

人肝细胞生长因子基因腺病毒重组体的构建 及转染血管平滑肌细胞的表达

冯宗承, 胡新华, 于 彭, 孙达欣, 辛世杰, 张 强

(中国医科大学附属第一医院外科, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 分子生物学; 肝细胞生长因子基因腺病毒重组体的构建; 基因重组; 基因表达, 肝细胞生长因子; 腺病毒载体; 同源重组; 血管平滑肌细胞; 绿色荧光蛋白

[摘 要] 为探讨构建能表达肝细胞生长因子基因的腺病毒重组体的方法, 以及这种腺病毒重组体能否在血管平滑肌细胞表达。将含有肝细胞生长因子基因片段的质粒用限制内切酶酶切, 以琼脂糖凝胶电泳回收得到目的基因片段; 将它用 DNA 连接酶插入至腺病毒穿梭质粒中, 并用限制内切酶鉴别插入方向, 得到插入方向正确的重组腺病毒穿梭质粒。用限制内切酶酶切重组腺病毒穿梭质粒和表达载体, 使它们线性化; 以电转化方法使它们共转化至 BJ5183 细胞中进行同源重组, 构成肝细胞生长因子基因腺病毒重组体。以脂质体为转染介质, 将肝细胞生长因子基因腺病毒重组体转染到人胚肾细胞中进行包装, 使病毒复性具有感染能力。用包装后的肝细胞生长因子基因腺病毒重组体感染体外培养的大鼠主动脉平滑肌细胞; 经逆转录—聚合酶链反应和蛋白印迹检测发现肝细胞生长因子呈过表达。此外, 酶切及测序发现重组腺病毒穿梭质粒和肝细胞生长因子基因腺病毒重组体是正确的; 绿色荧光蛋白标记对重组体在人胚肾细胞中的包装及包装后感染大鼠主动脉平滑肌细胞进行了荧光示踪。结果提示, 肝细胞生长因子基因腺病毒重组体构建成功, 为血管疾病转基因治疗奠定了基础, 具有一定临床价值。

[中图分类号] Q78

[文献标识码] A

Construction of Hepatocyte Growth Factor Gene Recombinant Adenovirus Vector and its Expression in Vascular Smooth Muscle Cells

FENG Zong-Cheng, HU Xin-Hua, YU Peng, SUN Da-Xin, XIN Shi-Jie, and ZHANG Qiang

(Department of Surgery, the First Clinical College of China Medical University, Shenyang 110001, China)

[KEY WORDS] Gene Expression, Hepatocyte Growth Factor; Adenovirus Vector; Homologous Recombination; Vascular Smooth Muscle Cells; Green Fluorescent Protein

[ABSTRACT] **Aim** To construct an adenovirus expression vector which can express hepatocyte growth factor (HGF) in vascular smooth muscle cells (SMC). **Methods** The plasmid containing HGF fragment was cleaved by restriction enzyme digestion, and the resultant fragment was inserted directionally into adenoviral shuttle plasmid. The linearized recombinant adenoviral shuttle plasmid and adenovirus expression vector were cotransformed into *Escherichia coli* BJ5183 cells for homologous recombination. The resultant recombinant plasmid, pAd-HGF, then was transfected into HEK293 cells with liposome for packaging. The recombinant adenoviral shuttle plasmid and pAd-HGF were identified by enzyme digestion and sequencing. The package of pAd-HGF in HEK293 cells was tracked by fluorescent microscope, and was observed by electronic microscope. The expression of packaged pAd-HGF in abdominal aortic SMCs of rat was identified by RT-PCR and Western blotting. **Results** HGF fragment was inserted correctly into the adenoviral shuttle plasmid and adenovirus expression vector. High-titer packaged adenovirus vector was produced and expressed in abdominal aortic SMCs of rat. **Conclusions** A recombinant adenovirus expression vector of HGF was constructed successfully. This study suggested that HGF may be a potential target for the gene therapy of vascular diseases and established a foundation for further study.

肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 是一个很有发展前景的生物大分子, 其分子量约 90 kDa, 由 60 kDa 的 α 重链和 30 kDa 的 β 轻链以二

硫键连接成异二聚体, 具有多种生物学活性, 其中较为突出的是对内皮细胞的保护和促分裂作用。文献 [1] 报道, HGF 促进内皮细胞增殖的作用强于血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)。并且不引起内皮细胞通透性的改变。其作用机制是 [2], 经膜受体对细胞进行信号及周期调节。血管损伤后重建过程中内皮的及时修复, 对防止血管狭窄有重要作用。本实验构建含人 HGF (human HGF, hHGF) 基因的腺病毒载体重组体, 并转染原代培养

[收稿日期] 2003-08-10 **[修回日期]** 2004-02-26

[基金项目] 国家自然科学基金 (30000163) 资助

[作者简介] 冯宗承, 博士研究生, 副教授, 联系电话为 024-23281550, E-mail 为 zongchengfeng@sohu.com。胡新华, 博士, 主治医师。张强, 外科学教授, 博士研究生导师, 为本文通讯作者, 联系电话为 024-83300071, E-mail 为 qzhang@mail.sy.ln.cn。

的 Wistar 大鼠主动脉平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC),旨在为血管损伤疾病的基因治疗奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

质粒 pUC-SR α /HGF 由日本大阪大学医学院 Toshikazu Nakamura 教授惠赠,内含 2.3 kb hHGF cDNA 片段,克隆在 pUC-SR α 的两个限制内切酶位点 Not I 之间。缺陷型腺病毒表达载体系统(包括腺病毒主链质粒 pAdEasy-1、穿梭载体 pAdTrac-CM 和大肠埃希菌 BJ5183 细胞)为美国 Stratagene 公司产品,其中穿梭载体含有绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)序列。HEK293 细胞购于中国科学院上海细胞库。限制内切酶 Hot I、碱性磷酸酶及 T4DNA 连接酶购于日本 Takara 公司。限制内切酶 Pme I 和 Pac I 购于 NEB 公司。DNA 片段快速回收试剂盒为北京鼎国生物技术公司产品。脂质体转染试剂购于 Invitrogen 公司。Wistar 鼠由中国医科大学实验动物中心提供。聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)引物由大连宝生物公司合成。HGF 一级抗体由武汉博士德生物工程有限公司提供。

1.2 肝细胞生长因子基因腺病毒穿梭载体的重组

依据腺病毒穿梭载体上的多克隆位点和 pUC-SR α /HGF 的酶切图谱,选择限制内切酶位点 Not I 进行单酶切,反应终止后上样于 1% 琼脂糖凝胶电泳切胶回收。腺病毒穿梭载体经限制内切酶 Not I 酶切后被线性化;pUC-SR α /HGF 被限制内切酶 Not I 酶切后可以收获 HGF 基因片段。将线性化的腺病毒穿梭载体用碱性磷酸酶做去磷酸化处理,溶于 TE 缓冲液中。将 HGF 基因片段溶于 TE 缓冲液中。按照载体:插入片段为 1:4 的比例,取适量线性化的腺病毒穿梭载体和 HGF 基因片段,加入到含 T4DNA 连接酶的体系中进行连接。将连接产物经大肠杆菌感受态细胞转化后,涂于卡那霉素琼脂糖平板筛选,提取质粒后,用限制内切酶 Not I 做单酶切分析重组质粒。若得 2.3 kb 切下片段,则重组体即是 HGF 基因腺病毒穿梭载体。再以限制内切酶 Kpn I 单酶切重组体,鉴别基因片段插入质粒的方向。将含有正向插入基因片段的重组体转化,提取质粒,纯化后溶于去离子水中并测浓度。

1.3 肝细胞生长因子基因腺病毒重组体的构建

按缺陷型腺病毒表达载体系统手册提供的方法制备 BJ5183 感受态细胞,以 10% 甘油洗涤。取适量的 HGF 基因腺病毒穿梭载体,加入到含 1 μ L (10 u)

限制内切酶 Pme I 的 40 μ L 反应体系中,使其线性化。经乙醇沉淀后,再加入到含有 1 μ L (10 u)碱性磷酸酶的 40 μ L 反应体系中去磷酸化,以去离子水溶解,并测浓度。取 38 μ L BJ5183 感受态细胞、1 μ L (约 1 μ g)线性化的 HGF 基因腺病毒穿梭载体、1 μ L (约 0.1 μ g)纯化的腺病毒主链质粒,混合后总体积为 40 μ L,加入到 2 mm 电转杯中。在 200 Ω 、2.5 kV 条件下进行电转化。将电转后的液体加入到 1 mL 丰富培养基中摇菌 2 h,以表达抗性。其后涂于含 50 mg/L 卡那霉素琼脂板过夜筛选。挑菌落小提质粒,用限制内切酶 Pac I 酶切鉴定,其中切得短片段 4.5 kb、长片段约 30 kb 者为目的克隆,即 HGF 基因腺病毒重组体。将 HGF 基因腺病毒重组体重新转化入大肠杆菌感受态细胞,提取质粒,纯化后溶于去离子水中并测浓度。

1.4 肝细胞生长因子基因腺病毒重组体的包装

将 293 细胞在含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基的培养瓶里,置 5% CO₂ 培养箱内培养至融合率达 70% 时,取 25 μ L (0.5 g/L)经限制内切酶 Pac I 酶切线性化的 HGF 基因腺病毒重组体,加入到 475 μ L 无血清的 DMEM 培养中稀释,同时用 475 μ L 无血清的 DMEM 培养液稀释 25 μ L 脂质体转染介质,两种液体混合后 5 min 内加入到培养瓶中。6 h 后加入 2 mL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液。于 72 h 倒出培养液,4 $^{\circ}$ C 12 kr/min 离心 5 min,吸取上清,即得到包装好的 HGF 基因腺病毒重组体。向培养瓶中再加入 3 mL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,于 1 周后取上清。提取的上清加入到同等条件培养的 293 细胞进行病毒扩增。1 周后提上清,以氯化铯法进行密度梯度离心提高病毒滴度。

1.5 感染平滑肌细胞

取 250 g 雄性 Wistar 鼠的腹主动脉,以 I 型胶原酶消化分离,培养于含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基中,在 5% CO₂ 培养箱里传至第 5 代。于融合率达 70% 时,用 HGF 基因腺病毒重组体感染培养瓶中的平滑肌细胞,于 24 h 后用荧光显微镜观察转染情况,48 h 后收集细胞用于 HGF mRNA 和蛋白检测。

1.6 肝细胞生长因子基因腺病毒重组体的表达

用逆转录 PCR(reverse transcription PCR RT-PCR)检测 HGF mRNA 的表达。HGF 的上游引物为 5'-CAA ATG TCA GCC CTG GAG TT-3',下游引物为 5'-ATT GAC AGT GCC CCT GTA GC-3',扩增范围为 E09626 的 441-954,长 514 bp。以 β -肌动蛋白为对照,其上游引物为 5'-ATC ATG TTT GAG ACC TTC AAC A-3',下游引物为 5'-CAT CTC TTG GTC GAA

GTC CA-3', 扩增长度 308 bp。采用 Trizol 一步法从收集的 SMC 中进行总 RNA 提取^[3], 逆转录的反应体系为 20 μ L (5 \times 逆转录酶缓冲液, 25 mmol MgCl₂, 各 10 mmol 混合脱氧核苷酸, 逆转录酶, RNA 酶抑制剂, 寡聚核苷酸引物, 总 RNA), 条件为 42 $^{\circ}$ C 30 min \rightarrow 99 $^{\circ}$ C 5 min \rightarrow 5 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 体系为 50 μ L (去离子水 38.5 μ L, 10 \times TaqDNA 聚合酶缓冲液 5 μ L, 各 10 mmol 混合脱氧核苷酸 3 μ L, 底物 1 μ L, 上下游引物各 0.5 μ L, TaqDNA 聚合酶 2.5 u) 条件为预变性 94 $^{\circ}$ C 4 min \rightarrow 变性 94 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 退火 55 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 延伸 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 终止反应。取 6 μ L PCR 产物, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 在紫外灯下观察电泳结果并拍照。

用蛋白印迹 (Western blot) 法检测 HGF 的表达。于冰水混合物上, 向放有收集 SMC 的微量离心管内加入细胞裂解液 100 μ L, 4 $^{\circ}$ C 12 kr/min 离心 15 min 提取蛋白并定量。取 70 μ g 蛋白, 于 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后将蛋白转移到硝酸纤维素膜上, 经 10% 脱脂奶粉 4 $^{\circ}$ C 封闭 16 h。一抗抗 HGF 为兔抗多克隆抗体, 加一抗后反应 2 h; 二抗为碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG, 加二抗后反应 1 h。酶法显色, 深兰色为阳性反应。

1.7 荧光显微镜和透射电子显微镜观察

肝细胞生长因子 (HGF) 基因腺病毒重组体经脂质体转染介质导入 293 细胞后, 分别于 24 h、48 h 和 72 h 于倒置荧光显微镜 (OLYMPUS, 日本产) 10 \times 40 倍放大条件下, 以紫外光激发观察。同样条件下观察 HGF 基因腺病毒重组体感染的原代培养 SMC。

将包装 HGF 基因腺病毒重组体的 293 细胞, 于 72 h 收集到离心管中, 1 kr/min 离心 5 min, PBS 清洗 2 次, 用 2.5% 戊二醛固定沉淀细胞。透射电子显微镜 (JEM-1200EX/JEOL 型, 日本产品) 观察腺病毒繁殖情况。

2 结果

2.1 酶切鉴定

肝细胞生长因子 (HGF) 基因腺病毒穿梭载体经紫外透射检测, 可见 1 条约 2.3 kb 的目的带和 9.22 kb 的载体带, 与预测结果相符, 表明 HGF 基因已被插入到穿梭载体。限制内切酶 Kpn I 单酶切电泳可见两种情况: 一个是只有 1 条约 115.2 kb 的带, 为 HGF 基因反向插入的重组体; 另一个是有约 2.2 kb 和约 9.33 kb 两条带 (图 1, Figure 1), 为 HGF 基因正向插入的重组体。将腺病毒主链质粒和 HGF 基因

腺病毒穿梭载体同源重组后, 用限制内切酶 Pac I 酶切, 0.5% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外透射检测, 可见 1 条 4.5 kb 带和 1 条约 30 kb 带 (图 2, Figure 2), 与缺陷型腺病毒表达载体系统试剂盒说明书相符合, 表明腺病毒主链质粒和 HGF 基因腺病毒穿梭载体同源重组成功。

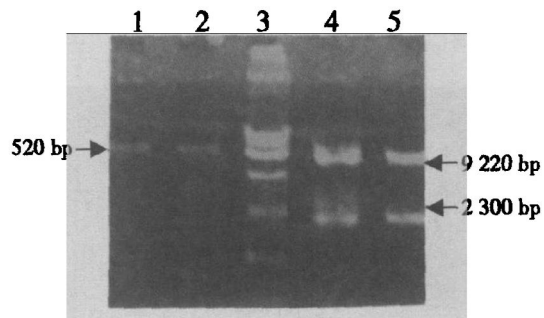


图 1. 重组肝细胞生长因子基因腺病毒穿梭质粒经限制内切酶 Not I 或 Kpn I 酶切 1 和 2 为 HGF 基因反向插入重组体; 3 为标准物; 4 为 HGF 基因正向插入重组体; 5 为 Not I 酶切鉴定。

Figure 1. recombinant of HGF adenoviral shuttle plasmid with Not I or Kpn I digestion

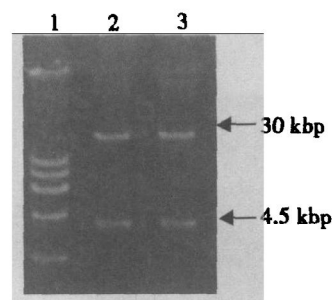


图 2. 肝细胞生长因子基因腺病毒重组体经限制内切酶 Pac I 酶切 1 为标准物; 2 和 3 为 HGF 基因腺病毒重组体。

Figure 2. recombinant of HGF adenoviral plasmid with Pac I digestion

2.2 肝细胞生长因子基因腺病毒重组体的包装

以脂质体为转染介质, 成功的将 HGF 基因腺病毒重组体转入 293 细胞 (图 3A, Figure 3A), 荧光显微镜观察显示绿色荧光。透射电子显微镜观察 293 细胞中含有大量的多边形颗粒, 符合腺病毒的形态特点 (图 3B, Figure 3B)。

2.3 肝细胞生长因子基因的表达

包装后的 HGF 基因腺病毒重组体和空病毒的最大病毒滴度达 1.5×10^{12} cfu/L 和 3×10^{12} cfu/L。收获的 HGF 基因腺病毒重组体感染 SMC, 转染率达 80% 以上。HGF 基因腺病毒重组体感染血管 SMC 后 RT-PCR 结果发现: 外源性 HGF 基因 mRNA 在血

管 SMC 出现高表达,而正常大鼠主动脉 SMC 和转染同一病毒滴度空病毒的血管 SMCHGF 基因 mRNA 无表达(图 4A, Figure 4A)。提取 HGF 基因腺病毒重组体感染血管 SMC、正常血管 SMC 和转染空病毒的血管 SMC 的蛋白质,以抗 HGF 抗体进行蛋白印迹检测。结果发现,与正常血管 SMC 及转染空病毒的血管 SMC 相比,HGF 基因腺病毒重组体感染的血管 SMCHGF 蛋白表达明显增加(图 4B, Figure 4B)。

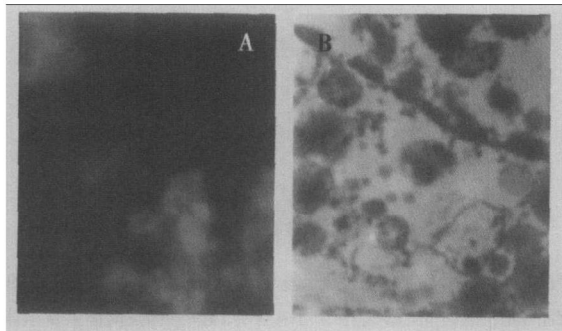


图 3. 肝细胞生长因子基因腺病毒重组体在 HEK293 细胞中的包装 A 为荧光显微镜下放大 400 倍, B 为透射电子显微镜下放大 8 000 倍

Figure 3. The package of recombinant of HGF adenoviral plasmid in HEK293 cells.

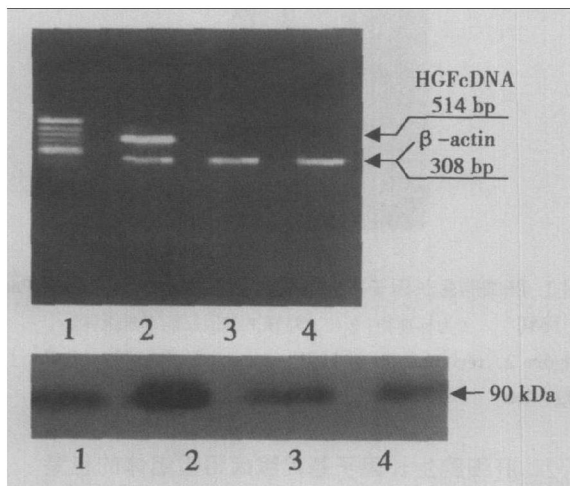


图 4. 肝细胞生长因子基因腺病毒重组体转染血管平滑肌细胞 上图为 HGF mRNA 表达,其中 1 为标准物,2 为 HGF 基因腺病毒重组体转染血管 SMC,3 为空病毒转染血管 SMC;下图为 HGF 蛋白表达,其中 1 和 2 为 HGF 基因腺病毒重组体转染血管平滑肌 24 h 后,3 为空病毒转染血管 SMC 24 h 后,4 为正常血管 SMC。

Figure 4. Recombinant of HGF adenoviral plasmid was transfected into VSMC

3 讨论

本实验选用腺病毒作载体构建重组体,是因为

腺病毒载体具有感染效率高和瞬时表达不与基因组整合等优点^[4-6]。我们用腺病毒主链质粒与穿梭载体同源重组,将插入 CMV 下游的外源基因加入到腺病毒主链质粒。穿梭载体含有两个 CMV,其中一个位于多克隆位点的上游;另一个则位于多克隆位点的下游,绿色荧光蛋白基因序列的上游。我们将人 HGF 基因片段于体外重组,插入到穿梭载体的 Not I 限制性酶切位点,再经 BJ5183 细胞内同源重组插入到腺病毒主链质粒,从而形成 HGF 基因腺病毒重组体。穿梭载体含有绿色荧光蛋白序列,通过同源重组也加入到腺病毒主链质粒,其作用是基因转染研究中确定转染率、蛋白质表达及蛋白质定位等提供了较直观的靶标记^[7]。

肝细胞生长因子(HGF)由二硫键连接的异二聚体分子组成,其中 α 重链含有 kringle 结构域,分子质量为 69 kDa, β 轻链分子质量为 34 kDa。是一种新的具有多种潜能的治疗性生长因子(促进血管生成、创伤愈合和细胞存活)。有研究显示系统的给予人重组 HGF 用于调节肝、肾和肺疾病创伤愈合过程。文献^[8,9]报道,HGF 基因是一种特殊的内皮细胞生长因子,保护血管或促进血管修复。HGF 发挥作用时,首先结合于内皮细胞表面的 HGF 受体,再经细胞内 Grb2、Grb1、PI3 等信号途径发挥作用。我们成功构建了表达 HGF 基因的重组腺病毒载体 HGF 基因腺病毒重组体,为血管疾病转基因治疗奠定了基础。

【参考文献】

- [1] Aoki M, Morishita R, Taniyama Y, Kaneda Y, Ogihara T. Therapeutic angiogenesis induced by hepatocyte growth factor: potential gene therapy for ischemic diseases. *J Arterioscler Thromb*, 2000, 7: 71-76
- [2] Morishita R. Recent progress in gene therapy for cardiovascular disease. *Circ J*, 2002, 66: 1 077-086
- [3] 吴胜英,张宝红,蒋宏峰,潘春水,庞永政,唐朝枢,等. 血管钙化对血管组织内皮素表达的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2003, 11: 277-282
- [4] Romano G, Pacilio C, Giordano A. Gene transfer technology in therapy: current applications and future goals. *Stem Cells*, 1999, 17: 191-202
- [5] 唐蔚青,王抒,黎健. 野生型 p53 基因导入诱导血管平滑肌细胞凋亡. *中国动脉硬化杂志*, 1997, 5 (3): 194-198
- [6] 刘启功,陆再英,周洪莲,张卫东,颜进. 血管内皮生长因子预防血管成形术后再狭窄的机理. *中国动脉硬化杂志*, 2001, 9 (3): 209-212
- [7] Naylor LH. Reporter gene technology: the future looks bright. *Biochem Pharmacol*, 1999, 58: 749-757
- [8] Morishita R, Aoki M, Nakamura S, Matsushita H, Tomita N, Hayashi S, et al. Potential role of a novel vascular modulator, hepatocyte growth factor (HGF), in cardiovascular disease: characterization and regulation of local HGF system. *J Arterioscler Thromb*, 1997, 4: 12-19
- [9] 李跃华,戚晓红,李善,吴翠贞,徐柯. 猪肝部分切除术后不同部位血管的血清及肝细胞生长因子对原代肝细胞生长的影响. *中国病理生理杂志*, 1998, 14 (3): 257-260

(此文编辑 胡必利)