

重组腺病毒介导 VEGF₁₂₁ cDNA 体外转移与表达

王跃祥 杨 健 马春姑 杨新英 宋后燕*

(复旦大学教育部分子医学重点实验室, 上海 200032)

摘要 构建携带 VEGF₁₂₁ cDNA 重组复制缺陷型腺病毒表达载体, 制备重组腺病毒, 该腺病毒能介导 VEGF₁₂₁ cDNA 基因促进人脐静脉血管内皮细胞增殖, 促进毛细血管管腔样结构形成。ELISA 检测表明 VEGF₁₂₁ cDNA 基因表达产物分泌至培液上清, 并显示强烈血管通透作用。为进一步利用重组腺病毒介导 VEGF₁₂₁ cDNA 进行缺血性疾病的基因治疗奠定良好的基础。

关键词 VEGF₁₂₁ cDNA, 重组腺病毒, 基因转移, 表达, 增殖, 血管通透

学科分类号 Q786

血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 是一类特异性促进血管内皮细胞增殖并增加血管通透性的细胞因子^[1,2], 在血管发生 (vasculogenesis) 和血管生成 (angiogenesis) 中起重要作用^[2], 在缺血性疾病的治疗方面有潜在的临床应用价值。VEGF 也是实体肿瘤生长和转移的关键因子, 其功能一旦被抑制, 肿瘤生长将受抑制^[3,4]。

人 VEGF 是由两条糖蛋白链形成的同源二聚体, 由于基因转录水平剪切方式不同, VEGF 至少有 5 种亚型^[4], VEGF₁₂₁、VEGF₁₄₅、VEGF₁₆₅、VEGF₁₈₉ 和 VEGF₂₀₆, 其中 VEGF₁₂₁ 和 VEGF₁₆₅ 功能最强并且可以分泌于细胞外, VEGF₁₂₁ 没有亲肝素及硫酸乙酰肝素的特性, 外源给予 VEGF₁₂₁ 更有利于其扩散, 显示更强的活性^[4,5]。鉴于 VEGF 生物半衰期短, 体内易降解的药代动力学特性, 用 VEGF cDNA 基因治疗代替 VEGF 蛋白质治疗具更强的现实意义^[6,7]。

腺病毒能感染分裂期和非分裂期细胞, 对机体相对安全, 是一种较好的基因治疗载体^[8]。我们构建了携带 VEGF₁₂₁ cDNA 重组复制缺陷型腺病毒, 观察并研究了该腺病毒介导 VEGF₁₂₁ cDNA 体外转移与表达, 为进一步利用该重组腺病毒介导 VEGF₁₂₁ cDNA 进行缺血性疾病的基因治疗奠定了良好的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒和细胞: 大肠杆菌 DH5 α 为本实验室冻存, pcDNA₃-VEGF₁₂₁ 质粒为本实验室构建, pShuttle、pAdeno-X 质粒和 Human Embryonic

Kidney (HEK) 293 细胞株购自 Clontech 公司, 人脐静脉血管内皮细胞株 ECV304 从 ATCC 购买, 编号为 CRL-8659。

1.1.2 试剂和仪器: 限制性内切酶购自 NEB 公司; DMEM、胎牛血清 (FBS) 购自 Gibco BRL 公司; QIAGEN plasmid Mini/Midi Kit 购自 QIAGEN Inc. (德国); GeneJammer™ Transfection Reagent 购自 Stratagene 公司; 伊文氏蓝染料、CsCl 及 MTT 购自 Sigma 公司; SeaPlaque 琼脂糖购自 BMA 公司; VEGF ELISA kit 购自 R&D 公司; ECMatrix™ 购自 Chemicon 公司; 图像分析系统 ImageMaster VDS 购自 Pharcia Biotech 公司; PE2000 PCR 扩增仪购自 PE 公司; 酶标仪 Model 550 购自 BIO-RAD 公司。

1.2 方法

1.2.1 VEGF₁₂₁ cDNA 重组腺病毒表达载体的构建: pcDNA₃-VEGF₁₂₁ 经 *Bam*H I 酶解、Klenow 酶补平、*Eco*R I 酶解, 回收目的片段 (0.45 kb); pShuttle 经 *Xba* I 酶解、Klenow 酶补平、*Not* I 酶解, 回收载体片段 (4.1 kb); 两片段连接后转化大肠杆菌 DH5 α , 扩增转化菌并制备质粒, 经限制性内切酶筛选阳性克隆^[9], 阳性克隆命名为 pShuttle-VEGF₁₂₁, pShuttle-VEGF₁₂₁ 经 *PI-Sce* I 和 *I-Ceu* I 双酶解后, 与 pAdeno-X 重组, 经 PCR 筛选阳性克隆, 阳性克隆命名为 pAdeno-X-VEGF₁₂₁ (图 1)。同法构建 pAdeno-X-LacZ。

* 通讯联系人。

Tel: 021-64033738, Fax: 021-64033738

E-mail: hysong@shmu.edu.cn

收稿日期: 2003-02-08, 接受日期: 2003-03-24

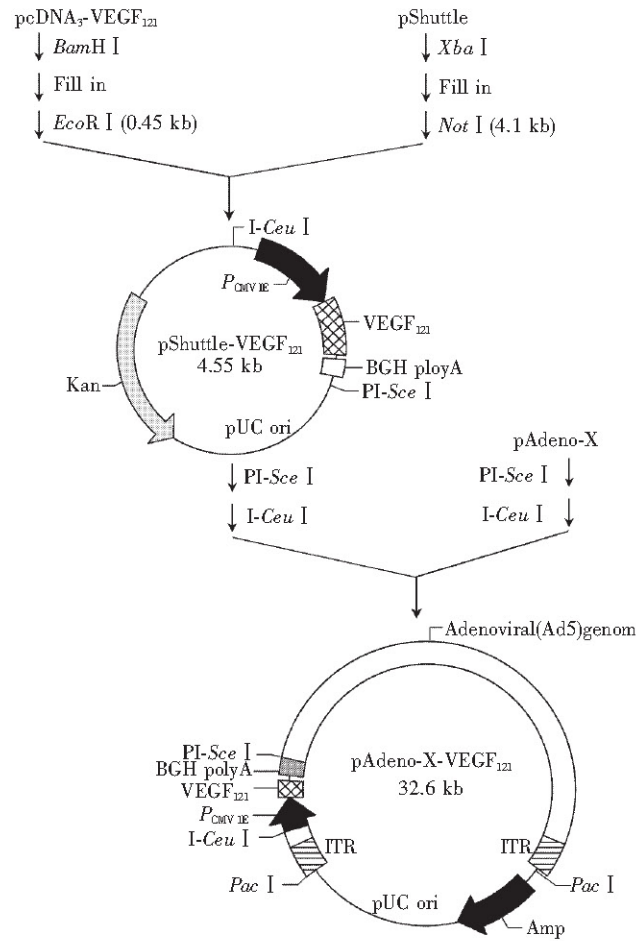


Fig. 1 Construction of plasmid pAdeno-X-VEGF₁₂₁

1.2.2 VEGF₁₂₁ cDNA 重组腺病毒的制备: HEK293 细胞在 10% FBS 的 DMEM 培养液, 37°C, 5% CO₂ 环境中培养至 50%~70% 融合度时, 脂质体介导下将 *Pac*I 线性化的 pAdeno-X-VEGF₁₂₁ 和 pAdeno-X-LacZ 转染 HEK293 细胞, 具体方法参照 GeneJammer™ Transfection Reagent 说明书进行, 3 h 后换成含 5% FBS 的 DMEM 培养液, 培养 10~14 天, 出现细胞病变效应 (CPE), 将出现病变的细胞吹下, 反复冻融 3 次, 备用。

1.2.3 单个噬斑纯化病毒及 PCR 鉴定: HEK293 细胞接种于 6 孔板中, 至 80% 融合度时, 加入上述冻融病毒液, 37°C 感染 2 h, 弃去病毒液, 加入 1.25% SeaPlaque 琼脂糖半固体培养基, 室温 30 min 使其凝固, 培养 10 天后挑取单个噬斑, 重新感染 HEK293 细胞, 反复扩增, 大量制备重组腺病毒, 取 1 μl 病毒液, PCR 扩增, 鉴定。

1.2.4 重组腺病毒的纯化及滴度测定: 重组腺病毒大量扩增, 2 次 CsCl 梯度离心后, 噬斑分析法

测定滴度。

1.2.5 重组腺病毒介导 VEGF₁₂₁ cDNA 基因体外转移促进 ECV304 增殖作用: 用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液, 在 37°C, 5% CO₂ 条件下传代培养 ECV304 细胞。该细胞经 PBS 漂洗、胰酶消化, 用含 2% 小牛血清的 DMEM 培养液制成细胞悬液, 接种到 24 孔板继续培养 (5.0×10^3 /孔)。24 h 后, 吸弃培养液, 分别感染重组腺病毒 Adeno-X-VEGF₁₂₁ (5、20、80、160、320 pfu/个) 及 Adeno-X-LacZ (5、20 pfu/个), 另设未感染对照组, 感染 24 h 后换成含 2% 小牛血清的 DMEM 培养液, 再过 120 h 后加入噻唑蓝 (MTT), 酶标仪测定 A₅₇₀ 值, 计算细胞生存率, 方差统计分析 Adeno-X-VEGF₁₂₁ 感染组与 Adeno-X-LacZ 感染组及未感染组的差异。

1.2.6 VEGF₁₂₁ cDNA 体外表达产物 ELISA 检测: 同 1.2.5, 用含 2% 小牛血清的 DMEM 培养液将 ECV304 细胞制成细胞悬液, 接种到 24 孔板继续培养 (5.0×10^3 /孔)。24 h 后, 吸弃培养液, 分别感染重组腺病毒 Adeno-X-VEGF₁₂₁ (20 pfu/个) 及 Adeno-X-LacZ (5 pfu/个), 另设未感染对照组, 感染 24 h 后换成含 2% 小牛血清的 DMEM 培养液, 以后每隔 24 h 收集上清, ELISA 检测上清中 VEGF₁₂₁ 含量。

1.2.7 VEGF₁₂₁ cDNA 体外表达产物血管通透作用: 同 1.2.5, 用含 2% 小牛血清的 DMEM 培养液将 ECV304 细胞制成细胞悬液, 接种到 24 孔板继续培养 (5.0×10^3 /孔)。24 h 后, 吸弃培养液, 分别感染重组腺病毒 Adeno-X-VEGF₁₂₁ (20 pfu/个) 及 Adeno-X-LacZ (5 pfu/个), 另设未感染对照组, 感染 24 h 后换成含 2% 小牛血清的 DMEM 培养液, 96 h 后收集上清, 备用。取约 250 g 雄性健康豚鼠, 剃毛后足趾静脉注射伊文氏蓝染液 20 mg/kg, 5 min 后于豚鼠背部皮内注射上述上清各 400 μl, 10 min 后观察蓝斑范围, 分别于 3 只豚鼠重复上述实验。

1.2.8 重组腺病毒介导 VEGF₁₂₁ cDNA 基因体外转移促进毛细血管管腔样结构形成: 于 96 孔板中加入 ECMatrix™ 50 μl, 37°C 固化至少 1 h, 分别加入 Adeno-X-VEGF₁₂₁ (20 pfu/个) 和 Adeno-X-LacZ (5 pfu/个) 感染 48 h 后的 ECV304 细胞 (7.5×10^3 /孔) 及其上清 (100 μl/孔), 另设未感染对照组, 37°C、5% CO₂ 环境中培养, 24 h 后观察毛细血管管腔样结构形成情况。

2 结 果

2.1 VEGF₁₂₁ 重组腺病毒表达载体的构建

pShuttle-VEGF₁₂₁ 经三套限制性内切酶鉴定与预期结果一致. pAdeno-X-VEGF₁₂₁ 经 PCR 扩增, 得一条 370 bp 特异性条带.

2.2 重组腺病毒的制备, 单个噬斑纯化及 PCR 鉴定

pAdeno-X-VEGF₁₂₁ 及 pAdeno-X-LacZ 转染 IIEK293 细胞, 利用 IIEK293 细胞中 E1A 蛋白, 包装出重组腺病毒. 10~14 天后, IIEK293 细胞出现典型细胞病变效应 (CPE), 核大, 细胞粘附力降低, 多数呈现串珠状. 单个病毒噬斑感染 IIEK293 细胞后, 大量扩增腺病毒, 取 1 μ l 病毒液, PCR 扩增、鉴定, Δ Adeno-X-VEGF₁₂₁ 及 Δ Adeno-X-LacZ 有 370 bp 特异性条带 (图 2).

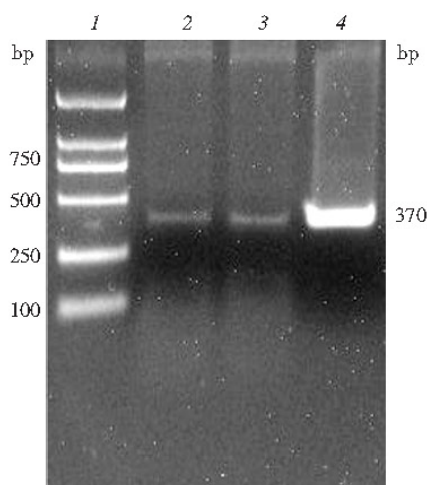


Fig. 2 PCR analysis on viral lysate

1: DNA marker; 2, 3: Adeno X VEGF (370 bp);
4: Adeno X LacZ (370 bp).

2.3 重组腺病毒的纯化及滴度测定

重组腺病毒大量扩增, 2 次 CsCl 梯度离心, 透析去除 CsCl 后, 保存于腺病毒保存缓冲液 (10 mmol/L Tris, 4% 蔗糖, 2 mmol/L MgCl₂, pII 8.0)^[10]. 经噬斑分析法测定 Δ Adeno-X-VEGF₁₂₁ 和 Δ Adeno-X-LacZ 滴度分别为 6.25×10^9 pfu/ml 和 2.5×10^{10} pfu/ml.

2.4 重组腺病毒介导 VEGF₁₂₁ cDNA 基因体外转移促进 ECV304 增殖作用

小牛血清降至 2% 后, ECV304 生长受抑制, 此时, 重组腺病毒 Δ Adeno-X-VEGF₁₂₁ (5、20、80、160 pfu/个) 感染组 ECV304 细胞生存率与 Δ Adeno-

X-LacZ 感染组及未感染组有统计学差异 ($P < 0.01$), Δ Adeno-X-VEGF₁₂₁ (320 pfu/个) 感染组由于感染复合指数 (MOI) 太高, 导致细胞高死亡率, 细胞生存率与 Δ Adeno-X-LacZ 感染组及未感染组没有统计学差异 ($P > 0.05$) (图 3d), Δ Adeno-X-VEGF₁₂₁ (20 pfu/个) 感染组 ECV304 细胞显示最佳生长状态 (图 3a, b, c) 及最高生存率 (图 3d).

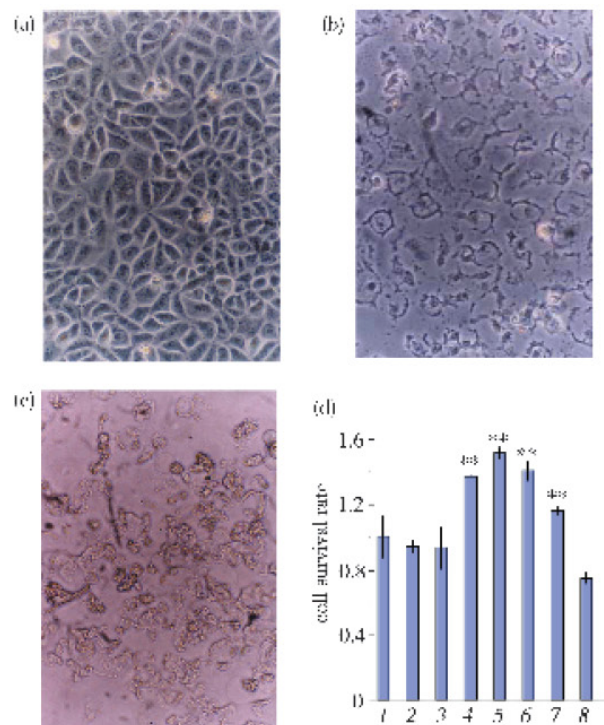


Fig. 3 Effect of Adeno-X-VEGF₁₂₁ infection on proliferation of ECV304

(a) Representative example of cells infected with Adeno X VEGF₁₂₁ (20 pfu/cell); (b) Representative example of cells infected with Adeno X LacZ (5 pfu/cell); (c) Representative example of uninfected control cells; (d) Cell survival rates were assayed after infection. P values refer to Adeno X VEGF₁₂₁ vs either control (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). 1: uninfected control; 2: Adeno X LacZ 5 pfu/cell; 3: Adeno X LacZ 20 pfu/cell; 4: Adeno X VEGF₁₂₁ 5 pfu/cell; 5: Adeno X VEGF₁₂₁ 20 pfu/cell; 6: Adeno X VEGF₁₂₁ 80 pfu/cell; 7: Adeno X VEGF₁₂₁ 160 pfu/cell; 8: Adeno X VEGF₁₂₁ 320 pfu/cell. ($\times 200$).

2.5 VEGF₁₂₁ cDNA 体外表达产物 ELISA 检测

ELISA 检测结果显示 Δ Adeno-X-VEGF₁₂₁ 感染组 ECV304 细胞培养液上清有 VEGF₁₂₁, 时相曲线可见, 感染后 7~10 天, VEGF₁₂₁ cDNA 表达达峰值, 约 $2 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cell}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (图 4). 而 Δ Adeno-X-LacZ 感染组和未感染组上清均检测不到 VEGF₁₂₁, 表明 VEGF₁₂₁ cDNA 基因获得表达.

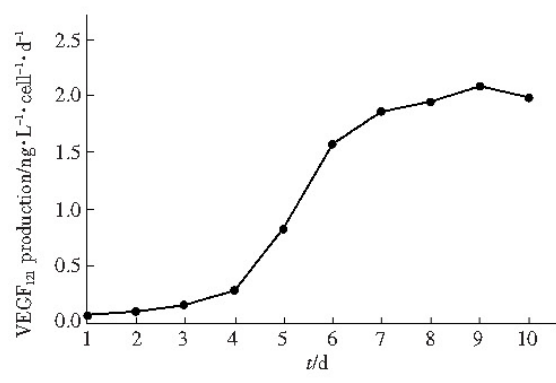


Fig. 4 In vitro VEGF₁₂₁ production

2.6 VEGF₁₂₁ cDNA 体外表达产物血管通透作用

豚鼠皮内注射 Adeno-X-VEGF₁₂₁ 感染组上清后, 显示很强血管通透作用, 伊文氏蓝染液从注射点附近外渗, 形成蓝色斑块; 而皮内注射 Adeno-X-LacZ 感染组和未感染组上清后, 均显示微弱血管通透作用 (图 5), 表明 VEGF₁₂₁ cDNA 体外表达产物能分泌到培养上清中, 且具有生物学活性。

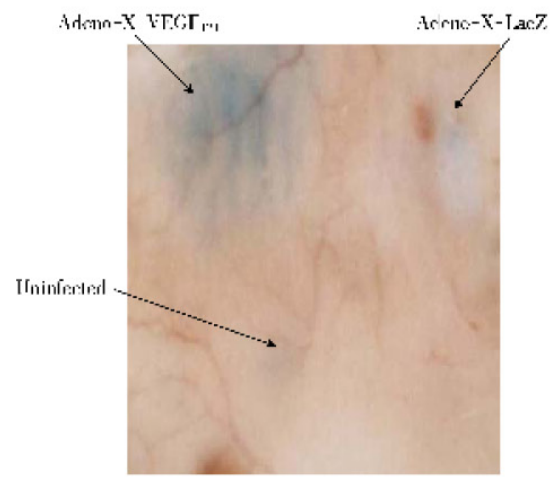


Fig. 5 Effect of conditioned medium from ECV304 on the Miles permeability assay

2.7 重组腺病毒介导 VEGF₁₂₁ cDNA 基因体外转移促进毛细血管管腔样结构形成

24 h 后, 加入 Adeno-X-VEGF₁₂₁ 感染过的 ECV304 细胞及其上清组有明显毛细血管管腔形

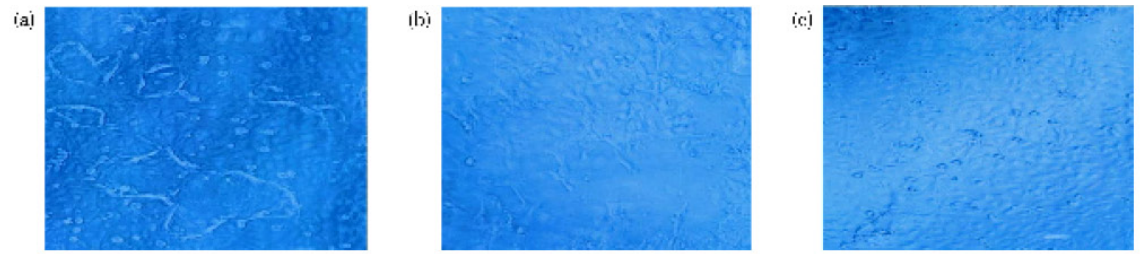


Fig. 6 Capillary-like structure formation by ECV304 infected with Adeno-X-VEGF₁₂₁
(a) cells infected with Adeno X VEGF₁₂₁; (b) cells infected with Adeno X LacZ; (c) uninfected control. (×200).

成, 而加入 Adeno-X-LacZ 感染过的 ECV304 细胞及其上清组和未感染对照组都没有明显毛细血管管腔形成 (图 6), 表明该重组腺病毒介导 VEGF₁₂₁ cDNA 基因体外转移能够促进毛细血管管腔样结构形成。

3 讨 论

为了有效地将 VEGF 送至靶部位, 长期稳定地释放 VEGF, 以达到治疗缺血性疾病的目的, 我们构建了含 VEGF₁₂₁ cDNA 重组腺病毒表达载体。由于腺病毒具有可感染非分裂期细胞, 对靶细胞的高感染性和低病源性, 能高效介导基因转移及表达, 易纯化, 适于原位注射, 感染细胞后基因组不

整合至宿主细胞基因组中, 致癌、致突变几率小等优点, 因而在缺血性心脏病的基因治疗中被认为是理想的基因转移载体^[6,7]。

我们选用带有 CMV 启动子和 BGII polyA 加尾信号的真核表达盒, 将其完整切下, 重组入腺病毒表达载体, 转染 IIEK293 细胞, 获得重组腺病毒。以往腺病毒系统常以含外源基因质粒与腺病毒基因组质粒共转染 IIEK293 细胞, 同源重组效率低下, 且需多次反复噬斑纯化, 实验周期长^[8]。我们使用的腺病毒系统利用细菌同源重组法制备包装腺病毒, 同源重组效率高。

为了验证重组腺病毒介导 VEGF₁₂₁ cDNA 体外转移与表达情况, 我们选用了 ECV304 细胞进

行检测, ELISA 分析可检测到重组腺病毒介导 VEGF₁₂₁ cDNA 在 ECV304 细胞中能有效翻译并可分泌至胞外上清, 感染后上清显示很强血管通透作用, 表明表达的产物具有良好的生物学活性. 血管通透实验 (Miles assay) 是检测 VEGF 生物学活性快速的方法之一, 有文献报道 Akt 介导 VEGF 血管通透作用^[11].

在体外将 Adeno-X-VEGF₁₂₁ 感染过的血管内皮细胞接种于 ECMatrix™ 胶上, 能够形成毛细血管管腔样结构, 模拟体内新生血管生成^[12], 表明 VEGF₁₂₁ 能够促进血管内皮细胞迁移、分化形成管腔样结构, 但具体机制有待进一步研究.

我们成功地构建携带 VEGF₁₂₁ cDNA 重组复制缺陷型腺病毒表达载体, 为进一步利用该腺病毒介导 VEGF₁₂₁ cDNA 进行缺血性疾病的基因治疗奠定良好的基础.

参 考 文 献

- 1 Yancopoulos G D, Davis S, Gale N W, *et al.* Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 2000, **407** (6801): 242~248
- 2 Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis.

- Nature Med*, 2000, **6** (4): 389~395
- 3 Carmeliet P, Jain R K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 2000, **407** (6801): 249~257
- 4 Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*, 1999, **13** (1): 9~22
- 5 Mack C A, Patel S R, Schwarz E A, *et al.* Cardiopulmonary support and physiology. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1998, **115** (1): 168~177
- 6 Isner J M. Myocardial gene therapy. *Nature*, 2002, **415** (6868): 234~239
- 7 Hammond H K, McKirman M D. Angiogenic gene therapy for heart disease: a review of animal studies and clinical trials. *Cardiovascular Research*, 2001, **49** (3): 561~567
- 8 Hitt M, Bett A, Prevec L, *et al.* Construction and propagation of human adenovirus vectors. In: Celis J E ed. *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. 2nd. San Diego: Academic Press, 1998. 500~512
- 9 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989. 1. 21~1. 110
- 10 Nyberg-Hoffman C, Aguilar-Cordova E. Instability of adenoviral vectors during transport and its implication for clinical studies. *Nature Med*, 1999, **5** (8): 955~957
- 11 Six I, Kureishi Y, Luo Z, *et al.* Akt signaling mediates VEGF/VPF vascular permeability *in vivo*. *FEBS Lett*, 2002, **532** (1~2): 67~69
- 12 Vailhe B, Vittet D, Feige J J. *In vitro* models of vasculogenesis and angiogenesis. *Lab Invest*, 2001, **81** (4): 439~452

Recombinant Adenovirus-mediated VEGF₁₂₁ cDNA Gene Transfer and Expression *In vitro*

WANG Yue-Xiang, YANG Jian, MA Chun-Gu, YANG Xin-Ying, SONG Hou-Yan*

(The Key Laboratory of Molecular Medicine, Ministry of Education, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract The replication-incompetent adenoviral vector containing the cDNA of VEGF₁₂₁ was constructed. After transfection, individual viral plaques were isolated and amplified in HEK293 cells. Confirmed by PCR, both Adeno-X-VEGF₁₂₁ and Adeno-X-LacZ were propagated in HEK293 cells and were purified by CsCl density gradient centrifugation. Adenovirus-mediated VEGF₁₂₁ gene transfer promotes ECV304 proliferation and formation of capillary-like structures *in vitro*. The expression of VEGF₁₂₁ by adenovirus-infected ECV304 was quantified by enzymelinked immunosorbent assay. Peak VEGF₁₂₁ production was achieved at 7~10 days after infection. The conditioned media from ECV304 infected with Adeno-X-VEGF₁₂₁ markedly enhanced vascular permeability. These data may support that adenovirus-mediated VEGF₁₂₁ cDNA gene transfer could provide a useful strategy for efficient delivery of VEGF₁₂₁ in the treatment of ischemic diseases.

Key words VEGF₁₂₁ cDNA, recombinant adenovirus, gene transfer, expression, proliferation, vascular permeability

* Corresponding author. Tel: 86-21-64033738, Fax: 86-21-64033738, E-mail: hysong@shmu.edu.cn

Received: February 8, 2003 Accepted: March 24, 2003