

[文章编号] 1007-3949(2007)15-05-0337-05

•实验研究•

## RTP801 缺氧反应性核心序列调控下血管生长因子 165 和成纤维细胞生长因子 2 的高效共表达

朱含章, 王志广, 蒋玲琳, 苏鑫铭, 张芳林, 徐亚林, 徐州, 陈琪, 范乐明

(南京医科大学动脉粥样硬化研究中心, 江苏省南京市 210029)

[关键词] 病理学与病理生理学; 血管生长因子 165; 成纤维细胞生长因子 2; RTP801 增强子; 载体构建; 基因表达

[摘要] 目的 获取人血管内皮生长因子 165 基因和人成纤维细胞生长因子 2 基因, 克隆基因损伤诱导转录物 4 基因启动子中的缺氧反应性核心序列, 以含有内核糖体进入位点的单启动子双表达载体为骨架构建真核表达载体, 转染人胚肾 293 细胞, 观察在正常和缺氧下人血管内皮生长因子 165 和人成纤维细胞生长因子 2 的表达。方法 利用聚合酶链反应法从小鼠基因组中获取基因损伤诱导转录物 4 基因启动子的缺氧反应性核心序列 337 bp~511 bp, 替换含有内核糖体进入位点的单启动子双表达载体上的巨细胞病毒增强子(150 bp~390 bp)。通过聚合酶链反应法获取含有人血管内皮生长因子 165 基因和人成纤维细胞生长因子 2 基因的片段, 插入含有内核糖体进入位点的单启动子双表达载体中的多克隆位点中, 构建重组质粒。利用生物性可降解的聚乙烯亚胺多分支树状聚合物将重组质粒体外转染人胚肾 293 细胞, 在正常和缺氧条件下分别培养 36 h, Western 印迹法检测细胞内血管内皮生长因子 165 基因和人成纤维细胞生长因子 2 基因的表达, 酶联免疫吸附法检测细胞培养基中分泌性蛋白血管内皮生长因子 165 和人成纤维细胞生长因子 2 的表达。结果 真核表达载体经聚合酶链反应和酶切分析及测序证实构建成功。Western 印迹法和酶联免疫吸附法检测证实重组质粒中血管内皮生长因子 165 基因和人成纤维细胞生长因子 2 基因在基因损伤诱导转录物 4 基因缺氧反应性核心序列介导下在缺氧人胚肾 293 细胞有高效共表达。结论 获取的基因损伤诱导转录物 4 基因的缺氧反应性核心序列在缺氧状态下有增强下游基因表达的功能, 含有该增强子的真核质粒在缺氧下高效表达血管内皮生长因子 165 和人成纤维细胞生长因子 2。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### High Efficient Co-Expression of Vascular Endothelial Growth Factor 165 and Fibroblast Growth Factor-2 Under the Control of RTP801 Core Hypoxia-Response Enhancer

ZHU Han Zhang, WANG Zhi-Guang, JIANG Lin-Lin, SU Xin-Ming, ZHANG Fang-Lin, XU Ya-Lin, XU Zhou, CHEN Qi, and FAN Le-Ming

(Atherosclerosis Research Center of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

[KEY WORDS] Vascular Endothelial Growth Factor-165; Fibroblast Growth Factor-2; RTP801 Enhancer; Vector Construction; Gene Expression

[ABSTRACT] **Aim** To clone human vascular endothelial growth factor-165 (VEGF-165) gene and human fibroblast growth factor-2 (FGF-2), and clone core hypoxia-response enhancer RTP801 (RTP801HRE) of RTP801 promoter. Using plasmid pIRES as backbone to construct eukaryotic expression vector, then transfecting it into human embryo kidney 293 cell and observing the expression of VEGF-165 and FGF-2 under normal condition and anoxic condition. **Methods** The 337 bp~511 bp of core hypoxia-response enhancer (core HRE) in RTP801 promoter was obtained by polymerase chain reaction (PCR) from mouse genomic DNA, to replace the CMV enhancer (150 bp~390 bp) in pIRES. The fragment containing VEGF-165 and FGF-2 was acquired by PCR, and then inserted into the recombinant plasmid pIRES/Ig $\kappa$ -VEGF-165/IRES/Ig $\kappa$ -FGF-2, and transfected recombinant plasmid pIRES/RTP801HRE/Ig $\kappa$ -VEGF-165/IRES/Ig $\kappa$ -FGF-2 into the 293 cells with biodegradable hyperbranched polyethyl-imine (PEI) in vitro. The infected cells were cultivated for 36 hours under normal and anoxic condition respectively. The expression of VEGF-165 and FGF-2 were detected by Western blot and ELISA. **Results** Eukaryotic expression vector pIRES/RTP801HRE/Ig $\kappa$ -VEGF-165/IRES/Ig $\kappa$ -FGF-2 has been confirmed to be successfully constructed by PCR, enzyme digestion and sequencing. Highly efficient co-expression of VEGF-165 and FGF-2 by the recombinant plasmid under the regulation of the RTP801 core enhancer in anoxic 293 cells has been shown by both Western blot and ELISA. **Conclusion** The RTP801

[收稿日期] 2007-01-09 [修回日期] 2007-04-01

[基金项目] 国家自然科学基金(30470707)资助

[作者简介] 朱含章, 硕士研究生, 主要从事心血管疾病基因治疗的研究, E-mail 为 zhztow@sohu.com。通讯作者范乐明, 教授, 博士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化发生的病理生理学分子机制和基因治疗方面的研究。陈琪, 教授, 博士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化发生的分子机制和信号转导方面的研究。

core hypoxia response enhancer can enhance the expression of downstream genes, so the constructed eukaryotic vector which contains this enhancer can high efficiently express VEGF-165 and FGF-2 under anoxic condition

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种分子质量为40~45 kDa的分泌性糖蛋白,有121、145、165、189和206等各种分子质量不同的亚型,其中VEGF-165是发挥生物学效应的主要成分,分子质量42 kDa,促血管生成的作用最为强烈,在促进缺血心肌和肌体侧枝循环方面具有很好的临床应用前景<sup>[1-4]</sup>。碱性成纤维细胞生长因子2(basic fibroblast growth factor-2, FGF-2)是一种分子质量为18 kDa的分泌性糖蛋白,有明显的促进成纤维细胞、内皮细胞及平滑肌细胞增殖的作用,在缺血性疾病的治疗方面有重要的应用价值<sup>[5-7]</sup>。为了发挥VEGF-165和FGF-2在血管生成方面的联合作用,以含有内核糖体进入位点的单启动子双表达载体(plasmid contains the internal ribosome entry site, pIRES)为骨架构建VEGF-165和FGF-2共表达的的真核载体,其中VEGF-165和FGF-2的前端均接有分泌蛋白分泌引导信号IgK的DNA序列,以利于两蛋白的出胞。并用损伤诱导转录物4基因RTP801启动子上的337 bp~511 bp片段代替pIRES载体上原有巨细胞病毒的增强子。RTP801基因是一种被缺氧和其它细胞应激信号所诱导的应激反应性基因,该基因的启动子全长为2700 bp,可被缺氧诱导因子1(hypoxia inducible factor 1, HIF-1)所激活,引发下游蛋白的高效表达<sup>[8-10]</sup>。缺氧条件下全长RTP801启动子可调控下游VEGF的表达量达猿猴空泡病毒(Simian vacuolating virus 40, SV40)启动子和促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)增强子联用时下游VEGF表达量的3倍<sup>[11]</sup>。有报道RTP801启动子的445 bp~495 bp可能为其缺氧反应元件的最核心部分<sup>[11]</sup>,但未见将此片断用于增强下游基因表达的报道。我们通过与EPO增强子核心部位和内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)增强子核心部位的比对<sup>[12-13]</sup>及考虑PCR的可行性,克隆了337 bp~511 bp片段作为缺氧反应性核心序列,以此构建旨在缺氧细胞中高效表达VEGF-165和FGF-2的重组质粒,并转染人胚肾293细胞,在细胞水平观测VEGF-165和FGF-2在正常氧浓度和缺氧条件下的表达情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

大肠杆菌DH-5a、人胚肾293细胞由本实验室

保存;昆明种小鼠由南京医科大学动物中心提供;质粒pIRES购自BD公司;质粒pSEC/IgK-VEGF-165/IRES/IgK-FGF-2由Janik教授惠赠;质粒抽提试剂盒、DNA割胶纯化试剂盒、限制性内切酶、高保真Taq酶Primer Star及T4DNA连接酶购自日本Takara Biotech公司;DMEM培养基购自美国GibcoBRL公司;胎牛血清和新生牛血清由杭州四季青生物工程研究所提供;聚乙烯亚胺树状聚合物GenEscort<sup>TM</sup>由南京凯基生物公司提供;兔抗人VEGF-165抗体、兔抗人FGF-2抗体、鼠抗人 $\beta$ -actin抗体、羊抗兔HRP标记的二抗、羊抗鼠HRP标记的二抗以及VEGF和FGF-2酶联免疫试剂盒购自武汉博士德公司;BCA蛋白定量试剂盒购自美国Pierce公司;CO<sub>2</sub>三气培养箱(7101C型)购自美国Napco公司;引物由上海英骏生物技术公司合成。

### 1.2 引物设计与合成

参考Genebank登录RTP801启动子序列(NC000076),设计合成一对RTP801核心缺氧增强子引物:上游5'-CTA GAC TAG TCT AGA GCG TTC TGG GGC TCC GTG G-3',下游5'-CGC CAT ATG GCG CAG CAG CCT ATA AGG GCT CT-3',上游引物5'端引入保护性碱基及SpeI酶切位点,下游引物5'端引入保护性碱基及NdeI酶切位点,扩增目的产物为203 bp。根据质粒pSEC/IgK-EGF-165/IRES/IgK-FGF-2中IgK-VEGF-165的5'端和IgK-FGF2的3'端序列设计合成一对获取IgK-VEGF-165/IRES/IgK-FGF-2片段的引物:上游5'-CCG ACG CGT CGG ATG AAC TTT CTT TCT GCT GCT GCT GTC TTG G-3',下游5'-ACG CGT CGA CGT CGA TTC AGC TCT TAG CAG ACA T-3'。上游引物5'端引入保护性碱基及MluI酶切位点,下游引物5'端引入保护性碱基及SalI酶切位点,扩增目的产物为1757 bp。

### 1.3 载体的构建

用MluI和SalI双酶切PCR产物IgK-VEGF-165/IRES/IgK-FGF-2和pIRES空载体,将目的条带割胶纯化,连接过夜后转化DH-5a感受态细胞,氨苄青霉素筛选阳性菌落,摇菌抽提质粒DNA,酶切鉴定和以该重组质粒为模板,用相应引物进行PCR电泳鉴定得到可能的重组质粒pIRES/IgK-VEGF-165/IRES/IgK-FGF-2(简称pVF),并测序确认。将所获得的RTP801HRE和IgK-VEGF-165/IRES/IgK-FGF-2片段,插入pVF载体中的多克隆位点中,构建获得pIRES/RTP801 HRE/IgK-VEGF-165/IRES/IgK-FGF-2重组质

粒;用 SpeI 和 NdeI 双酶切 PCR 产物 RTP801HRE 和 pIRES/Ig $\kappa$ -VEGF-165/IRES/Ig $\kappa$ -FGF-2, 将目的条带割胶纯化, 连接过夜后转化 DH-5a 感受态细胞, 氨苄青霉素筛选阳性菌落, 摇菌抽提质粒 DNA, 通过酶切鉴定和以该重组质粒为模板, 用相应引物进行 PCR 电泳鉴定得到可能的重组质粒为 pIRES/RTP801HRE/Ig $\kappa$ -VEGF-165/IRES/Ig $\kappa$ -FGF-2 (简称 pE-VF), 并测序确认。

#### 1.4 细胞培养和转染

用含有 10% 小牛血清的 DMEM 培养基培养 293 细胞, 细胞长满后消化至两块六孔板培养, 待细胞汇合率达到 90% 时, 开始以聚乙烯亚胺树状聚合物包裹 DNA 形成的混合物进行转染, 每块六孔板上预留一孔空白细胞, 另外转染 pIRES、pVF 和 pEVF 各一孔, 每孔细胞培养液为 2 mL, 将其中一块六孔板置于 CO<sub>2</sub> 三气培养箱中培养 36 h。收取六孔板每孔细胞培养液备用。提取每孔细胞总蛋白, 并用 BCA 试剂盒测定各孔蛋白浓度并定量至 40  $\mu$ g 每管, 置于 -80  $^{\circ}$ C 保存。

#### 1.5 人胚肾 293 细胞血管内皮生长因子 165 和成纤维细胞生长因子 2 蛋白的表达检测

以每孔 40  $\mu$ g 蛋白上样进行 Western blot 检测细胞内 VEGF-165 和 FGF-2 蛋白的表达, 每例样品目的蛋白在胶片上 VEGF-165 和 FGF-2 条带灰度值与同一标本  $\beta$ -actin 条带灰度值的比值作为蛋白的表达量。细胞外 VEGF-165 和 FGF-2 的蛋白表达量以 ELISA 试剂盒测定, 操作严格按照试剂盒使用说明书进行操作。

#### 1.6 统计学分析

采用 SPSS10.0 统计软件。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 *t* 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

#### 2.1 目的片断的获取

通过 PCR 从小鼠基因组 DNA 中获取了 337 bp ~ 511 bp 片段的 RTP801HRE (203 bp), 从质粒 pSEC/Ig $\kappa$ -VEGF-165/IRES/Ig $\kappa$ -FGF-2 中获得了 Ig $\kappa$ -VEGF-165/IRES/Ig $\kappa$ -FGF-2 片段 (1757 bp)。由于质粒中 VEGF-165 和 FGF-2 的头端均有 Ig $\kappa$  序列, 故上游引物以 Ig $\kappa$  序列为主要成分时 PCR 同时扩增出 Ig $\kappa$ -FGF-2 片段 (596 bp), 以上扩增产物均经测序验证 (图 1 和 2)。

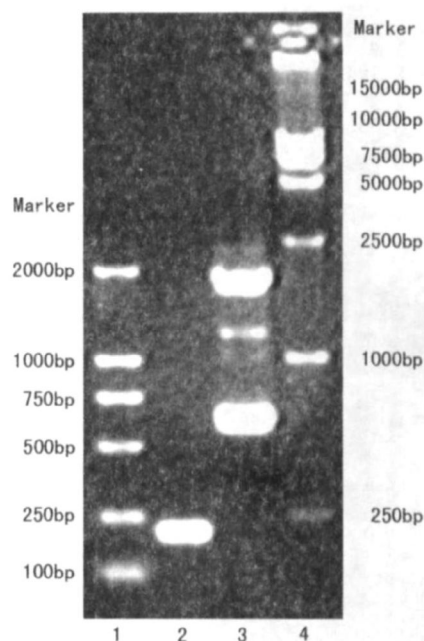


图 1. 电泳鉴定聚合酶链反应获取的 RTP801HRE 和 VEGF-165/IRES/FGF-2 片断 1 为 2000 bp 的 DNA Marker, 2 为 RTP801HRE (203 bp), 3 为 Ig $\kappa$ -VEGF-165/IRES/Ig $\kappa$ -FGF-2 片断 (1757 bp) 和 Ig $\kappa$ -FGF-2 片段 (596 bp), 4 为 15000 bp 的 DNA Marker。

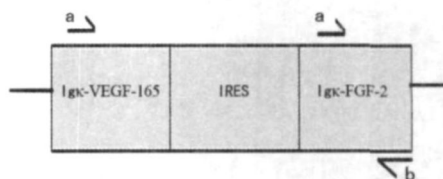


图 2. Ig $\kappa$ -VEGF-165/IRES/Ig $\kappa$ -FGF-2 结构及其与引物的关系 a 为上游引物, b 为下游引物。

#### 2.2 重组质粒的鉴定

PCR 扩增获得了 RTP801HRE (203 bp)、VEGF-165 (549 bp)、Ig $\kappa$ -VEGF-165/IRES/Ig $\kappa$ -FGF-2 (1757 bp) 和 Ig $\kappa$ -FGF-2 (596 bp) 片段 (图 3 条带 2-4), 表明目的片段均已插入重组质粒。图 3 条带 6 为 SpeI 和 NdeI 双酶切结果, 由于 Ig $\kappa$ -VEGF-165/IRES/Ig $\kappa$ -FGF-2 内含另一 SpeI 酶切位点, 故酶切出 RTP801HRE 片段 (195 bp) 和 2120 bp 的片段; 图 3 条带 7 为 SpeI 和 MluI 双酶切结果, 由于 Ig $\kappa$ -VEGF-165/IRES/Ig $\kappa$ -FGF-2 内含另一 SpeI 酶切位点, 故切出三个条带, 均符合载体构建成功所应切出的条带位置; 图 3 条带 8 为 NdeI 和 SalI 双酶切的结果, 切出条带均符合载体构建成功所应切出的条带的位置; 图 3 条带 9 为 MluI 和 SalI 双酶切结果, 切出 Ig $\kappa$ -VEGF-165/IRES/Ig $\kappa$ -FGF-2 片断 (1749 bp)。图 4 为构建成功后的质粒示意图。

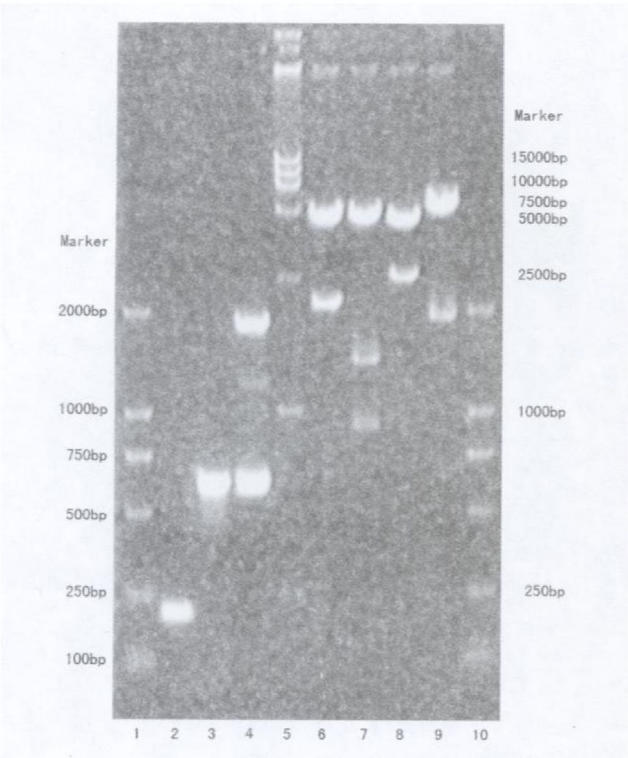


图 3. pIRES/RTP801HRE/VEGF-165/IRES/FGF-2 质粒的聚合酶链反应及酶切鉴定 1 和 10 为 2 000 bp 的 DNA Marker, 2 为 RTP801HRE, 3 为 Ig $\kappa$ -VEGF-165, 4 为 Ig $\kappa$ -VEGF-165/IRES/Ig $\kappa$ -FGF-2 和 Ig $\kappa$ -FGF-2 片段, 5 为 15 000 bp 的 DNA Marker, 6 为 SpeI 和 NdeI 双酶切结果, 7 为 SpeI 和 MluI 双酶切结果, 8 为 NdeI 和 SalI 双酶切的结果, 9 为 MluI 和 SalI 双酶切结果。

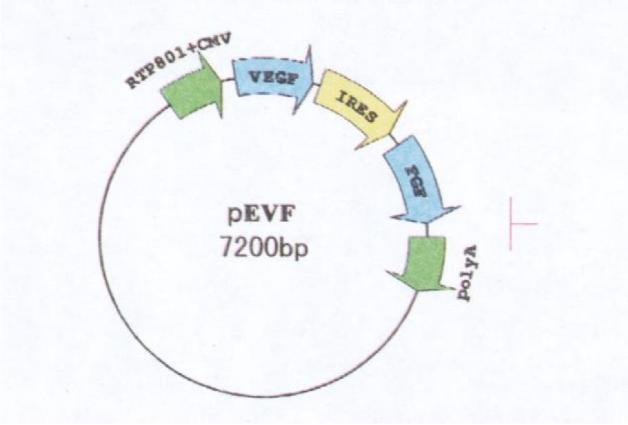


图 4. 构建成功的 pIRES/RTP801HRE/VEGF-165/IRES/FGF-2 (pEVF) 质粒示意图

2.3 细胞内血管内皮生长因子 165 和成纤维细胞生长因子 2 蛋白的表达

Western blot 检测所得 VEGF-165、FGF-2 及  $\beta$ -actin 条带, 分子质量分别为 42 kDa、18 kDa 和 42 kDa (图 5)。缺氧下 pEVF 转染组 VEGF-165/ $\beta$ -actin 比值和 FGF-2/ $\beta$ -actin 比值较其它各组有一定增加, 但无显著性差异(表 1)。

表 1. Western blott 检测细胞内血管内皮生长因子 165 和成纤维细胞生长因子 2 蛋白的表达 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

分 组	VEGF-165/ $\beta$ -actin	FGF-2/ $\beta$ -actin
正常氧浓度下空白对照组	1.141 $\pm$ 0.053	0.536 $\pm$ 0.052
正常氧浓度下 pIRES 空载体转染组	1.144 $\pm$ 0.051	0.513 $\pm$ 0.059
正常氧浓度下 pVF 转染组	1.187 $\pm$ 0.056 <sup>a</sup>	0.640 $\pm$ 0.060 <sup>a</sup>
正常氧浓度下 pEVF 转染组	1.181 $\pm$ 0.054 <sup>a</sup>	0.626 $\pm$ 0.050 <sup>a</sup>
缺氧下空白对照组	1.135 $\pm$ 0.067	0.558 $\pm$ 0.062
缺氧下 pIRES 空载体转染组	1.132 $\pm$ 0.062	0.550 $\pm$ 0.057
缺氧下 pVF 转染组	1.193 $\pm$ 0.058 <sup>a</sup>	0.667 $\pm$ 0.051 <sup>a</sup>
缺氧下 pEVF 转染组	1.250 $\pm$ 0.064 <sup>abc</sup>	0.707 $\pm$ 0.053 <sup>abc</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与正常氧浓度下空白对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与缺氧下 pVF 转染组比较; c 为  $P < 0.05$ , 与正常氧浓度下 pEVF 转染组比较。

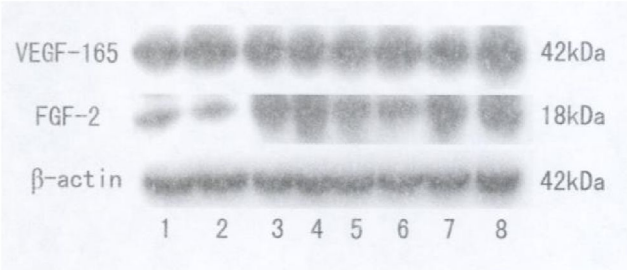


图 5. Western blott 检测细胞内血管内皮生长因子 165 和成纤维细胞生长因子 2 蛋白的表达 1 为正常氧浓度下空白对照组, 2 为正常氧浓度下 pIRES 空载体转染组, 3 为正常氧浓度下 pVF 转染组, 4 为正常氧浓度下 pEVF 转染组, 5 为缺氧下空白对照组, 6 为缺氧下 pIRES 空载体转染组, 7 为缺氧下 pVF 转染组, 8 为缺氧下 pEVF 转染组。

2.4 细胞外血管内皮生长因子 165 和成纤维细胞生长因子 2 水平

缺氧下 pEVF 转染组细胞外 VEGF-165 和 FGF-2 水平较其它各组显著增高, 正常氧浓度下 pEVF 转染组细胞外 VEGF-165 和 FGF-2 水平明显低于正常氧浓度下 pVF 转染组(表 2)。

表 2. 酶联免疫吸附法检测细胞外血管内皮生长因子 165 和成纤维细胞生长因子 2 浓度 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ , ng/L)

分 组	VEGF-165	FGF-2
正常氧浓度下空白对照组	114.12 $\pm$ 15.37	63.67 $\pm$ 13.85
正常氧浓度下 pIRES 空载体转染组	101.23 $\pm$ 20.51	52.34 $\pm$ 14.78
正常氧浓度下 pVF 转染组	1127.23 $\pm$ 68.34 <sup>a</sup>	540.67 $\pm$ 59.19 <sup>a</sup>
正常氧浓度下 pEVF 转染组	729.23 $\pm$ 80.36 <sup>ab</sup>	360.47 $\pm$ 41.27 <sup>ab</sup>
缺氧下空白对照组	155.27 $\pm$ 19.34 <sup>a</sup>	89.12 $\pm$ 9.62 <sup>a</sup>
缺氧下 pIRES 空载体转染组	142.29 $\pm$ 21.22 <sup>a</sup>	83.23 $\pm$ 8.67 <sup>a</sup>
缺氧下 pVF 转染组	850.67 $\pm$ 98.57 <sup>ab</sup>	440.19 $\pm$ 39.73 <sup>ab</sup>
缺氧下 pEVF 转染组	1 655.1 $\pm$ 1 690 <sup>abcd</sup>	7 961 $\pm$ 860 <sup>abcd</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与正常氧浓度下空白对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与正常氧浓度下 pVF 转染组比较; c 为  $P < 0.01$ , 与缺氧下 pVF 转染组比较; d 为  $P < 0.01$ , 与正常氧浓度下 pEVF 转染组比较。



### 3 讨论

VEGF-165 和 FGF-2 是促进血管生成的重要生长因子。VEGF-165 是内皮细胞的特异性丝裂原,可以促进内皮细胞的增殖和移行,增加后毛细血管和小静脉等微小血管对大分子的通透性,调节血管紧张性,促进胚胎期血管形成,对维持血管的正常状态和完整性有重要意义。FGF-2 也是重要的促有丝分裂因子和细胞形态发生分化的诱导因子,它对新生血管形成的多个环节如毛细血管基底膜降解、内皮细胞迁移增殖、胶原合成、小血管腔形成等均有明显促进作用,有明显的促进成纤维细胞和血管平滑肌细胞增殖的作用。有证据表明 VEGF-165 和 FGF-2 在真核载体中共表达可以发挥更好的治疗效果<sup>[14]</sup>。RTP801 启动子在缺氧条件下具有强效的启动能力,RTP801 启动子的全长从 445 bp 增至 495 bp 时,缺氧时下游 Luciferase 蛋白表达量有 14 倍的增加,从 495 bp 增至 545 bp 时,缺氧时下游 Luciferase 蛋白表达量仅为 RTP801 启动子为 445 bp 时下游 Luciferase 蛋白表达量的 6 倍,缺氧时 RTP801 启动子取全长 2700 bp 时表达量为 445 bp 时的 12 倍<sup>[11]</sup>,提示 RTP801 启动子的 445 bp~495 bp 片段可能为缺氧反应性核心序列<sup>[11]</sup>,但迄今未见将该片段试用于真核表达载体以增强目的基因表达的报道。我们根据其 EPO 核心增强子和 eNOS 核心增强子的比对以及 PCR 的可行性,克隆了 337 bp~511 bp 片段作为增强子,成功构建了真核质粒 pIRES/RTP801HRE/Ig $\kappa$ -VEGF-165/IRES/Ig $\kappa$ -FGF-2。并以 Western blot 和 ELISA 验证了该载体在缺氧条件下表达明显增强的效果。由于 VEGF-165 和 FGF-2 均为分泌性蛋白且载体中其 cDNA 前端连有分泌蛋白分泌引导信号 Ig $\kappa$ -chain leader 的 DNA 片段,其表达后大部分出胞,故 Western blot 检测其胞内含量时,pEVF 缺氧转染组 VEGF-165 和 FGF-2 的蛋白表达虽然较其它各组有一定增加但并不十分显著。在 ELISA 检测 VEGF-165 和 FGF-2 胞外表达,则明显观察到 pEVF 缺氧转染组高于其它各组的蛋白表达,从而验证了我们获取的 RTP801 缺氧反应性核心序列在缺氧下的增强作用和其与 CMV 启动子之间的良好的匹配性。本文获

取了原本 2700 bp 的 RTP801 缺氧启动子中推断的缺氧反应性核心序列并首次将其与巨细胞病毒启动子联用,启动了 pIRES 载体上两种主要的血管生成因子 VEGF-165 和 FGF-2 的高效共表达,为研制高效针对缺血性疾病的基因治疗载体打下了基础。

### [参考文献]

- [1] Robinson CJ, Stringer SE. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptor [J]. *J Cell Sci*, 2001, **114** (5): 853-865.
- [2] Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen [J]. *Science*, 1989, **246** (4953): 1306-309.
- [3] El-Gendi H, Violaris AG, Foale R, Sharma HS, Sheridan DJ. Endogenous, local vascular endothelial growth factor production in patients with chronic total coronary occlusions: further evidence for its role in angiogenesis [J]. *Heart*, 2002, **87** (2): 158-159.
- [4] Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K, et al. Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia [J]. *Circulation*, 1998, **97** (12): 1114-123.
- [5] Gospodarowicz D. Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth [J]. *Nature*, 1974, **249** (453): 123-129.
- [6] Miyatake M, Ishikawa K, Katori R. Basic fibroblast growth factor increased regional myocardial blood flow and limited infarct size of acutely infarcted myocardium in dogs [J]. *Angiology*, 1998, **49** (5): 381-390.
- [7] Udelson JE, Dilsizian V, Laham RJ, Chronos N, Vansant J, Blais M, et al. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor 2 improves stress and rest myocardial perfusion abnormalities in patients with symptomatic chronic coronary artery disease [J]. *Circulation*, 2000, **102** (14): 1605-610.
- [8] Shoshani T, Faerman A, Mett I, Zelin E, Tenne T, Gorodin S, et al. Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, **22** (7): 2283-293.
- [9] Lin L, Qian Y, Shi X, Chen Y. Induction of a cell stress response gene RTP801 by DNA damaging agent methyl methanesulfonate through CCAAT/enhancer binding protein [J]. *Biochemistry*, 2005, **44** (10): 3909-914.
- [10] Lee M, Lee ES, Kim YS, Choi BH, Park HS, Park HC, et al. Ischemic injury-specific gene expression in the rat spinal cord injury model using hypoxia-inducible system [J]. *Spine*, 2005, **30** (24): 2729-734.
- [11] Lee M, Bikram M, Oh S, Bull DA, Kim SW. Sp1-dependent regulation of the RTP801 promoter and its application to hypoxia-inducible VEGF plasmid for ischemic disease [J]. *Pharmac Res*, 2004, **21** (5): 736-741.
- [12] Lee M, Rentz J, Bikram M, Han S, Bull DA, Kim SW. Hypoxia-inducible VEGF gene delivery to ischemic myocardium using water-soluble lipopolymer [J]. *Gene Therapy*, 2003, **10** (18): 1535-542.
- [13] Coulet F, Nadaud S, Agrapart M, Soubrier F. Identification of hypoxia response element in the human endothelial nitric oxide synthase gene promoter [J]. *J Biol Chem*, 2003, **278** (47): 46230-240.
- [14] Malecki M, Przybyszewska M, Janik P. Construction of a bicistronic proangiogenic expression vector and its application in experimental angiogenesis in vivo [J]. *Acta Biochim Polon*, 2003, **50** (3): 875-882.

(此文编辑 文玉珊)