

携带反义凝血酶受体和 p21 双基因共表达腺病毒伴随病毒载体的构建与包装*

孟宪敏^{1)**} 吴小兵²⁾ 米立国¹⁾ 伍志坚²⁾ 赵秀文¹⁾ 刘冬青¹⁾ 丁金凤¹⁾

¹⁾ 中国医学科学院 心血管病研究所, 阜外心血管病医院分子医学中心, 北京 100037;
中国协和医科大学

²⁾ 中国预防医学科学院病毒学研究所, 基因工程国家重点实验室, 北京 100052)

摘要 为探讨双基因共表达对再狭窄的防治作用, 分别构建了含反义凝血酶受体 (ATR) 或/和 p21 单、双基因及报告基因绿色荧光蛋白 (GFP) 的腺病毒伴随病毒 (AAV) 载体。上述载体经脂质体介导转染 BHK-21 细胞, G418 筛选获得整合有外源基因的细胞株。克隆形成过程中显示单、双基因转染后细胞增殖受到了不同程度的抑制, 克隆形成速度减慢, 细胞形态改变, 且双基因的作用明显大于单基因。以绿色荧光出现说明报告基因得到表达后, 又以 DNA 印迹证实 ATR 和 p21 单、双基因已整合于细胞基因组中, 并维持了凝血酶受体 (TR) 基因的反义位置。半定量 RT-PCR 证实 TR 基因表达降低, p21 基因表达升高, ATR 和 p21 (AP) 双基因得到了共表达。以具有可提供复制和包装功能的重组单纯疱疹病毒 rHSV-rc/ΔU12 分别感染载有不同基因的 BHK 细胞株, 包装产生重组 AAV (rAAV) 病毒, 并经点杂交法测定其滴度 (每毫升病毒液中所含病毒颗粒数)。rAAV/AP 中 ATR 与 p21 的病毒颗粒数分别为 $1.02 \times 10^{13}/\text{ml}$ 和 $1.08 \times 10^{13}/\text{ml}$, 单基因 rAAV/ATR 的滴度为 $6.54 \times 10^{12}/\text{ml}$, rAAV/P21 为 $1.06 \times 10^{13}/\text{ml}$, 为进一步的体内外实验奠定了物质基础。

关键词 反义凝血酶受体基因, p21 基因, 腺病毒伴随病毒载体, 病毒滴度, 再狭窄

学科分类号 Q782

血管再狭窄的发生是由多基因参与的过程, 单一基因治疗难以达到预防其发生的目的。随着基因治疗的不断发展, 构建含有双基因乃至多基因共表达载体是提高外源基因在靶细胞高效转移和表达的新策略。以腺病毒伴随病毒 (adenovirus associated virus, AAV) 为载体的双基因构建尚未见报道。本文拟在应用反义凝血酶受体 (antisense thrombin receptor, ATR) 基因进行体外细胞学实验的基础上^[1], 运用新型 AAV 载体 pSNAV, 分别构建含有 ATR 和细胞周期负调控因子 p21 的双基因 (AP) 及相应单基因载体, 拟探索通过双基因共表达的策略, 提高外源基因的转移和表达水平, 为预防再狭窄的研究开拓一条新途径。

1 材料和方法

1.1 材料

质粒 pcDNA3/ATR、pCA13/p21、pSV-β-galactosidase LacZ 和菌株 DH-5α 为阜外心血管病医院分子医学中心构建或保存。质粒 pSNAV、pcDNA2.1/GFP 和 BHK-21 (金黄地鼠胚胎肾细胞) 细胞株由中国预防医学科学院病毒学研究所基因室提供。各种内切酶及连接酶购自 Promega 公司, 转

染试剂 Lipofectamine 为 GIBCO 公司产品, 地高辛探针标记试剂盒为宝灵曼公司产品。

1.2 方法

质粒的酶切、电泳、回收、连接、转化、重组子筛选等操作参照文献 [2] 进行。

1.2.1 单基因 AAV 载体 pSNAV/ATR、pSNAV/p21 和 pSNAV/GFP 的构建: 载体质粒 pSNAV 含有外源基因表达元件, 其两端是 2 型 AAV 的反末端重复序列 (inverted terminal repeat, ITR)。用 *Kpn* I 和 *Eco* R I 双酶切质粒 pcDNA3/ATR, 回收 599 bp 的 ATR 片段并插入载体 pSNAV 的多克隆位点, 构成 pSNAV/ATR。用 *Sal* I 和 *Bgl* II 双酶切载体 pSNAV 的多克隆位点, 并以 *Sal* I 和 *Bam* H I 切开 pCA13/p21, 回收 1 999 bp 的 p21 片段, 亚克隆至 pSNAV 载体, 构成 pSNAV/p21。用 *Eco* R I 和 *Sal* I 双酶切载体 pSNAV, *Eco* R I 和 *Xho* I 双酶切质粒 pcDNA2.1/GFP, 回收 700 bp 的

* 国家“九五”攻关项目 (96-906-02-07), 国家自然科学基金资助项目 (39970297), 国家“863”基因治疗重大课题 (863-BH03-05-02)。

** 通讯联系人。

Tel: 010-68314466-8069, E-mail: xmmeng@elong.com

收稿日期: 2001-12-07, 接受日期: 2001-12-28

报告基因绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 片段, 亚克隆至 pSNAV 载体, 构成 pSNAV/GFP. 在 pSNAV/p21 和 pSNAV/GFP 的构建中, 各使用一对同尾酶 (*Bgl* II 和 *Bam* HI, *Sal* I 和 *Xho* I), 构建完成后, 4 个位点均消失.

1.2.2 双基因 AAV 载体 pSNAV/AP 的构建: 先用酶切、补平、再连接的方式, 去除 pCA13/p21 上的 *Eco*RI 位点. 该位点位于 p21 的读码框外, 写作 pCA13/p21E⁻. 再将 p21E⁻ 卸下并插入去除 LacZ 表达盒的 pSV- β -galactosidase LacZ 质粒骨架中, 形成中间重组子 pSV-p21E⁻. 用 *Eco*RI 和 *Bgl* II 双切质粒 pSV-p21E⁻, 回收 SV40 启动子 (约 0.4 kb) 和 1.6 kb 的 p21E⁻ 片段, 亚克隆至以同样双酶切的载体 pSNAV/ATR 中, 构成携带 ATR 和 p21 两个目的基因的表达载体 pSNAV/AP.

1.2.3 细胞转染: 用含 5% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养 BHK-21 细胞. 以转染的质粒不同, 实验分为 GFP 组、ATR 组、p21 组、AP 组和未转染的正常对照组. 各质粒酶切鉴定无误后, 经 Lipofectamine 介导分别转染入 BHK-21 细胞, 转染步骤按试剂盒说明书进行. 以 800 mg/L G418 筛选, 7~15 d 后克隆形成. 每组随机选取 6 个视野, 10 $\times$ 显微镜下计数克隆数. 导入 pSNAV/GFP 的 BHK-21 细胞在筛选、克隆形成过程中于倒置荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白表达. 收集各组细胞克隆, 扩增, 获得携带不同外源基因的 rAAV 前病毒载体细胞株.

1.2.4 DNA 印迹: 分别提取各组细胞基因组 DNA. 未转染组、GFP 组和 ATR 组, 经 *Bam*HI 酶切以 TR 基因为探针杂交. 未转染组、GFP 组和 p21 组, 经 *Sal*I 和 *Bam*HI 双酶切以 p21 基因为探针杂交. 使用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切 AP 双基因组, 该酶切可能产生两种结果: a. 完全酶切: 得到一个 0.6 kb 的 ATR 片段和一个 2.2 kb 含 p21 的片段. b. 不完全酶切: 得到一个 0.6 kb 的 ATR 片段和仅由 *Bam*HI 位点酶切造成的既含有 ATR 基因又含有 p21 基因的 2.8 kb 片段. 因 TR 基因是以反义方向插入载体, 为维持其反义位置, 本研究希望得到后一种结果, 即两基因以顺序相连 (ATR-p21) 的方式整合入基因组. 对双基因组分别以 TR 和 p21 两个探针杂交. 杂交过程参照文献 [2].

1.2.5 半定量 RT-PCR 鉴定外源基因表达: 提取未转染组、ATR 组、p21 组和 AP 组细胞的总 RNA, 以 GAPDH 为内参, 进行 RT-PCR. 逆转录反应按试剂盒说明书操作. TR 基因上游引物: 5'-CCC GAA TTC TGG TGG CCG CCT GCT TCA G-3'; 下游引物: 5'-CCC GGA TCC ATG TCT TGA CCT TCA TTT TCA GG-3'. p21 上游引物: 5'-CAA AGC TTA TGT CAG AAC CGG CTG GGG AT-3'; 下游引物: 5'-ATG GAT CCG TCG ACT TAG GGC TTC CTC TTG GGG AA-3'. GAPDH 基因上游引物: 5'-GTG AAG GTC GGT GTC AAC G-3'; 下游引物: 5'-GGT GAA GAC GCC AGT AGA CTC-3'. 扩增片段长度分别为 436 bp、512 bp 和 300 bp. 对各扩增条带与相应的 GAPDH 电泳条带行灰度扫描, 以二者比值作为该基因表达的相对量.

1.2.6 重组 AAV 的包装与滴度测定: 用可提供 AAV 载体复制和包装功能的重组单纯疱疹病毒 rHSV-rc Δ U12 (recombinant herpes simplex virus) 分别感染载有不同基因的 rAAV 前病毒载体 BHK 细胞株, 产生重组 AAV (recombinant AAV, rAAV) 病毒. 传代扩增, 收集细胞, 经氯仿处理, PEG/NaCl 沉淀, 氯仿再抽提三步法, 分离、浓缩、纯化 rAAV^[3]. 包装后获得带有外源基因的重组 AAV, 写作 rAAV/ATR、rAAV/P21、rAAV/AP 和 rAAV/GFP.

采用点杂交方法测定各 rAAV 的物理滴度. 取 1 μ g pSNAV/AP 和 1 μ g pSNAV/ATR 质粒及 1 μ l rAAV/AP 和 1 μ l rAAV/ATR 病毒液, 1:10 连续倍比稀释, 各取 2 μ l 点膜. 同样取含有 p21 基因的质粒和病毒液点于另一张膜. 分别以 ATR 和 p21 基因的 PCR 产物为探针, 地高辛标记做点杂交 (杂交程序按试剂盒说明书进行). 根据质粒的分子质量、稀释倍数及最后一个杂交点的分子个数, 再根据病毒的稀释倍数, 计算出每毫升病毒液中所含病毒颗粒数即滴度^[4,5].

2 结 果

2.1 单基因 AAV 载体的构建

单基因 AAV 载体 pSNAV/ATR、pSNAV/p21 和 pSNAV/GFP 的构建如图 1 所示.

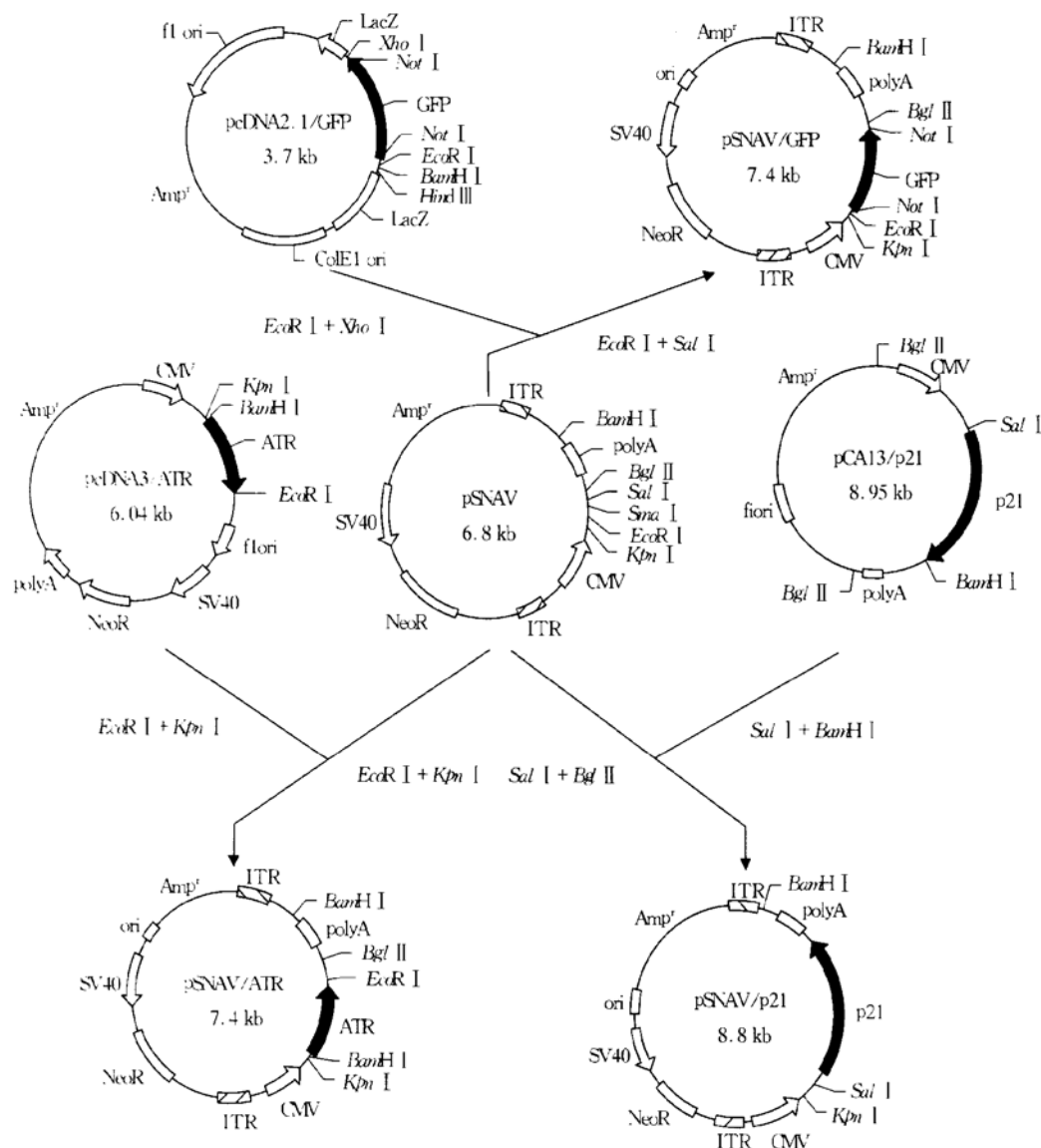


Fig. 1 Construction strategy of pSNAV/ ATR, pSNAV/ p21 and pSNAV/ GFP single gene AAV expression vectors

2.2 双基因 AAV 载体 pSNAV/ AP 的构建

将 p21 基因克隆到 pSNAV/ ATR 中, 使在一个载体的多克隆位点中携带两个外源基因, 其特点是它们头尾顺序相连, 具有两个独立的表达盒, 且一个为反义基因. 各有一个启动子. 因 TR 基因是以反义 mRNA 形式表达, 无需 poly A 加尾信号, pSNAV 载体提供的 poly A 序列恰为 p21 所利用 (图 2).

2.3 稳定表达外源基因细胞株的建立

未转染组细胞经 G418 筛选 7~14 d 后, 全部死亡, 转染组则形成大小不一的克隆, 表明新霉素抗性基因已在细胞内表达. pSNAV/ GFP 转染后 7 d 即可出现克隆 (图 3a), 并有大量绿色荧光出现

(图 4), 说明报告基因已得到表达. pSNAV/ AP 的克隆约 2 周方可形成, 数目较少, 细胞体积变小, 胞质颗粒增多, 细胞出现“突起”, 干枯树叶状, 似老年细胞 (图 3d). pSNAV/ ATR 和 pSNAV/ p21 克隆形成时间与数目居中. 细胞虽有不同程度的形态变化, 但无干枯树叶状 (图 3b 和图 3c). 各组在 6 个视野内计数的克隆数分别为: pSNAV/ GFP 组 53 ± 4 , pSNAV/ ATR 组 35 ± 5 , pSNAV/ p21 组 28 ± 5 , pSNAV/ AP 组 19 ± 3 . 结果已显示单、双基因转染后细胞增殖受到了不同程度的抑制, 克隆形成速度减慢, 细胞形态发生改变, 且双基因的作用明显大于单基因. 收集各组细胞克隆, 扩增, 建立携带外源基因的 AAV 前病毒载体细胞株.

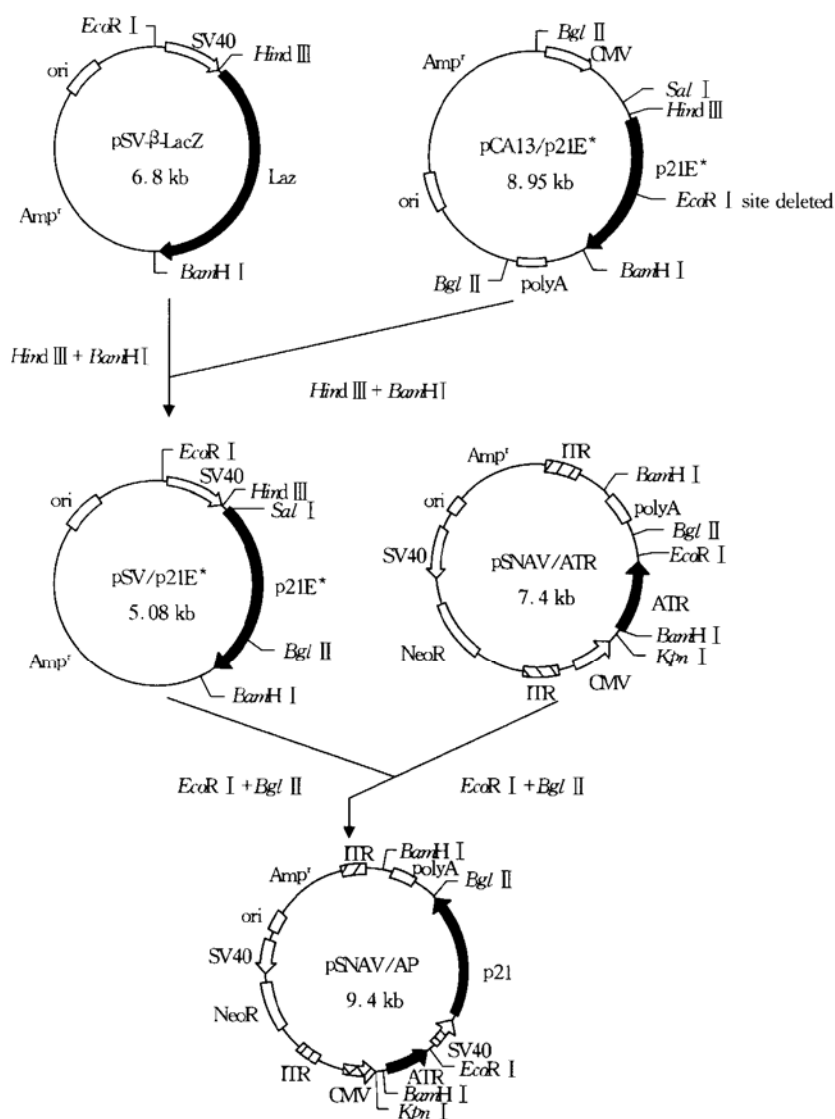


Fig. 2 Construction strategy of pSNAV/AP double genes AAV expression vector

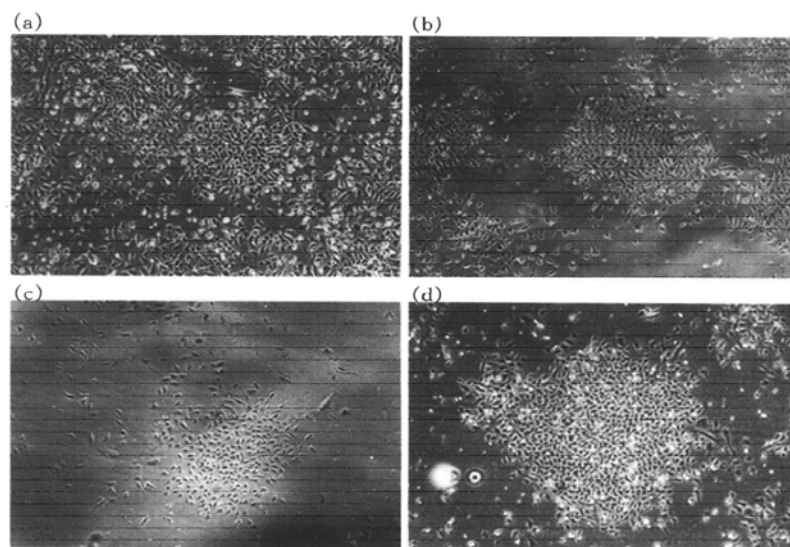


Fig. 3 The effects on cell clone formation of single or double gene

(a) pSNAV/GFP group; (b) pSNAV/ATR group; (c) pSNAV/p21 group; (d) pSNAV/AP group.



Fig. 4 Expression of GFP in BHK cell line transfected with pSNAV/GFP ($\times 400$)

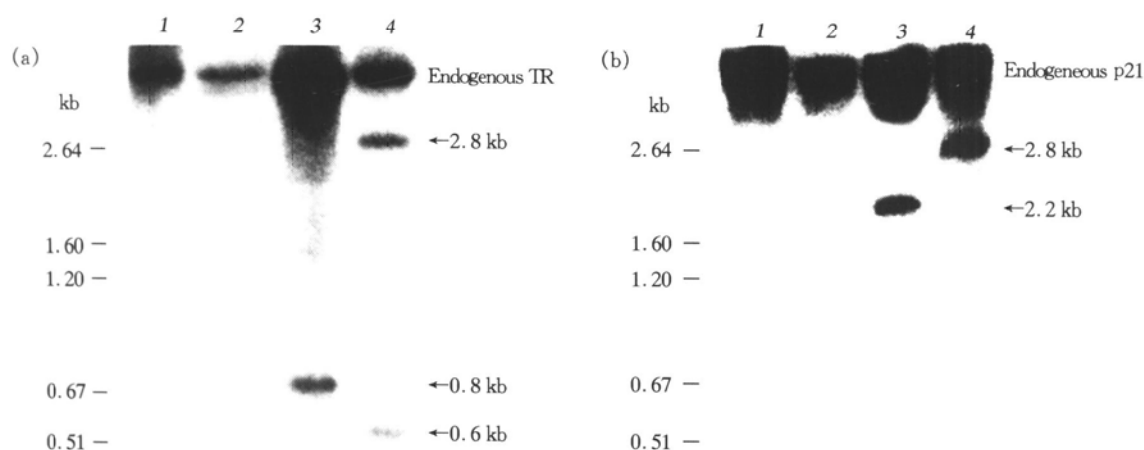


Fig. 5 Southern blot analysis to show integrations of ATR and p21 genes in BHK cells genomic DNA

(a) integration of ATR gene. 1: untransfected group; 2: GFP group; 3: ATR group; 4: AP group. (b) integration of p21 gene. 1: untransfected group; 2: GFP group; 3: p21 group; 4: AP group. Size markers (kb) are in the left.

交带, 但 GFP 组的杂交带很弱, 其原因尚待探讨. 未转染组及 GFP 组无任何外源基因杂交带.

2.5 外源基因在 BHK-21 细胞中的整合与表达

RT-PCR 结果如图 6 所示. p21 单基因组、AP 双基因组和未转染组均扩增出约 512 bp 的 p21 扩增带, 各组灰度扫描分析的比值为: 2.7、2.49 和 0.9, p21 在单基因载体中的表达高于其在双基因载体. 以 TR 基因引物进行扩增的结果显示: ATR 单基因组、AP 双基因组和未转染组均可见约 436 bp TR 基因扩增带, 灰度扫描分析的比值为 0.83、1.1 和 1.49, 显示反义 TR 基因整合入细胞后其表达降低. 在 AP 双基因转染的细胞中, 既可扩增出 p21 (图 6-2) 又可扩增出 TR 基因(图 6-5)

2.4 DNA 印迹验证

在以凝血酶受体 (TR) 基因为探针的杂交中 (图 5a), 可见 ATR 组有一 0.8 kb 杂交带, 其中 ATR 基因 0.6 kb, poly A 片段 0.2 kb. 在以 p21 基因为探针的杂交中 (图 5b), p21 组有一 2.2 kb 杂交带, 其中 p21 基因 2.0 kb, poly A 片段 0.2 kb. AP 双基因组仅以 *Bam*H I 酶切就产生既含 ATR 基因又含 p21 基因的 2.8 kb 片段, 故用 TR 和 p21 探针分别进行杂交后, 均在 2.8 kb 处得到阳性杂交带. 双基因组中的 ATR 基因则是在 *Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶切作用下, 除在 2.8 kb 处, 还在 0.6 kb 处得到片段. 以构建时不完全相同的位点酶切后杂交, 不但证实了双基因载体构建成功, 还证实了 ATR 和 p21 双基因可同时被导入 BHK 细胞基因组并得到整合. 各组均可见内源性 TR 与 p21 杂

条带, 说明双基因载体不但已整合入细胞, 且发生了共表达.

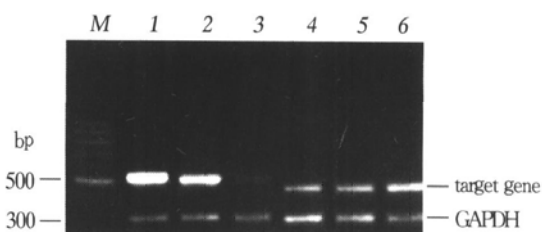


Fig. 6 Identification of the expression of ATR and p21 by RT-PCR

M: 100 bp DNA ladders; 1: p21 group; 2: AP group; 3: untransfected group; 4: ATR group; 5: AP group; 6: untransfected group. Top bands: expression of p21 gene in 1, 2, 3; expression of ATR gene in 4, 5, 6.

2.6 病毒滴度测定

对包装所获得的病毒, 分别以 TR 和 p21 基因为探针行点杂交, 结果见图 7. 经计算, 双基因 rAAV/AP 中 ATR 与 p21 的病毒滴度分别为 $1.02 \times 10^{13}/\text{ml}$ 、 $1.08 \times 10^{13}/\text{ml}$, 单基因 rAAV/ATR 的滴度为 $6.54 \times 10^{12}/\text{ml}$, rAAV/p21 为 $1.06 \times 10^{13}/\text{ml}$.

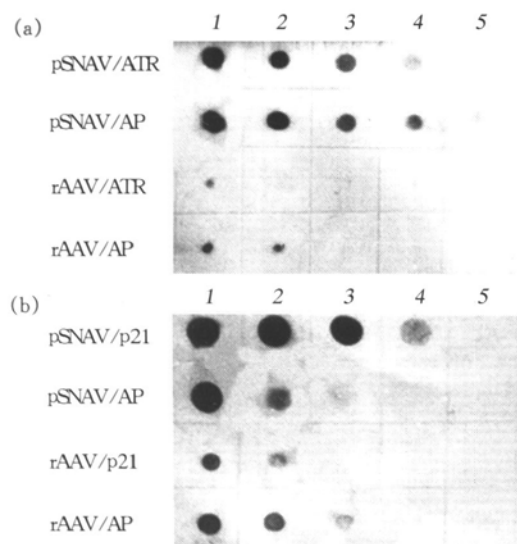


Fig. 7 The titre of rAAV by dot blot detection

(a) ATR probe; (b) p21 probe. The dilution of plasmids and rAAVs showed respectively: 1: 1:1; 2: 1:10; 3: 1:100; 4: 1:1000; 5: 1:10000.

3 讨 论

凝血酶是一种与再狭窄的发生密切相关的血管活性物质, 具有促进血管平滑肌细胞增殖的作用, 其功能由凝血酶受体介导. 实验证明, 血管损伤后, 病灶区局部的凝血酶及其受体的表达均增高, 因此抑制凝血酶受体基因的表达, 阻断凝血酶的功能, 不失为一个有效预防再狭窄的手段之一^[6,7]. 为尽早阻断平滑肌细胞的增殖, 我们认为还应从细胞周期调控途径入手. 抑癌基因 p21 是细胞周期的负调控因子, 该基因的过度表达, 可抑制平滑肌细胞的增殖^[8,9]. 因此本研究选用了 TR 的反义 mRNA 和 p21 基因为目的基因, 并首次以 AAV 为载体进行了双基因构建.

AAV 载体具有可以感染分裂和非分裂细胞, 并整合至染色体中, 可长期表达外源基因, 无致病性和免疫原性低等优点, 是较为理想的基因荷载工具^[10]. 但 AAV 病毒的 DNA 包装容量小, 两侧

ITR 间的外源基因总共不能超过 4.7 kb. 传统的包装步骤又非常繁琐, 重组过程中需将携带外源基因的质粒载体和助手质粒共同瞬时转染宿主细胞后, 再用辅助病毒感染之, 方可包装产生 rAAV, 且病毒滴度较低. 这极大地限制了 AAV 载体的利用, 也是目前国内实验室较少用其研究的原因. 新型重组单纯疱疹病毒 rHSV-rc/ΔU12 的出现, 不仅具有对 AAV 的全部辅助作用, 同时还携带可反式提供 AAV 复制和包装所必需的 rep 和 cap 基因, 将常规方法中的助手质粒和辅助病毒的作用合二为一. 本研究用其感染携带外源基因的 rAAV 前病毒载体细胞株, 将包装过程一步完成, 且重组病毒滴度达到了目前国际水平, 这为目的基因的高效表达奠定了基础^[11,12]. 本研究还利用 TR 基因反向插入和不携带 poly A 的特点, 仅使用其部分读码框序列, 而对 p21 基因则保证了读码框的完整, 但未取其 cDNA 全长, 从而才能在 4.7 kb 的容量范围内完成双基因的构建. 相信随着对 AAV 载体的开发研究, 它将在再狭窄的基因治疗中充分发挥其优势.

建立双基因乃至多基因共表达载体模式, 是为了能够同时有效地表达不同的治疗基因, 提高基因的转染效率. 本研究采用反义-正义的构建方式, 通过抑制 TR 表达和增强 p21 表达的方法, 以期达到从不同角度有效抑制靶细胞增殖的目的.

印迹杂交证明双基因可被同时导入并整合到 BHK 细胞基因组中, 并维持了反义-正义顺序相连的构建方式. RT-PCR 反应不但证明 TR 和 p21 两基因如期达到“一低一高”的 mRNA 表达水平, 且发生了两基因的共表达. 克隆形成过程中还显示出双基因对细胞增殖速度的抑制作用大于单基因. 推测双基因可能通过不同的作用机制产生协同作用, 但其对再狭窄治疗的最终生物学效应将进一步在血管平滑肌细胞和体内实验中验证.

参 考 文 献

- 1 张茜, 孟宪敏, 丁金凤. 反义凝血酶受体基因的表达对人 ASMC 增殖的影响. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, 15 (3): 484~487
Zhang Q, Meng X M, Ding J F. Chin J Biochem Mol Biol, 1999, 15 (3): 484~487
- 2 萨姆克鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T 著. 金冬雁, 等译. 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社, 1996. 16~491
Sambrook J, Fritsch E F, Coulson A R. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 16~69
- 3 伍志坚, 吴小兵, 侯云德. 具有 AAV 载体包装功能的重组

- HSV 的产生. 科学通报, 1999, **44** (5): 506~ 509
Wu Z J, Wu X B, Hou Y D. Chinese Science Bulletin, 1999, **44** (5): 506~ 509
- 4 Salvetti A, Oreve S, Chadeuf G, *et al.* Factors influencing recombinant adenovirus associated virus production. Hum Gene Ther, 1998, **9** (5): 695~ 706
 - 5 Cao L, Liu Y, During M J, *et al.* High-titer, wild-type free recombinant adenovirus associated virus production using intron-containing helper plasmids. J Virol, 2000, **74** (24): 11456~ 11463
 - 6 Cheung W M D, Andrea M R, Damiano B P, *et al.* Altered vascular injury responses in mice deficient in protease-activated receptor-1. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999, **19** (12): 3014~ 3024
 - 7 Baykal D, Schmedtje Jr J F, Runge M S. Role of the thrombin receptor in restenosis and atherosclerosis. Am J Cardiol, 1995, **75** (6): 82B~ 87B
 - 8 Mstushita H, Morishita R, Kida I, *et al.* Inhibition of growth of human vascular smooth muscle cells by overexpression of p21 gene through induction of apoptosis. Hypertension, 1998, **31** (part 2): 493~ 498
 - 9 Boulaire J, Fotadar A, Fotadar R. The functions of the cdk-cyclin kinase inhibitor p21WAF1. Pathol Biol, 2000, **48** (3): 190~ 202
 - 10 Monahan P E, Samulski R T. AAV vector: is clinical success on the horizon. Gene Ther, 2000, **7** (1): 24~ 30
 - 11 Nathwani A C, Hanawa H, Vandergriff J, *et al.* Efficient gene transfer into human cord blood CD34+ cells and the CD34+ CD38- subset using highly purified recombinant adenovirus associated viral vector preparations that are free of helper virus and wild-type AAV. Gene Ther, 2000, **7** (3): 183~ 195
 - 12 Conway J E, Rhys C M, Zolotukhin I, *et al.* High-titer recombinant adenovirus associated virus production utilizing a recombinant herpes simplex virus 1 vector expressing AAV-2 Rep and Cap. Gene Ther, 1999, **6** (6): 986~ 993

Construction and Package of Antisense Thrombin Receptor and p21 Co-expression Adenovirus associated Virus Vector*

MENG Xian-Min^{1)**}, WU Xiao-Bing²⁾, MI Li-Guo¹⁾, WU Zhi-Jian²⁾,
ZHAO Xiu-Wen¹⁾, LIU Dong-Qing¹⁾, DING Jin-Feng¹⁾

¹⁾ Cardiovascular Institute and Fuwai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100037, China;

²⁾ State Key Laboratory for Molecular Virology and Genetic Engineering, Institute of Virology,
Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100052, China)

Abstract In order to study the co-expression effect of antisense thrombin receptor (ATR) and p21 genes on preventing restenosis, an adenovirus associated virus (AAV) vector carrying the two genes with different promoters was constructed. Simultaneously, rAAV vectors containing ATR or/and p21 gene were constructed respectively. BHK-21 cell lines carried different plasmids were established by lipofectamine transfection and G418 selection. During the process of cell clones selected, double gene showed stronger inhibition to cell proliferation than single gene. The speed of clones formation decreased meanwhile the morphological alteration of cells occurred. Southern blot confirmed that expression vectors containing ATR or/and p21 gene had been steadily integrated into BHK-21 cells. The antisense position of TR gene has been maintained. Semi-quantitative RT-PCR showed that the expression of TR decreased and the expression of p21 increased. Co-expression of double gene was obtained. rAAV virions were packaged through recombinant herpes simplex virus (rHSV-rc/ Δ U12) infecting BHK-21 cell lines carried various vectors. The titre of rAAV (particles/ml) determined by dot blot analysis. The particles of ATR and p21 in rAAV/AP double gene vector were 1.02×10^{13} particles/ml and 1.08×10^{13} particles/ml respectively. The particles of single gene rAAV /ATR or rAAV /p21 were 6.54×10^{12} particles/ml or 1.06×10^{13} particles/ml.

Key words antisense thrombin receptor gene, p21 gene, adenovirus associated virus vector, virus titre, restenosis

* This work was supported by grants from The State Key Program "95" (96-906-02-07), The National Natural Science Foundation of China (39970297).

** Corresponding author. Tel: 86-10-68314466-8069, E-mail: xmmeng@elong.com

Received: December 7, 2001 Accepted: December 28, 2001