165 - IRES - ZsGreen 质粒在 293AAV 细胞中进行病毒的包装、感染和纯化后, 实时荧光定量 PCR 法测得 rAAV2 - hVEGF165 病毒效

价为 5×10^{12} v. g/ml。

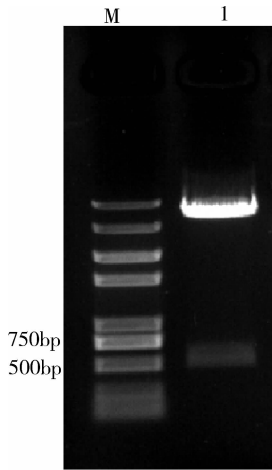


图 1 pAAV - hVEGF165 - IRES - ZsGreen 酶切鉴定结果
M. marker; 1. 双酶切后 pAAV - hVEGF165 - IRES - ZsGreen

2. rAAV2 - hVEGF165 在猪 MSCs 中的表达:
rAAV2 - hVEGF165 转染后, MSCs 正常生长, 转染后 24h 骨髓间充质干细胞开始出现绿色荧光, 转染 72h

后, 荧光阳性细胞可达 90% 以上, 与未转染的 MSCs 相比, 转染 rAAV2 - hVEGF165 后 24、48、72h 细胞中 VEGF 蛋白相对表达量分别上升 32. 17%、75. 82%、87. 38%, 有统计学差异 ($P < 0.05$, 图 2)。

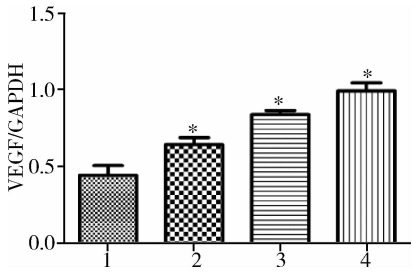


图 2 Western blot 检测 VEGF 蛋白的表达

1. 对照组; 2、3、4. 转染后 24、48、72h; 与对照组比较, * $P < 0.05$

3. VEGF165 蛋白活性水平的检测: 将培养过 rAAV2 - hVEGF165 修饰的 MSCs 上清液滴加到血管内皮细胞的培养基中, 随着加入的上清液增加, VEC 的增殖水平呈上升趋势, 且实验组较对照组 A 值明显增加, 有统计学差异 ($P < 0.05$, 表 1)。

表 1 MTS 法检测 VEGF165 蛋白活性 (A)

组别	0 (μl)	20 (μl)	40 (μl)	60 (μl)	80 (μl)	100 (μl)
1 组	0.584 ± 0.032	0.654 ± 0.019	0.747 ± 0.025	0.689 ± 0.034	0.763 ± 0.028	0.807 ± 0.031
2 组	0.675 ± 0.025	0.76 ± 0.027	1.25 ± 0.042 *	1.76 ± 0.062 *	2.072 ± 0.059 *	2.132 ± 0.067 *

1 组: 对照组; 2 组: 实验组; 与对照组比较, * $P < 0.01$

讨 论

腺相关病毒 (AAV) 的基因组结构简单, 全长仅有 4.7kb, 仅编码 Cap 和 Rep 两个基因, 是目前已知的唯一可以整合在染色体上长期表达而不致病的病毒载体^[1]。腺相关病毒可以感染多种哺乳动物细胞, 并能安全的整合到特定的位点, 因此该病毒成为了基因治疗载体研究的热点^[4]。

心肌梗死是导致冠心病心力衰竭的重要原因, 由于骨髓干细胞具有免疫耐受、多潜能性、容易获取等优点, 近年来被用于心肌梗死治疗的研究。既往各种体内外研究表明^[5-8], 骨髓干细胞可以促进心脏功能的恢复, 其具体机制可能是: ①转化为心脏祖细胞从而修复损伤的心肌; ②通过分化为心肌细胞增加心肌细胞数量; ③通过旁分泌作用增强心肌细胞功能、激活休眠状态的祖细胞, 抑制梗死后心脏的重塑; ④骨髓干细胞和心肌细胞的偶合作用。把干细胞治疗和基因治疗技术相结合对治疗缺血性心脏病具有极大的潜在价值。

VEGF165 属于 VEGF - 1 的亚型, VEGF 家族成员都有一段分泌信号序列, 其可以分泌到细胞外, 与细胞膜或细胞间质结合, 是目前较为公认的一种重要的血管形成刺激因子^[9,10]。本研究制备了高效价和纯度的重组 AAV2 - VEGF165 病毒颗粒, 效价达 5×10^{12} v. g/ml, 用 Western blot 证实 AAV2 - VEGF165 转染干细胞后, VEGF 基因得到有效的表达, 并能够促进血管内皮细胞的增殖。这为进一步探索 AAV2 - VEGF165 修饰的骨髓干细胞治疗缺血性心肌病的研究奠定了基础。

参考文献

1 Flotte TR. Gene therapy progress and prospects: recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors[J]. Gene Ther, 2004, 11(10): 805-810

2 Rohr UP, Wulf MA, Stahn S, et al. Fast and reliable titration of recombinant adeno-associated virus type-2 using quantitative real-time PCR[J]. J Virol Methods, 2002, 106(1): 81-88

3 Chen SL, Zhu CC, Liu YQ, et al. Mesenchymal stem cells genetically modified with the angiopoietin-1 gene enhanced arteriogenesis in a

- porcine model of chronic myocardial ischaemia[J]. J Int Med Res, 2009, 37(1): 68-78
- 4 Daya S, Berns KI. Gene therapy using adeno-associated virus vectors[J]. Clin Microbiol Rev, 2008, 21(4): 583-593
- 5 Jackson KA, Majka SM, Wang H, *et al.* Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells[J]. J Clin Invest, 2001, 107(11): 1395-1402
- 6 Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, *et al.* Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium[J]. Nature, 2001, 410(6829): 701-705
- 7 Rissanen TT, Ylä-Herttuala S. Current status of cardiovascular gene therapy[J]. Mol Ther, 2007, 15(7): 1233-1247
- 8 Cashman TJ, Gouon-Evans V, Costa KD. Mesenchymal stem cells for cardiac therapy: practical challenges and potential mechanisms[J]. Stem Cell Rev, 2013, 9(3): 254-265
- 9 Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 1999, 237: 1-30
- 10 Tischer E, Mitchell R, Hartman T, *et al.* The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing[J]. J Biol Chem, 1991, 266(18): 11947-11954
- (收稿日期:2013-09-26)
- (修回日期:2013-10-18)

人工流产与中国女性乳腺癌关联性的荟萃分析

郭雪君 张寅静 梅 勇

摘 要 目的 探讨人工流产与中国女性乳腺癌发病风险的关系,为我国人群慎重选择人工流产术及乳腺癌的预防提供科学可信的依据。**方法** 通过检索中国知网学术期刊全文数据库、万方数据库、维普数据库和文献追溯等方法,收集国内公开发表的关于人工流产与中国女性乳腺癌相关的病例对照研究文献。采用 Meta(荟萃)分析方法计算人工流产与中国女性乳腺癌的合并效应值 OR 及其 95% 的可信区间(95% CI)。**结果** 共检索到 257 篇文献,依照纳入标准和剔除标准,最终 19 篇相关文献被纳入。根据异质性分析结果($P < 0.001$, $I^2 = 86\%$),选择随机效应模型。Meta 分析结果显示,人工流产与中国女性乳腺癌的合并效应值 OR = 1.59, 95% CI: 1.30 ~ 1.94, $P < 0.001$ 。根据人工流产的次数进行亚组分析,与无人工流产史相比,人工流产 1 次、 ≥ 2 次的合并效应值 OR 及 95% CI 分别为 1.01(0.93 ~ 1.10)和 1.69(1.25 ~ 2.29)。**结论** 人工流产是中国女性乳腺癌的危险因素,多次人工流产术可增加罹患乳腺癌的风险。

关键词 乳腺癌 人工流产 危险因素 荟萃分析

[中图分类号] R719, R737 [文献标识码] A

A Meta-analysis of the Relationship Between the Breast Cancer and Induced Abortions in China. Guo Xuejun, Zhang Yinjing, Mei Yong. School of Public Health, Wuhan University of Science and Technology, Hubei 430065, China

Abstract Objective To evaluate the relationship between the risk of breast cancer and induced abortions in China. **Methods** The literatures from 1998 to 2012 about the correlation between the breast cancer and induced abortions among Chinese female were retrieved. By estimating those literatures and using Meta-analysis method, we calculated the pooled OR and 95% CI as the assessment of the link between induced abortions and breast cancer. **Results** According to the results of heterogeneity test ($I^2 = 87\%$, $P < 0.001$), we used the random effect model to summarize the data. The pooled OR (95% CI) was 1.59 (1.3 ~ 1.94). Subgroup analysis revealed that the pooled OR (95% CI) was 1.01 (0.93 ~ 1.10) for induced abortion one time, and 1.69 (1.25 ~ 2.29) for induced abortion more than two times respectively. **Conclusion** There is a correlation between breast cancer and induced abortions among Chinese women. Repeated induced abortions can increase the risk of breast cancer.

Key words Breast cancer; Induced abortion; Risk factor; Meta-analysis

乳腺癌如今已成为我国最常见的恶性肿瘤之一,其发病率居我国城市女性肿瘤第 1 位^[1]。2011 年,中国癌症基金会发起的我国首个大规模乳腺癌流行

病调研结果在上海发布,数据显示我国乳腺癌发病年龄趋于年轻化,女性乳腺癌患者发病的中位年龄是 48 岁,比西方国家提早了 10 年。我国人工流产率高,其是否影响了女性乳腺癌发病风险目前尚无定论,国内外有关人工流产与女性乳腺癌关系的研究结果还不一致,且单独研究人工流产与中国女性乳腺癌关系的文献大多数都没有区分人工流产与自然流

作者单位:430065 武汉科技大学医学院公共卫生学院(郭雪君、梅勇);430079 武汉,湖北省疾病预防控制中心(张寅静)

通讯作者:张寅静,研究员,电子信箱:suzugamori@163.com