

· 论 著 ·

人组织型纤维蛋白溶解酶原激活剂 cDNA
在牛血管内皮细胞中的表达刘 鹏^① 韩琴琴^① 宋后燕^② 杨英珍^①

(上海医科大学 ①附属中山医院 上海市心血管病研究所, ②分子遗传学研究室, 上海 200032)

Expression of Human Tissue-type Plasminogen Activator cDNA in Endothelial Cell of Bovine

LIU Peng, HAN Qin-Qin, SONG Hou-Yan and YANG Ying-Zhen

(Shanghai Institute of Cardiovascular Disease, Zhongshan Hospital, Shanghai Medical University, Shanghai, 200032, China)

ABSTRACT

Aim To determine the expression of human tissue-type plasminogen activator (tPA) cDNA in mammalian cells.

Methods A recombinant retroviral vector containing tPA gene was constructed and transfected into bovine endothelial cells (EC) by retroviral vector-mediated gene transfer. The tPA activity of transduced cells was measured with casein-plasminogen-agarose plate and a synthetic-peptide substrate S-2390.

Results The viral titer was 4×10^8 cfu/L. Transfection efficiency was 6×10^5 colonies/g DNA/ 10^6 cells. The tPA activity of transduced cells was obviously increased. Immunohistochemistry analyses confirmed the expression of tPA gene in the genetically engineered cells.

Conclusions Retroviral vector mediated gene transfer can be used to enhance the fibrinolytic activity of EC. It might be an approach for tPA gene therapy.

KEY WORD Tissue plasminogen activator; Recombinant retrovirus; Endothelial cell; Transfection; Expression

摘要 利用基因重组技术, 将人组织型纤维蛋白溶解酶原激活剂 cDNA 与逆转录病毒载体 LNSX 重组后转染至病毒包装细胞, 其分泌的重组逆转录病毒颗粒再用未感染 NIH 3T3 细胞和牛血管内皮细胞, 经 G418 筛选, 二周后计数存活的阳性细胞克隆数, 得到病毒滴度为 4×10^8 cfu/L。计算转染效率为 6×10^5 克隆/g DNA/ 10^6 细胞。在含人纤维蛋白原和凝血酶的纤维蛋白板上点样并用标准品作对照, 发现经逆转录病毒感染重组内皮细胞和包装细胞, 分泌的细胞培养液, 在纤维蛋白板上显示有大小不一的溶圈。使用发色底物法也测得含人组织型纤维蛋白溶解酶原激活剂 cDNA 转基因内皮细胞培养液的分泌活性。正常的内皮细胞则由于分泌量少而在敏感度以下。使用特异性的免疫组织化学染色并经图像分析证实, 人组织型纤维蛋白溶解酶原激活剂基因在牛的血管内皮细胞中得到表达。说明人组织型纤维蛋白溶解酶原激活剂基因的 cDNA 已正确转入牛的血管内皮细胞中, 为将来进行基因治疗展示了良好的应用前景。

关键词 组织型纤维蛋白溶解酶原激活剂; 重组逆转录病毒; 内皮细胞; 转染; 表达

组织型纤维蛋白溶解酶原(简称纤溶酶原)激活剂(tissue-type plasminogen activator, tPA)是由血管内皮细胞分泌的丝氨酸蛋白酶, 它能激活纤溶酶原形成纤溶酶, 使不溶的纤维蛋白水解, 是当前治疗以血栓形成为主要病理变化的疾病(如急性心肌梗塞等)的最有效的药物。但由于正常的血管内皮细胞合成 tPA 的量极少, 且内皮细胞同时还分泌纤溶酶原激活剂抑制物(plasminogen activator inhibitor, PAI-I), 因此在通常条件下, 内源性 tPA 很难达到防止血栓形成的作用。1983 年, Pennica 等^[1]应用基因重组技术, 构建了 tPA cDNA 克隆并在

① 国家八六三和卫生部科研基金资助项目

大肠杆菌和 CHO 细胞中得到表达。此后,宋后燕等^[2]也成功地开展了同样的研究工作。本文即是在以往的基础上,在国内率先采用牛主动脉内皮细胞为靶细胞,以逆转录病毒为载体,来探讨人 tPA cDNA 转录单位在哺乳动物细胞中的表达。

1 材料与方法

1.1 材料

实验使用的 tPA cDNA 由上海医科大学分子遗传学研究室宋后燕等构建,逆转录病毒载体 LNSX 由美国德州大学馈赠,PA317 病毒包装细胞由上海市肿瘤研究所提供,tPA 活性测定试剂盒由上海医科大学分子遗传学研究室研制,tPA 标准品由 Genentech 公司提供,DMEM、琼脂糖、G418、聚凝胺 (Polybrene) 为 BRL 公司产品,限制性内切酶、T4DNA 连接酶、碱性磷酸酶和 DNA 聚合酶 (Klenow 酶) 分别购于 Boehringer Mannheim、BRL 和 Promega 公司,细胞培养基为 Unipath 公司产品,胶原酶为 Sigma 公司产品,胰蛋白酶、小牛血清白蛋白和羊抗鼠免疫球蛋白购于华美公司,兔抗人 VII 因子抗体购于丹麦 DALO 公司,羊抗兔和兔 PAP 由上海医科大学病理解剖学教研室提供。

1.2 转录单位重组逆转录病毒的构建

按图 1 (Figure 1) 方案将逆转录病毒 LNSX 和质粒 PUC18 tPA 组装成重组 LNS-tPA 逆转录病毒表达载体,采用限制性核酸内切酶片段分析来鉴定结果。

1.3 重组逆转录病毒转染包装细胞

用磷酸钙 DNA 沉淀法转染 PA317 细胞并加入 400 mg/L 的 G418 进行筛选,二周后挑取单克隆细胞,转入 24 孔板培养,经扩增后转入 50 cm² 培养瓶培养。

1.4 内皮细胞的分离、培养及鉴定

无菌条件下取放血处死的新生小牛胸主动脉 6~8 cm,4℃ Hank's 液保存,超净后仔细分离动脉外膜,结扎各分支残端。近端用细镊固定,用长止血钳伸入管腔内轻轻夹住远端,使内膜外翻,Hank's 液洗净,然后浸入 0.15% 胶原酶消化液中。25 min 后,弃血管,消化液离心 (1 000 r/min, 10 min)。细胞用 DMEM (含 10% 小牛血清、青霉素 100 ku/L、链霉素 100 mg/L) 悬浮,接种于培养瓶中 37℃,5%CO₂ 培养箱内培养 6 h 后第一次换液,以除去未贴壁的平滑肌细胞,以后隔日换液一次。细胞 80% 汇合后用 0.1% 胰蛋白酶消化传代。相差显微镜观察和 VII 因子相关抗原免疫组织化学 PAP 法

证实是血管内皮细胞。实验采用 3~5 代细胞。

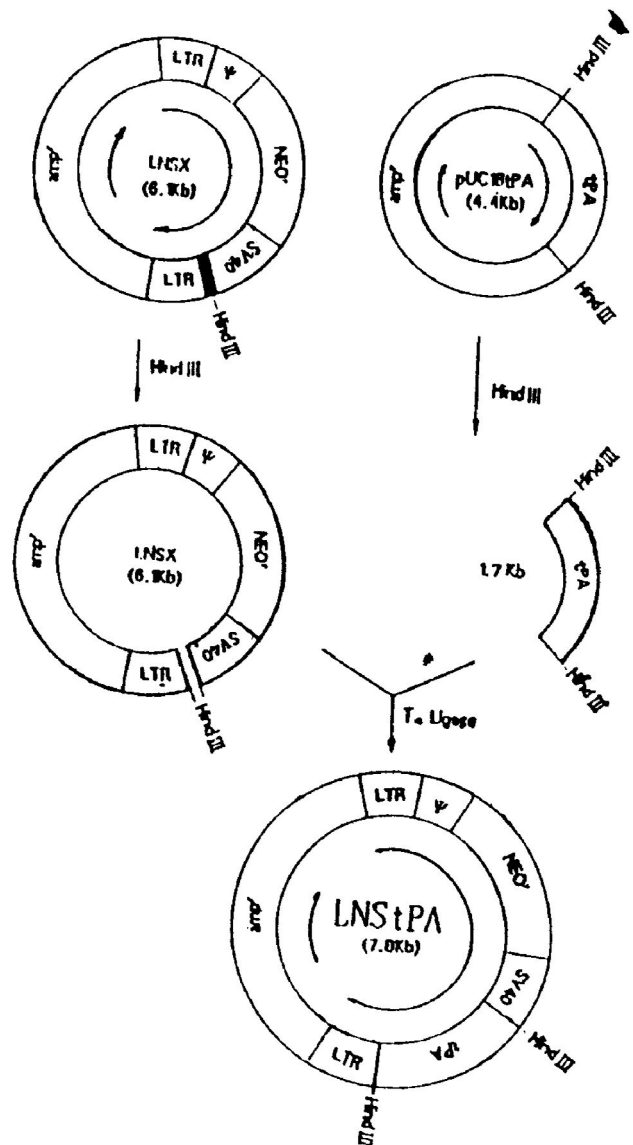


Figure 1. Construction of recombinant retroviral vector containing human tPA cDNA transcriptional units.

1.5 重组病毒颗粒感染靶细胞

生长状态良好的血管内皮细胞和 NIH3T3 细胞,培养至 80% 汇合时,加入含有 LNS-tPA 病毒颗粒的重组 PA317 细胞上清液 4 ml,同时加入 8 mg/L Polybrene,使终浓度达到 1:100,37℃ 孵育 2 h,弃除含 Polybrene 的培养液,换新鲜培养基。

1.6 病毒滴度和转染效率的计算

重组病毒感染后 24 h,换含有 400 mg/L G418 的 DMEM 筛选,每 3 天换液一次,约二周后克隆逐渐形成。准确计数克隆数,用稀释倍数折算为病毒滴度。计算转染效率并挑取克隆,继续用含 G418 的 DMEM 培

养,然后依次经 96 孔板、24 孔板梯度扩增后,留取培养液待测活性。取活性单克隆在培养瓶中继续培养。

1.7 组织型纤溶酶原激活剂活性检测

0.1 克人纤维蛋白原用 10 ml PBS 溶解,0.25 克琼脂糖加入 20 ml PBS 在微波炉中煮沸,56℃ 水浴中二者混匀,同时加入 10 μ l 凝血酶,并不时振荡,待混合液颜色发白后,立即铺板,4℃ 冰箱冷却,30 min 后打孔,每孔点样 10 μ l。

1.8 转基因内皮细胞生长状况及组织型纤溶酶原激活剂分泌活性曲线

取 24 孔板,每孔均接种 10^5 的转基因内皮细胞,各加入 2 ml 的 DMEM,以是否加用 10% 小牛血清来分组,每日消化计数细胞数量,并留取细胞培养液,加等量酸液-70℃ 保存。活性测定使用发色底物法^[1]。

1.9 免疫组织化学染色及图像分析

转基因的内皮细胞和未转基因的正常内皮细胞在胰酶消化后,分别放入约 1 cm² 的小载玻片,待细胞贴壁并长满后取出,用 4% 的多聚甲醛固定,采用 PAP 法染色。镜下观察染色结果,拍照后使用 MIAS-300 全自动图像分析系统测定结果,数据值用灰度表示。

2 结果

2.1 重组逆转录病毒转染血管内皮细胞

重组 LNS-tPA 转染 PA317 细胞后,其分泌的病毒颗粒,再用来感染内皮细胞,后者带有 Neo 筛选基因在 G418 中能够存活。病毒颗粒裂解细胞进入培养液中,使培养液中的 tPA 活性极度升高。

2.2 病毒滴度和转染效率的测定

转染后的 NIH3T3 细胞和血管内皮细胞,在浓度为 400 mg/L 的 G418 作用下,大部分被杀死,计数存活的细胞克隆数,得到病毒滴度为 4×10^4 cfu/L,计算转染效率为 6×10^5 克隆/g DNA/ 10^5 细胞。

2.3 转基因内皮细胞组织型纤溶酶原激活剂分泌活性测定

如图 2 (Figure 2) 所示,经倍比稀释的 tPA 标准品和 LNS-tPA-EC、LNS-tPA-PA317 细胞培养液,在纤维蛋白板上大小不一的溶圈出现;PA317 细胞培养液、正常内皮细胞培养液及正常 DMEM 点样孔则无溶圈出现。

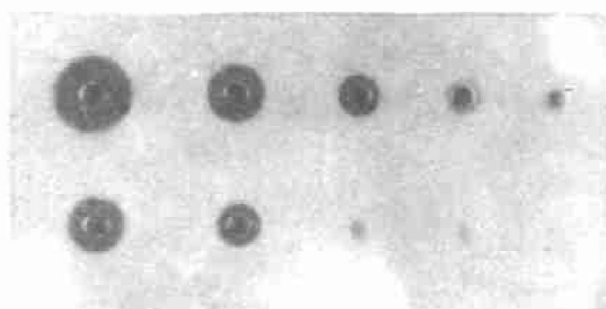


Figure 2. Measurement of tPA activity with fibrinogen-agarose plate. Spots in the first row (from left) were a series of dilutions of the standard tPA (10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 kIU/L, respectively). Spots in the second row were the samples of media (LNS-tPA-EC, LNS-tPA-PA317, PA317, EC and DMEM, respectively).

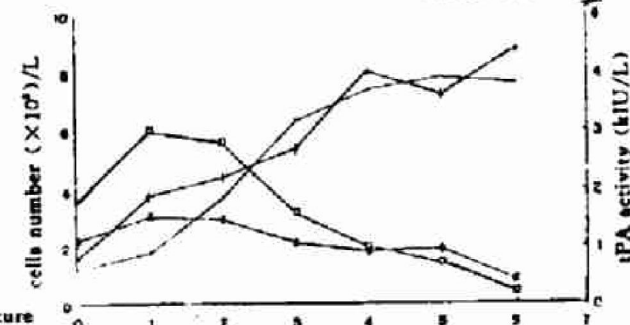


Figure 3. Relation between cell number and tPA activity. —○— Growth curve of transduced EC in DMEM with 10% FBS. —○— Growth curve of transduced EC in serum-free medium. —+— tPA activity curve of transduced EC in DMEM with 10% FBS. —□— tPA activity curve of transduced EC in serum-free medium.

2.4 转基因内皮细胞的生长与分泌的关系

如图 3 (Figure 3) 所示,当培养基含有 10% 小牛血清时,转基因内皮细胞的生长曲线与 tPA 分泌活性曲线相似;随培养时间的延长,细胞数量增加,tPA 分泌活性亦增加;而在无血清条件下,转基因内皮细胞的生长曲线和 tPA 活性分泌曲线均呈下降趋势。未转基因的正常内皮细胞分泌 tPA 活性在敏感度以下。

2.5 免疫组织化学染色及图像分析

转基因内皮细胞和未转基因的正常内皮细胞均为胞浆着色(图 4, Figure 4),所不同的是

在相同染色条件下,前者阳性指数明显增加。经图像分析,转基因内皮细胞的平均灰度为 63,正常内皮细胞为 50,二者差异具有高度显著性 ($P < 0.01$)。

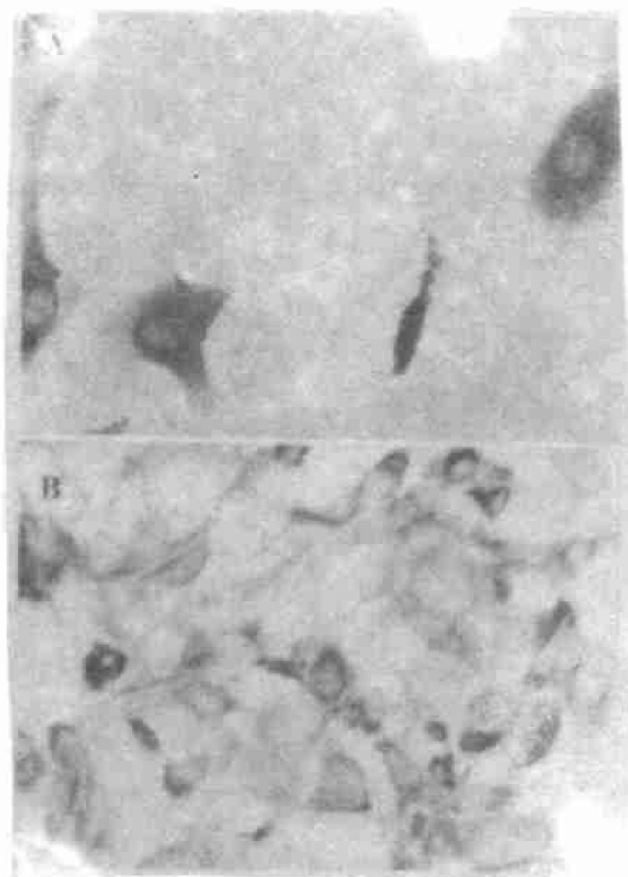


Figure 4. Immunohistochemistry stain ($\times 200$) PAP method. A. Transduced EC. B. Non-transduced EC.

3 讨论

利用基因操作技术,把外源基因导入体细胞内,使之表达出相应的蛋白质,以达到预防和治疗疾病的目的,这就是基因治疗的基本方法。内皮细胞由于位于血管内膜的表面,直接和血液接触,分泌的蛋白质不仅在血管局部而且能够在体循环发挥作用,因而用内皮细胞作靶细胞就倍受瞩目。组织型纤溶酶原激活剂(tPA)是由 527 个氨基酸组成的高效、特异的溶栓药物,把外源的 tPA 基因导入哺乳动物的内皮细胞中,使之分泌出生物活性较原先高得多的基

因产物,对防止血栓性疾病的发生有重要意义^[4]。为此,我们构建了重组逆转录病毒载体 LNS-tPA,该载体含有 LTR 控制转录的逆转录病毒包装信号基因、Neo 基因和 SV40 启动、LTR 终止的 tPA cDNA 转录单位。由于其编码功能蛋白的反式序列已被外源基因所代替,必须借助病毒包装细胞,才能形成具有感染能力的完整病毒颗粒。后者不仅表达重组 tPA 的溶栓活性,而且能够直接感染内皮细胞^[4]。由于重组基因片段易于与靶细胞的染色质 DNA 整合,又由于我们构建的 tPA cDNA 含有信号肽编码顺序^[5],因而转基因的内皮细胞不仅能合成 tPA,而且能将 tPA 分泌入培养液。虽然整合有人 tPA cDNA 和 Neo 转录单位的内皮细胞能够转录和翻译为相应的蛋白产物,但由于没有包装系统,不可能组装和繁殖病毒颗粒,因而其安全性能得到保证。把含人 tPA cDNA 的转基因内皮细胞种植到血管支架上,再植入到动物的血管内,用以观察对再狭窄和血栓形成的预防和治疗作用,将是我们下一步的研究工作。

参考文献

- 1 Pennica D, Holmes WE, Kohr WJ, et al. Cloning and expression of human tPA cDNA in E Coli. *Nature*, 1983, 301: 214.
- 2 宋后燕,朱运松,韦莹,等. 组织型纤溶酶原激活剂 cDNA 表达质粒的构建及其在哺乳动物细胞中的表达. 上海医科大学学报, 1992, 19(增刊): 12~17.
- 3 王结义,贾海燕,宋后燕,等. 人组织型纤溶酶原激活剂及抑制剂活性测定. 中华检验学杂志, 1989, 12(2): 163~166.
- 4 Dichek DA, Neville RF, Zwiebel JA, et al. Seeding of intravascular stents with genetically engineered endothelial cells. *Circulation*, 1989, 80: 1347~1353.
- 5 Zwiebel JA, Freeman SM, Kantoff PW, et al. High level recombinant gene expression in rabbit endothelial cells transduced by retroviral vectors. *Science*, 1989, 243: 220~222.
- 6 顾耀良,袁小华,王龙生,等. 组织型纤溶酶原激活剂分子信号肽与 N 端肽段编码顺序的化学合成与克隆. 上海医科大学学报, 1992, 19(增刊): 18~23.

(1997-01-12 收到)