

· 实验研究 ·

视网膜特异性表达人血管内皮生长因子 基因载体的构建

吕秀兰 吕林 李永浩 张静琳 李石毅

【摘要】 目的 构建在视网膜组织特异性表达的人血管内皮生长因子(VEGF)₁₆₅基因。方法 用聚合酶链反应(PCR)方法从 BLAB/C 鼠全基因组扩增能在视网膜组织特异性表达的 rho 启动子,经限制性内切酶纯化后克隆于质粒 pcDNA^{3.1+}-VEGF₁₆₅中,建立重组质粒 pcDNA^{3.1+}-rho-VEGF₁₆₅,通过限制性内切酶酶切分析及 PCR 鉴定筛选出正确重组质粒 pcDNA^{3.1+}-rho-VEGF₁₆₅,由 jetPEI 介导转染人视网膜色素上皮细胞和人脐静脉内皮细胞,并通过免疫组织化学染色以及绘制细胞生长曲线检测在人视网膜色素上皮细胞和人脐静脉内皮细胞中 VEGF 蛋白的表达。结果 在人视网膜色素上皮细胞中,重组质粒 pcDNA^{3.1+}-rho-VEGF₁₆₅比质粒 pcDNA^{3.1+}-VEGF₁₆₅的 VEGF 蛋白表达强,在人脐静脉内皮细胞,两者的表达量无明显差别。结论 载体 pcDNA^{3.1+}-rho-VEGF₁₆₅的构建为进一步研究 VEGF 在视网膜新生血管形成中的致病机理提供基础材料,并为进一步建立视网膜特异性表达 VEGF 转基因鼠模型建立了基础。

【关键词】 血管生长因子; 血管,内皮; 聚合酶链反应; DNA,重组; 小鼠,转基因;
糖尿病视网膜病

中图分类号:R466.62 R587.2

Construction of specifically expressed vascular endothelial growth factor₁₆₅ gene in retina LÜ Xiu-lan, LÜ Lin, Li Yong-hao, et al. Department of Zhongshan Ophthalmology Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

Corresponding author: LÜ Lin, Email: lvlin888@public.gangzhou.gd.cn

【Abstract】 Objective To construct specifically expressed vascular endothelial growth factor (VEGF)₁₆₅ gene in retina. **Methods** Rho promoter, specifically expressed in retina, was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from the genomic DNA of a BLAB/C rat, then it was cut with restriction enzymes and cloned into the plasmid pcDNA^{3.1+}-VEGF₁₆₅ to form recombinant plasmid pcDNA^{3.1+}-rho-VEGF₁₆₅. The correct recombinant plasmid pcDNA^{3.1+}-rho-VEGF₁₆₅ was identified by restriction enzymes and PCR, and was transferred by jetPEI into cultured human navel vein endothelial cells and human retinal pigment epithelial (RPE) cells. The expression of VEGF protein in human navel vein endothelial and RPE cells was detected by immunocytochemical staining and protraction of the growth curve of the cells.

Results In human RPE cells, the expression of VEGF protein was more in recombinant plasmid pcDNA^{3.1+}-rho-VEGF₁₆₅ than that in plasmid pcDNA^{3.1+}-VEGF₁₆₅; in human navel vein endothelial cells, no obvious difference of the expression of VEGF protein between recombinant plasmid pcDNA^{3.1+}-rho-VEGF₁₆₅ and plasmid pcDNA^{3.1+}-VEGF₁₆₅ was found. **Conclusions** The construction of pcDNA^{3.1+}-rho-VEGF₁₆₅ carrier may provide the basic material for the study of the nosogenesis of VEGF in retinal neovascularization, and establish the foundation to set up the model of transgenic mice with VEGF specific expressing in retina.

【Key words】 Growth substances; Endothelium, vascular; Polymerase chain reaction; DNA, recombinant; Mice, transgenic; Diabetic retinopathy

随着人类生活水平的提高及饮食结构的变化,糖尿病视网膜病变已成为四大致盲眼病之一。其病理过程主要是微循环障碍,视网膜组织缺血缺氧,最终形成视网膜新生血管。已有大量研究表明,其新生血管的形成与血管内皮生长因子(VEGF)关系密切^[1]。我们通

过构建视网膜特异性表达 VEGF 的真核表达载体,为进一步研究 VEGF 与糖尿病视网膜病变的关系以及建立视网膜特异性 VEGF 转基因鼠奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

质粒 pcDNA^{3.1+}-VEGF₁₆₅ 由课题组人员先期构

基金项目:广东省重点科技攻关项目(A052001084)

作者单位:510060 广州,中山大学中山眼科中心

通讯作者:吕林,Email: lvlin888@public.guangzhou.gd.cn

建,由本校生物化学教研室保存。宿主菌 *E. coli* JM-109(美国 Promega 公司)由本实验室保存。D407 细胞(人视网膜色素上皮细胞)由哥伦比亚 University of South Carolina Medical School Dr. Hunt 惠赠, ECV304 细胞(人脐静脉内皮细胞)由本校动物中心细胞库提供。

限制性内切酶 *EcoR*I、*Bam*H I、*Hind* III、*Nhe* I(美国 NEB 公司),质粒 DNA 提取试剂盒、聚合酶链反应(PCR)纯化试剂盒和胶回收试剂盒(美国 QIGEN 公司),*Taq* 酶、*T4*DNA 连接酶(日本 Takana 公司)。RPMI-1640 培养基、改良 Eagle 培养基(DMEM)、G418(美国 Gibco 公司),胎牛血清(杭州四季青生物工程公司),*jet*PEI 转染试剂(德国默克公司)。鼠抗人 VEGF 单克隆抗体(标准抗体生产公司)。免疫组织化学试剂盒(ABC 法)(武汉博士德公司)。

PCR 引物:根据 Genebank 报告(Ana Boulanger, 2001, AF432266),视网膜色素上皮(RPE)65 基因全序列设计引物^[2],扩增其上游-655~+52 片断,上游引物 5'AATGCTAGCGCAATGGTGAAGACAGT-G3',下游引物 5'GCCAAGCTTCTTCCAGTGAAG-AAYAGAG3'。上游引物包含基因的起始密码和 *Nhe*I 酶切位点,下游引物包含终止密码和 *Hind* III 酶切位点。引物由上海博亚公司合成。

1.2 方法

rho 启动子基因的扩增、回收、酶切及纯化:提取 BLAB/C 鼠基因组,以其为模板行 PCR 扩增出 *rho* 启动子基因,反应条件为 96 C 预变性 8 min, 94 C 45 s, 56 C 45 s, 72 C 60 s 循环 28 次, 72 C 延伸 7 min。扩增产物电泳鉴定后用 PCR 产物回收试剂盒回收,然后经 *Hind* III 和 *Nhe* I 限制性内切酶酶切该产物,纯化后备用,操作程序参照试剂盒说明书。

pcDNA^{3.1+}-*rho*-VEGF₁₆₅ 重组质粒的构建:提取质粒 pcDNA^{3.1+}-VEGF₁₆₅,以 *Hind* III 和 *Nhe* I 双酶酶切,纯化后与同样限制性内切酶酶切纯化过的 *rho* 启动子基因按 1:3 比例混合,在 *T4*DNA 连接酶作用下 22 C 连接 9 h,然后转化宿主菌 *E. coli* JM-109,铺于含有 50 mg/ml 氨苄青霉素的 LB 平皿上,37 C 培养过夜。挑取单克隆,氨苄青霉素(50 mg/ml)阳性液体培养基 37 C, 180 r/min 摇床中培养过夜,提取质粒 DNA,通过限制性内切酶酶切分析及 PCR 鉴定筛选出阳性克隆,称之为 pcDNA^{3.1+}-*rho*-VEGF₁₆₅。大量提取质粒 pcDNA^{3.1+}-*rho*-VEGF₁₆₅,纯化后备用。

阳离子聚合物转染(*jet*PEI)介导的 pcDNA^{3.1+}-*rho*-VEGF₁₆₅ 转染 D407 细胞、ECV304 细胞及细胞筛

选:在 6 孔板中,用含 15% 小牛血清的 RPMI-1640、DMEM 培养液,37 C 下 5%CO₂ 培养箱内培养 ECV304 细胞, D407 细胞,使细胞达 50%~80% 融合,待转染用。在 0.5 ml EP 管内准备下列溶液, A 溶液: 3 μg 质粒 DNA 溶于 50 μl 150 mmol/L NaCl 中; B 溶液: 6 μl *jet*PEI 稀释于 50 μl 150 mmol/L NaCl 溶液中。将 B 溶液加入 A 溶液中,混匀后室温放置 30 min,加全培养基,37 C 下 5%CO₂ 培养箱内培养 24 h,弃去转染液,加培养基继续培养; 48 h 后,将 D407 细胞的培养液更换为含 0.8% G418 和 15% 小牛血清的 DMEM,进行选择培养; 7 d 后将培养液中 G418 浓度更换为 0.2%,维持筛选 1 个月。将 ECV304 细胞的培养液更换为含 0.7% G418 和 15% 小牛血清的 RPMI-1640,进行选择培养; 7 d 后将培养液中 G418 浓度换为 0.2%,维持筛选 1 个月。

PCR 检测 D407 细胞, ECV304 细胞 *rho* 启动子基因和 VEGF 基因:收集 1×10⁷ 个转染后的细胞,提取细胞基因组 DNA,以基因组 DNA 为模板行 PCR 扩增,引物同上,反应条件为 96 C 预变性 8 min, 94 C 45 s, 56 C 45 s, 72 C 60 s 循环 32 次, 72 C 延伸 7 min。

免疫细胞化学(ICC)分析 VEGF 基因在 D407 细胞、ECV304 细胞中的蛋白表达:ABC 免疫组织化学操作程序按试剂盒说明书进行,一抗为即用型抗体。

细胞生长曲线绘制:分别消化一定数量的 PCR 扩增阳性的细胞与未转染细胞,制成细胞悬液,以每孔 2×10⁵ 个接种于 24 孔板中,加培养液致 1 ml/孔,每隔 24 h 记数 3 孔细胞数,计算平均值,共记数 8 d,绘制细胞生长曲线。

2 结果

2.1 *rho* 启动子基因的克隆

PCR 扩增得到长度为 714 碱基对(bp)的特异性产物带,序列测定结果与 Genebank 报告的 RPE65 基因启动子序列完全一致^[2]。

2.2 pcDNA^{3.1+}-*rho*-VEGF₁₆₅ 重组质粒的鉴定结果

载体质粒 pcDNA^{3.1+} 大小为 5 400 bp,连接 *rho*-VEGF₁₆₅ 片段的重组质粒 pcDNA^{3.1+}-*rho*-VEGF₁₆₅ 约 6 700 bp。重组质粒 pcDNA^{3.1+}-*rho*-VEGF₁₆₅ 经 *Hind* III 和 *Nhe* I 双酶酶切后得到约 714 bp 和 6 000 bp 2 条带(图 1)。PCR 扩增后,以 pcDNA^{3.1+}-*rho*-VEGF₁₆₅ 为模板的反应体系得到长度为 714 bp 的扩增条带,以质粒 pcDNA3.1 为模板和空白对照无该扩增条带。

2.3 D407 细胞和 ECV304 细胞内 *rho*-VEGF 基因检测结果

转染 pcDNA^{3.1+}-rho-VEGF₁₆₅ 重组质粒组的 D407 细胞和 ECV304 细胞,PCR 方法可检测到 rho 基因的存在,而未转染组及转染 pcDNA^{3.1+} 空载体组的 D407 细胞和 ECV304 细胞未能检测到 rho 基因(图 2)。

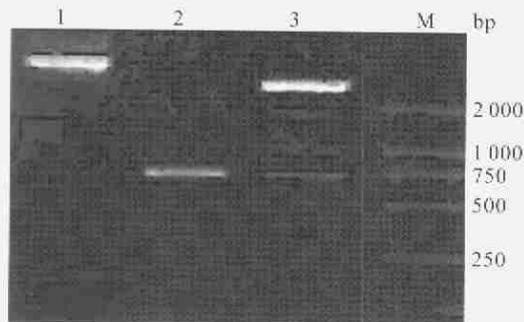


图 1 重组质粒 pcDNA^{3.1+}-rho-VEGF 鉴定电泳像。M: DL2000 DNA marker; 1: pcDNA^{3.1+}-rho 质粒; 2: rho 基因的 PCR 产物; 3: pcDNA^{3.1+}-rho/Nhe I + Hind III



图 2 转染细胞 PCR 鉴定电泳像。M: DL2000 DNA marker; 1: 阳性对照; 2: ECV304 细胞转染 pcDNA^{3.1+}; 3: ECV304 细胞转染 pcDNA^{3.1+}-VEGF₁₆₅; 4: ECV304 细胞转染 pcDNA^{3.1+}-rho-VEGF₁₆₅; 5: D407 细胞转染 pcDNA^{3.1+}-rho-VEGF₁₆₅; 6: D407 细胞转染 pcDNA^{3.1+}-VEGF₁₆₅; 7: D407 细胞转染 pcDNA^{3.1+}

2.4 D407 细胞和 ECV304 细胞转染前后细胞生长情况

ECV304 细胞在转染 pcDNA^{3.1+}-VEGF₁₆₅ 和 pcDNA^{3.1+}-rho-VEGF₁₆₅ 重组质粒后比未转染组细胞生长速度明显加快,转染 pcDNA^{3.1+}-VEGF₁₆₅ 和 pcDNA^{3.1+}-rho-VEGF₁₆₅ 质粒的两组细胞生长速度无明显差别(图 3)。D407 细胞在转染 pcDNA^{3.1+}-VEGF₁₆₅ 和 pcDNA^{3.1+}-rho-VEGF₁₆₅ 重组质粒后比未转染组细胞生长速度明显加快。转染 pcDNA^{3.1+}-rho-VEGF₁₆₅ 质粒组比转染 pcDNA^{3.1+}-VEGF₁₆₅ 细胞生长速度加快(图 4)。

2.5 VEGF 蛋白在 D407 细胞和 ECV304 细胞内的

ICC 鉴定结果

转染 pcDNA^{3.1+}-VEGF₁₆₅ 和 pcDNA^{3.1+}-rho-VEGF₁₆₅ 重组质粒组的 D407 细胞和 ECV304 细胞培养系统中许多细胞的细胞浆内均有 VEGF 蛋白表达,以细胞核周围量最多,部分细胞表达较弱。未转染组和转染 pcDNA^{3.1+} 组细胞则无 VEGF 蛋白的表达。ECV304 细胞: 转染 pcDNA^{3.1+}-VEGF₁₆₅ 和 pcDNA^{3.1+}-rho-VEGF₁₆₅ 重组质粒组 VEGF 蛋白的表达量无明显差别(图 5)。D407 细胞: 转染 pcDNA^{3.1+}-rho-VEGF₁₆₅ 重组质粒组与转染 pcDNA^{3.1+}-VEGF₁₆₅ 组比较,免疫细胞化学显色在 pcDNA^{3.1+}-rho-VEGF₁₆₅ 组明显加深(图 6)。

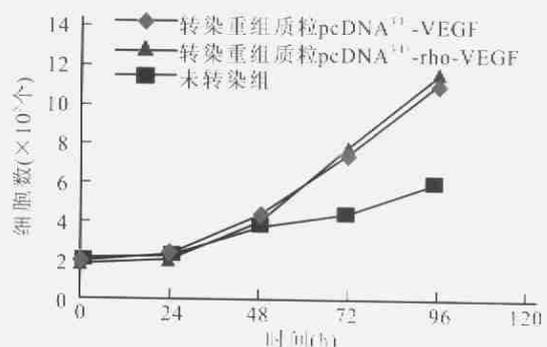


图 3 转染组及未转染组 ECV304 细胞生长曲线
Fig. 3 Growth curve of ECV304 cells in transfected and un-transfected group

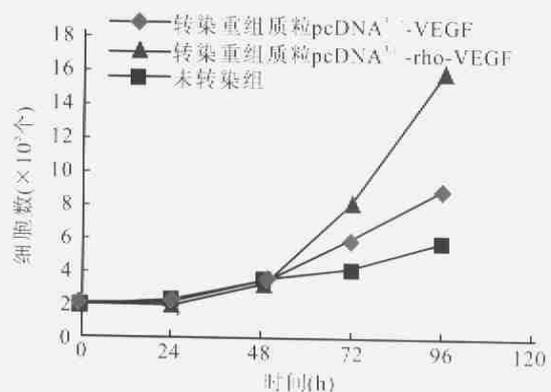


图 4 转染组及未转染组 D407 细胞生长曲线
Fig. 4 Growth curve of D407 cells in transfected and un-transfected group

3 讨论

目前普遍应用的基因研究载体目的基因的表达受载体自带启动子自发激活,表达不受限制。不能解决目的基因表达的位置、时机与动态水平的控制。与基因在动物体内的实际作用相差较大。

VEGF 是已知的与眼部新生血管性疾病新生血管的形成与发展关系最密切的因子之一^[3]。在糖尿病视



图 5 ECV304 细胞光学显微镜像。转染质粒 pcDNA^{3.1(+)}-VEGF₁₆₅ 组(5a)与转染质粒 pcDNA^{3.1(+)}-rho-VEGF₁₆₅ 组(5b)染色程度相同 (DAB, ×200) 图 6 D407 细胞光学显微镜像。转染质粒 pcDNA^{3.1(+)}-rho-VEGF₁₆₅ 组(6a)比转染质粒 pcDNA^{3.1(+)}-VEGF₁₆₅ 组(6b)染色明显加深 (DAB, ×200)

Fig. 5 Photograph of light microscope of ECV304 cells. The staining of cells transfected pcDNA^{3.1(+)}-rho-VEGF₁₆₅ (5a) is the same as the cells transfected pcDNA^{3.1(+)}-VEGF₁₆₅ (5b). (DAB, ×200) Fig. 6 Photograph of light microscope of D407 cells. The staining of cells transfected pcDNA^{3.1(+)}-rho-VEGF₁₆₅ (6a) is more stronger than cells transfected pcDNA^{3.1(+)}-VEGF₁₆₅ (6b). (DAB, ×200)

网膜病变患者的玻璃体和视网膜中, VEGF 的表达均有增加^[1]。有研究证实, RPE 细胞能表达一种组织专一性且高度保守的蛋白(RPE65 蛋白), 其全长相对分子质量约为 61×10^3 。其功能可能与视网膜色素上皮和(或)光感受器维生素 A 循环有关。我们选用的 rho 启动子即 RPE65 基因 5' 端(-655~+52 序列)调节序列, 包括了临近转录起点的保守序列 TATA 盒(-20~-27), 核因子(NF)-1(-178~-165), Octamer 盒(-498~-491), 2 个 E-box 连接序列(-84~-79, -257~-252)。另外, 部分区域与编码光感受器连接蛋白和视黄醇连接蛋白基因上游区域有同源性, 这两种蛋白均是视网膜特异性蛋白^[2-4]。本研究结果证明了 rho 启动子能特异性诱导 VEGF 基因在视网膜色素上皮细胞中的表达, 并且与载体自带的巨细胞病毒(CMV 启动子)启动子序列有协同作用, 引起 RPE 细胞的生长速度加快。在脐静脉内皮细胞, rho 启动子不能诱导其下游 VEGF 基因表达的增强。

综上所述, 我们成功地克隆了视网膜特异性启动子 rho 启动子, 并构建了视网膜特异性表达 pcDNA^{3.1(+)}-rho-VEGF₁₆₅ 重组真核表达载体, 在细胞水平对其功能进行了初步检测。视网膜特异性启动子可以引导其下游基因在视网膜组织中的特异性表达。若将其下游 VEGF 基因换成其他的与视网膜组织疾病相关的基因, 可以用于其它的视网膜组织疾病的研究。同时还可用于研究新生血管形成的拮抗基因, 有可能提供一种治疗视网膜新生血管性疾病而又最大限度的减少其毒副作用的新途径^[5]。我们所构建的真核表

达载体 pcDNA^{3.1(+)}-rho-VEGF₁₆₅ 为进一步研究 VEGF 与糖尿病视网膜膜疾病的关系奠定了一定的基础。然而, 在实验中我们也发现了一些问题, 比如转染后 VEGF 的蛋白表达极易丢失, 如何维持其长期高效的表达等; 这种 VEGF 表达的增加, 对于一些其他与新生血管形成有关的因素有无影响等, 还需要我们做进一步的研究。

4 参考文献

- 1 Chen CH, Chen SC. Evidence of the presence of a specific vascular endothelial growth factor in fetal bovine retina. *Exp Cell Res*, 1987;169:287-95.
- 2 Boulanger A, Liu S, Yu S, et al. Sequence and structure of the mouse gene for RPE65. *Mol Vis*, 2001;7:283-287.
- 3 Okamoto N, Tohe T, Hackett SF, et al. Transgenic mice with increased expression of vascular endothelial growth factor in the retina: a new model of intravitreal and subretinal neovascularization. *Am J Pathol*, 1997;151:281-294.
- 4 Campochiaro PA, Hackett SF. Ocular neovascularization: a valuable model system. *Oncogene*, 2003;22:3537-3548.
- 5 Nicoletti A, Kawase K, Thompson BA. Promoter analysis of RPE65, the gene encoding a 61-kDa retinal pigment epithelium-specific protein. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998;39:637-644.
- 6 Boulanger A, Redmond TM. Expression and promoter activation of the RPE65 gene in retinal pigment epithelium cell lines. *Curr Eye Res*, 2002; 23:368-375.
- 7 Boulanger A, Liu S, Henningsgard AA, et al. The upstream region of the RPE65 gene confers retinal pigment epithelium-specific expression in vivo and in vitro and contains critical octamer and E box binding sites. *J Biol Chem*, 2000;275:31274-31282.
- 8 Murawski CJ, Skinner SL, Stubbs AJ, et al. The renin-angiotensin system influences ocular endothelial cell proliferation in diabetes: transgenic and interventional studies. *Am J Pathol*, 2003;162:151-160.

(收稿日期:2003 年 11 月 25 日)

(本文编辑:朱敏)