

重组腺相关病毒介导人血管内皮生长因子 165 基因在培养大鼠心肌细胞中的表达

曾钧发¹, 王佐², 袁洪³, 桂培根¹

(1. 南华大学附属第二医院 ICU; 2. 南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001;

3. 中南大学湘雅三医院, 湖南省长沙市 410013)

[关键词] 病理学与病理生理学; 腺相关病毒; 血管内皮生长因子; 基因转导; 基因表达; 心肌细胞

[摘要] 目的 探讨 2 型腺相关病毒载体介导的人血管内皮生长因子 165 基因在离体心肌细胞中的表达及表达产物的生物活性。方法 构建携带人血管内皮生长因子的 2 型腺相关病毒载体(rAAV-2/hVEGF165), 感染大鼠原代心肌细胞, 采用逆转录聚合酶链反应、免疫印迹法和酶联免疫吸附测定等方法检测心肌细胞人血管内皮生长因子 165 的表达, 应用 MTT 法检测转染后细胞上清液中血管内皮生长因子 165 的生物活性。结果 逆转录聚合酶链反应检测结果发现感染的心肌细胞可表达人血管内皮生长因子 165 mRNA; 免疫印迹法检测结果表明感染的心肌细胞中有人血管内皮生长因子 165, 酶联免疫吸附测定法检测到血管内皮生长因子蛋白分泌水平为 546.5 ± 15.6 pg/L, 未转染组未检测到血管内皮生长因子蛋白的分泌; 还发现感染的心肌细胞上清具有明显的促人内皮细胞增殖作用。结论 2 型腺相关病毒载体介导的人血管内皮生长因子 165 可有效转染大鼠心肌细胞, 且表达产物具有促内皮细胞增殖作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Expression of Human Vascular Endothelial Growth Factor 165 Gene Mediated by Recombinant Adeno-associated Viral Vector2 in Rat Cardiomyocytes in vitro

ZENG Jun-Fa¹, WANG Zuo², YUAN Hong³, and GUI Pei-Gen¹

(1. The Second Affiliated Hospital of Nanhua University, 2. The Institute of Cardiovascular Disease of Nanhua University, Hengyang 421001; 3. The Third Xiangya Hospital, Centre South University, Changsha 410013, China)

[KEY WORDS] Adeno-associated Virus; Vascular Endothelial Growth Factor; Gene Transfer; Rat Cardiomyocytes

[ABSTRACT] **Aim** To investigate vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression and bioactivity in rat cardiomyocytes transfected by a recombinant adeno-associated viral vector 2. **Methods** Recombinant adeno-associated viral vector 2 encoding the human VEGF 165 were constructed and infected in vitro to the neonate rat ventricular myocytes. RT-PCR, Western blot and ELISA were used to detect the expression of VEGF gene, and MTT to detect the biological activity of the conditioned medium after transfection. **Results** The presence of VEGF165 mRNA in transfected cells was demonstrated by RT-PCR, the expression of VEGF165 protein was confirmed by western blot. The level of VEGF165 protein expressed by transfected cells was higher than that by control according to an enzyme-linked immunosorbent assay. The conditioned medium after transfection could stimulate the proliferation of endothelial cells. **Conclusion** Rat cardiomyocytes transfected by Recombinant adeno-associated viral vector 2 containing the human vascular endothelial growth factor 165 cDNA (rAAV-2/hVEGF165) could express VEGF165 with highly biological activity, which might be useful for gene therapy of myocardial ischemia.

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种相对分子质量为 34~46 kDa 的分泌性糖蛋白,能特异地作用于血管内皮细胞,强烈刺激其增殖,促进侧支血管形成^[1],在心肌缺血或心肌梗死后的血液循环重建中起着关键作用^[2]。随着对血管生成发生机理研究的深入,通过导入 VEGF

基因诱导心肌侧支血管形成来治疗缺血性心脏病出现良好的应用前景,备受研究者的关注。重组腺相关病毒(recombinant adeno-associated virus, rAAV)载体因具有安全性好、能感染多种类型细胞、可介导外源基因长期表达等特点,是目前较理想的基因载体之一。目前,国内外研究者将 VEGF 基因导入心肌细胞的途径主要是通过物理方法介导和腺病毒介导的基因转移方法^[3-5]。本研究以 rAAV 为载体介导人 VEGF 基因修饰大鼠心肌细胞,测定 VEGF 基因的表达及其生物学活性,为 VEGF 基因治疗缺血性心脏病提供实验基础。

[收稿日期] 2005-07-25 [修回日期] 2006-01-20

[基金项目] 863 高科技发展计划基因治疗重大关键技术资助项目(863-BH03-05-02)

[作者简介] 曾钧发,硕士,研究方向是冠心病的基因治疗,联系电话 0734-8288999,13873463650, E-mail 为 zjf_1320@163.com。通讯作者袁洪,主任医师,教授,硕士研究生导师,研究方向为心血管疾病的基因治疗,联系电话 0731-8618331, E-mail 为 yonghong01@vip.sina.com。

1 材料与方法

1.1 主要材料

腺相关病毒通用载体质粒 pSNAV-1、pUC18/hVEGF165(含位于 Kpn *iv*和 sal *iv*酶切位点间 495 bp 的 VEGF165 cDNA 片段)和具有 AAV 包装功能的 rHSV-HSV-rc/ΔUL2 由中国预防医学科学院病毒研究所吴小兵博士提供,金黄地鼠胚胎肾细胞 BHK-21、人血管内皮细胞株 ECV304 由本实验室保存。

Kpn *iv*、sal *iv*酶及 T4DNA 连接酶(Promega 公司),兔抗人 VEGF 抗体、羊抗兔生物素标记抗体(Santa Cruz 公司)。

TRIzol 试剂盒(Invitrogen 公司);RT-PCR 逆转录试剂盒(MBI 公司);PCR 引物(上海华大基因公司);hVEGF165-CytElisa 试剂盒(CytImmune Science 公司);LipofectamineTM 2000 细胞转染试剂(Gibco/BRL 公司);质粒 DNA 提取试剂盒(QIAGEN)。

1.2 含人血管内皮生长因子 165 基因的重组腺相关病毒载体的构建

用限制性内切酶 Kpn *iv*、Sal *iv*酶切质粒 pUC18-hVEGF165,回收约 495 bp 大小的 hVEGF165DNA 片段,pSNAV-1 载体用 Kpn *iv*+ Sal *iv*酶切,回收线性片段,两片段 16℃连接过夜。连接产物命名为 pSNAV-1/hVEGF165,转化涂板后,用 Kpn *iv*+ Sal *iv*酶切鉴定。AAV 的包装按文献[6]介绍的方法进行。用脂质体法将 pSNAV-1/hVEGF165 转染 BHK-21 细胞,24 h 后加入 800 mg/L 的 G418,压力筛选得到转入重组质粒的混合细胞株 BHK/SN。将细胞系转入大转瓶扩大培养,当生长至 80% 时用具有 rAAV 包装功能的 rHSV-HSV-rc/ΔUL2 感染细胞待细胞完全病变后收获病毒,纯化后 rAAV-2/hVEGF165,56℃水浴 30 min,并测其滴度。

1.3 乳鼠心肌细胞的原代培养

出生后 1~3 天的 SD 大鼠 10 只,经颈椎断白处死,无菌条件下取出心脏,迅速置于预冷的 D-Hank's 液中,剪下心尖部分的心室组织,用 D-Hank's 液清洗,将心肌组织剪成 0.5~1.0 mm³ 大小的组织块后移入 50 mL 锥形瓶中。加入 10 倍体积 0.25% 的胰蛋白酶,置于 37℃恒温水浴箱中震荡消化约 15 min,待消化液变混浊,用等量的含 20% 胎牛血清的 DMEM/F-12 培养基终止消化,经 100 目不锈钢滤网过滤后,将细胞悬液接种到 75 mL 培养瓶中,置于 37℃,5% CO₂ 培养箱内培养。采用反复贴壁法纯化心肌细胞,将心肌细胞按 1×10⁵/L 的密度重新接种于 50 mL 培养瓶中。前 36 h 换为含 0.1 mmol/L 5-溴

脱氧尿苷的 DMEM/F-12 培养基培养,以抑制非心肌细胞增殖,以后每 48 h 换液 1 次。

1.4 rAAV-2/hVEGF165 转染心肌细胞

待细胞培养至 70%~80% 融合时,更换新鲜培养基,按感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 5×10⁵ 病毒颗粒/细胞分别加入 rAAV/hVEGF165,37℃孵育 1 h 弃去培养基,加入含丁酸钠(50 mmol/L)的 DMEM/F-12 培养基,5% CO₂、37℃培养 72 h。

1.5 逆转录聚合酶链反应检测人血管内皮生长因子 165 基因的表达

用 TRIzol 试剂盒提取心肌细胞的总 RNA。取 1 μg 的总 RNA,在 20 μL 的反应体系中,用逆转录酶进行 cDNA 合成。取 2 μL 体积的 cDNA,在 50 μL 的反应体系中进行 PCR 扩增,GAPDH 为内参照。VEGF 上游引物序列为 5'-AGG GCA GAA TCA TCA CGA AG-3',下游引物序列为 5'-AGG TTT GAT CCG CAT AAT CT-3',扩增长度为 235 bp。GAPDH 上游引物序列为 5'-GAC CCC TTC ATT GAC CTC AA-3',下游引物序列为 5'-GCA TGG ACT GTG GTC ATG AGT-3',扩增长度为 437 bp。反应条件为:94℃预变性 5 min 后,94℃变性 30 s→54℃退火 30 s→72℃延伸 40 s,共 30 个循环;72℃延伸 5 min。取 5 μL PCR 产物上样,1.5% 琼脂糖凝胶电泳。

1.6 Western blot 法检测血管内皮生长因子蛋白表达水平

取转染后 72 h 的无血清无抗生素培养上清液 5 mL,-60℃,85 mbar 冻干,再溶于 50 μL PBS 溶液中,取 10 μL 样品及纯 VEGF 蛋白共 2 组行蛋白电泳后,转移至醋酸纤维膜,进行丽春红染色,5 min 后去离子水漂洗 5 次,制膜,用 5% 脱脂奶粉封闭醋酸纤维膜上的免疫球蛋白位点,温育 2 h 后弃去封闭液加入鼠抗人 VEGF 多克隆抗体,抗体滴度为 1:2 000,温育 24 h,用 PBS 漂洗滤膜 5 次,每次 10 min,重新封膜,加入封闭液及羊抗鼠生物素标记抗体,温育 2 h,PBS 漂洗滤膜 5 次,每次 10 min,DAB 显色。

1.7 酶联免疫吸附法定量分析培养上清中人血管内皮生长因子 165 含量

应用 hVEGF165-CytElisa 试剂盒检测培养上清中 hVEGF165 的含量。主要步骤如下:按照说明书配好各种溶液,添加空白液、标准品及培养上清各 100 μL;每孔添加 25 μL 生物素标记的兔抗人 VEGF 多克隆抗体;室温下(20~25℃)孵育 3 h;清洗 5 次后,每孔添加 50 μL 抗生物素碱性磷酸酶,孵育 45 min;再次清洗 5 次;每孔添加 200 μL 染色剂;在 ELX800NB Kejunior 酶标仪上于 490 nm 处检测标准

品的 OD 值, 记录所有孔的 OD 值; 计算标准曲线和各个样本的 hVEGF165 浓度。

1.8 转染血管皮生长因子上清生物学活性检测

将人内皮细胞株 ECV304 以 2×10^3 /孔的密度接种至 96 孔培养板。培养 4 h 后弃去培养液。将以 rAAV-2/hVEGF165 转染和无转染细胞培养上清用含 10% FBS 的 DMEM/F-12 培养基对半稀释, 作为 ECV304 的培养介质, 以 200 μ L/孔加入 96 孔板, 每组设 6 个复孔。采用 MTT 法测定对培养第 1、2、4、6 和第 8 d 内皮细胞增殖的影响。

1.9 统计学方法

所有实验重复 3 次, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 t 检验, $P < 0.05$ 认为有显著性差异。

2 结果

2.1 重组质粒 pSNAV1/hVEGF165 的构建与鉴定

构建成表达 hVEGF165 的 AAV 质粒, 结构如图 1 所示, 具有 AAV 的两个倒转末端重复序列 (ITR), VEGF165 基因位于 CMV 立早启动子控制之下。其后是 polyA 序列, 同时质粒上含新霉素抗性基因。用 Kpn I 与 Sal I 双酶切后电泳, 得到约 495 bp 和 7 000 bp 的基因片段 (图 2), 其酶切结果与质粒 pSNAV 及目的片段的大小相一致, 说明目的片段已成功插入 pSNAV 载体中。

2.2 转染心肌细胞中 hVEGF165 基因的表达

重组腺相关病毒介导的 hVEGF165 基因转染大鼠心肌细胞后第 72 h, RT-PCR 可检测出 235 bp 的扩增片段, 证实 rAAV/hVEGF165 成功转入大鼠心肌细胞, 并获得 VEGF165 基因的有效表达 (图 3)。

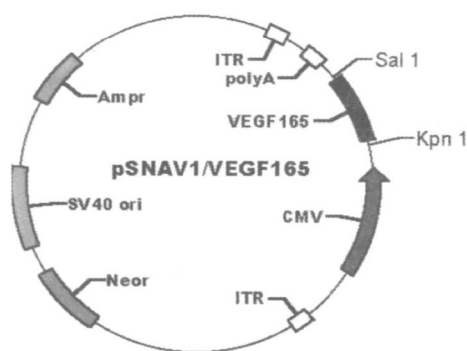


图 1. 含 VEGF165 表达盒的 AAV 载体质粒 pSNAV1 的结构图

2.3 转染心肌细胞 VEGF 蛋白的表达

Western blot 法检测结果发现, 在 rAAV-2/hVEGF165 转染的心肌细胞培养上清液中可以检测到 VEGF 蛋白的存在, 而未转染组未检测到 VEGF

的表达 (图 4)。

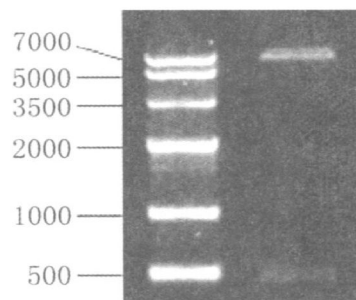


图 2. KpnI 和 SalI 双酶切重组质粒 pSNAV1/VEGF165 的鉴定结果

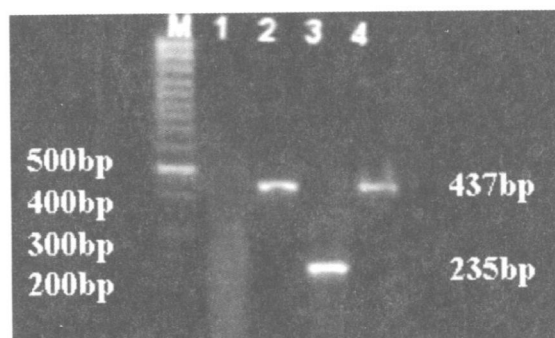


图 3. 转染后的大鼠心肌细胞中血管内皮生长因子 165 mRNA 电泳图 M 为 DNA 标记, 1 为对照组, 2 为内对照基因 GAPDH, 3 为转染组, 4 同 2。

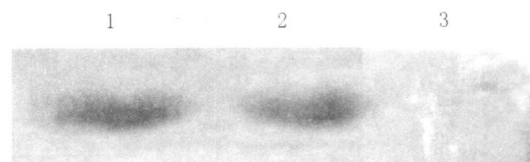


图 4. 转染组与对照组的 Western blot 滤膜照片 1 为 VEGF 蛋白阳性对照, 2 为 rAAV-2/hVEGF165 转染组, 3 为未转染组。

2.4 心肌细胞血管内皮生长因子蛋白的分泌水平

血管皮生长因子 (VEGF) 蛋白的标准曲线上 490 nm 处光密度对数值与 VEGF 蛋白浓度的对数值成正比, 表明两者线性关系良好。根据标准曲线得到各组的 VEGF 蛋白浓度。rAAV/hVEGF165 转染的心肌细胞培育上清中 VEGF 蛋白质量浓度为 546.5 ± 15.6 μ g/L, 而未转染组则未检测到 VEGF 蛋白。

2.5 转染心肌细胞上清生物学活性检测

转染组心肌细胞培养上清经 1:2 稀释后, 对人脐静脉内皮细胞 ECV304 有显著的促增殖作用。未转染组增殖缓慢, 培养的第 3 天后, 两者的 A 值有显著性差异 ($P < 0.05$, 表 1)。

表 1. 人血管内皮生长因子 165 对人脐静脉内皮细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

时间	对照组	rAAV-2/hVEGF165 组
1 d	0.032 \pm 0.011	0.040 \pm 0.028
2 d	0.132 \pm 0.030	0.125 \pm 0.014
4 d	0.234 \pm 0.045	0.284 \pm 0.079 ^a
6 d	0.240 \pm 0.042	0.346 \pm 0.032 ^a
8 d	0.244 \pm 0.034	0.281 \pm 0.107 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

3 讨论

血管内皮生长因子(VEGF)可促进内皮细胞分裂、增殖和迁移,抑制其凋亡,从而促进新生血管的形成^[2,7];还可增加毛细血管后静脉和小静脉等微小血管的通透性,调节血管紧张性,对维持血管的完整性有重要作用^[8]。VEGF 以旁分泌和自分泌方式,通过与其特异性受体 Flt-1、Flt-1/KDR 和 Flt-4 结合发挥其生物学作用^[9,10],促进内皮细胞增殖,而内皮细胞增殖则是新生血管形成的始动因素^[11]。

动物实验和临床实践^[2,12,13]均证明 VEGF 蛋白对改善心肌缺血具有良好的治疗作用,可明显增加缺血心肌内的毛细血管密度和侧枝循环的血流量,改善心肌缺血区的血液供应。但是单纯外源性 VEGF 蛋白治疗可引起系统低血压^[14],并因其在循环中的半衰期很短,发挥其治疗作用需反复多次给药,需要量大且价格昂贵,使其临床应用受到限制。而 VEGF 基因转染细胞后,一次给药可在较长时间内持续表达,且需要的外源性基因用量小,操作简便,故 VEGF 基因治疗具有较好的临床应用前景。

如何使 VEGF 基因在心肌细胞内高效、长期表达是目前基因治疗缺血性心脏病亟待解决的问题,而选择安全高效的载体是其成功关键。裸质粒具有无传染性、不限制载体容量;可大量制备等优点。但是由于转导效率低和表达时间短,使其应用受到限制。腺病毒载体能高效感染多种细胞,已广泛用于基因转移的研究中。但由于腺病毒基因未能完全去除,腺病毒载体对细胞有直接的细胞毒性作用,并诱发对转基因细胞的免疫反应,使目的基因不能在心肌细胞内长期表达^[15]。重组腺相关病毒已完全去除 AAV 表达的病毒蛋白基因,本身无直接细胞毒性作用或免疫原性,且 AAV 载体能够转染静止期和分裂期的细胞,具人整合到宿主基因组的特点,可使目的基因长期表达,更适用于在体心肌细胞的

基因转移^[16]。本研究构建了含人 VEGF165 基因的 rAAV-2/hVEGF165,并感染体外培养的大鼠心肌细胞,RT-PCR 可检测到人 VEGF165 mRNA 的表达,Western 免疫印迹可检测到人 VEGF165 蛋白的表达,ELISA 法检测到 VEGF 蛋白分泌水平远高于未转染组,且感染的心肌细胞上清具有明显的促人内皮细胞增殖的生物学活性。以上结果为进一步运用 rAAV-2/hVEGF165 在体转染心肌细胞奠定了实验基础,也为心肌缺血的治疗提供一条有效途径。

[参考文献]

- [1] Leung DW, Cachianec G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen [J]. *Science*, 1989, **246** (4935): 1306-309
- [2] Banai S, Jaklitsch MT, Shou M, Lazarous DF, Scheinowitz M, Biro S, et al. Angiogenic induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs [J]. *Circulation*, 1994, **89** (5): 2183-189
- [3] Sarkar N, Ruck A, Kallner G, Y-Hassan S, Blomberg P, Islam KB, et al. Effects of intramyocardial injection of phVEGF-A165 as sole therapy in patients with refractory coronary artery disease: 12-month follow-up: angiogenic gene therapy [J]. *J Intern Med*, 2001, **250** (5): 373-381
- [4] 刘艳秋, 周爱儒, 朱小君, 牛大地, 陈光慧, 汤健. 大鼠心肌缺血的血管内皮生长因子基因治疗[J]. 北京医科大学学报, 1999, **31** (4): 489-492
- [5] 周磊, 马文珠, 杨志健, 张馥敏, 陆丽, 丁兆丰, 等. 血管内皮生长因子 165 及血管生成素 1 减小大鼠心肌梗死面积的研究[J]. 中华心血管病杂志, 2003, **31** (10): 767-772
- [6] 伍志坚, 吴小兵, 曹晖, 董小岩, 王宏, 侯云德. 一种高效的重组腺伴随病毒载体生产系统[J]. 中国科学(C 辑), 2001, **31** (5): 423-430
- [7] Spyridopoulos I, Brogi E, Kearney M, Sullivan AB, Cetrulo C, Isner JM, et al. Vascular endothelial growth factor inhibit endothelial cell apoptosis induced by tumor necrosis factor- α : balance between growth and death signals [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1997, **29** (5): 1321
- [8] Ferrara N, Smyth TD. The biology of vascular endothelial growth factor [J]. *Endocrine Rev*, 1997, **18** (1): 4-25
- [9] Vries de C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT, et al. The flms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor [J]. *Science*, 1992, **255** (5047): 989-991
- [10] Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors [J]. *FASEB J*, 1999, **13** (1): 9-22
- [11] Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis [J]. *Nat Med*, 2000, **6** (10): 389-395
- [12] Harada K, Friedman M, Lopez JJ, Wang SY, Li J, Prasad PV, et al. Vascular endothelial growth factor administration in chronic myocardial ischemia [J]. *Am J Physiol*, 1996, **270** (5Pt2): H1791-802
- [13] Henry TD, Rocher-Singh K, Isner JM, Kereiakes DJ, Giordano FJ, Simons M, et al. Intracoronary administration of recombinant human vascular endothelial growth factor to patients with coronary artery disease [J]. *Am Heart J*, 2001, **142** (5): 872-880
- [14] Hariawala MD, Horowitz JR, Esakof D, Sheriff DD, Walter DH, Keyt B, et al. VEGF improves myocardial blood flow but produces EDHF-mediated hypotension in porcine hearts [J]. *J Surg Res*, 1996, **63** (1): 77-82
- [15] Chimule N, Probert K, Magosin S, Qian Y, Qian R, Wilson J. Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans [J]. *Gene Ther*, 1999, **6** (9): 1574-583
- [16] Grimm D, Klenschidt JA. Progress in adeno associated virus type 2 vector production: promises and prospects for clinical use [J]. *Hum Gene Ther*, 1999, **10** (15): 2445-450

(此文编辑 胡必利)