

人碱性成纤维细胞生长因子腺病毒表达载体的构建及其在人脐静脉内皮细胞中的表达

郭伶俐¹, 邢新^{1*}, 刘刊², 韩妲丽¹

(1. 第二军医大学长海医院整形外科, 上海 200433; 2. 第二军医大学海军医学系潜水医学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 构建人碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast cell growth factor, bFGF)腺病毒载体, 并观察其在体外血管内皮细胞中的表达。**方法:** 采用同源重组的方法, 构建重组腺病毒 Ad5-bFGF。携有绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)的 Ad5 腺病毒转染人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC), 检测最佳转染复数。Ad5-bFGF 体外转染 HUVEC, 免疫细胞化学法、Western 印迹法检测 bFGF 蛋白的表达。**结果:** Ad5 转染 HUVEC 的最佳转染复数为 200, 转染率为 90%。免疫细胞化学法和 Western 印迹结果显示 bFGF 基因以 Ad5 为载体可以在 HUVEC 的胞质和胞核表达, 并且表达量较未转染的 HUVEC 明显增加。**结论:** 成功构建了携带 bFGF 基因的腺病毒载体, 体外可以成功表达, 为 bFGF 基因治疗及肿瘤发病机制的研究奠定了基础。

[关键词] 成纤维细胞生长因子 2; 腺病毒科; 基因表达; 脐静脉; 内皮, 血管

[中图分类号] Q 78 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)04-0408-04

Construction of basic fibroblast growth factor adenovirus vector and its expression in human umbilical vein endothelial cells

GUO Ling-li¹, XING Xin^{1*}, LIU Kan², HAN Da-li¹ (1. Department of Plastic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Diving Medicine, Faculty of Navy Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

[ABSTRACT] **Objective:** To construct an adenovirus vector harboring human basic fibroblast growth factor (bFGF) cDNA and investigate the expression of bFGF in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) *in vitro*. **Methods:** The adenovirus expression vector Ad5-bFGF was constructed by homologous recombination technique. The best value of MOI was tested by transfecting human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) with Ad5-GFP. Ad5-bFGF was used to transfect HUVEC at the obtained value of MOI and the expression of bFGF protein was detected by immunocytochemistry method and Western blotting. **Results:** The best value of MOI for adenovirus 5 to transfect HUVEC was 200 and the transfection rate was 90%. Immunocytochemistry method and Western blotting showed that bFGF was expressed in HUVEC after transfection with Ad5-bFGF and the expression was significantly higher than that in untransfected HUVEC ($P < 0.05$). **Conclusion:** We have successfully constructed a recombinant adenovirus vector Ad5-bFGF which can be expressed *in vitro* in HUVEC, paving a way for application of bFGF in gene therapy and study of tumorigenesis.

[KEY WORDS] basic fibroblast growth factor 2; adenoviridae; gene expression; umbilical veins; endothelium, vascular

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(4): 408-411]

在正常成人, 血管内皮细胞相对于体内其他细胞增生速度慢, 属于静止期细胞, 生理情况下血管生成过程只见于女性生殖系统和创伤愈合过程, 而且这种血管生成是受体内各种因素严格调控的。过度、无序的血管增生见于肿瘤血管形成和血管增生性疾病, 包括 Kaposi 肉瘤、婴幼儿血管瘤、血管内皮瘤等。在体内和体外一些细胞因子可刺激血管内皮细胞增生, 而碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast cell growth factor, bFGF)是其中的一个重要因子。bFGF 又称 FGF-2, 是 FGF 家族中的重要成员, 具有多种生物学功能, 如诱导细胞增生、蛋白酶合成, 体外发挥内皮细胞趋化作用等。

在血管生成、创伤愈合和肿瘤病理等领域关于

bFGF 的研究越来越多。在众多的研究方法中, 基因工程方法引起了学者们浓厚兴趣, 并在基础研究和临床应用上都取得一定成绩。但以往多采用逆转录病毒^[1]或质粒^[2]作为目的基因的载体, 转染操作复杂, 宿主细胞要求高, 而且转染效率低, 为寻求安全、高效、宿主细胞广泛的转染方法, 本实验构建了 bFGF 基因腺病毒载体, 并在体外成功转染血管内皮细胞。

1 材料和方法

1.1 材料 人血清 5 型腺病毒(Ad5)、腺病毒载体

[作者简介] 郭伶俐, 博士生. E-mail: guo-linlidirector@163.com

* Corresponding author. E-mail: XingXin56@yahoo.com.cn

pDC316、载体 pUC19 及 Ad5-GFP 由第二军医大学东方肝胆外科医院病毒与基因治疗研究室提供; pcDNA3.1/MYC-HIS(-)-bFGF 由本室保存; Lipofectamine 2000 试剂盒购于 Gibco BRL 公司; QIAamp DNA Blood Mini Kit 购于 Qiagen 公司; *Nhe*I、*Eco*RI、*Xba*I、*Hind*III 购于 NEB 公司; *Taq* 酶购于申能博彩公司; DNA 连接酶 Solution I 购于 TaKaRa 公司; PCR 产物回收试剂盒、质粒 DNA 制备试剂盒和病毒 DNA 提取试剂盒购于 Qiagen 公司; 293 细胞株购于加拿大 Microbix Biosystems 公司; 人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)株、M200 购于 Cascade 公司。bFGF 抗体购于 Santa Cruz 公司(抗体稀释度为 1:200), ABC 试剂盒购于华美生物工程公司。

1.2 重组腺病毒的制备

1.2.1 pDC316-bFGF 载体的制备 用 *Xba*I 和 *Hind*III 酶切 pUC19 载体获得 pUC19 片段, 用 *Nhe*I 和 *Hind*III 酶切质粒 pcDNA3.1/MYC-HIS(-)-bFGF, 获得 bFGF 碱基序列, Solution I 连接 bFGF 与 pUC19, 将连接产物转化 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞, 铺含氨苄青霉素的琼脂板, 37 $^{\circ}$ C 培养 10~12 h。挑取生长的细菌单克隆, 扩增 12 h。抽提阳性克隆的质粒 DNA, 酶切鉴定正确后命名为 pUC19-bFGF。用 *Eco*RI 和 *Hind*III 分别酶切 pUC19-bFGF 和 pDC316 载体, 16 $^{\circ}$ C 连接 12 h, 将连接产物转化 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞, 铺含氨苄青霉素的琼脂板, 37 $^{\circ}$ C 培养 10~12 h, 挑取生长的细菌单克隆扩增, 抽提阳性克隆的质粒 DNA, 酶切鉴定正确后命名为 pDC316-bFGF。

1.2.2 重组腺病毒 Ad5-bFGF 的制备 将质粒 pDC316-bFGF 与 Ad5 骨架质粒通过 Lipofectamine 2000 共转染至 293 细胞。共转染后 9~14 d 出现病毒空斑, 经过 3 次病毒空斑纯化, 应用 QIAamp DNA Blood Mini Kit 提取腺病毒 DNA, 用 TB 引物做 PCR 鉴定, PCR 扩增方案为: 96 $^{\circ}$ C 5 min; 96 $^{\circ}$ C 30 s, 52 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。鉴定正确的腺病毒命名为 Ad5-bFGF, 即携带 bFGF 基因的重组缺陷型腺病毒。扩增病毒, 测定病毒滴度(TCID₅₀)。

1.3 HUVEC 复苏、传代 HUVEC 的复苏、传代按产品说明书进行: 将冻存的细胞于 37 $^{\circ}$ C 水浴中迅速融化, 取 20 μ l 细胞悬液, 行锥虫蓝染色并计数, 细胞数目为 3.8 \times 10⁵/ml, 按 1:5 分装于 25 cm² 培养瓶中, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱孵育 24~36 h。细胞完全贴壁后, 隔日换液, 待细胞融合至 80% 传代。取第 3 代细胞待转染。

1.4 重组腺病毒最佳转染复数(MOI)的测定 将 HUVEC 接种于 24 孔板, 每孔细胞数为 2 \times 10⁴, 培养 24 h 后, 换无血清培养液, 分别按 MOI 值为 10、50、100、200、300 加入携带绿色荧光蛋白的腺病毒 Ad5-GFP, 转染后的 HUVEC 命名为 GFP-T-HUVEC。每个 MOI 值分别设 3 孔, 同时设立不加病毒的空白对照组, 培养 2 h 后, 吸去病毒液, 加入完全培养基继续培养, 于倒置荧光显微镜下连续观察 3 周, 计数阳性细胞, 并计算百分率。

1.5 重组腺病毒介导的 bFGF 在 HUVEC 中的表达 将 HUVEC 接种于 6 孔板, 每孔细胞数为 1 \times 10⁶ (部分 6 孔板中预置涂明胶的玻片, 做成细胞爬片), 培养 24 h 后, 换无血清培养液, 按最佳 MOI 加入病毒 Ad5-bFGF, 培养 2 h 后, 吸去病毒液, 加入完全培养基继续培养至所需时间, 转染后的 HUVEC 命名为 bFGF-T-HUVEC, 同时设立不加病毒的空白对照组及加腺病毒 Ad5-GFP 的病毒对照组。分别于转染后 2、5、7 d 后进行细胞免疫化学(ABC 法)染色和 Western 印迹法检测。应用电泳凝胶分析系统对 Western 印迹结果进行图像分析, 结果用 SPSS 软件进行统计学分析和处理。

2 结果

2.1 重组腺病毒的制备 pDC316-bFGF 经酶切鉴定正确(图 1), 重组腺病毒 Ad5-bFGF 经 PCR 鉴定正确(图 2), 扩增的病毒滴度为 7.9 \times 10⁹ pfu/ml。

2.2 重组腺病毒载体最佳 MOI 的测定 转染后 2 d 在倒置荧光显微镜下观察, 发现 MOI 为 50 时只有少量细胞表达绿色荧光; MOI 为 100 时, 转染效率为 30%~40%; MOI 值为 200 时, 大量细胞表现为绿色荧光, 病毒转染率可达 80%~90%(图 3A), 与 MOI 为 300 时无明显差别; 培养 3 周后细胞仍有绿色荧光蛋白表达(图 3B), 而未见明显毒性反应。因此可以确定 Ad5 转染 HUVEC 的最佳 MOI 是 200, 转染效率为 90%。

2.3 重组腺病毒介导的 bFGF 在 HUVEC 中的表达 Ad5-bFGF 以 MOI=200 转染 HUVEC, 进行 ABC 法细胞免疫化学检测, 发现正常 HUVEC 和 GFP-T-HUVEC bFGF 表达较少, 而 bFGF-T-HUVEC 胞核呈强阳性染色, 胞质为弱阳性染色(图 4)。

用凝胶成像系统分析 Western 印迹结果, 发现 bFGF-T-HUVEC 组中 bFGF 表达量明显较正常 HUVEC 组和 GFP-T-HUVEC 组高 ($P<0.05$, 图 5)。说明重组腺病毒 Ad5-bFGF 可以介导 bFGF 基因在 HUVEC 中的大量表达。

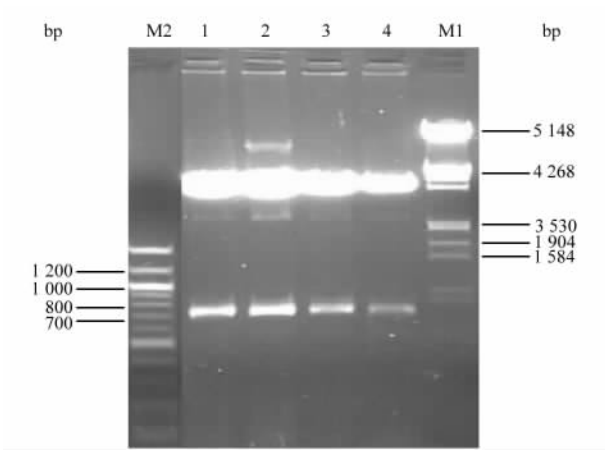


图 1 pDC316-bFGF 质粒酶切鉴定

Fig 1 Identification of pDC316-bFGF plasmid using restrictive enzyme digestion

M1:λ DNA/(EcoR I +Hind III) marker; M2: 100 bp DNA ladder; 1-4:pDC316-bFGF products

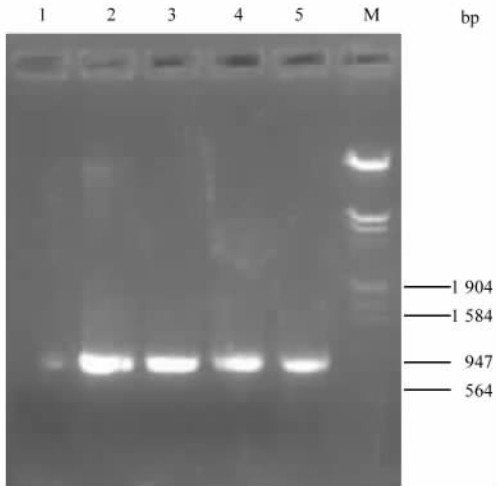


图 2 病毒目的基因 PCR 鉴定

Fig 2 PCR identification of target virus gene

M:λ DNA/(EcoR I +Hind III) marker;1-5: Ad5-bFGF products

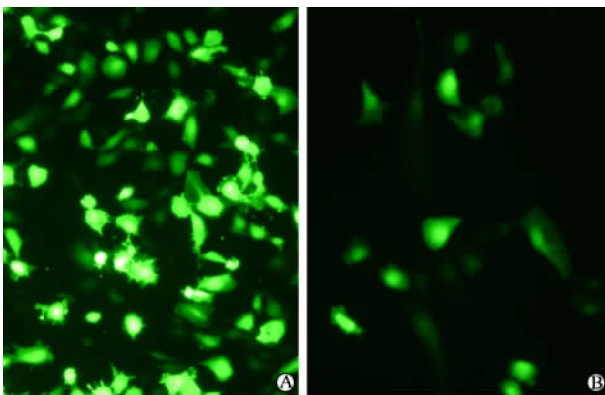


图 3 Ad5-GFP 转染 HUVEC 后表达绿色荧光

Fig 3 GFP expression in HUVEC transfected by Ad5-GFP(×200)

A:When MOI reached 200, 80%-90% HUVEC expressed GFP; B:HUVEC still expressed GFP three weeks after transfection

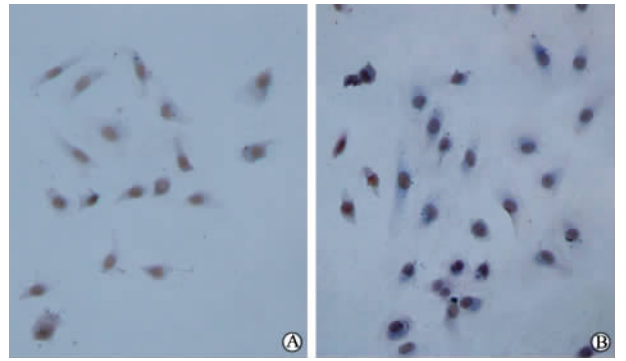


图 4 细胞免疫化学法检测 bFGF 蛋白在 HUVEC 中的表达(ABC 法)

Fig 4 Immunocytochemistry in detection of bFGF protein expression in HUVEC(ABC method, ×100)

A:Normal HUVEC and GFP-T-HUVEC showed negative staining; B: bFGF-T-HUVEC showed a strong signal in the nuclear and weak in the cytoplasm

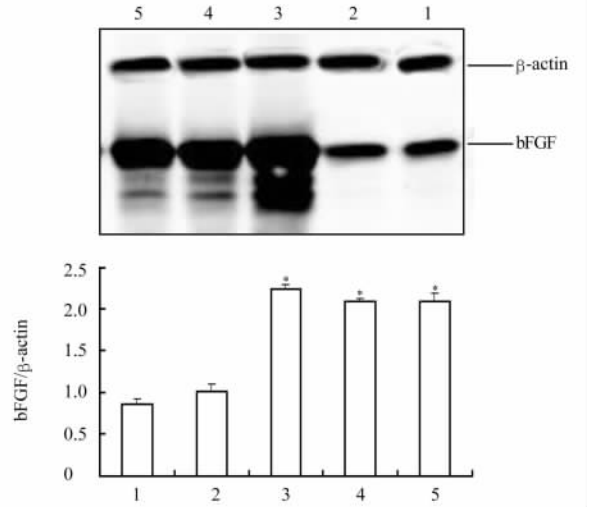


图 5 Western 印迹法检测 bFGF 在 bFGF-T-HUVEC 中的表达

Fig 5 bFGF expression in bFGF-T-HUVEC as determined by Western blotting

1: Normal HUVEC; 2: GFP-T-HUVEC; 3: bFGF-T-HUVEC (2 d after transfection); 4: bFGF-T-HUVEC (5 d after transfection); 5: bFGF-T-HUVEC (7 d after transfection). * P<0.05 vs normal HUVEC

3 讨论

bFGF 表达复杂,在人类至少有 4 种异构体,相对分子质量分别为 24 000、22 500、22 000、18 000。高分子量的异构体位于细胞核,低分子量的分泌型 bFGF 主要位于胞质^[3]。bFGF 是多种细胞的强促有丝分裂因子,它通过自分泌和旁分泌作用刺激细胞增殖、分化和迁移,诱导血管新生;参与多种病理

生理反应,如组织损伤和修复,并且在神经系统、眼睛、骨骼的分化过程中发挥重要作用。国内外研究还发现 bFGF 与增生性血管肿瘤的发生密切相关^[4]。bFGF 还参与其他肿瘤的病理演变过程,如膀胱癌^[5]、胆管癌^[6]、肾癌等^[7]。

bFGF 具有多种生物学功能,广泛应用于临床,如 bFGF 可加速创面修复和组织愈合^[8],并能促进皮瓣的成活^[9],在组织工程实验中,bFGF 可促肌腱细胞增生^[10],还可促进人工软骨组织的形成^[11]。但临床治疗和基础研究中应用 bFGF 也发现了很多问题;bFGF 半衰期很短,与组织的作用时间短,疗效不稳定,价格昂贵而且易引起免疫反应等。

国内外有人应用逆转录病毒^[1]、质粒^[2]等为载体,通过各种方法介导 bFGF 基因在肌细胞、小鼠主动脉内皮细胞中表达。而人血管内皮细胞在正常生理状态下是静止期细胞,在体外培养条件下,对培养条件要求较高,增殖亦不迅速,应用质粒、电穿孔等物理和化学方法转染效率低。腺病毒转染细胞时其 DNA 不整合到宿主细胞染色体中,遗传毒性低,不会干扰其他宿主基因。因此以腺病毒作为基因转染的载体是近几年基因治疗中广泛应用的基因转移方法^[12]。本研究采用同源重组的方法构建了 Ad5-bFGF。先把目的基因 bFGF 装入带有腺病毒基因组同源序列表达载体 pDC316 中,构建了质粒 pDC316-bFGF,再将表达载体 pDC316-bFGF 质粒转染已被增殖缺陷型腺病毒感染的 293 细胞,表达载体 pDC316-bFGF 与腺病毒包装质粒 DNA 进行同源重组,目的基因被转移到腺病毒基因组中,形成一个在 E1 缺陷区插入目的基因的重组腺病毒 Ad5-bFGF,并在 293 细胞中复制,包装成病毒颗粒。经过扩增、纯化,所得重组腺病毒滴度为 7.9×10^9 pfu/ml。

不同类型细胞对腺病毒的感染性不一致,主要由可作用的受体数目决定的。常用 MOI 即每个细胞感染病毒颗粒数来实行感染程度的比较。本研究应用 Ad5-GFP 体外以不同的 MOI 值感染 HUVEC,发现 MOI 值为 200 时,80%~90%的细胞可表达绿色荧光蛋白,与 MOI 为 300 时无明显差别,连续观察 3 周,仍有绿色荧光表达,说明 Ad5 转染 HUVEC 的最佳转染复数是 200,而且外源基因在 HUVEC 内能持续表达较长时间。

Ad-bFGF 以 MOI 为 200 的感染强度转染 HUVEC,转染后 2、5 和 7 d 用细胞免疫化学方法和 Western 印迹方法检测,结果表明 Ad-bFGF 可介导

bFGF 基因在 HUVEC 中过量表达,免疫定位结果发现 HUVEC 胞核为强阳性,胞质为弱阳性,同时未观察到明显的细胞毒性反应,说明所构建的腺病毒载体体外能安全、有效地转染 HUVEC。

本实验结果表明,用同源重组方法可以方便、快捷的制备重组腺病毒,所制备的腺病毒在体外可以安全、高效地转染血管内皮细胞,而且可以持续表达较长时间。本研究结果为 bFGF 基因治疗及包括血管瘤在内肿瘤发病机制的研究奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Liekens S, Neyts J, De Clercq E, et al. Inhibition of fibroblast growth factor-2-induced vascular tumor formation by the acyclic nucleoside phosphonate cidofovir[J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 5057-5064.
- [2] 张启旭,周刚,陆佳韵,等. 碱性成纤维生长因子真核表达载体的构建及表达[J]. *中国修复重建外科*, 2004, 18: 435-450.
- [3] Florkiewicz R Z, Anchin J, Baird A. The inhibition of FGF2 export by cardenolides implies a novel function for the catalytic subunit of Na^+ , K^+ -ATPase[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 544-551.
- [4] Chang J, Most D, Bresnick S, et al. Proliferative hemangiomas: analysis of cytokine gene expression and angiogenesis[J]. *Plast Reconstr Surg*, 1999, 103: 1-9.
- [5] Gravas S, Bosinakou I, Kehayas P, et al. Urinary basic fibroblast growth factor in bladder cancer patients. Histopathological correlation and clinical potential[J]. *Urol Int*, 2004, 73: 173-177.
- [6] Ogasawara S, Yano H, Higaki K, et al. Expression of angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in human biliary tract carcinoma cell lines[J]. *Hepatol Res*, 2001, 20: 97-113.
- [7] Dhanabal M, Wu F, Alvarez E, et al. Correlation of bFGF expression in renal cell cancer with clinical and histopathological features by tissue microarray analysis and measurement of serum levels[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2005, 131: 715-722.
- [8] 程颺,付小兵,盛志勇. 外源性 bFGF 对深 I 度烫伤大鼠创面血管内皮细胞增殖与迁移的影响[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2004, 18: 200.
- [9] Tanaka Y, Sung K C, Fumimoto M, et al. Prefabricated engineered skin flap using an arteriovenous vascular bundle as a vascular carrier in rabbits[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2006, 117: 1860-1875.
- [10] Costa M A, Wu C, Pham B V, et al. Tissue engineering of flexor tendons: optimization of tenocyte proliferation using growth factor supplementation[J]. *Tissue Eng*, 2006, 12: 1937-1943.
- [11] Miot S, Scandiucci D E, Freitas P, et al. Cartilage tissue engineering by expanded goat articular chondrocytes[J]. *J Orthop Res*, 2006, 24: 1078-1085.
- [12] Hardy S, Kitamura M, Harris Stansil T, et al. Construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination[J]. *J Virol*, 1997, 71: 1824-1849.

[收稿日期] 2007-01-05

[修回日期] 2007-03-17

[本文编辑] 孙岩