

文章编号:1005-6947(2008)06-0574-04

· 基础研究 ·

# 大鼠 VEGF 腺病毒基因转染系统的构建及鉴定

邹君杰<sup>1</sup>, 杨宏宇<sup>1</sup>, 祁泓<sup>2</sup>, 章希炜<sup>1</sup>

(南京医科大学 1. 第一附属医院 血管外科 2. 公共卫生学院, 江苏 南京 210029)

**摘要:**目的 探讨构建携带大鼠血管内皮细胞生长因子(VEGF)的重组腺病毒载体方法,为后续的基因转染研究作准备。**方法** 采用 RT-PCR 扩增的方法获取鼠源性的 VEGF,并克隆入穿梭质粒 pDC316。构建的质粒 pDC316-VEGF 经酶切及测序鉴定正确后,通过 lipofectamine2000 的介导与腺病毒包装质粒 pHGE3 共转染至人胚肾细胞 HEK293,经同源重组后获得携带鼠 VEGF 的重组腺病毒 VDC316-VEGF。应用 PCR 鉴定重组腺病毒,空斑传代纯化病毒并反复冻融扩增病毒。以 50% 组织培养感染剂量法(TCID<sub>50</sub>)测定病毒滴度。**结果** PCR 鉴定证实重组腺病毒含有鼠 VEGF,病毒滴度为  $3 \times 10^9$  pfu/mL。**结论** 成功构建的携带大鼠 VEGF 的重组腺病毒载体能在 HEK293 细胞内扩增获得足够高的病毒滴度,可作为后续基因治疗研究工作中可靠的基因转染工具。

[中国普通外科杂志,2008,17(6):574-577]

**关键词:** 血管内皮生长因子;腺病毒载体;基因转染

中图分类号:R 322.1

文献标识码:A

## Construction and identification of rat vascular endothelial growth factor recombinant adenovirus-mediated gene transfer system

ZOU Junjie<sup>1</sup>, YANG Hongyu<sup>1</sup>, QI Hong<sup>2</sup>, ZHANG Xiwei<sup>1</sup>

(1. Department of Vascular Surgery of the First Affiliated Hospital 2. School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

**Abstract:** **Objective** To construct the recombinant adenovirus vector carrying rat vascular endothelial growth factor (VEGF) as preparation for later use for genetic transfection. **Methods** Rat VEGF was obtained by using RT-PCR amplification and then cloned into the shuttle plasmid pDC316. Subsequently, this newly constructed plasmid pDC316-VEGF, after identification by nuclease digestion analysis and sequencing analysis, was transfected into human embryonic kidney cells HEK293 by lipofectamine 2000 mediation, together with adenovirus-packaging plasmid pHGE3. Based on the homologous recombination of the two plasmids within HEK293 cells, the recombinant adenovirus vector carrying VEGF, VDC316-VEGF, was created. VDC316-VEGF was subsequently identified using PCR, purified using repeated plaque passages, proliferated using freezing and melting within HEK293 cells, and titrated using 50% Tissue Culture Infective Dose (TCID<sub>50</sub>) assay. **Results** The newly constructed recombinant adenovirus was confirmed carrying rat VEGF by PCR, and its titration value determined based on TCID<sub>50</sub> assay was  $3 \times 10^9$  pfu/ml. **Conclusions**

The recombinant adenovirus carrying rat VEGF was successfully constructed. The newly constructed adenovirus can produce a sufficiently high titration value within HEK293 cells, providing a reliable tool for genetic transfection in further gene therapy researches.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(6): 574-577]

**Key words:** Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF); Adenovirus Vector; Genes Transfection

CLC number: R 322.1

Document code: A

**基金项目:**江苏省自然科学基金资助项目(BK2005158)。

**收稿日期:**2007-12-25; **修订日期:**2008-03-19。

**作者简介:**邹君杰,男,南京医科大学第一附属医院主治医师,主要从事动脉疾病诊治方面的研究。

**通讯作者:**杨宏宇 E-mail:wishlucky@163.com

血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial cell growth factor, VEGF) 是 Ferrara 等<sup>[1]</sup> 于 1989 年在牛垂体滤泡星状细胞体外培养液中分离出的一种糖蛋白。多年来的研究已证明 VEGF 是机体内促血管生成 (angiogenesis) 和促血管形成 (vasculogenesis) 最重要的分泌性生长因子, 它能特异性地促进血管内皮细胞的分裂增殖和增生。VEGF 目前已成为尝试使用基因治疗技术治疗冠心病、周围动脉闭塞、术后血管再狭窄等疾病的首选基因<sup>[2-3]</sup>。血管内皮祖细胞 (endothelial progenitor cell, EPC) 是成熟血管内皮细胞的前体细胞, 属于干细胞群体, 既可自我更新, 又能定向分化为成熟的内皮细胞。近年的实验表明, VEGF 也是动员 EPC 从骨髓向外周血释放和诱导 EPC 向成熟内皮细胞转化的重要调控因子<sup>[4-6]</sup>。Hideki 等<sup>[7]</sup> 首先尝试用 VEGF 转染后的 EPC 治疗小鼠下肢缺血性疾病模型, 他们发现 EPC 经 VEGF 转染后在体外可显著增强细胞的增殖、迁移及黏附能力, 能在体内显著提高修复损伤血管内皮。笔者为了满足下一步将 VEGF 基因转染入 EPC 的需要, 采用双质粒共转染人胚肾细胞 HEK293 的方法构建携带 VEGF 的重组腺病毒载体。为进一步探讨联合应用 VEGF 基因和 EPC 的治疗方法以加速修复损伤内皮修复的可能性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 质粒、菌株和细胞 穿梭质粒载体 pDC316, 腺病毒包装质粒 pBHGE3 和人胚肾细胞系 HEK293 购自加拿大 Microbix Biosystems 公司; E. coli DH5 $\alpha$  菌株由本实验室保存。

1.1.2 酶和试剂 限制性内切酶 EcoRI 和 Hind III 购自美国 NEB 公司, 多聚酶链反应 (PCR) 试剂 Taq 聚合酶和 dNTPs 购自上海申能博彩生物科技有限公司; DNA 胶回收试剂盒购自德国 MN 公司; DNA 连接酶 solution (溶液) I 购自日本 TaKaRa 公司; 质粒 DNA 制备试剂盒及病毒 DNA 提取试剂盒购自德国 QIAGEN 公司; lipofectAmine 2000 试剂盒购自美国 GIBCO BRLQIAGEN 公司。

### 1.2 实 验 方 法

1.2.1 采用逆转录-多聚酶链反应 (RT-PCR) 从鼠源性 cDNA 中扩增 VEGF 基因 以大鼠 VEGF 的转录体形式作为靶序列设计 RT-PCR 引物。其上游引物为 5' ggg aat tcA TGA ACT TTC TGC TCT CTT GGG TGC 3', 下游引物为 5' gga agc ttT CAC CGC CTT GGC TTG TCA CA 3'。PCR 以鼠源性的 cDNA 为模板, 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min 后扩增 35 个循

环。每个循环步骤包括 94  $^{\circ}$ C 45 s, 60  $^{\circ}$ C 45 s, 68  $^{\circ}$ C 45 s。循环结束后 68  $^{\circ}$ C 最终延伸 10 min。RT-PCR 扩增产物经 1.1% 琼脂糖凝胶电泳检测后用 DNA 胶回收试剂盒纯化回收。

1.2.2 穿梭质粒 pDC316-VDGF 的构建及鉴定 应用限制性内切酶 EcoRI 和 Hind III 分别对纯化回收的 PCR 产物及穿梭质粒载体 pDC316 进行双酶切; 酶切条件为 37  $^{\circ}$ C 水浴, 8 h。获得的两种酶切产物分别经 1.1% 琼脂糖凝胶电泳检测和分离后用 DNA 胶回收试剂盒纯化回收。回收的两种酶切产物在加入 DNA 连接酶 I 后于 16  $^{\circ}$ C 孵育 16h, 所得到的连接产物再转染已制备好的感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。将转染混合物铺于含氨苄青霉素 (AMP) 的 LB 琼脂板上, 置于培养箱内于 37  $^{\circ}$ C 培养 12 h。挑取生长的细菌单克隆, 在含 AMP 的 LB 溶液中于 37  $^{\circ}$ C 摇床扩增 12 h。应用质粒 DNA 制备试剂盒抽提阳性克隆的质粒 DNA, 经 EcoRI 和 Hind III 酶切鉴定正确后再行测序鉴定。鉴定正确后的重组质粒命名为 pDC316-VEGF。

1.2.3 VEGF 重组腺病毒 VDC316-VEGF 的包装, 鉴定, 扩增和滴度测定 首先使用含 10% (小牛血清) FBS 的 DMEM 培养液将人胚肾细胞 HEK293 接种于 75 cm<sup>2</sup> 培养瓶中, 在 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中 37  $^{\circ}$ C 培养 18 ~ 24 h, 以达到 60% ~ 80% 细胞融合度, 然后将重组穿梭质粒 pDC316-VEGF 与含有 5 型腺病毒右臂的包装质粒 pBHGE3 通过 lipofectamine 2 000 的介导共转染至 HEK293 细胞。如共转染成功, 继续培养一段时间后基于细胞毒性效应可观察到病毒空斑的出现。选取大的病毒空斑进行 3 次传代纯化后然后用 QIAamp DNA 血液微量试剂盒提取腺病毒 DNA, 再行 PCR 鉴定。PCR 所用引物和扩增条件同 1.2.1。经正确鉴定的腺病毒命名为 VDC316-VEGF, 即携带 VEGF 基因的重组腺病毒。采用冻融法在 HEK293 细胞内进行病毒的扩增至所需要的病毒量。首先取 0.5  $\mu$ L 首次扩增的病毒保存液, 加入 10% FBS/DMEM 培养液至 1 mL, 混匀后制成病毒混合液, 然后再使用 10% FBS/DMEM 培养液常规培养 HEK293 细胞。当细胞数量增长至约  $5 \times 10^6$  时移去培养液, 并小心加入制备好的病毒混合液, 上下左右慢慢晃动 3 次, 置于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中于 37  $^{\circ}$ C 培养 120 min。再加入 9 mL 10% FBS/DMEM 培养液继续培养 72 h 后收集细胞, 600  $\times$  g 离心 5 min 沉淀细胞。病毒保存溶液重悬细胞, -20 ~ 37  $^{\circ}$ C 冻融 3 次。最后使用台式离心机以最大速率离心 20 min 去除细胞碎片, 收集上清液。根据病毒的需要量可重复这一过程以扩增病

毒。采用 50% 组织培养感染剂量法 (TCID<sub>50</sub>) 测定病毒滴度。收集一瓶 HEK293 细胞, 计数及稀释后加入 96 孔板, 每孔 100  $\mu$ L, 细胞数量约  $1 \times 10^4$  个, 置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养待用。然后 10 倍倍比稀释病毒保存液至  $10^{-10}$  稀释度, 并将最后 8 个稀释液加入 96 孔板。每个稀释度做 10 孔, 每孔 0.1 mL; 另取 2 孔作为阴性对照。放置 96 孔板于培养箱 37 $^{\circ}$ C 培养 10 d 后置于倒置显微镜下观察, 计算每一排中出现致细胞病变效应 (CPE) 的孔数, 根据 Karbers 公式计算病毒滴度。

## 2 结果

### 2.1 PCR 扩增鼠源性 cDNA 中 VEGF 基因

根据 GeneBank (基因库) 发布的转录体大鼠 VEGF 的参考序列和 PCR 上、下游引物在序列中的位置, 推测 PCR 产物的大小应为 589 bp。PCR 产物的电泳结果显示在众多的电泳条带中有一条

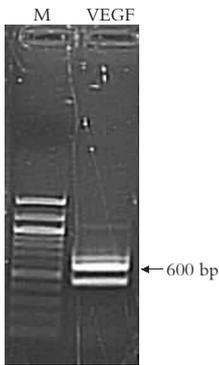


图1 RT-PCR 扩增 VEGF 基因的电泳结果 M: 100 bp DNA Ladder (NEB); VEGF: VEGF 基因

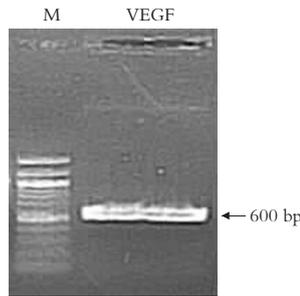


图2 EcoRI + Hind III 双酶切 VEGF 的 RT-PCR 扩增体的电泳结果 M: 100 bp DNA Ladder (NEB); VEGF/E+H: EcoRI + Hind III 双酶切 VEGF 的 RT-PCR 扩增体

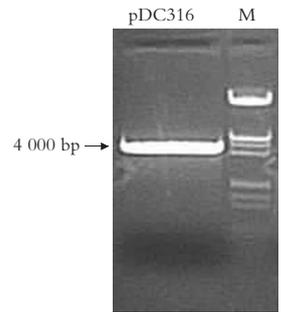


图3 EcoRI + Hind III 双酶切质粒 pDC316 的电泳结果 M:  $\lambda$ DNA/ EcoR I + Hind III (MBI); pDC316: 双酶切质粒 pDC316

### 2.3 VEGF 重组腺病毒的包装, 鉴定, 扩增和滴度测定结果

PCR 产物的电泳结果 (图 5) 显示 1~4 号标本均能扩增出和阳性对照大小一致的 VEGF 基因片段, 表明重组腺病毒成功。冻融法扩增重组腺病毒后, 采用 50% 组织培养感染剂量法 (TCID<sub>50</sub>) 测定病毒滴度, 病毒滴度为  $3 \times 10^9$  pfu/mL, 该滴度已足够用于下一步的转染实验。

略小于 600 bp 的电泳带 (图 1), 是 PCR 成功扩增出的 VEGF cDNA165 的产物。

### 2.2 穿梭质粒 pDC316-VEGF 的构建及鉴定

纯化回收的 PCR 产物及穿梭质粒载体 pDC316 经 EcoRI 和 Hind III 双酶切后应分别出现 579 bp 和 3 895 bp 的片段。电泳结果 (图 2-3) 显示酶切后的片段大小与预测相符。连接后的两种酶切产物转染大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$ , 培养 12 h 后出现的细菌阳性克隆应含有构建成功的重组质粒 PDC316-VEGF。PDC316-VEGF 经 EcoRI 单独酶切后将会出现一条 4 474 bp 的片段, 经 EcoRI 和 Hind III 双酶切后将会出现 579 bp 和 3 895 bp 两个片段。电泳结果 (图 4) 证实与预测相符合。对 PDC316-VEGF 行进一步的测序鉴定, 测序结果证实 PDC316-VEGF 中含有与 GeneBank 中发表的 VEGF165 序列完全一致的 DNA 片段。

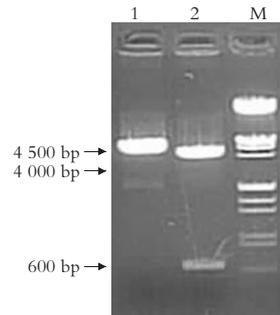


图4 EcoRI 和 EcoRI + Hind III 酶切重组质粒 PDC316-VEGF 的电泳结果 M:  $\lambda$ DNA/ EcoR I + Hind III (MBI); 1: EcoRI 单酶切 PDC316-VEGF; 2: EcoRI 和 Hind III 双酶切 PDC316-VEGF

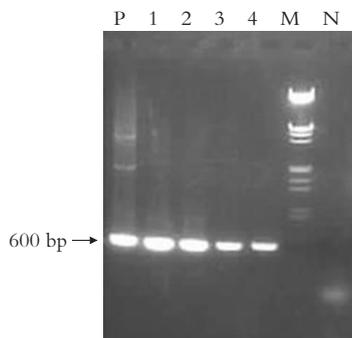


图5 PCR 鉴定 VDC316-VEGF 的电泳结果 P: 阳性对照 (PDC316-VEGF 质粒); 1~4: 4 份重组腺病毒样品。M:  $\lambda$ DNA/ EcoRI + Hind III ( MBI); N: 阴性对照

### 3 讨论

VEGF 作为一种特异地作用于血管内皮细胞的有丝分裂原,在体内外都特异地表现出促进血管内皮细胞生长并诱导血管生成的作用。迄今为止共发现人 VEGF 有 6 种不同的转录体形式: VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF183, VEGF189 和 VEGF206<sup>[8-9]</sup>。大多数细胞优先产生 VEGF121, VEGF165 和 VEGF189,其中 VEGF165 在体内的表达最为丰富,是最强的促内皮细胞分裂原。

近年来随着基因疗法的出现,为血管疾病的治疗开辟了一个全新的领域。成功实施基因治疗的关键因素之一是基因转移载体的选择。目前基因治疗临床试验中采用的载体大多数是病毒载体,主要包括逆转录病毒载体、腺病毒载体和腺相关病毒载体。其中腺病毒载体是目前应用最广泛的一种病毒载体,具有许多独特的优点<sup>[10]</sup>。不可否认腺病毒载体也有许多不足之处,例如载体本身的基因所编码的几种病毒蛋白 (E1, E2 和 E4) 是免疫性较强的抗原,可引发机体产生程度不同的免疫反应,因此新型腺病毒载体的构建一直是基因治疗研究工作中的重点。目前最新一代的腺病毒载体剔除了所有的编码序列,仅保留有 ITR 重复序列和病毒包装序列,其免疫原性可被降至最低<sup>[11]</sup>。在不久将来的基因治疗基础研究和临床试验中,可以期待有更高效和安全的腺病毒载体的出现。

本实验采用双质粒共转染法构建重组腺病毒载体<sup>[12]</sup>。其基本过程是,将一个携带目的基因 VEGF 的缺失 E1 基因区的穿梭质粒 pDC316 与含有 5 型腺病毒右臂序列的腺病毒包装质粒 pBHGE3,共同转染携带 E1 基因区的 HEK293 细胞。两种质粒在 HEK293 细胞内通过同源重组形成重组腺病毒基因组,并包装成病毒颗粒。为了简化

实验操作和提高重组效率,笔者一方面在 PCR 反应的上、下游引物上分别设计了 EcoR I 和 Hind III 的酶切识别序列,便于外源基因 VEGF 和穿梭质粒 pDC316 的连接;另一方面,在双质粒 pDC316 和 pBHGE3 共转染至人胚肾细胞 HEK293 的实验过程中加入阳离子脂质体 lipofectamine 2 000,大大提高了哺乳动物细胞对裸露的质粒 DNA 的摄取率。

本实验成功构建了携带 VEGF 基因的重组腺病毒载体 VDC316-VEGF,并在 HEK293 细胞内获得了较高的病毒滴度,为下一步必需的基因转移工作提供了基础。

### 参考文献:

- [1] Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, 161 (2): 851 - 858.
- [2] 方伟,郭曙光. 血管内皮生长因子治疗下肢缺血性疾病的研究进展 [J]. *中国普通外科杂志*, 2006, 15 (12): 952 - 954.
- [3] Geiger F, Bertram H, Berger I, *et al.* Vascular endothelial growth factor gene-activated matrix (VEGF165-GAM) enhances osteogenesis and angiogenesis in large segmental bone defects [J]. *J Bone Miner Res*, 2005, 20 (11): 2028 - 2035.
- [4] Gill M, Dias S, Hattori K, *et al.* Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2 (+) AC133 (+) endothelial precursor cells [J]. *Circ Res*, 2001, 88 (2): 167 - 174.
- [5] Asahara T, Takahashi T, Masuda H, *et al.* VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells [J]. *EMBO J*, 1999, 18 (14): 3964 - 3972.
- [6] Schuch G, Heymach JV, Nomi M, *et al.* Endostatin inhibits the vascular endothelial growth factor-induced mobilization of endothelial progenitor cells [J]. *Cancer Res*, 2003, 63 (23): 8345 - 8350.
- [7] Hideki I, Jun-ichi Y, Christoph K, *et al.* Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation*. *Circulation* [J], 2002, 105 (15): 732 - 738.
- [8] Stimpfl M, Tong D, Fasching B, *et al.* Vascular endothelial growth factor splice variants and their prognostic value in breast and ovarian cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8 (7): 2253 - 2259.
- [9] Povsic TJ, Zavodni KL, Kelly FL, *et al.* Circulating progenitor cells can be reliably identified on the basis of aldehyde dehydrogenase activity [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 50 (23): 2243 - 2248.
- [10] Majhen D, Ambriovic-Ristov A. Adenoviral vectors—how to use them in cancer gene therapy? [J]. *Virus Res*, 2006, 119 (2): 121 - 133.
- [11] Lieber A, Steinwaerder DS, Carlson CA, *et al.* Integrating adenovirus-adenovirus-associated virus hybrid vectors devoid of all viral genes [J]. *J Virol*, 1999, 73 (11): 9314 - 9324.
- [12] Bett AJ, Haddara W, Prevec L, *et al.* An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91 (19): 8802 - 8806.