

· 论 著 ·

腺病毒介导的血管内皮生长因子体外靶向性转染心肌细胞

张裕东¹, 张宝仁^{1*}, 梅 举^{1*}, 陈兰英², 刘 红², 黄盛东¹, 钱其军³, 吴红平³, 李林芳³, 肖海波¹, 王晓伟¹

(1 第二军医大学长海医院胸心外科, 上海 200433; 2 中国医学科学院心血管病研究所, 北京 100037; 3 东方肝胆外科医院病毒基因治疗实验室, 上海 200438)

[摘要] 目的: 构建以鼠心肌轻链蛋白基因(m lc-2v)为启动子、携带人血管内皮生长因子 hV EGF₁₆₅ 基因的重组腺病毒载体, 检测该重组腺病毒载体对心肌细胞转染的靶向性。方法: 酶切腺病毒载体 PDC315 自身启动子 CMV, 构建腺病毒载体 PDC317, 分别接入 hV EGF₁₆₅、m lc-2v 基因, 构建腺病毒载体 PDC γ m lc-hV EGF₁₆₅。鉴定正确后, 将 PDC γ m lc-hV EGF₁₆₅ 与 Lipofectamine 共转染至 293 细胞, 经同源重组获得以 m lc-2v 为启动子、携带 hV EGF₁₆₅ 基因的重组腺病毒 A d γ m lc-hV EGF₁₆₅, 同步构建无靶向性的重组腺病毒 A d-hV EGF₁₆₅。扩增并测定滴度后, A d-hV EGF₁₆₅、A d γ m lc-hV EGF₁₆₅ 分别转染体外培养的心肌细胞、骨骼肌细胞及平滑肌细胞, 利用 ELISA、Western 印迹分析等方法检测 A d γ m lc-hV EGF₁₆₅ 转染心肌细胞的靶向性。结果: 构建的病毒正确, 病毒滴度为 2.8×10^9 pfu/ml。转染 3 d 后, A d-hV EGF₁₆₅ 组在各培养细胞的上清液及细胞内均检测到 VEGF 的表达, 而 A d γ m lc-hV EGF₁₆₅ 组仅在心肌细胞中有 VEGF 的表达, 且 A d γ m lc-hV EGF₁₆₅ 组心肌细胞分泌的 VEGF 要少于 A d-hV EGF₁₆₅ 组。结论: 成功构建了以 m lc-2v 为启动子、携带人 VEGF 基因的重组腺病毒 A d γ m lc-hV EGF₁₆₅; 该重组载体能体外靶向性转染心肌细胞并使之表达 VEGF。

[关键词] 血管内皮生长因子; 心肌轻链蛋白启动子; 转染; 腺病毒; 心肌细胞

[中图分类号] R 542.205 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X (2004)07-0759-04

Adenovirus-mediated vascular endothelial growth factor transfecting cardiomyocyte in vitro

ZHANG Yu-Dong¹, ZHANG Bao-Ren^{1*}, MEI Ju^{1*}, CHEN Lan-Ying², LIU Hong², HUANG Sheng-Dong¹, QIAN Qi-Jun³, WU Hong-Ping³, LI Lin-Fang³, XIAO Hai-Bo¹, WANG Xiao-Wei¹ (1 Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2 Cardiac Institute, Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100037; 3 Department of Virus and Gene Therapy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Shanghai 200438)

[ABSTRACT] **Objective:** To construct a recombinant adenovirus vector harboring hV EGF₁₆₅ cDNA under the control of ventricle-specific myosin light chain-2 (m lc-2v) promoter and to detect whether it can specifically transfect cardiomyocyte *in vitro*. **Methods:** PDC317 was built by removing the native promoter CMV of PDC315. Human vascular endothelial growth factor (hV EGF₁₆₅) cDNA and m lc-2v were cloned into adenovirus shuttle vector PDC317 by standard procedure, and the product was identified and transferred to the adenoviral packaging cell HEK 293 cells mediated by lipofectamine. The desired Ad vectors were purified by density gradient ultracentrifuge and titrated in 293 cells after identified. The neonatal rat cardiomyocytes, skeletal muscle cells and smooth muscle cells were transfected with A d γ m lc-hV EGF₁₆₅ and A d-hV EGF₁₆₅ *in vitro*, respectively. The expression of VEGF₁₆₅ proteins was assessed by ELISA and Western blot. **Results:** The segment length of PDC γ m lc-VEGF and the correct clones containing target gene in right direction was identical. The titer of adenovirus reached 2.8×10^9 pfu/ml after density gradient ultracentrifuge. ELISA and Western blot showed that all the 3 cells secreted VEGF protein in A d-hV EGF₁₆₅ group, and only cardiomyocyte secreted VEGF₁₆₅ proteins in A d γ m lc-hV EGF₁₆₅ group. VEGF secretion in A d γ m lc-hV EGF₁₆₅ group was less than that in A d-hV EGF₁₆₅ group. **Conclusion:** The recombinant adenoviral vector A d γ m lc-hV EGF₁₆₅ has been successfully established, which can make the neonate cardiomyocyte secrete VEGF₁₆₅ *in vitro*, providing a promising tool for gene targeting therapy of myocardial ischemia.

[KEY WORDS] vascular endothelial growth factor; m lc-2v; transfection; adenovirus; myocardial cell

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(7): 759-762]

〔1〕 近 10 年缺血性心脏病的基因治疗研究显示, 对于大多数冠状动脉末梢广泛病变、终末期心衰的患者, 基因治疗在缓解心绞痛症状、提高运动耐力、改善缺血心肌的灌注等方面具有良好前景, 目前国内外已有应用于小规模人群临床试验的报道^{〔1~4〕}。

但基因治疗的靶向性是值得密切关注的问题之一。本研究以人 VEGF₁₆₅ 基因为目的基因, 构建以鼠心

〔基金项目〕 国家自然科学基金(39970735)。

〔作者简介〕 张裕东(1969-), 男(汉族), 博士生, 讲师, 主治医师

* Corresponding author. E-mail: mdzhangyd@sohu.com

肌轻链蛋白基因 (m lc-2v) 为启动子、携带人 VEGF₁₆₅ 基因的重组腺病毒载体, 体外分别转染心肌细胞、骨骼肌细胞及平滑肌细胞, 检测该重组腺病毒载体对心肌细胞转染的靶向性, 为缺血性心脏病的靶向性基因治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器 *Not* I、*Xho* I、*Eco*R I 为 Gibco BRL 公司产品, *Taq* 酶购自 MBI 公司, T₄ DNA 连接酶、蛋白酶 K、RNA 酶购自 Promega 公司, 胶回收试剂盒、PCR 产物回收试剂盒、病毒 DNA 提取试剂盒、Lipofectamine 2000 试剂盒均为 Gibco BRL 公司产品, DMEM、MDM 培养基购自 Sigma 公司, 胎牛血清购自 Gibco BRL 公司, ELISA 试剂盒、小鼠抗人 VEGF₁₆₅ 单抗、羊抗小鼠单抗及细胞裂解液等购自 R&D 公司。

1.2 质粒、菌株和细胞系 质粒 pSOVA-m lc-2v 由阜外医院生化室保存, 质粒 pDNA 3-VEGF₁₆₅ (H) 由上海市第一人民医院检验中心王倩教授惠赠; 人胚肾 293 细胞购自加拿大 Microbix Biosystems 公司。

1.3 Ad-m lc-hV EGF₁₆₅ 的构建 酶切腺病毒载体 PDC315 自身 CMV 启动子, 得到 3 419 bp 大小的 PDC317 载体片段; 酶切质粒 pDNA 3-VEGF 后回收 610 bp 大小的 VEGF DNA 片段。连接上述片段, 产物转化感受态 DH5 α 大肠杆菌, 铺琼脂板 (含 AMP), 37°C 生化培养箱内培养 12 h。挑取生长的细菌单克隆, 扩增。PCR 法筛选阳性克隆, 抽提阳性克隆的质粒 DNA, 酶切鉴定正确后命名为 PDC-VEGF。酶切 PDC-VEGF 及 m lc-2v, 产物 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 回收 PDC-VEGF 4 002 bp 片段及 m lc-2v 250 bp 片段, 连接得到腺病毒载体 PDC-m lc-2v-VEGF。酶切鉴定正确后与 Lipofectamine 2000 和 5 含有型腺病毒骨架载体, 共转染至 293 细胞, 得到腺病毒 Ad-m lc-hV EGF₁₆₅, PCR 鉴定 (VEGF 引物: 检测目的基因是否已经装入; VT001/VT002 引物: 鉴别 E1B 包装信号区的改造是否成功及有无野生型腺病毒; VT215/VT216 引物: 鉴别包含 VEGF 序列的片段是否已克隆入非增殖型腺病毒及有无野生型腺病毒)。

1.4 Ad-m lc-hV EGF₁₆₅ 的扩增、纯化及滴度测定 取重组腺病毒上清 500 μ l, 加至 90% 融合的 293 细胞中, 37°C、5% CO₂ 孵育箱中培养。镜下观察到 95%~98% 细胞出现病变效应后, 收集细胞, 反复冻融 3 次, 离心, 收集上清, 氯化铯梯度离心纯化病毒, 应用

50% 组织培养感染剂量法 (TCID₅₀) 测定病毒滴度。

1.5 腺病毒 Ad-hV EGF₁₆₅ 的构建 参见文献[5]。

1.6 乳鼠心肌细胞、平滑肌细胞及骨骼肌细胞的培养 取新生 3 d 以内的 SD 乳鼠, 按照文献[6]方法进行心肌细胞、骨骼肌细胞、平滑肌细胞的培养, 待细胞生长至 80% 融合时用于实验。

1.7 实验分组及病毒的转染 实验分为 Ad-m lc-hV EGF₁₆₅ 组、Ad-hV EGF₁₆₅ 组及对照组, 每组设 6 复孔; 吸除各组细胞的培养液, 0.1 mol/L PBS 清洗 2 次后按 MOI = 1 : 20 加入 Ad-hV EGF₁₆₅ 或 Ad-m lc-hV EGF₁₆₅, 对照组加入 0.1 mol/L PBS。感染 1 h 后, 吸除各组细胞的上清液, PBS 清洗 2 次, 加入含血清的 DMEM, 继续培养。

1.8 VEGF 表达的检测 病毒感染后 3 d 吸取各组上清液 100 μ l, 使用 ELISA 试剂盒检测上清液中 VEGF; 吸除培养液, 4°C PBS 清洗 3 次后, 加入细胞裂解液, 辅以细胞刮刀以利于细胞分离, 收集裂解液, 4°C 下离心 6 min, 吸取上清, 应用 Western 印迹分析测定裂解液中蛋白的含量。

1.9 统计学处理 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析。

2 结果

2.1 pDC-m lc-VEGF 酶切结果鉴定 腺病毒载体 PDC-m lc-VEGF 经 *Eco*R I + *Hind* III、*Bam*H I、*Xba* I + *Sal* I 酶切, 分别为 4 019 bp + 250 bp、3 689 bp + 610 bp、3 359 bp + 930 bp (图 1)。琼脂糖凝胶电泳证明目的基因插入位置正确, 载体构建成功。

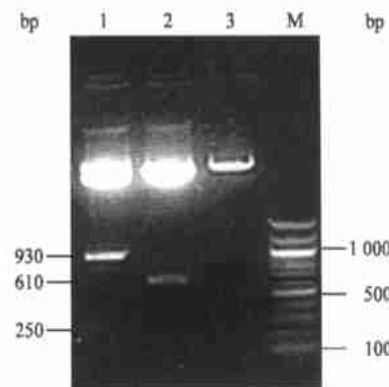


图 1 PDC-m lc-VEGF 载体酶切鉴定

Fig 1 Identification of PDC-m lc-VEGF digested by restriction enzymes

1: PDC317/*Eco*R I + *Hind* III; 2: VEGF gene/*Bam*H I;
3: m lc-2v gene/*Xba* I + *Sal* I; M: 100 bp marker

2.2 重组病毒 Ad-m lc-hV EGF₁₆₅ 的 PCR 鉴定 鉴

定结果表明 V T001/V T002 只能扩增出 PXC1 为 830 bp, V T215/V T216 能扩增出 VEGF 目的基因为 421 bp。表明 A d m l c-hV EGF₁₆₅ 克隆入相应的目的基因, 且没有野生型腺病毒混杂(图 2)。

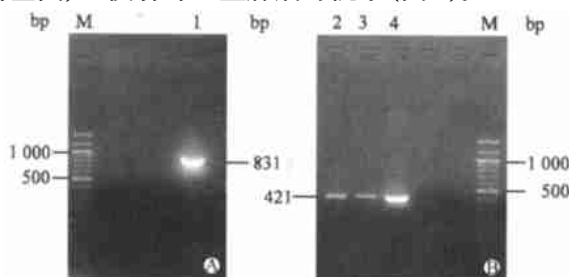


图2 重组病毒Ad-m lc-hVEGF₁₆₅的PCR鉴定

Fig 2 PCR results of recombinant Ad-m lc-hVEGF₁₆₅

A: Adenovirus correctly built without wild adenovirus;

B: VEGF gene was cloned into adenovirus without wild adenovirus; M: 100 bp DNA ladder; 1: PXC1;

2, 3: VEGF was cloned into adenovirus; 4: pcDNA3 VEGF

2.3 A d m l c-hV EGF₁₆₅ 的扩增及滴度鉴定 A d-hV EGF₁₆₅ 经扩增后, 测得病毒滴度为 2.8×10^9 pfu/ml。

2.4 ELISA 检测培养心肌细胞上清液中 VEGF 含量 于 490 nm 处测得光密度 D 值, 根据阳性对照孔的 D₄₉₀ 值和相应的标准品浓度求出回归方程: $y = 0.266 \ln x - 0.5719$, 式中 x 为 VEGF 标准品浓度, y 为 D₄₉₀ 值 ($r = 0.266, P < 0.01$)。根据回归方程计算相应 VEGF 的浓度。在 A d-V EGF 组, 心肌细胞、骨骼肌细胞和平滑肌细胞分泌的 VEGF 分别为 (387.6 ± 2.5) 、 (315.7 ± 1.3) 和 (276.5 ± 0.8) pg/ml; 而在 A d m l c-hV EGF₁₆₅ 组仅有心肌细胞有 VEGF 的分泌 (19.8 ± 0.3) pg/ml, 且 VEGF 浓度较 A d-V EGF 组低, 在平滑肌细胞、骨骼肌细胞及 PBS 对照组各细胞的培养上清中仅能检测到微量的 VEGF, 与 PBS 对照组无统计学差异。

2.5 Western 印迹检测 病毒感染后第 3 天, 抽取细胞总蛋白进行 Western 分析, 结果表明 VEGF₁₆₅ 可产生并且是可分泌性的, 转染后第 3 天即可检测到 VEGF₁₆₅ 的表达, PBS 对照组阴性(图 3)。

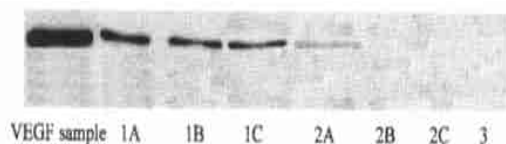


图3 Western 印迹检测结果

Fig 3 Western blot results of VEGF

1A-1C: A d-V EGF; 2A-2C: A d m l c-hV EGF₁₆₅;

3: Control; 1A, 2A: Cardiomyocyte;

1B, 2B: Skeletal muscle cell; C: Smooth muscle cell

3 讨论

将目的基因特异地导入靶细胞(即基因转染的靶向性)是利用组织特异性的基因启动子限制目的基因只在靶细胞内表达。心肌 m l c-2v 启动子能够靶向性表达于心肌细胞, 无论是在心肌细胞形成过程中还是在出生后的心肌中, 在 m l c-2v 启动子的作用下均可产生目的基因的靶向性表达^[7]。

启动子 m l c-2v 基因序列全长有 1 700 bp, 而真正有活性的部分为 250 bp。本实验选取 250 bp 的启动子, 以避免因重组腺病毒的复杂操作所引起的不稳定性^[8~10]。在本研究中, 我们将同步构建的 A d-hV EGF₁₆₅ 与 A d m l c-hV EGF₁₆₅ 同时转染心肌细胞、平滑肌细胞及骨骼肌细胞, 结果显示在 A d-hV EGF₁₆₅ 组每种细胞均有 VEGF 的表达, 而在 A d m l c-hV EGF₁₆₅ 组仅心肌细胞有 VEGF 的表达。证明 250 bp 的启动子确实能使目的基因靶向表达于心肌细胞内。VEGF 对促心肌血管增生具有确切的作用^[11], 因此本研究选择 VEGF 为目的基因。转染心肌细胞后 A d m l c-hV EGF₁₆₅ 组分泌的 VEGF 要明显少于 A d-hV EGF₁₆₅ 组, 可能与组织特异性启动子的控制会导致目的基因表达能力的下降有关^[12]。W ijelath 等^[13]发现, 在 VEGF 基因的特定区域连接一个纤维连接蛋白因子的基因片段即可明显提高 VEGF 的活性。因此如何提高基因的表达及表达产物的活性仍是目前研究的热点。

[参考文献]

- [1] Losordo DW, Vale PR, Symes J, et al. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF₁₆₅ as sole therapy for myocardial ischemia[J]. *Circulation*, 1998, 98(25): 2800-2804
- [2] Symes JF, Losordo DW, Vale PR, et al. Gene therapy with vascular endothelial growth factor for inoperable coronary artery disease[J]. *Ann Thorac Surg*, 1999, 68(3): 830-836
- [3] Vale PR, Losordo DW, Milliken CE, et al. Left ventricular electromechanical mapping to assess efficacy of phVEGF₁₆₅ gene transfer for therapeutic angiogenesis in chronic myocardial ischemia[J]. *Circulation*, 2000, 102(9): 965-974
- [4] 陈良万, 廖崇先, 陈道中, 等. 血管内皮生长因子基因疗法诱导缺血心肌血管生成(9例报告)[J]. *福建医科大学学报*, 2001, 35(2): 157-159
- [5] Chen LW, Liao CX, Chen DZ, et al. Gene therapy with vascular endothelial growth factor for angiogenesis in coronary artery disease (report of 9 cases)[J]. *Fujian Yike Daxue Xuebao (J Fujian Med Univ)*, 2001, 35(2): 157-159
- [5] 张裕东, 张宝仁, 黄盛东, 等. 腺病毒介导的血管内皮生长因子体外转染心肌细胞的研究[J]. *第二军医大学学报*, 2004, 25

- (5): 485-488
- Zhang YD, Zhang BR, Huang SD, *et al* Adenovirus-mediated vascular endothelial growth factor transfecting cardiomyocyte in vitro [J]. *Di-er Junyi Daxue Xuebao (Acad J Sec Mil Med Univ)*, 2004, 25(5): 485-488
- [6] 司徒镇强, 吴军正 主编 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版社, 1996 107-109
- [7] Henderson SA, Spencer M, Sen A, *et al* Structure, organization, and expression of the rat cardiac myosin light chain-2 gene Identification of a 250-bp pair fragment which confers cardiac-specific expression [J]. *J Biol Chem*, 1989, 264(30): 18142-18148
- [8] Lee KJ, Hickey R, Zhu H, *et al* Positive regulatory elements (HF-1a and HF-1b) and a novel negative regulatory element (HF-3) mediate ventricular muscle-specific expression of myosin light-chain 2-luciferase fusion genes in transgenic mice [J]. *Mol Cell Biol*, 1994, 14(2): 1220-1229
- [9] Griscelli F, Gilardi-Hobenstreit P, Hanania N, *et al* Heart-specific targeting of beta-galactosidase by the ventricle-specific cardiac myosin light chain 2 promoter using adenovirus vectors [J]. *Hum Gene Ther*, 1998, 9(13): 1919-1928
- [10] Franz WM, Rothmann T, Frey N, *et al* Analysis of tissue-specific gene delivery by recombinant adenoviruses containing cardiac-specific promoters [J]. *Cardiovasc Res*, 1997, 35(3): 560-566
- [11] Cammelliet P. VEGF gene therapy: stimulating angiogenesis or angioma-genesis [J]? *Nat Med*, 2000, 6(10): 1102-1103
- [12] Phillips M I, Tang Y, Schmidt-Ott K, *et al* Vigilant vector: heart-specific promoter in an adenovirus-associated virus vector for cardioprotection [J]. *Hypertension*, 2002, 39(2 part 2): 651-655
- [13] Wijelath ES, Murray J, Rahman S, *et al* Novel vascular endothelial growth factor binding domains of fibronectin enhance vascular endothelial growth factor biological activity [J]. *Circ Res*, 2002, 91(1): 25-31
- [收稿日期] 2004-02-06 [修回日期] 2004-05-24
- [本文编辑] 曹 静

· 研究简报 ·

错𪚩畸形患者 Hawley 上𪚩保持器配戴时间与复发的关系

Relationship between treatment time with Hawley retainer and relapse in malocclusion patients

尚艳丽¹, 李凤华¹, 王 芳² (1 山东省济宁口腔医院正畸科, 济宁 272045; 2 牙体牙髓科)

[关键词] 错𪚩畸形; Hawley 保持器; 复发

[中图分类号] R 783.6

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X (2004) 07-0762-01

错𪚩畸形患者正畸治疗结束后, 由于基骨的生长、神经肌肉动力平衡的改建未完成, 牙周膜纤维张力未恢复平衡, 𪚩的平衡尚未建立, 口腔不良习惯未破除等原因, 使矫治后的结果达到绝对稳定是不可能的, 临床上必须采用各种措施防止复发^[1]。本研究旨在观察保持器配戴时间长短对上𪚩牙弓稳定性的影响, 以期减少复发, 达到更加稳定的疗效。

1 材料和方法

随机抽取安氏 I 类和安氏 II 类错𪚩畸形患者 62 例, 均有上𪚩前部拥挤或牙齿接触不良。所有患者均用直丝弓矫治器矫治, 在保持阶段做 Hawley 保持器。分为 2 组, A 组 30 例, 年龄 12 岁~16 岁 8 岁, 平均 14 岁 2 岁; 男 18 例, 女 12 例; 上𪚩用 Hawley 保持器保持 6 个月, 3 个月全天, 3 个月晚间戴用, 14 例拔牙, 16 例未拔牙。B 组 32 例, 年龄 12 岁~17 岁, 平均 14 岁 6 岁; 男 15 例, 女 17 例, 上𪚩用 Hawley 保持器保持 12 个月, 6 个月全天, 6 个月晚间戴用, 17 人拔牙, 15 人未拔牙。两组患者性别、年龄、拔牙患者数均具有可比性。分别在治疗前、治疗结束开始配戴保持器时、保持结束时、保持结束后 3 个月取上𪚩牙弓模型, 用数字两脚规测量。测量内容包括: (1) 切牙不整齐指数^[2], 即前牙区从一个解剖接触点到相邻近的接触点连线的长度之和, 共有 5 个线段, 可说明

牙齿唇舌向的错位。(2) 尖牙间宽度, 即左右尖牙牙尖之间的距离。(3) 磨牙间宽度, 即左右第一恒磨牙远中舌尖之间的距离。(4) 牙弓长度, 即中切牙切缘近中接触点到左右第一恒磨牙远中边缘嵴连线的垂直距离。研究模型由同一个有经验的医师测量, 隔 2 周后再次进行测量, 共测量 3 次, 以保证测量值的一致性。对两组间不同时期的测量值进行 *t* 检验。

2 结果

两组患者矫治前各项指标基本持平, 无显著差异。两组的不整齐指数在矫治后开始配戴保持器时均明显降低 ($P < 0.01$); 保持结束后 3 个月有所上升 ($P < 0.05$) 但仍显著低于矫治前 ($P < 0.01$), 配戴 1 年组比配戴 6 个月组上升程度较小, 但无统计学差异 ($P = 0.06$), 两组的复发量 (保持结束后 3 个月的不整齐指数-保持结束时的不整齐指数) 亦无统计学差异, 可能与本研究中样本量较小有关。保持 6 个月组有 11 例患者 (36.7%) 复发量 $> 3\text{mm}$ ($< 3\text{mm}$ 在临床上是可接受的范围), 其中 8 例拔牙病例, 3 例不拔牙病例。保持 1 年组 2 例患者 (6.8%) 复发量 $> 3\text{mm}$, 其中 1 例拔牙病例, 1 例不 (下转第 765 页)

[作者简介] 尚艳丽 (1974-), 女 (汉族), 医师