

• 基础研究 •

大鼠血小板衍生生长因子 C 重组腺病毒载体的构建及在内皮祖细胞中的表达^{*}

李 锋,罗文军[△],唐 博,陈以宽,孙建明,付 健
(重庆医科大学附属第二医院血管外科 400010)

摘要:**目的** 构建含大鼠血小板衍生生长因子 C(PDGF-C)基因的 pAD-EGFP-PDGF-C 的重组腺病毒表达载体,体外转染骨髓源性内皮祖细胞(EPCs)并观察目的基因蛋白及 mRNA 表达情况。**方法** 通过逆转录聚合酶链式反应技术(RT-PCR)法从 pIRES2-EGFP-PDGF-C 真核表达载体中获得 PDGF-C 目的片段,经 BP 重组与 LR 重组插入到 pAD/CMV/V5-DEST,构建 pAD-PDGF-C-IRES2-EGFP 腺病毒载体。酶切及 DNA 测序鉴定后转染 HEK293A 包装、纯化,测定病毒滴度后转染大鼠骨髓源性 EPCs,应用 Real-time qPCR、蛋白免疫印迹法(Western blotting)等方法检测 PDGF-C 蛋白及 mRNA 的表达。**结果** 核酸内切酶消化及 PCR 分析证实 PDGF-C 基因成功插入 pAD/CMV/V5-DEST 腺病毒载体,转染后荧光显微镜下观察可见绿色荧光蛋白表达,转染 48 h 后实时定量酶素聚合反应技术(Real-time qPCR)测定 EPCs 中 PDGF-C 含量明显提高($P<0.05$),Wester blotting 检测证实在 46×10^3 存在特异性条带。**结论** 成功构建了大鼠 PDGF-C 基因的腺病毒表达载体 pAD-EGFP-PDGF-C,体外转染大鼠骨髓源性 EPCs 能高效表达目的基因产物,为后续研究 PDGF-C 基因功能以及进一步开展基因治疗奠定了基础。

关键词:血小板衍生生长因子 C;pAD/CMV/V5-DEST 腺病毒载体;内皮祖细胞;转染
doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.16.016 文献标识码:A 文章编号:1671-8348(2013)16-1837-04

Construction of the rat recombinant adenovirus vector containing platelet-derived growth factor-C and its expression in the endothelial progenitor cells derived from rat bone marrow^{*}

Li Feng ,Luo Wenjun[△] ,Tang Bo ,Chen Yikuan ,Sun Jianming ,Fu Jian
(Department of Vascular Surgery,the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University,Chongqing 400010,China)

Abstract: Objective To construct the recombinant adenovirus vector encoding rat PDGF-C gene and to observe the expression of target gene in endothelial progenitor cells derived from rat bone marrow. **Methods** The gene encoding rat PDGF-C was obtained through RT-PCR from pIRES2-EGFP-PDGF-C. The gene fragment was cloned into pAD/CMV/V5-DEST gateway vector via BP recombination and LR recombination. After confirmed by PCR and DNA sequencing, the adenovirus vector carrying PDGF-C gene was linearized with Pac I enzyme and transfected into HEK293A cells to package recombinant adenovirus particles. The polymerase chain reaction(PCR)was used to detect target gene. The titre of AD-PDGF-C was measured with the aid of enhanced green fluorescent protein(EGFP) expression. EPCs derived from rat bone marrow were obtained by adherent culture. The recombinant adenovirus was transfected into EPCs. The expression of PDGF-C was detected by Real-time qPCR and Western blotting analysis respectively. **Results** The evidence of endonuclease digestion and PCR analysis confirmed that PDGF-C gene was correctly inserted into the pAD/CMV/V5-DEST gateway vector. After transfection, the expression of PDGF-C protein in pAD-PDGF-C was significantly higher than that before transfected EPCs group and that of transfected with AD-GFP. **Conclusion** The recombinant adenovirus vector containing rat PDGF-C was constructed correctly, which can mediate target gene expression in transfected EPCs effectively. This study provides a research basis for constructing genetic transfection tool in follow-up gene therapy study.

Key words:platelet-derived growth factor C;pAD/CMV/V5-DEST vector;endothelial progenitor cells;transfection

血小板衍生生长因子 C(PDGF-C)是由 Li 等^[1]新近发现的 PDGF 家族成员,活化形式为同二聚体 PDGF-CC,受体为 PDGFR- $\alpha\alpha$ 和 PDGFR- $\alpha\beta$,分子结构中除包含高度保守的 PDGF/VEGF 同源结构域外,还含有独特的 CUB 结构域^[2-3]。本研究旨在以复制缺陷型腺病毒 pAD/CMV/V5-DEST 为载体,采用 Gateway 克隆系统的 BP 及 LR 同源重组技术,构建大鼠过表达目的基因 PDGF-C 的腺病毒载体,包装后转染大鼠骨

髓源性内皮祖细胞(EPCs),观察其稳定转染对 PDGF-C 表达的影响,为探讨基因修饰 EPC 治疗肢体缺血性疾病提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、细菌、细胞和实验动物 大鼠 pIRES-EGFP-PDGF-C 真核表达载体由本中心实验室保存;定向克隆中间载

^{*} 基金项目:重庆市卫生局医学科研基金资助项目(2012-2-053)。 作者简介:李锋(1987~),硕士研究生在读,主要从事四肢缺血性疾病的病因与治疗的研究。[△] 通讯作者,Tel:13708308568;E-mail:lf20052001@sina.com。

体 pDONR221 与腺病毒表达载体 pAD/CMV/V5-DEST 购自 Invitrogen 公司;DH5 α 、HEK293A 细胞由重庆医科大学生命科学院提供;雄性 SD 大鼠,由重庆医科大学实验动物中心提供,并符合重庆医科大学实验动物管理委员会制定的实验动物管理要求。

1.1.2 主要试剂及耗材 DNA Marker 购自 Takara 公司;PacI 限制性内切酶购自 Neb 公司;TRIzol 总 RNA 提取试剂盒、病毒载体重组酶、PCR 产物割胶回收试剂盒及 Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司;T4 DNA 连接酶、反转录 Kit 购自 Fermentas 公司;Plasmid 抽提 Kit 及 DNA 抽提 Kit 购自 Axygen 公司;EBM-2Kit 完全培养基购自 Lonza 公司;DiI-ac-LDL 及 FITC-UEA-Lectin 购自 Invitrogen 公司;引物合成和测序由上海生工生物工程公司完成。

1.2 方法

1.2.1 中间载体 pDONR221-IRES2-EGFP-PDGF-C 的构建

根据目的片段序列设计 BP 重组 PCR 引物,上下游引物 5' 端分别添加 ATTB1 和 ATTB2 重组序列,序列如下:PDGF-C-ATTB1;GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT CGC CAC CAT GCT CCT CCT CGG CCT C;EGFP-ATTB2;GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC;以 pIRES2-EGFP-PDGF-C 为模板,行目的片段 PCR 扩增,使目的片段两端分别带上 ATTB1 和 ATTB2 序列,分离 PCR 产物并用 axygen 公司胶回收目的片段。使用 BP 重组系统将 PDGF-C-IRES-EGFP 重组到中间载体 pDONR221 上,并取 5 μ L 重组反应液转化 DH5 α 感受态细胞。

1.2.2 pAD-PDGF-C-IRES-EGFP 重组腺病毒质粒的构建 使用 LR 重组系统将 pDONR221-IRES2-EGFP-PDGF-C 携带的目的片段重组到 pAD/CMV/V5-DEST 腺病毒载体。菌落 PCR 鉴定为阳性的克隆质粒行测序验证。将重组菌液划线培养,挑单克隆接入 50 mL 含氨苄抗性 LB 中培养,37 $^{\circ}$ C 过夜,次日行菌落 PCR,将鉴定阳性克隆接种到 LB 培养基,过夜,次日用 axygen 质粒中抽试剂盒进行质粒抽提,筛选的阳性克隆质粒行测序验证并保存。

1.2.3 重组腺病毒在 HEK293A 中的包装、扩增、纯化 质粒用 PacI 进行线性化后,按照 Lipofectamine 说明,将腺病毒质粒导入 HEK293A 细胞,36~48 h 后观察细胞形态,7 d 后见明显病毒克隆或蚀斑形成,待大量细胞崩解脱落收集病毒液。经反复冻融 3 次裂解细胞后获取病毒粗提液,并经氯化铯密度梯度离心纯化。

1.2.4 病毒液滴度测定 取 -80 $^{\circ}$ C 保存的腺病毒原液,37 $^{\circ}$ C 融化后用 DMEM 以 10^{-1} ~ 10^{-12} 梯度稀释,取 100 μ L 加入 96 孔板与 293A 细胞共培养,连续孵育 10 d,显微镜观察细胞生长情况,记数细胞病变效应(CPE)孔数,用 karber 法计算滴度。

1.2.5 重组腺病毒 pAD-PDGF-C 转染 EPCs 取 3 周龄 SD 大鼠股骨及胫骨髓液,按文献[4]方法分离大鼠骨髓单个核细胞,用 EBM-2Kit 完全培养基培养,并采用 DiI-ac-LDL 及 FITC-UEA-Lectin 双标鉴定。待细胞融合约 80% 时行腺病毒转染,加入目的病毒 pAD-PDGF-C;阴性对照病毒 pAD-EG-

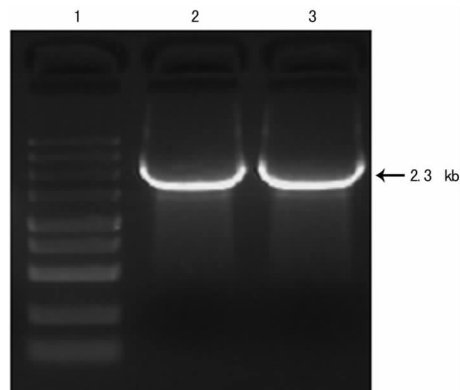
FP。48 h 后观察腺病毒上报告基因 GFP 的表达情况。

1.2.6 转染 EPCs 后目的蛋白的蛋白免疫印迹法(Western blotting)检测 将细胞浓度调整为 1×10^6 ,根据最佳 MOI 值 10,分别用目的基因病毒液及阴性对照空载体病毒液感染 EPCs 细胞,以空细胞作为空白对照。PDGF-C 一抗稀释比为 1:200, β -actin 蛋白抗体稀释比为 1:5 000,二抗稀释比为 1:5 000,ECL 底物化学发光显影,Bio-Rad 凝胶成像系统采集图片。

1.2.7 转染 EPCs 后目的基因的 Real-time qPCR 检测 分别用目的基因病毒液及阴性对照空载体病毒液感染 EPCs 细胞,以空细胞作为空白对照。用 1 mL Trizol 抽提总 RNA,根据 M-MLV 操作说明书进行反转录,获得 cDNA 后以 rACTB 为内参行 qPCR,SYBR Green 法荧光定量分析各基因的蛋白表达,引物序列如下:PDGF-C-F;CCA GCT GAC TTT GAT GAG AGA,PDG F-C-R;CAT CAC TGG GCT CCT CAA CT,ACTB-F;TTC TTG GGT ATG GAA TCC TGT G,ACTB-R;GGA GGA GCA ATG ATC TTG ATC TT。

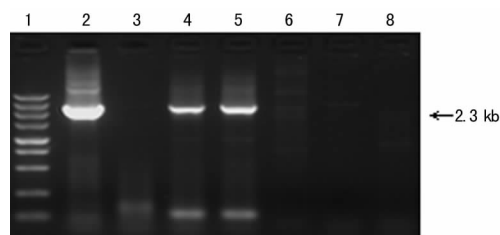
2 结果

2.1 目的片段的 PCR 扩增 以 pIRES2-EGFP-PDGF-C 为模板,PCR 扩增 PDGF-C-IRES-EGFP 片段,使目的片段两端分别带上 ATTB1 和 ATTB2 序列,PCR 结果显示 2.3 kb 处存在明显条带,证实成功扩增目的基因重组片段,见图 1。



1:Marker DL5000(从上至下分别为:5 000、3 000、2 000、1 500、1 000、750、500、250、100 bp);2、3:PDGF-C-IRES2-EGFP 重组片段 PCR 产物。

图 1 PDGF-C-IRES-EGFP 重组片段的 PCR 扩增



1:Marker DL5000(从上至下分别为:5 000、3 000、2 000、1 500、1 000、750、500、250、100 bp);2:阳性对照(以 pIRES2-EGFP-PDGF-C 为模板);3:阴性对照;4~8:pAD-PDGF-C-IRES2-EGFP 重组克隆的 PCR 扩增。

图 2 腺病毒载体 pAD-PDGF-C-IRES2-EGFP 的菌落 PCR 鉴定

2.2 腺病毒载体 pAD-PDGF-C-IRES2-EGFP 的菌落 PCR 鉴

定 经 BP 重组及 LR 重组将目的片段定向插入 pAD/CMV/V5-DEST 中,菌落 PCR 结果证实 在 2.3 kb 处存在条带,与阳性对照 pIERS2-EGFP-PDGF-C 结果一致,而阴性对照未见特异性条带(图 2),表明腺病毒载体 pAD-PDGF-C-IRES2-EGFP 构建成功。

2.3 腺病毒载体 pAD-PDGF-C-IRES2-EGFP 的测序结果
测序结果显示扩增序列片段长度为 1 113 bp,为一个完整的开放阅读框(ORF),经在线基因对比软件 Clusteral X 与 基因库 Genbank 比较显示与 Genbank ID:NM_031317 100 同源,说明成功克隆出 PDGF-C 基因。

2.4 重组腺病毒在 HEK293A 中的包装及滴度测定
pAD-PDGF-C-IERS2-EGFP 转染 HEK293A 细胞后,24 h 可见细胞肿胀、脱落、趋向圆形,荧光显微镜观察存在 GFP 表达,并随培养时间增加荧光逐渐增多,培养 10 d 后可呈现片状荧光(图

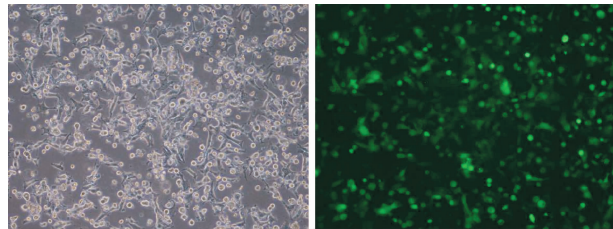


图 3 倒置及荧光显微镜观察 pAD-PDGF-C-IERS2-EGFP 转染 HEK293A 细胞影像学表现(×200)

3)。连 10⁻¹⁰ 浓度孔仍可发现有 10% 病变效应细胞,而更低浓度孔则未观察到。计算滴度为:TCID₅₀=10^{-9.6} · 0.1 mL。

2.5 AD-PDGF-C 在 EPCs 中的荧光表达及 Western blotting 鉴定
目的腺病毒 AD-PDGF-C 及阴性对照腺病毒 AD-EGFP 分别转染 EPCs,48 h 后可见 GFP 的表达,转染率约 90%~95%,同时观察细胞形态未发现细胞死亡(图 4)。Western blotting 检测结果显示在 46×10³ 出现特异性条带,而对照组和空病毒载体未检测到 PDGF-C 蛋白表达,证实稳定转染 AD-PDGF-C 的 EPCs 有外源性 PDGF-C 蛋白表达,见图 5。

2.6 目的基因的 qPCR 测定
实时荧光定量 PCR 测定结果显示 AD-PDGF-C 转染的 EPCs 中,PDGF-C 的表达量比 AD-EGFP 的表达量增加了 2 683 倍,目的基因过表达效果明显,见表 1。

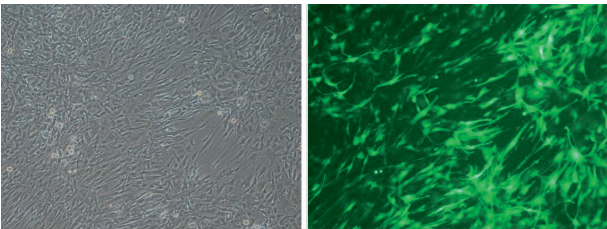
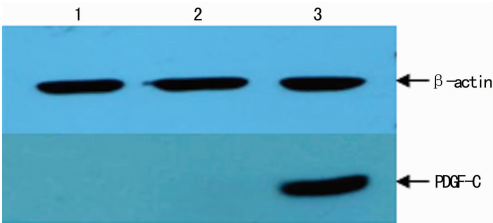


图 4 倒置及荧光显微镜观察 AD-PDGF-C 腺病毒转染 EPCs 影像学表现(×200)

表 1 腺病毒转染 EPCs 的 Real-time qPCR 结果

组别	目的基因 PDGF-C				内参基因 ACTB				△Ct	△△Ct	2 ^{-△△Ct}
	Ct1	Ct2	Ct3	Ct-av	Ct1	Ct2	Ct3	Ct-av			
A 组	27.93	27.79	28.12	27.95	17.25	17.08	16.89	17.07	10.88	2.41	0.19
B 组	25.81	26.03	26.37	26.07	17.77	17.49	17.53	17.60	8.47	0.00	1.00
C 组	13.84	14.40	13.91	14.05	17.07	17.13	16.70	16.97	-2.92	-11.39	2 683.69

A 组:未转染病毒的 EPCs 组;B 组:AD-EGFP 空病毒转染 EPCs 组;C 组:AD-PDGF-C 转染 EPCs 组。



1:大鼠骨髓 EPCs 对照组;2:AD-EGFP 转染 EPCs 组;3:AD-PDGF-C-IRES-EGFP 转染 EPCs 组。

图 5 Western blotting 检测各组 PDGF-C 的表达

3 讨 论

PDGF-C 在大鼠、小鼠、人体多个组织及细胞中广泛表达,并参与机体的生长发育和生理过程^[5]。Aase 等^[6]发现 PDGF-C 可能参与腔道结构的形成。此外,在血管萌芽过程中,PDGF-CC 可以诱导骨髓源性 EPCs 分化为平滑肌细胞并刺激其生长^[7-8]。

Li 等^[9]进行的体外及体内研究表明 PDGF-CC 不仅可以动员缺血条件下的骨髓源性 EPCs,还可诱导其分化和迁移。多个动物实验和体外细胞实验均证实 PDGF-CC 可以促进血

管周细胞、内皮细胞、成纤维细胞、巨噬细胞等多种细胞增殖、再生和迁移,表明其促血管新生作用具有广泛的细胞靶点^[10-11],更重要的是 PDGF-C 参与血管形成过程是一种非 VEGF 依赖的独立作用^[12-13]。因此,对 PDGF-CC 活性的调控可以对治疗缺血性疾病提供一种新的选择。

基因治疗关键在于探寻能携带目的基因高效表达及易于转染的载体。本研究载体选择 pAD/CMV/V5-DEST,是一种改进型重组腺病毒表达系统,其不仅含有 V5 表位基因,使目的基因表达时可以同时携带 V5 融合蛋白,有利于病毒表达的鉴定。更重要的是其属复制缺陷型病毒,由于只有 HEK293A 细胞能提供反式 E1 蛋白,因此,只能在此细胞中包装和扩增,不会导致目的细胞的基因突变,因此,是安全、高效、稳定的腺病毒载体系统。本研究选择 Gateway 克隆系统,无需限制性内切酶的酶切、割胶回收及连接酶的连接,仅靠载体上存在的特定重组位点和重组酶即可将目的基因克隆到目的载体上,还可进行非宿主系统的亚克隆,避免了传统重组系统繁琐、复杂耗时的操作过程,因而其应用潜力十分突出。

参考文献:

- [1] Li X, Ponten A, Aase K, et al. PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha receptor[J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(5): 302-309.
- [2] Lei H, Kazlauskas A. Focus on molecules: platelet-derived growth factor C, PDGF-C[J]. *Exp Eye Res*, 2008, 86(5): 711-712.
- [3] Gilbertson DG, Duff ME, West JW, et al. Platelet-derived growth factor C (PDGF-C), a novel growth factor that binds to PDGF alpha and beta receptor[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(29): 27406-27414.
- [4] 况春燕, 黄岚, 喻杨, 等. 提高培养内皮祖细胞成功率探讨[J]. *重庆医学*, 2011, 40(32): 3291-3293.
- [5] Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis[J]. *Nature*, 2011, 473(3): 298-307.
- [6] Aase K, Abramsson A, Karlsson L, et al. Expression analysis of PDGF-C in adult and developing mouse tissues[J]. *Mechanisms of Development*, 2002, 110(2): 187-191.
- [7] Dimmeler S. Platelet-derived growth factor CC—a clinically useful angiogenic factor at last? [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(17): 1815-1816.
- [8] Leistner DM, Fischer-Rasokat U, Honold J, et al. Trans-

plantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): final 5-year results suggest long-term safety and efficacy [J]. *Clin Res Cardiol*, 2011, 100(10): 925-934.

- [9] Li X, Tjwa M, Moons L, et al. Revascularization of ischemic tissues by PDGF-CC via effects on endothelial cells and their progenitors[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(1): 118-127.
- [10] Hou X, Kumar A, Lee C, et al. PDGF-CC blockade inhibits pathological angiogenesis by acting on multiple cellular and molecular targets[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(27): 12216-12221.
- [11] Stephan B, Olivera S, Michael S, et al. Growth factors and cytokines in wound healing[J]. *Wound Rep Reg*, 2008, 16(5): 585-601.
- [12] Li XR, Kumar A, Zhang F, et al. VEGF-independent angiogenic pathways induced by PDGF-C[J]. *Oncotarget*, 2010, 1(4): 309-314.
- [13] Cao R, Brokenhielm E, Li X. Angiogenesis stimulated by PDGF-CC, a novel member in the PDGF family, involves activation of PDGFR-alphaalpha and PDGFR-alphabeta receptors[J]. *FASEB J*, 2002, 16(12): 1575-1583.

(收稿日期: 2012-12-08 修回日期: 2013-01-18)

(上接第 1836 页)

参考文献:

- [1] Meadows TA, Bhatt DL. Clinical aspects of platelet inhibitors and thrombus formation[J]. *Circ Res*, 2007, 100(9): 1261-1275.
- [2] Prabhakaran S, Rundek T, Ramas R, et al. Carotid plaque surface irregularity predicts ischemic stroke; the northern Manhattan study[J]. *Stroke*, 2006, 37(11): 2696-2701.
- [3] Topol EJ. Intensive statin therapy—a sea change in cardiovascular prevention[J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(15): 1562-1564.
- [4] Amarenco P, Bogousslavsky J, Callacan A 3rd, et al. High-dose atorvastatin after stroke or transient ischemic attack[J]. *N Engl J Med*, 2006, 355(6): 549-559.
- [5] Shishehbor MH, Brennan ML, Aviles RJ, et al. Statins promote potent systemic antioxidant effects through specific inflammatory pathways [J]. *Circulation*, 2003, 108(4): 426-431.
- [6] Nissen SE, Tuzcu EN, Schoenhagen P. Statin therapy, LDL cholesterol, C-reactive protein, and coronary artery disease[J]. *N Engl J Med*, 2005, 41(4): 732.
- [7] Di Napoli P, Taccardi AA, Oliver M, et al. Statins and stroke: evidence for cholesterol-independent effects [J]. *Eur Heart J*, 2002, 23(24): 1908-1921.
- [8] Inagaki M, Nakagawa-Toyama Y, Nishida M, et al. Effect of probucol on antioxidant properties of HDL in patients

with heterozygous familial hypercholesterolemia [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2012, 19(7): 643-656.

- [9] Iqbal M, Sharma SD, Okada S. Probucol as a potent inhibitor of Oxygen radical-induced lipid peroxidation and DNA damage; in vitro studies[J]. *Redox Rep*, 2004, 9(3): 167-172.
- [10] Zhong JK, Guo ZG, Li C, et al. Probucol alleviates atherosclerosis and improves high density lipoprotein function [J]. *Lipids Health Dis*, 2011, 10(10): 210.
- [11] Meng XP, Wang SX, Zhang JC, et al. Effects of probucol, aspirin and atorvastatin combination therapy upon atherosclerosis[J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2009, 89(28): 1986-1988.
- [12] 蒋美媛, 庞明, 黄东挺, 等. 普罗布考联合阿司匹林、阿托伐他汀治疗老年颈动脉粥样硬化的临床观察[J]. *广西医学*, 2012, 34(10): 1325-1326, 1228.
- [13] 李鹏, 梁丽贞. 普罗布考和阿托伐他汀联合治疗颈动脉粥样硬化斑块的临床观察[J]. *心脑血管病防治*, 2009, 9(1): 47-49.
- [14] 龙骁, 李向平, 薛彦琼, 等. 普罗布考与阿托伐他汀对急性冠脉综合征的调脂及抗氧化作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17(11): 933-937.
- [15] 赵晓晖, 隋海晶, 周媛, 等. 阿托伐他汀与普罗布考联合治疗对脑梗死颈动脉粥样硬化斑块影响的影像学评价[J]. *中国临床神经科学*, 2012, 20(4): 397-401.

(收稿日期: 2012-10-28 修回日期: 2013-01-22)