

用腺相关病毒载体介导人血管内皮生长因子受体 KDR 胞外区基因的表达

曾革非 张立国 张智清*

(中国预防医学科学院病毒学研究所病毒基因工程国家重点实验室 北京 100052)

摘 要 新生血管大量形成在实体瘤的生长和转移中起着关键的作用。血管内皮生长因子(VEGF)是介导肿瘤血管生成的最主要因素。从原代培养的人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)提取细胞总 RNA,采用逆转录 PCR(RT-PCR)方法得到 VEGF 受体 KDR 胞外区 cDNA 片段。将获得的受体基因克隆到 AAV 基因治疗载体 pSNAV 中,得到重组质粒 pSNAV/KDR。重组质粒转染 BHK 细胞,加入辅助病毒后,获得了表达目的蛋白的重组 AAV。重组病毒表达的 KDR 在体外实验中具有与 VEGF 结合的活性。在体内实验中,重组 AAV 感染的黑色素瘤细胞在小鼠中形成肿瘤的血管化程度明显低于对照组。

关键词 血管内皮生长因子,受体,腺病毒伴随病毒

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)04-0388-04

新生血管的形成与多种疾病的发生密切相关,例如,肿瘤的生长和转移、糖尿病相关的视网膜病变、类风湿等^[1]。VEGF 在介导新生血管生成的过程中起着最主要的作用^[2],VEGF 主要通过其两个高亲和力和受体发挥作用,即 Flt-1 和 KDR。Flt-1 与 VEGF 和血小板衍生生长因子(PDGF)均有很高的亲和力,而 KDR 只与 VEGF 特异结合。VEGF 受体由胞外区、跨膜区和胞内区三部分组成,与配体结合的活性部位位于胞外区,胞内区具有酪氨酸蛋白激酶的活性^[3]。通过抑制 VEGF 的生物学活性可以抑制血管生成,目前正在研究的有抗 VEGF 或其受体的抗体、小分子 VEGF 拮抗物、化学药物等。与其它方法相比较,用受体的胞外段阻断 VEGF 的病理作用,且具有无免疫原性的优点,是目前研究的热点。

腺病毒伴随病毒(AAV)载体是目前基因治疗中应用的重要载体之一,它与人类疾病无相关性。本文报道将 VEGF 受体 KDR 的全长胞外区基因克隆到 pSNAV 载体中,包装出含受体胞外区基因的重组 AAV 病毒,并利用小鼠黑色素瘤模型,初步研究了重组病毒对血管生成的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 细胞和质粒

AAV 基因治疗载体 pSNAV 由本实验室构建^[4]。人脐静脉内皮细胞(HUVEC),金黄地鼠肾细胞(BHK)均由本实验室保存,小鼠黑色素瘤细胞系 B16F10 购自 ATCC。

1.2 酶及试剂

各种限制性酶、修饰酶购于 New England Biolabs 公司。细胞总 RNA 提取试剂 TRIZOL、脂质体 Lipofectamine 为 GIBCO BRL 公司产品。MTT 为 Sigma 公司产品。重组人 VEGF 及其单抗由本室制备。

1.3 受体胞外区基因的克隆和序列分析

取培养至 3~4 代的 HUVEC 1 瓶,用 Trizol 法提取细胞总 RNA,经 RT-PCR 获得 KDR 胞外区 cDNA 片段,所用引物序列如下:

上游引物 5'TAG GAT CCA TGA GCA AGG TGC TGC TG 3'

下游引物 5'TAG GAT CCT TAC AAG TTC GTC TTT TC 3'

PCR 产物直接克隆至 pGEM-T 载体后,测定基因序列。

1.4 目的基因 KDR 克隆入载体 pSNAV

将 KDR 克隆到 AAV 基因治疗载体 pSNAV。酶切鉴定重组质粒,命名为 pSNAV/KDR。基因重组克隆操作技术均照 Molecular Cloning 实验手册^[5]进行。用 Qiagen 质粒小量提取试剂盒提取 pSNAV/KDR 质粒用于转染细胞。

重组病毒的获得与纯化见参考文献 [6]。

1.5 重组病毒的感染及表达产物的活性测定

取一方瓶生长状态良好的 BHK 细胞 ,加入重组病毒 50 μ L ,37 $^{\circ}$ C 吸附 1h ,加入不含血清的 DMEM 培养液 ,室温静置培养 5d ,取上清包被于 96 孔 ELISA 板 ,牛血清白蛋白(BSA)封闭后加入 VEGF(1 μ g/ μ L) 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h ,一抗为抗 VEGF 单抗 ,二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG ,OPD 底物显色。

1.6 重组病毒对肿瘤血管生成及肿瘤生长的抑制作用

用纯化的重组病毒感染 80% 成片的小鼠黑色素瘤细胞 B16F10 ,48h 后 ,将细胞重悬于无血清的 DMEM 培养液中 ,每只 C57 鼠背部皮下注射 10⁶ 细胞 ,以带有 AAV 病毒感染的黑色素瘤细胞作为对照。每组 5 只小鼠。观察肿瘤生长情况 ,2 周后将肿瘤组织作石蜡切片 ,常规 HE 染色 ,血管形成定量以微血管密度(MVD)表示 :在低倍镜(100 \times)下确定肿瘤内 5 个新生血管密集区 ,再在高倍镜(200 \times)下计数每个密集区中一个视野内的微血管数 ,以 5 个区域微血管数的平均数作为微血管密度 ,显微镜下进行血管记数并拍照 ,采用 *t* 检验方法进行数据分析。

2 实验结果

2.1 KDR 胞外区基因的克隆与序列分析

从 HUVEC 细胞提取总 RNA ,经 RT-PCR 扩增出血管内皮生长因子 KDR 受体的 cDNA 片段 ,将 PCR 产物克隆到 pGEM-T 载体 ,挑取重组质粒 pGEM-T/KDR ,限制性酶分析图谱及核苷酸序列分析表明其序列与已发表的资料相符 [7,8]。

2.2 pSNAV/KDR 重组质粒的构建及其酶切鉴定

用 *Eco*RI + *Sal*I 双酶切 pGEM-T/KDR 并回收目的片段 ,克隆到同样酶切的 pSNAV 载体(图 1)。

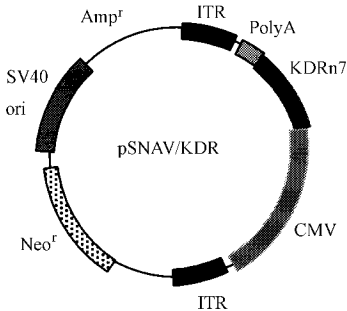


图 1 质粒 pSNAV/KDR 的结构图

Fig.1 Structure of pSNAV/KDR

2.3 表达产物与 rVEGF165 的结合活性

用表达 KDR 的重组 AAV 感染 BHK 细胞 ,采用间接 ELISA 方法检测表达的受体与 VEGF 的结合活性 ,结果如图 2 所示 ,与对照相比 ,感染了重组病毒的细胞上清具有与 VEGF₁₆₅ 特异性结合的能力。

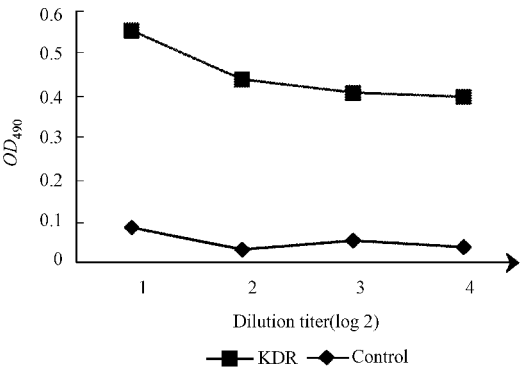


图 2 重组 AAV 表达的 KDR_{n7} 与 VEGF 的结合活性

Fig.2 VEGF Binding activity of KDR_{n7} expressed by recombinant AAV

Negative control :supernatant of normal BHK ;

KDR :supernatant of BHK infected by recombinant AAV

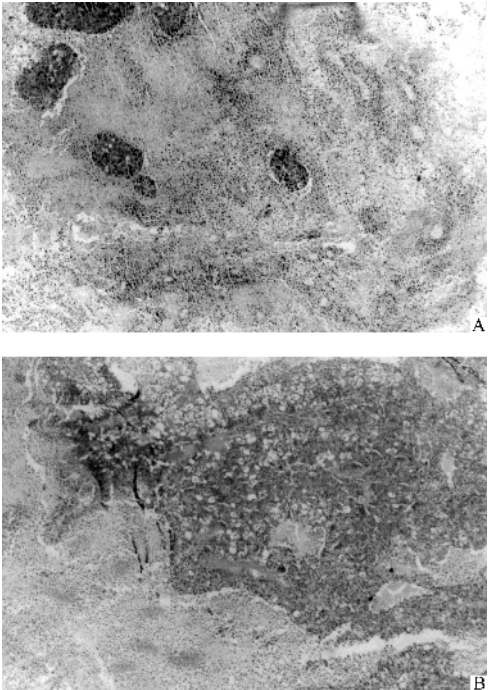


图 3 表达 KDR 的重组 AAV 对小鼠恶性黑色素瘤血管形成的影响(200 \times)

Fig.3 Anti-angiogenesis of KDR expressed by recombinant AAV on melanoma

A. Melanoma infected by recombinant AAV virus expressing KDR ;

B. Melanoma infected by AAV

2.4 重组病毒对肿瘤血管生成及肿瘤生长的抑制作用

用表达 KDR 胞外区基因的重组病毒感染小鼠黑色素瘤细胞后,在 C57 小鼠上观察了 KDR 胞外区基因对肿瘤血管形成的抑制作用。肿瘤细胞接种于小鼠皮下,2 周后取肿瘤组织切片,常规 HE 染色。结果如图 3、表 1 所示。结果表明感染了重组病毒的小鼠恶性黑色素瘤组织血管密度明显低于对照肿瘤组织。

表 1 表达 KDR 的重组 AAV 对小鼠恶性黑色素瘤新生血管的影响

Table 1 Anti-angiogenesis of KDR expressed by recombinant AAV on melanoma		
Groups	Number	Microvessel density MVD($\bar{x} \pm s$)
KDR/AAV	5	18 \pm 6
AAV	5	62 \pm 11

$P < 0.05$

3 讨 论

大量的研究表明,VEGF 是刺激肿瘤血管生成的主要作用因子。VEGF 在许多实体瘤中大量表达,肿瘤细胞产生的 VEGF 通过旁分泌作用刺激周围新生血管的形成,而新形成的血管又可为肿瘤组织提供必要的养分,促进肿瘤的生长。这个过程是通过 VEGF 与血管内皮细胞上 VEGF 受体的相互作用完成的。VEGFR1/Flt-1 和 VEGFR2/KDR/Flk-1 是 VEGF 的两种高亲和力受体。在许多肿瘤组织中,KDR 的表达量明显升高,这提示着 VEGF-KDR 途径可能在肿瘤血管生成中起着主要的作用。

腺病毒伴随病毒(AAV)具有与人类疾病无相关性、能将其基因组定点整合到宿主细胞染色体及可感染有丝分裂后细胞等特点,已被广泛应用于基因治疗的研究。本文将 VEGF 受体 KDR 的全长胞外区基因克隆到 pSNAV 载体中,包装出含受体胞外区基因的重组 AAV 病毒,并研究了重组病毒对小鼠肿瘤生长及肿瘤血管生成的抑制作用。从肿瘤组织切片和血管计数的结果来看,KDR 胞外区基因能较为显著地抑制黑色素瘤新生血管的形成。转染了表达 KDR 胞外区重组 AAV 的小鼠黑色素瘤细胞在成瘤时间与阴性对照没有明显差别,我们推测这可能是因为黑色素瘤生长较快,而外源导入的 VEGF 可溶性受体基因在肿瘤组织内表达并发挥作用是一个

较为缓慢的过程。

我们首次探索了用 AAV 基因治疗载体介导 VEGF 可溶性受体抑制肿瘤的血管生成。这一结果初步证实了 VEGF 受体 KDR 胞外区对肿瘤血管生成的抑制作用,同时为以后进一步用基因治疗的手段介导 VEGF 的可溶性受体基因进行抗血管生成的研究奠定了基础。为肿瘤及其它血管生成相关疾病的抗血管治疗提供了实验依据。

致 谢 本实验中 AAV 重组病毒的包装工作由本室吴小兵博士和伍志坚博士协助完成,特此表示感谢。

REFERENCES(参考文献)

[1] Patricia Lee ,Cindy C Wang ,Anthony P. Adamis .Ocular neovascularization :an epidemiologic review . *Survey of Ophthalmology* ,1998 ,**43** (3) 245 ~ 269

[2] Lloyd Paul Aiello ,Robert L Avery ,Paul G *et al* .Vascular Endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders . *N Engl J Med* .1994 ,**331** :1480 ~ 1487

[3] Bernhard Barleon ,Frank Totzke ,Xhristel Herzog *et al* . Mapping of the sites for ligand binding and receptor dimerization at the extracellular domain of the vascular endothelial growth factor receptor FLT-1 . *J Biol Chem* .1997 ,**272** (16) :10382 ~ 10388

[4] Wu Z X (伍志坚) ,Wu X B (吴小兵) ,Hou Y D (侯云德) . Generation of a recombinant herpes simplex virus which can provide packaging function for recombinant adeno-associated virus . *Chinese Science Bulletin* (科学通报) ,1999 ,**44** (5) 506 ~ 509

[5] Sambrook J ,Fritsch E F ,Maniatis T . *Molecular Cloning :A Laboratory Manual* . 2nd ed ,New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989 .

[6] Wu Z X (伍志坚) ,Wu X B (吴小兵) ,Hou Y D (侯云德) . Construction of a series of adeno-associated virus vectors and their expression of β -galactosidase gene . *Chinese Journal of Virology* (病毒学报) 2000 ,**16** (1) :1 ~ 6

[7] Terman B ,Carrion M ,Kovacs E *et al* . Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase . *Oncogene* ,1991 ,**6** : 1677 ~ 1683

[8] Terman B I ,Dougher-Vermazen M ,Carrion M E *et al* . Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor . *Biochem Biophys Res Commun* ,1992 ,**187** :1579 ~ 1586

[9] Keyt B A ,Nguyen H V ,Berleau L T *et al* . Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors-generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis . *J Bio Chem* .1996 ,**271** :5638 ~ 5646

[10] Muller Y A ,Christinger H W ,Keyt B A *et al* . The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 angstrom resolution :multiple copy flexibility and receptor binding . *Structure* . 1997 ,**5** :1325 ~ 1338

Expression of Extracellular Domain of VEGF Receptor KDR with Recombinant AAV

ZENG Ge-Fei ZHANG Li-Guo ZHANG Zhi-Qing*

(National Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering ,Institute of Virology ,Beijing 100052 ,China)

Abstract New vessel formation plays a key role in tumor growth and transforming ,and the Vascular endothelial growth factor (VEGF) is the most important factor inducing tumor vessel formation .The cDNA of extracellular domain of VEGF receptor KDR was cloned from primary cultured HUVEC by RT-PCR and subcloned into AAV vector pSNAV .Recombinant AAV was obtained from BHK cells transformed with pSNAV/KDR after adding helper virus .The recombinant AAV expressing soluble KDR that can bind to VEGF .*In vivo* experiment demonstrated that the recombinant virus can inhibit the new vessel formation of melanoma in C57 mice model .

Key words VEGF , receptor , AAV

Received :December 31 2000

This work supported by grant from State “ 863 ”High-Tech Project (102-08-01-03)

* Corresponding author .Tel 86-10-63510655 ;Fax 86-10-63532053 ;E-mail :zhangzq@public3 .bta .net .cn

丙型肝炎病毒的危害及其防治研究

丙型肝炎病毒(HCV)是肝炎病毒家族的重要成员之一 ,全球性地危害人体健康 ,据 WHO 报告 “ 丙肝 ”病毒已感染了约 1.7 亿人 ,是 HIV(艾滋病病毒)感染的 4 倍 ,也是全球性肝损伤、肝癌的主要发病原因 ,在法国 ,有 1% 人口感染“ 丙肝 ”病毒 ,它不仅引起急性肝炎 ,而且 80% 的带毒者会逐渐发展成慢性肝炎 ,其中 20% 最后会出现肝硬化 ,或原发性肝细胞肿瘤。在俄国 ,研究人员发现“ 丙肝 ”病毒传染给寄主 ,其寄生性不仅伤害患者肝脏 ,而且也会破坏神经系统。此病毒在患者体内潜伏 15 ~ 20 年 ,一旦确诊 ,患者很可能已转为慢性肝炎 ,甚至出现肝硬化 ,实验证明 ,这种病毒破坏神经系统难以修复 ,严重危及人的生命安全。为诊断和治疗“ 丙肝 ”以恢复健康 ,我国第二军医大学研究人员在国际上首次构建成功中国丙肝病毒基因文库 ,并率先研制成功新一代“ 丙肝 ”诊断试剂盒 ,将为“ 丙肝 ”患者诊断与治疗提供较为方便的途径。

为了更好实施对“ 丙肝 ”的有效治疗 ,除了目前通常采用干扰素的特定控制病毒病之外 “ 丙肝 ”疫苗对“ 丙肝 ”治疗或许是个更为有效的治疗方法 ,有人对“ 丙肝 ”病毒进行基因工程改造 ,使其能在培养细胞中更有效繁殖 ,这样将更有助于设计疫苗的“ 丙肝 ”病毒突变 ,可是目前还没有这种疫苗和普遍有效的治疗方法。为此 ,有三方面研究取得进展或将有所突破 :一是“ 丙肝 ”疫苗的研制。我国有关科研单位认为 ,研制“ 丙肝 ”疫苗势在必行。武汉大学与广西北海海洋生物产业股份有限公司签订了联合开发“ 人丙肝基因工程疫苗 ”的项目协议书 ,必将加快此疫苗的研究进程 ,预祝早日造福于民。二是新型干扰素的研究。美国研究人员在干扰素用于治疗“ 丙肝 ”的基础上通过临床试验研究 ,开发出了一种新的干扰素叫 Pegasy ,通过 3 年分别对澳大利亚、英国、加拿大等 9 个国家和地区的“ 丙肝 ”患者试用 ,取得较显著的效果。副作用小 ,疗效持续时间长 ,每周只注射 1 次即可。三是重视“ 丙肝 ”的辅助治疗。日本研究人员通过临床试验证实牛奶中的乳铁蛋白能使“ 丙肝 ”病毒减少 ,有望成为“ 丙肝 ”的一种辅助疗法 ,试验证明 ,让“ 丙肝 ”患者每天服用 0.6g 乳铁蛋白(2 ~ 3L 牛奶的含量) ,3 个月后 ,患者血液里的“ 丙肝 ”病毒的量平均比服用前减少了约 30% ,肝功能得到改善 ,没有产生明显副作用。因此 ,有可能在服用乳铁蛋白后使病毒含量下降 ,之后再干扰素进行治疗 ,会进一步提高疗效。

总之 ,对危害人体健康 ,威胁生命安全的“ 丙肝 ”病毒的有效控制及病害的根治 ,给生命科学工作者、医学科学工作者提出了重要研究课题 ,对“ 丙肝 ”病毒侵染寄主的致病机制和它们的分子生态学的深入研究 ,对根治“ 丙肝 ”有着很重要的实际意义。

(柯 为 供稿)