

hVEGF₁₆₅ 和嵌合水蛭肽融合基因的构建、表达和活性检测*

沈 雳¹⁾ 陈少萍^{1)**} 秦永文¹⁾ 蔡在龙²⁾

(¹⁾第二军医大学长海医院心内科, 上海 200433; ²⁾第二军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433)

摘要 根据抗 PTCA 或支架后再狭窄的基因治疗需要多基因治疗的特点, 用基因重组技术构建了 hVEGF₁₆₅ 和嵌合水蛭肽 (fused hirudin, FH) 融合基因, 并克隆到真核表达载体 pcDNA3.0 中, 通过脂质体介导将 pcDNA3.0/hVEGF₁₆₅ - FH 转染到人内皮细胞株 (ECV₃₀₄) 中, RT-PCR 及蛋白质印迹证明融合基因 hVEGF₁₆₅ - FH 在 ECV₃₀₄ 细胞中得到表达 (分子质量为 24 ku 左右). 通过体外活性检测——MTT 法检测 hVEGF₁₆₅ - FH 对 ECV₃₀₄ 细胞增殖的影响, 通过体外血管生成分析 hVEGF₁₆₅ - FH 对内皮细胞株 ECV₃₀₄ 增殖的影响. 通过体外抗栓活性检测, 表明表达产物具有促进内皮细胞株增殖及加快血管生成的作用, 同时显著抑制了 ADP 诱导的血小板聚集率 ($P < 0.05$) 并显著延长 APTT 和 TT ($P < 0.05$). 实验结果表明, 融合基因在内皮细胞株中得到表达, 表达的融合蛋白具有 hVEGF₁₆₅ 和嵌合水蛭肽 (FH) 的双重活性, 这为以后的融合基因治疗再狭窄的动物实验打下了良好基础.

关键词 血管内皮生长因子, 水蛭肽, 融合基因, pcDNA3.0, 载体构建, 基因表达

学科分类号 Q78, R54

随着经皮冠状动脉内成形术 (percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA) 和内支架植入术的迅速发展, 冠心病介入治疗的效果有显著提高, 但再狭窄却严重影响其远期疗效^[1,2]. 尽管一些新的药物及方法被用来减少再狭窄的发生, 但他们的效果并不十分理想. 基因治疗是目前具有前景的抗再狭窄的治疗方法之一^[3]. 但是因为再狭窄发生机制的复杂性, 单一基因的治疗依然无法达到理想的效果, 所以多基因的联合治疗或称之为鸡尾酒疗法可能更利于再狭窄的防治. 研究证实内皮损伤是所有再狭窄病理过程的始动因素, 内皮的缺失及功能障碍使受损血管暴露于各种病理因素下 (诸如血栓、炎性细胞浸润、血管痉挛等), 而血栓形成分泌的细胞因子又促进了内膜平滑肌细胞的过度增殖, 从而促进再狭窄的形成^[4,5]. 因此基因治疗的核心在于保护内皮细胞, 加快其再生及内皮修复, 同时抑制损伤后血栓的形成, 从而从多个环节抑制再狭窄的发生.

血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是一种强有力的血管生成因子, 可以特异性地促进血管内皮的增殖, 并被认为是内皮存活因子 (survival factors)^[6], 除此以外, 它还具有促进内皮释放一氧化氮和前列腺环素的作用

用^[7], 这些作用使 VEGF 成为最有效的内皮修复因子之一. 嵌合水蛭肽是以水蛭素 C 端 12 肽为核心的具有抗凝及抗血小板功能的多肽, 它具有很强的抗栓作用^[8], 同时也具有较强的抗内膜增殖作用. 本实验构建了具有内皮修复功能的 hVEGF₁₆₅ 基因和抗栓功能的嵌合水蛭肽基因的融合基因, 并转染至内皮细胞株, 检测其表达产物的体外抗栓及促进内皮细胞增殖的活性, 为抗再狭窄的基因治疗研究寻找新的方向和实验基础.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒. JM109 菌、pcDNA3.0、pcDNA3.0/hVEGF₁₆₅、pcDNA3.0 和 pBSK 由本实验室保存.

1.1.2 试剂. 限制内切酶 *Bam*H I, *Eco*R I, *Xho* I, T4DNA 连接酶及 DNA 分子质量标准购于 TaKaRa 公司. 质粒小量抽提试剂盒和胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司. T 载体构建系统

*国家自然科学基金资助项目 (30200281).

** 通讯联系人.

Tel: 021-25072064, E-mail: cspcsp@vip.sina.com

收稿日期: 2005-05-16, 接受日期: 2005-06-30

(pGEM-T Vector) 及连接酶 (T4 DNA ligase) 购自 Promega 公司. DMEM 高糖培养基 (Catalog: 11995) 购自 GIBCO 公司. Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司. 逆转录试剂盒 (First-Strand cDNA Synthesis Kit) 购自上海申能博彩生物科技有限公司. 永生型人内皮细胞株 ECV₃₀₄ 为本实验室保存. 阳离子脂质体 LIPOFECTAMINE 2000 购自 Invitrogen 公司. 兔抗人 VEGF 多克隆抗体及人 VEGF 标准蛋白购自 PeproTech 公司. 标准分子质量蛋白 (Prestained Protein Molecular Weight Marker, Catalog: SM0441) 购自 Fermentas 公司. MTT 试剂购自 Sigma 公司. 体外血管生成分析试剂盒 (ECMatrixTM 胶包被 96 孔板) 购自 Chemicon 公司. 引物由上海生工生物技术工程有限公司合成. 测序由上海生工生物技术工程有限公司完成.

1.2 方法

1.2.1 融合基因的构建和重组真核表达载体.

a. 目的基因的设计. 融合多肽 N'端为 VEGF₁₆₅, 通过 GlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySer (GGGSGG-GGS) 柔性多肽连接 C 端的嵌合水蛭肽的序列. 氨基酸序列如图 1 所示. 分别构建目的基因: (1) VEGF₁₆₅ 基因片段, 该序列的 5' 端引入 *Bam*H I 酶切位点 (GGATCC) 及起始密码子 (ATG), 3' 端引入 *Xho* I 酶切位点 (CTCGAG) 以便与嵌合水蛭肽基因片段连接. (2) 嵌合水蛭肽 (FH) 基因片段, 通过遗传密码在哺乳动物的偏向性设计 (DNAWORKS2.0 软件辅助设计) 后得到其 DNA 序列. 该基因 5' 端也引入 *Xho* I 酶切位点 (CTCGAG), 以便与 VEGF₁₆₅ 连接, 该序列 5' 端为 GGGSGGGGS 柔性多肽基因, 序列末 (3' 端) 为终止密码子 TGA 和 *Eco*R I 酶切位点 (GAATTC). 整个融合基因的核苷酸序列如图 2.

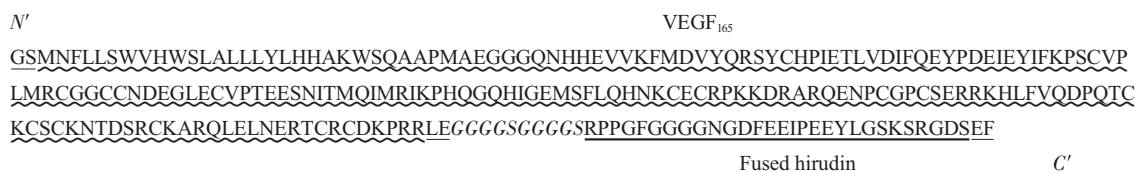


Fig. 1 Amino acid sequence of hVEGF₁₆₅-FH fusion protein

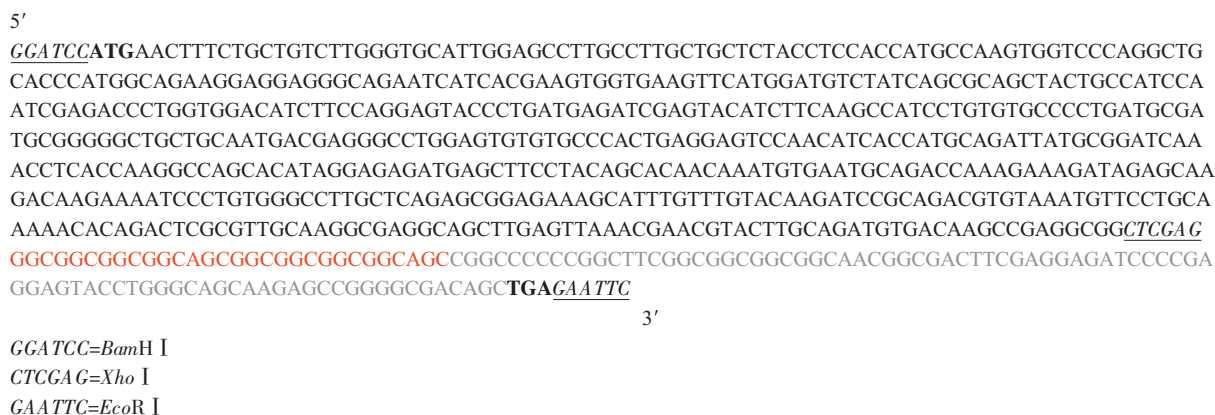


Fig. 2 DNA sequence of hVEGF₁₆₅-FH fusion gene

b. hVEGF₁₆₅ 基因片段的扩增及 pGEM-T/hVEGF₁₆₅ 的克隆. 引物 1: GGC GGA TCC ATG AAC TTT CTG CTG TCT TGG GTG, 引物 2 (5'-3'): GCG CTC GAG CCG CCT CGG CTT GTC ACA TCT G. 以 pcDNA3.0/hVEGF₁₆₅ 质粒为模板,

进行 PCR 反应, 反应体系如下: 10×PCR 缓冲液 5 μl, dNTP 4 μl, 模板 1 μl (10 mg/L), 引物 1, 2 各 1 μl (20 μmol/L), 双蒸水 37.5 μl, Taq 酶 0.5 μl, 总体积 50 μl. PCR 反应条件: 94℃ 2 min; 93℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s, 循环 30 次;

72℃延伸 5 min. 0.7% 琼脂糖凝胶电泳分析扩增片段. 按胶回收试剂盒的方法回收及纯化 hVEGF₁₆₅ 基因 PCR 产物. hVEGF₁₆₅ 基因 PCR 产物的克隆: 取 Promega 公司的 pGEM-T 载体. 反应体系: 2×Rapid Ligation Buffer 5 μl, pGEM-T 1 μl, 纯化 PCR 产物 1 μl, T4 DNA Ligase 1 μl, 双蒸水 2 μl, 总体积 10 μl. 4℃ 过夜. 取 pGEM-T/hVEGF₁₆₅ 连接反应液 5 μl 转化感受态 JM109 菌. 经蓝白斑鉴定取阳性克隆作酶切鉴定. 鉴定正确克隆送测序.

c. 嵌合水蛭肽基因(fused hirudin, FH)的合成及 pBSK/FH 的克隆. 因为所需要合成基因序列短, 直接空出两端的酶切位置, 合成互补的两对引物. 引物 1(5'-3'): TCGAGGGCGGCGGCGGCAGCG-GCGGCGGCGGCGAGCCGGCCCCCGGCTTCGG-CGGCGGC, 引物 2(5'-3'): TCGCCGTTGCCGCGCCGCCGAAGCCGGGGGGCGGCTGCCGCC-GCCGCCGCTGCCGCCGCCGCC, 引物 3(5'-3'): GGCAACGGCGACTTCGAGGAGATCCCC-GAGGAGTACCTGGGCAGCAAGAGCCGGGGCG-ACAGCTGAG, 引物 4(5'-3'): AATTCTCAG-CTGTCGCCCCGGCTCTTGCTGCCCAGGTACTC-CTCGGGGATCTCCTCGAAG.

直接采用退火反应合成基因(FH)全长. 反应体系如下: 各引物 2.5 μl(5 μmol/L), NaCl 缓冲液 2 μl, 双蒸水 8 μl, 总体积 20 μl. 在 PCR 仪上, 95℃ 2 min, 然后自然降到常温. 0.7% 琼脂糖凝胶电泳分析退火产物. pBSK 和电泳回收的产物(FH)用 *Xho* I /*Eco* R I 进行双酶切, pBSK 双酶切产物电泳回收, 连接、转化、挑菌、抽提质粒同上一次连接反应. 用 *Xho* I 和 *Eco* R I 进行 pBSK/FH 质粒双酶切鉴定. 37℃ 酶切 1 h, 0.7% 琼脂糖凝胶电泳. 鉴定正确克隆送测序.

d. pcDNA3.0/hVEGF₁₆₅-FH 表达载体的构建.

分别双酶切 pGEM-T/hVEGF₁₆₅ (*Xho* I / *Bam* H I), pBSK/FH(*Xho* I /*Eco* R I), pcDNA3.0 (*Bam* H I /*Eco* R I), 电泳回收纯化酶切产物, 作 3 片段(hVEGF₁₆₅, FH, pcDNA3.0) 连接反应: hVEGF₁₆₅ 5 μl, FH 5 μl, pcDNA3.0 1 μl, 2×Rapid Ligation Buffer 12 μl, T4 DNA Ligase 1 μl, 总体积 24 μl. 反应温度 12℃, 时间 12 h. 取 pcDNA3.0/hVEGF₁₆₅-FH 连接反应液转化、挑菌、抽提质粒作酶切鉴定, 鉴定正确克隆测序. 融合基因克隆示意图如图 3.

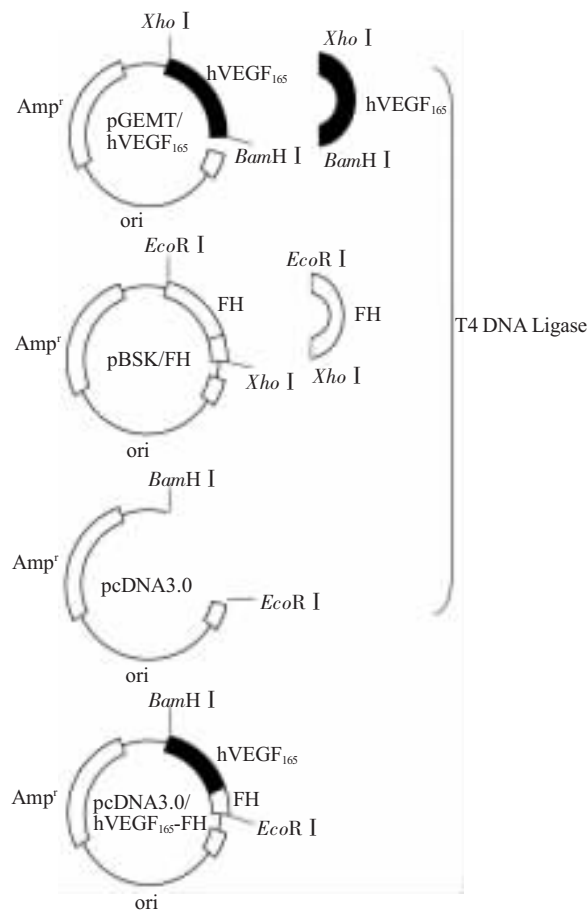


Fig. 3 Cloning of pcDNA3.0/hVEGF₁₆₅-FH

1.2.2 融合基因的表达.

a. 融合基因的内皮细胞转染. 按常规方法用含 10% 胎牛血清的 DMEM (高糖) 培养基, 培养、传代. 正常人内皮细胞株 (ECV₃₀₄ 细胞) 为梭形贴壁细胞. 以 2×10^5 ECV₃₀₄ 细胞 / 孔接种于 6 孔板中, 待生长汇合达 80% 时进行转染. 分别取上述制备好的质粒 pcDNA3.0 和 pcDNA3.0/hVEGF₁₆₅-FH. 预先将 100 μl 无血清培养基 (OPTI-MEM I) 稀释 1 μg DNA, 用 100 μl 无血清的培养基 (OPTI-MEM I) 稀释 3 μl 阳离子脂质体试剂. 将稀释的 DNA 同稀释的脂质体试剂混合. 在室温保温 15 min. 使用 0.8 ml / 孔的 OPTI-MEM I 在转染开始前清洗细胞后, 将稀释的复合物加入细胞. 5% CO₂, 37℃ 保温 5 h. 5 h 后弃去转染液, 换含血清的 DMEM 培养基 2 ml / 孔. 转染 48 h 后, 细胞 1:10 传代至新鲜培养基中, 加入筛选抗生素 G418 (600 mg/L) 进行筛选. 对稳定转染 pcDNA3.0 和 hVEGF₁₆₅-FH/ pcDNA3.0 的 ECV₃₀₄ 单克隆细胞进行扩大培养后收集无血清

的培养细胞上清,用于鉴定.

b. RT-PCR 法检测 hVEGF₁₆₅-FH mRNA 水平. 取稳定转染 pcDNA3.0 和 pcDNA3.0/hVEGF₁₆₅-FH 的 ECV₃₀₄ 单克隆细胞扩大培养 3 天的细胞,消化后离心收集细胞,用 Trizol 试剂盒提取总 RNA,凝胶电泳判断有无降解.取总 RNA 1 μ l 进行逆转录,逆转录产物 2 μ l 为 PCR 反应模板, GAPDH 作为内参照.设计引物.引物 1: ATC TTC AAG CCA TCC TGT GTG CC; 引物 2: GCA AGT ACG TTC GTT TAA CTC AAG; 引物 3: TCT TGC TGC CCA GGT ACT CCT C.其中引物 1 和 2 扩增 hVEGF₁₆₅-FH 中 VEGF 的特异片段 (339 bp), 引物 1 和 3 扩增 hVEGF₁₆₅-FH 中含有 FH 的特异片段 (470 bp), PCR 反应体系: 2 $\times$ GC 缓冲液 25 μ l, dNTP 8 μ l, 模板 2 μ l, 引物 1, 2 各 0.25 μ l, 双蒸水 14 μ l, Taq 酶 0.5 μ l, 总体积 50 μ l.反应条件: 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 循环 35 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min.取 5 μ l PCR 产物上样, 0.7% 琼脂糖凝胶电泳.

c. 蛋白质印迹法检测 hVEGF₁₆₅-FH mRNA 蛋白表达水平.取稳定转染的 pcDNA3.0 和 pcDNA3.0/hVEGF₁₆₅-FH 的 ECV₃₀₄ 单克隆细胞扩大培养 3 天的细胞上清液 (无血清) 5 ml 各 4 瓶, 于 -80 $^{\circ}$ C 放置 2 h, 用真空冷冻 -60 $^{\circ}$ C、8 500 Pa 冻干, 分别溶于 50 μ l PBS 溶液中, 取 10 μ l 样品及 VEGF₁₆₅ 蛋白等作 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 后, 转移至醋酸纤维素膜.转膜后, 用 TBS 洗膜 5 min $\times$ 1 次, 以 5% 脱脂奶粉室温 (15~25 $^{\circ}$ C) 封闭 1 h; TBS 室温洗膜 5 min $\times$ 3 次; 加入一抗工作液 (兔抗人 VEGF 多克隆抗体, 1:2 500, TBST 稀释), 室温平缓摇动孵育 1 h, 4 $^{\circ}$ C 过夜; TBS 室温洗膜 5 min $\times$ 3 次; 加入辣根过氧化物酶标记的 IgG 二抗工作液 (1:1 000, TBST 稀释), 室温平缓摇动孵育 1 h; TBS 室温洗膜 5 min $\times$ 3 次; 然后进行化学发光法显影.

1.2.3 融合基因表达产物的活性检测.

a. hVEGF₁₆₅-FH 对内皮细胞株 ECV₃₀₄ 细胞增殖的影响. 0.25% 的胰蛋白酶消化 ECV₃₀₄ 细胞 (未转染) 用含 10% 胎牛血清的 DMEM (高糖) 培养基配成单细胞悬液, 以每孔 10³ 个细胞接种 96 孔板, 每孔 200 μ l 体积. 24 h 后加入不同体积 pcDNA3.0/hVEGF₁₆₅-FH 的细胞上清浓缩蛋白 PBS 溶液, 同时换培养基为 0.4% 胎牛血清的 DMEM (高糖) 培养基, 总体积保持一致 (200 μ l). 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 48 h 后每孔加入 5 mg/L MTT 20 μ l, 再

置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养 4 h 后, 取出培养板于纸巾上轻轻倒扣, 使其液体洗干. 再加 DMSO 200 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 5 min, 镜下观察空中蓝色结晶全部溶解后, 于酶联免疫检测仪上 490 nm 观察, 记录 A₄₉₀, 每一浓度均有 12 个复孔, 取其平均值. 体外血管生成分析 hVEGF₁₆₅-FH 对内皮细胞株 ECV₃₀₄ 增殖的影响, 按试剂盒说明操作. 40 倍倒置显微镜下观察血管生成情况并计数: 每孔随机取 3 个视野计算新生的血管管腔数, 然后得到总数后平均.

b. hVEGF₁₆₅-FH 体外抗栓活性检测. 8 名健康献血者近 2 周内没有服用任何药物, 抽肘静脉血 10 ml, 以 106 nmol/L 枸橼酸钠抗凝 (血与抗凝剂之比为 9:1). 抗凝血经离心 (800 r/min, 5 min) 分离富血小板血浆 (PRP), 剩余血离心 (3 000 r/min, 30 min), 获得贫血浆 (PPP). 调整血小板浓度为 300 $\times$ 10⁹/L 备用. 将保存的细胞上清冻干粉用 PBS 1 350, 450, 150, 50 μ l/管溶解 (每管相当于 20 ml 细胞上清液的浓缩冷冻干燥粉), 配成从高到低的浓度比为 1:3:9:27 的溶解液. 取未转染的空 ECV₃₀₄ 细胞, 转染 pcDNA3.0 的 ECV₃₀₄ 细胞的细胞培养上清液作为对照组. PBS 溶液作为空白对照, 以扣除其本底吸收值. 160 μ l PRP 中分别加入 20 μ l 各浓度样品溶液并注入凝集器中, 总体积为 180 μ l, 以 1 000 r/min 的速度进行连续磁力搅拌 3 min 后, 加入 ADP 20 μ l (终浓度 2 μ mol/L). SH-93 智能血液凝聚仪测血小板聚集度. Thrombolyzer Racd Rator 测定活化部分凝血活酶时间 (activated partial thromboplastin time, APTT)、凝血酶时间 (thrombin time, TT) 等凝血指标.

2 结 果

2.1 hVEGF₁₆₅ 和嵌合水蛭肽融合基因 (pcDNA3.0/hVEGF₁₆₅-FH) 的克隆构建及鉴定

pGEM-T/hVEGF₁₆₅ (Xho I / BamH I), pBSK/FH (Xho I / EcoR I), pcDNA3.0 (BamH I / EcoR I) 双酶切后, 电泳回收纯化酶切产物, 按 5:5:1 的浓度作连接反应. 得到的重组质粒, 分别经 BamH I / EcoR I 做双酶切和 BamH I / Xho I / EcoR I 三酶切. 电泳 (图 4) 显示, 双酶切后得到 710 bp 大小的目的片段和载体片段, 三酶切后得到 580 bp 左右、130 bp 左右的目的片段及载体片段. 表明两目的片段已连接成功, 并与载体相连. 取阳性克隆送测序, 结果完全与预计序列相符 (测序图略), 表明融合基因克隆成功.

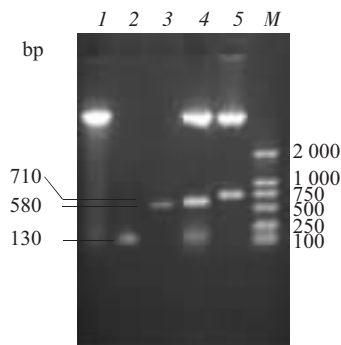


Fig. 4 Digestion analysis of pcDNA3.0/hVEGF₁₆₅-FH recombinants

I: pcDNA3.0 vector; 2: FH; 3:VEGF₁₆₅; 4: Tris-digestion of pcDNA3.0/hVEGF₁₆₅-FH with *Bam*H I/*Xho* I/*Eco*R I ; 5: Double digestion of pcDNA3.0/hVEGF₁₆₅-FH with *Bam*H I/*Eco*R I ; *M*: Marker (DNA marker DL2000, TaKaRa).

2.2 RT-PCR 法检测 hVEGF₁₆₅-FH mRNA 水平

稳定转染 pcDNA3.0/hVEGF₁₆₅-FH 的 ECV₃₀₄ 细胞的裂解产物经 RT-PCR 扩增出 470 和 339 bp 两条特异性条带，说明该细胞已转录出含有 hVEGF₁₆₅ 和 FH 融合基因的 mRNA (图 5). 而只转

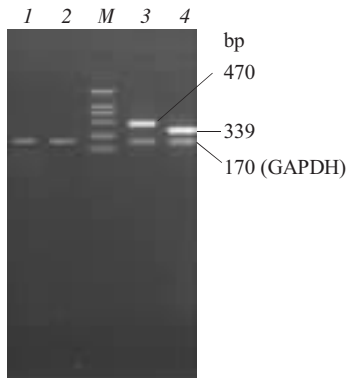


Fig. 5 RT-PCR products of pcDNA3.0/hVEGF₁₆₅-FH recombinants

I: RT-PCR product of ECV₃₀₄ (P1P3); 2: RT-PCR product of ECV₃₀₄ transfected with pcDNA3.0(P1P3); *M*: Marker (DNA marker DL2000, TaKaRa); 3: RT-PCR product of ECV₃₀₄ transfected with pcDNA3.0 / hVEGF₁₆₅-FH (P1P3); 4: RT-PCR product of ECV₃₀₄ transfected with pcDNA3.0/hVEGF₁₆₅-FH (P1P2).

染 pcDNA3.0 的 ECV₃₀₄ 无法扩增出特异性的 470 bp 的条带，仅仅扩增出 339 bp 的条带 (电泳图未显示)，这可能与 ECV₃₀₄ 细胞中表达少量 VEGF 有关.

2.3 蛋白质印迹检测 hVEGF₁₆₅-FH 蛋白表达水平

稳定转染 pcDNA3.0/hVEGF₁₆₅-FH 的 ECV₃₀₄ 单克隆细胞的上清液浓缩蛋白产物，经蛋白质印迹得到分子质量约 24 ku 大小的蛋白质条带，而 VEGF₁₆₅ 的阳性对照为 20 ku，说明该细胞已分泌出含有 hVEGF₁₆₅ 和 FH 的融合蛋白 (图 6).

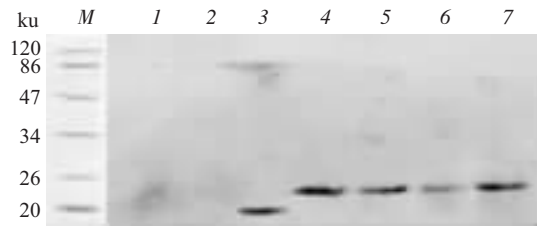


Fig. 6 Western blot analysis of hVEGF₁₆₅-FH fusion protein expression in ECV₃₀₄ cells

I: Nontreated cell; 2: Empty plasmid; 3: Positive VEGF; 4: No.1 cell clone; 5: No.5 cell clone; 6: No.6 cell clone; 7: No.9 cell clone; *M*: Maker (SM0441, Fermentas).

2.4 融合基因表达产物的活性检测

如表 1 所示，当加入 hVEGF₁₆₅-FH 转染阳性细胞上清液浓缩蛋白溶液 5，10，20 μl 后，内皮细胞株的 *A*₄₉₀ 值均较阴性对照及加 pcDNA3.0 转染阳性细胞上清液浓缩蛋白溶液高 (*P* < 0.05)，且随其浓度的增加而作用加强. 说明 hVEGF₁₆₅-FH 对内皮细胞株促进 ECV₃₀₄ 细胞增殖(表 1).

体外血管生成分析 hVEGF₁₆₅-FH 对内皮细胞株 ECV₃₀₄ 增殖的影响. 当加入 hVEGF₁₆₅-FH 转染阳性细胞上清液浓缩蛋白溶液后，内皮细胞逐渐融合逐步形成血管管腔结构，与对照及加入 pcDNA3.0-ECV₃₀₄ 上清浓缩蛋白溶液组比较，血管管腔形成数显著增加(*P* < 0.05)，且管腔壁结构更完整(图 7，8).

Table 1 MTT activity analysis of hVEGF₁₆₅-FH in supernatant from transfected ECV₃₀₄

Volume of concentrated protein solution μl	<i>A</i> ₄₉₀		
	Control	pcDNA3.0	hVEGF ₁₆₅ -FH/pcDNA3.0
5	0.0338±0.0335	0.0354±0.0272*	0.1397±0.0605**, ***
10	0.0363±0.0349	0.0370±0.0300*	0.2544±0.1618**, ***, ▲
20	0.0372±0.0283	0.0383±0.0260*	0.5203±0.0967**, ***, ▲, ■

P* > 0.05 *vs* control, *P* < 0.05 *vs* control, ****P* < 0.05 *vs* pcDNA3.0, ▲*P* < 0.05 *vs* 5 μl hVEGF₁₆₅-FH, ■*P* < 0.05 *vs* 10 μl hVEGF₁₆₅-FH.

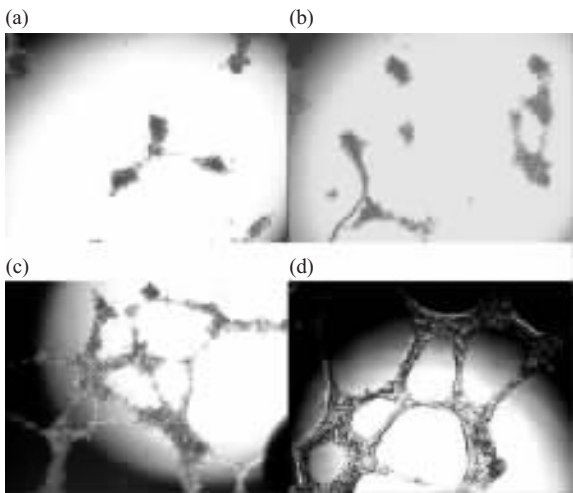


Fig. 7 The effect of hVEGF₁₆₅-FH on EC tube formation (40×)
(a) ECV₃₀₄, (b) pcDNA3.0, (c) hVEGF₁₆₅-FH (30 μl), (d) hVEGF₁₆₅-FH (50 μl).

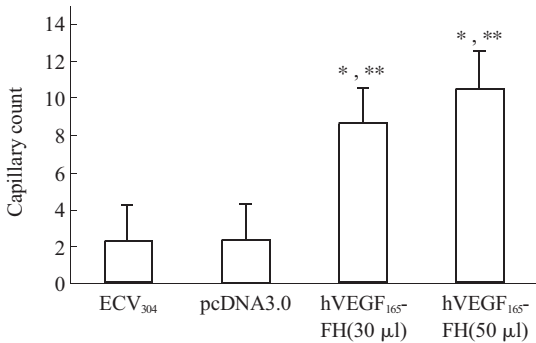


Fig. 8 Number of tube formation induced by hVEGF₁₆₅-FH
* $P < 0.05$ vs ECV₃₀₄, ** $P < 0.05$ vs pcDNA3.0.

hVEGF₁₆₅-FH 与 PBS 比较, 显著抑制了 ADP 诱导的血小板聚集率($P < 0.05$)并显著延长 APTT 和 TT($P < 0.05$), 而与未转染的空 ECV₃₀₄ 细胞及转染 pcDNA3.0 的 ECV₃₀₄ 细胞的培养上清液比较, hVEGF₁₆₅-FH 在 9×和 27×的浓度下显著抑制了 ADP 诱导的血小板聚集率($P < 0.05$), 且显著延长 APTT ($P < 0.05$), 而在 3×, 9×, 和 27×浓度下对 TT 有显著的延长作用($P < 0.05$), 说明融合蛋白 hVEGF₁₆₅-FH在一定浓度下能对血小板及凝血酶活性有显著抑制作用, 随浓度的增加而增加(图 9~11). 实验中同时发现, 未转染的空 ECV₃₀₄ 细胞及转染 pcDNA3.0 的 ECV₃₀₄ 细胞的培养上清液, 较 PBS 具有更明显的抑制 ADP 诱导血小板聚集率和凝血酶活性作用, 但其活性仍显著弱于 hVEGF₁₆₅-FH, 推测细胞培养液或血清中可能含有微量的抗栓物质.

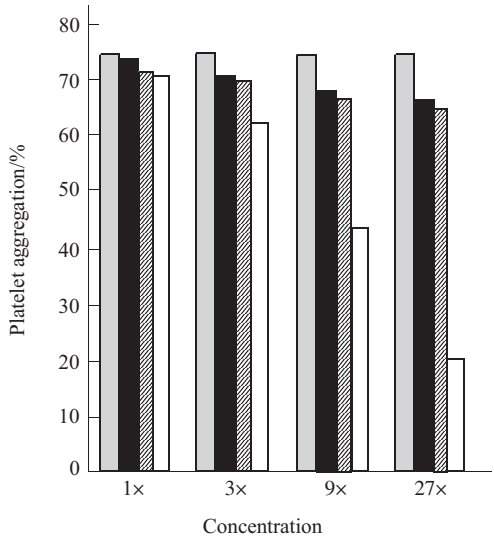


Fig. 9 Effects of hVEGF₁₆₅-FH on human platelet aggregation induced by ADP
□:PBS; ■:ECV; ▨:pcDNA3; □:hVEGF₁₆₅-FH.

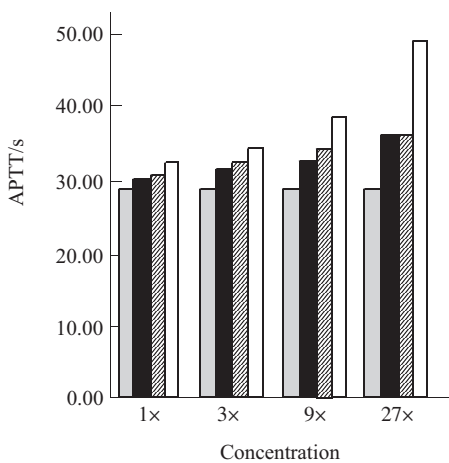


Fig. 10 Effects of hVEGF₁₆₅-FH on APTT
□:PBS; ■:ECV; ▨:pcDNA3; □:hVEGF₁₆₅-FH.

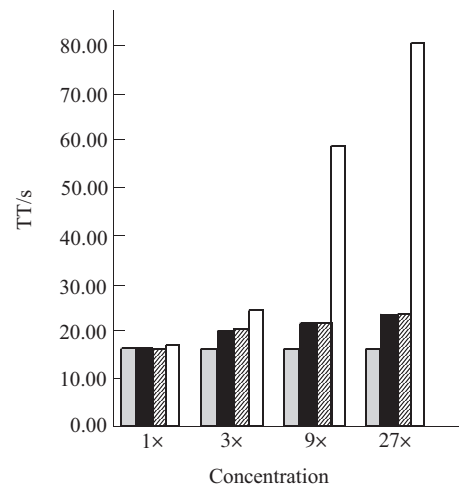


Fig. 11 Effects of hVEGF₁₆₅-FH on TT
□:PBS; ■:ECV; ▨:pcDNA3; □:hVEGF₁₆₅-FH.

3 讨 论

本实验设计将 VEGF 融合了具有抗栓功能的嵌合水蛭肽基因,旨在通过该融合基因从多个环节抑制再狭窄的发生.在设计出融合多肽后,将其氨基酸序列反向翻译成核苷酸序列并通过基因重组构建出融合表达质粒,使其成功地在内皮细胞株表达,希望表达的融合多肽能达到协同抗再狭窄的效果.为了更有效地发挥两多肽各自的功能,在两多肽间设计了一柔性接头 GlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySer, Gly 和 Ser 具有良好的伸展性,用它们连接的多肽片段不易在空间结构上相互干扰,从而最大限度地保留了各多肽片段的活性^[9].分别构建两段目的基因,然后通过连接反应使两段相连并插入载体 pcDNA3.0 中.多片段基因连接反应有一定难度,需要掌握好各片段间的浓度比例,而且片段需要预先纯化及酶切彻底,本实验中载体及两段基因同时连接,比例为 5:5:1,载体量较目的片段量多,使片段接入载体的几率增大,而减少自连.经酶切鉴定和测序证实融合基因成功克隆.

本实验依然采用 pcDNA3.0 做为表达载体,因为病毒载体存在潜在的毒性作用,并可能引起人体或细胞的免疫反应^[10].有实验发现腺病毒介导的基因转移到兔动脉后导致了血管细胞激活期延长,炎症反应,甚至内膜增殖^[11].pcDNA3.0 自带巨细胞病毒(CMV)启动子,在绝大部分哺乳动物均能表达,其具有拷贝数高和高度稳定的特点,为一理想的真核表达载体.当然质粒转染存在效率低的缺陷,不过 VEGF 基因的第一外显子含有分泌肽序列,可使表达的 VEGF 从细胞中完整地分泌出来,即使基因转染效率较低,通过旁分泌作用也能发挥很大作用.本融合基因将嵌合水蛭肽基因融合在 VEGF 的 3'端,不影响其分泌肽序列表达和功能.通过脂质体介导的细胞转染后,对转染基因的表达从 mRNA 和蛋白质水平来检测.通过 RT-PCR 法检测出转染阳性细胞中转录出特异的融合基因 mRNA,而其逆转录出的 cDNA 产物经测序证实与转染的融合基因序列一致.进一步通过蛋白质印迹检测,细胞培养上清液浓缩蛋白有特异性的蛋白质,其分子质量为 24 ku 左右.本实验用的是 VEGF 多抗,其可以与融合基因中 VEGF 的特异序列相结合形成免疫印迹.而其与 VEGF 标准蛋白亦可结合成免疫印迹,分子质量为 20 ku 左右,与文献[12]报道的结果相似.VEFG-FH 融合蛋白分子质量较 VEGF

蛋白的分子质量大 4 ku 左右,而这恰是嵌合水蛭素蛋白的分子质量大小,这说明 VEGF-FH 融合基因已在 ECV₃₀₄ 中表达且分泌到细胞上清液.

实验中从筛选后的转染阳性的多个单克隆细胞中选择蛋白质分泌量较高的细胞克隆,并经扩大培养后的细胞上清液在冷冻干燥后得到的浓缩蛋白更有利于蛋白质活性的研究.这主要考虑到真核细胞的表达虽然避免了原核细胞表达的蛋白质修饰、剪切及复性问题而保持了蛋白质活性,但其表达量较低,故用浓缩蛋白便于蛋白质的鉴定和活性分析.经过体外的活性分析,VEGF₁₆₅-FH 融合蛋白在较高浓度下具有促进内皮细胞增殖和抗栓作用,这初步证实该融合基因在内皮细胞得到表达且仍具有双重活性.由于实验时间及条件所限,本实验未将 VEGF₁₆₅-FH 融合蛋白分别与 VEGF 蛋白和水蛭素进行活性比较,也未将融合蛋白进行精确的定量分析,这有待实验的深入研究.但已得的结论可为融合基因的体内表达及活性研究打下基础.

参 考 文 献

- 1 Wurdeman R L, Hilleman D E, Mooss A N. Restenosis, the Achilles' heel of coronary angioplasty. *Pharmacotherapy*, 1998, **18** (5): 1024~1040
- 2 Welt F G, Rogers C. Inflammation and restenosis in the stent era. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22** (11): 1769~1776
- 3 Kibbe M R, Billiar T R, Tzeng E. Gene therapy for restenosis. *Circ Res*, 2000, **86** (8): 829~833
- 4 Hiltunen M O, Laitinen M, Turunen M P, *et al.* Intravascular adenovirus-mediated VEGF-C gene transfer reduces neointima formation in balloon-denuded rabbit aorta. *Circulation*, 2000, **102** (18): 2262~2268
- 5 Kipshidze N, Dangas G, Tsapenko M, *et al.* Role of the endothelium in modulating neointimal formation: vasculoprotective approaches to attenuate restenosis after percutaneous coronary interventions. *J Am Coll Cardiol*, 2004, **44** (4): 733~739
- 6 Ferrara N, Alitalo K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med*, 1999, **5** (12): 1359~1364
- 7 Murohara T, Horowitz J R, Silver M, *et al.* Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin. *Circulation*, 1998, **97** (1): 99~107
- 8 沈 雳,陈少萍,蔡在龙,等.嵌合水蛭肽的构建与活性分析. *中国生物化学与分子生物学报*, 2004, **20** (5): 702~706
Shen L, Chen S P, Cai Z L, *et al.* *Chin J Biochem Mol Biol*, 2004, **20** (5): 702~706
- 9 Newton D L, Xue Y, Olson K A, *et al.* Angiogenin single-chain immunofusion: influence of peptide linkers and spacers between fusion protein domains. *Biochemistry*, 1996, **35** (2): 545~553
- 10 von der Leyen H E, Braun-Dullaeus R, Mann M J, *et al.* A

- pressure-mediated nonviral method for efficient arterial gene and oligonucleotide transfer. *Hum Gene Ther*, 1999, **10** (14): 2355~2364
- 11 Newman K D, Dunn P F, Owens J W, *et al.* Adenovirus-mediated gene transfer into normal rabbit arteries results in prolonged vascular cell activation, inflammation, and neointimal hyperplasia. *J Clin Invest*, 1995, **96** (6): 2955~2965
- 12 Ruef J, Hu Z Y, Yin L Y, *et al.* Induction of vascular endothelial growth factor in ballon-injured baboon arteries. A novel role for reactive oxygen species in atherosclerosis. *Circ Res*, 1997, **81**(1): 24~33

Construction, Expression and Characterization of a Fusion Gene of hVEGF₁₆₅ and Fused Hirudin Peptide*

SHEN Li¹⁾, CHEN Shao-Ping^{1)**}, QIN Yong-Wen¹⁾, CAI Zai-Long²⁾

¹⁾Department of Cardiology of Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;

²⁾Department of Biochemistry and Molecular Biology, Department of Basic Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract In order to construct a fusion gene encoding hVEGF₁₆₅ and fused hirudin(FH), which can not only accelerate endothelial cell proliferation but also inhibit thrombosis, the eukaryotic expression vector hVEGF₁₆₅-FH/pcDNA3.0 was constructed which contained the hVEGF₁₆₅ and fused hirudin (FH). Then, the constructed vector was transfected into endothelial cell strain(ECV₃₀₄). The hVEGF₁₆₅-FH fusion gene transcription and protein expression were examined by RT-PCR and Western blot. The activities of fusion hVEGF₁₆₅-FH were identified by serials of endothelial cell proliferation tests and antithrombotic tests *in vitro*. The results showed that the fusion protein was successfully expressed and it had biological activities of both hVEGF₁₆₅ and fused hirudin. This new fusion gene with multi-function might be a new weapon to prevent restenosis after percutaneous coronary intervention(PCI).

Key words vascular endothelial growth factor(VEGF), hirudin, fusion gene, pcDNA3.0, vector construction, gene expression

*This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30200281).

**Corresponding author . Tel: 86-21-25072064, E-mail: cspcsp@vip.sina.com

Received: May 16, 2005 Accepted: June 30, 2005