

携带 sFlt-1 基因片段的慢病毒载体的构建及表达

吴 强 张 敏 宋蓓雯 贾丽丽 杜新华 江 丹

Construction of lentiviral expression plasmid carrying different fragments of sFlt-1 gene

Wu Qiang, Zhang Min, Song Beiwen, Jia Lili, Du Xinhua, Jiang Dan. Department of Ophthalmology, Affiliated Shanghai No. 6 People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

Abstract Objective sFlt-1, a soluble secreted variant of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-1 that possesses only its extracellular domain, is a specific endogenous inhibitor of VEGF. It is involved in retinal vasculogenesis. This study was to construct the lentiviral expression plasmids carrying different fragments of soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) gene. **Methods** The target fragments, sFlt-1(2-3) and sFlt-1(2-4), were amplified by RT-PCR from fresh human placenta. Then the fragments were subcloned into the lentiviral vector, pRRL-GFP to generate the lentiviral expression vector, pRRL/sFlt-1(2-3) and pRRL/sFlt-1(2-4). The corrected sFlt-1 gene fragments were confirmed by endoenzym digestion and sequencing. Recombinant lentiviruses were produced by HEK293T cells following the co-transfection of pRRL/sFlt-1 with the packaging plasmids pMDLg/pRRE, PRSV/REV and pMD2. G. The resulting recombinant lentiviruses Lenti. sFlt-1(2-3) and Lenti. sFlt-1(2-4) were then used to infect human retinal pigment epithelial cells strain (D407). sFlt-1 expression in retinal pigment epithelial cells was detected by RT-PCR and Western blotting analysis. **Results** The target gene fragments, sFlt-1 gene fragments including sFlt-1(2-3) and sFlt-1(2-4), were successfully cloned from fresh human placenta at 633 bp and 915 bp with the same values and sequence to their theory fragments. Restriction enzyme digestion and nucleotide sequence analysis verified that the corrected fragments were ligated into pRRL-GFP lentiviral vector. The recombinant lentiviruses carrying sFlt-1(2-3) or sFlt-1(2-4) could infect human retinal pigment epithelial cells, and expression of sFlt-1 was detected in retinal pigment epithelial cells. **Conclusion** The recombinant lentiviruses can deliver target sFlt-1 gene fragments to human retinal pigment epithelial cells and have high infection efficiency.

Key words sFlt-1; lentiviral vector; retinal neovascularization; gene therapy

摘要 目的 分别建立携带可溶性血管内皮生长因子受体-1(sFlt-1)不同基因片段的慢病毒表达质粒,为进一步研究 sFlt-1 不同基因片段表达的蛋白生物学功能奠定基础。**方法** 以人新鲜胎盘组织提取的 cDNA 为模板,进行 RT-PCR 扩增,制备 sFlt-1 基因片段 sFlt-1(2-3)和 sFlt-1(2-4)。扩增片段经限制性内切酶 BamHI 和 SalI 双酶切后,插入慢病毒载体 pRRL-GFP 中,构建慢病毒表达质粒 pRRL/sFlt-1(2-3)及 pRRL/sFlt-1(2-4),与慢病毒包装载体 pMDLg/pRRE、包被载体 PRSV/REV、pMD2. G 共转染人胚肾细胞(HEK293T),获得重组慢病毒 Lenti. sFlt-1(2-3)及 Lenti. sFlt-1(2-4),并感染人视网膜色素上皮(RPE)细胞,通过 RT-PCR 和 Western blotting 验证 Lenti. sFlt-1(2-3)及 Lenti. sFlt-1(2-4)在人 RPE 细胞的表达。**结果** 经酶切鉴定及基因测序证实 pRRL/sFlt-1(2-3)和 pRRL/sFlt-1(2-4)的序列与 GenBank 中的序列完全一致,并且包装成病毒后能有效感染人 RPE 细胞。**结论** 本实验成功构建了分别携带 sFlt-1 基因第 2-3 和第 2-4 免疫球蛋白样区域编码序列的慢病毒载体,包装成病毒后能有效感染人 RPE 细胞。

关键词 sFlt-1; 慢病毒载体; 视网膜新生血管; 基因治疗

分类号 R 774 Q 812 **文献标识码** A **文章编号** 1003-0808(2009)02-0137-04

慢病毒载体是近年发展起来的基因转移载体,其

最大的特点是能够在体内或体外高效地转染细胞,并且稳定表达。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是目前已知作用最强的促血管生成因子之一。可溶性血管内皮生长因子受体-1

本课题为上海市登山计划资助项目(064119543)

作者单位:200233 上海市交通大学附属第六人民医院眼科

通讯作者:吴强 (Email: wuyan559@hotmail.com)

(soluble fms-like tyrosine kinase-1, sFlt-1) 是 VEGF 受体-1 (fms-样酪氨酸激酶受体, fms-like tyrosine kinase, Flt-1) mRNA 胞外区不同剪接形成的可溶性形式, 因缺乏细胞内酪氨酸激酶区, 与 VEGF 结合后不产生信号转导, 所以可竞争性地抑制 VEGF 的作用。本研究携带 sFlt-1 基因片段的慢病毒载体的构建及表达。

1 材料与方 法

1.1 材 料

KOD-plus 酶、SalI 内切酶、BamHI 内切酶、pTA2 载体、T4DNA 连接酶(日本 Toyobo 公司); 质粒 DNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒(美国 Axygen 公司); 质粒 pRRL-GFP(慢病毒系统载体)、慢病毒包装载体 pMDLg/pRRE、包被载体 PRSV/REV、pMD2.G、人胚肾细胞(HEK293T)、人视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE) 细胞株(D407)(中国科学院生化研究所刘天津博士馈赠); 抗人 sFlt-1 单克隆抗体(美国 R&D 公司)。

1.2 制备 sFlt-1 基因片段及目的片段的克隆与鉴定

本研究经过本院伦理委员会批准。取人新鲜胎盘用 Trizol 法进行总 RNA 抽提, 经 RT-PCR 制备 sFlt-1 基因。分别选取人 sFlt-1 基因第 2-3 和第 2-4 免疫球蛋白样区域的编码序列设计引物, 上游 5' 引入 BamHI 酶切位点及 KDEL 序列, 下游 5' 引入 SalI 酶切位点及终止密码子。sFlt-1 (2-3) 上游引物序列: 5'-TAGGATCCATGGATACAGGTAGACCTTTCGTAGAG-3'。sFlt-1 (2-3) 下游引物序列: 5'-TAGTCGACTATTACAGCTCGTCCTTTTTTCGATGTTTCACAGTGA-3'。sFlt-1 (2-4) 上游引物序列: 5'-TAGGATCCATGGATACAGGTAGACCTTTCGTAGAG-3'。sFlt-1 (2-4) 下游引物序列: 5'-TAGTCGACTATTACAGCTCGTCCTTGGCCTTTTCGTAAATCTGG-3'。产物长度分别为 633 bp 和 915 bp。PCR 过程如下: 94 °C 变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 30 s, 68 °C 聚合延伸反应 30 s, 共循环 30 次, 再次 72 °C 聚合延伸反应 7 min, 于 4 °C 保存。将扩增产物分别以 SalI 及 BamHI 酶切位点连接入 pTA2 载体, 通过酶切、测序鉴定, 并将测序结果与 GenBank 中的序列进行对比。

1.3 携带 sFlt-1(2-3) 及 sFlt-1(2-4) 的慢病毒的构建

对测序正确的酶切产物进行 DNA 胶回收及纯化, 将回收产物以 SalI 位点及 BamHI 位点分别连入慢病毒载体 pRRL-GFP 质粒的多克隆位点(图 1), 将质粒 pRRL/sFlt-1(2-3) 和 pRRL/sFlt-1(2-4) 经过转化、筛选, 酶切鉴定, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外线下检测获得

的 DNA 片段。

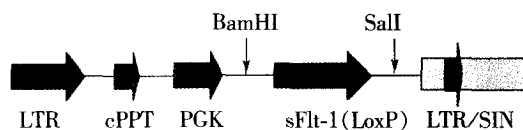


图 1 慢病毒载体 pRRL/sFlt-1 构建示意图

Fig. 1 The construction of lentiviral vector pRRL/sFlt-1

将慢病毒系统载体 pRRL-GFP、pRRL/sFlt1 (2-3) 和 pRRL/sFlt-1(2-4) 分别与慢病毒包装载体 pMDLg/pRRE、包被载体 PRSV/REV、pMD2.G 共转染 HEK293T 细胞, 离心、过滤后获得的培养液上清即携带 sFlt-1 基因片段的重组慢病毒 Lenti. sFlt-1 (2-3) 和 Lenti. sFlt-1 (2-4), 并通过逐孔梯度稀释测定法^[1]检测病毒滴度。

1.4 Lenti. sFlt-1 (2-3) 和 Lenti. sFlt-1 (2-4) 转染人 RPE 细胞的鉴定

复苏人 RPE 细胞株, 以 8×10^5 /皿接种于 60 mm 培养皿, 将分别携带 sFlt-1 (2-3) 和 sFlt-1 (2-4) 基因片段的重组慢病毒以 10MOI 感染人 RPE 细胞。同时设立未插入目的基因的空病毒 Lenti-GFP 为对照。3 d 后通过流式细胞仪检测报告基因 GFP 的表达量以反映病毒的转染效率。并通过 RT-PCR 法和蛋白印迹法检测感染细胞中 sFlt-1 (2-3) 和 sFlt-1 (2-4) 的表达。

收集转染细胞, 提取总 RNA, 经过反转录后, 以转染细胞 cDNA 为模板, 用目的基因引物扩增, PCR 反应程序如下: 94 °C 变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 聚合延伸反应 30 s, 共循环 25 次, 再次 72 °C 聚合延伸反应 7 min, 于 4 °C 保存。以人 GAPDH 作为内参, 引物设计如下: P1: 5'-gacccttcattgacctcaactaca-3'; P2: 5'-catgtggccatgaggtccaccac-3', 长 890 bp。反应产物均于 1% 的琼脂糖凝胶上电泳检测, 凝胶成相系统拍照。

同时将收集的另一部分转染细胞用 RIPA 裂解液提取总蛋白。取适量上述蛋白上样进行聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、封闭后, 放入一抗液中 (Flt-1, 以 1:500 稀释) 于 4 °C 孵育过夜。次日用辣根过氧化物酶标记的二抗液 (以 1:4000 稀释) 室温孵育 2 h, ECL 显色系统压片, 洗片后扫描。以 β -tubulin 作为内参。

2 结 果

2.1 sFlt-1(2-3) 及 sFlt-1(2-4) 基因片段的扩增

经 RT-PCR 扩增, 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 分别获得 633 bp 和 915 bp 的目的基因片段, 与两个片段理论

值一致(图 2)。

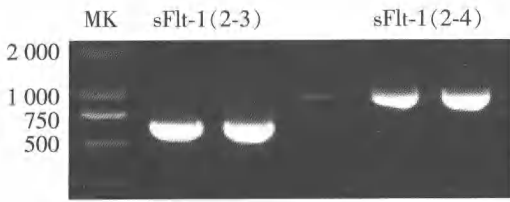


图 2 sFlt-1(2-3) 和 sFlt-1(2-4) 基因的扩增结果

Fig. 2 RT-PCR products of sFlt-1(2-3) and sFlt-1(2-4) gene fragments

2.2 酶切及测序鉴定结果

用 BamHI + SalI 双重酶切克隆载体,1% 琼脂糖凝胶电泳,紫外线下除了相应载体条带以外分别可见 2 个 DNA 片段,633 bp 片段和 915 bp 片段,与理论计算片段一致(图 3,4)。同时将测序结果的两个 sFlt-1 基因片段序列与 GenBank 中标准 Flt-1 序列(NM_002019)对比,显示为序列一致。病毒滴度通过逐孔梯度稀释测定法,检测得到病毒 Lenti-GFP、Lenti. sFlt-1(2-3) 和 Lenti. sFlt-1(2-4) 的滴度大致相同,约为 5×10^8 TU/mL。

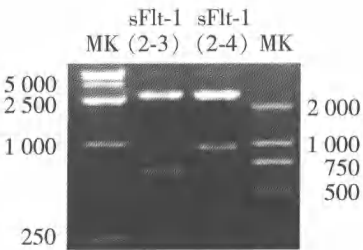


图 3 pTA2 载体连接产物 pTA2/sFlt-1(2-3) 和 pTA2/sFlt-1(2-4) 的酶切鉴定结果

Fig. 3 Identification of recombinant plasmids pTA2/sFlt-1(2-3) and pTA2/sFlt-1(2-4) with restrictive enzyme

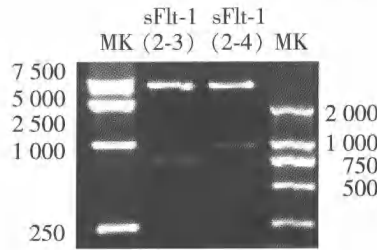


图 4 慢病毒载体连接产物 pRRL/sFlt-1(2-3) 和 pRRL/sFlt-1(2-4) 的酶切鉴定结果

Fig. 4 Identification of recombinant plasmids pRRL/sFlt-1(2-3) and pRRL/sFlt-1(2-4) with restrictive enzyme

2.3 鉴定 Lenti. sFlt-1(2-3) 和 Lenti. sFlt-1(2-4) 感染人 RPE 细胞后的表达

感染人 RPE 细胞 3 d 后 GFP 转染效率为 40% 左右。RT-PCR 和 Western blot 结果均显示,将重组 Lenti. sFlt-1(2-3) 和 Lenti. sFlt-1(2-4) 分别感染人 RPE 细胞后,能检测到 sFlt-1(2-3) 及 sFlt-1(2-4) mRNA 及蛋白的表达,证实 sFlt-1(2-3) 及 sFlt-1(2-4) 基因片段能被慢病毒介导感染人类细胞,并能转录翻译出蛋白质(图 5,6)。

3 讨论

sFlt-1 是 VEGF 受体 Flt-1 mRNA 胞外区选择性剪接形成的可溶性形式,在体内天然存在,仅有细胞外序列而无跨膜序列和细胞内序列,所以只具有与配体

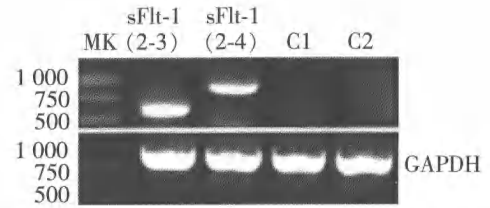


图 5 重组慢病毒 Lenti. sFlt-1(2-3) 和 Lenti. sFlt-1(2-4) 感染靶细胞后通过 RT-PCR 检测 sFlt-1(2-3) 及 sFlt-1(2-4) 基因片段的表达 C1、C2 是以感染空病毒 Lenti-GFP 的人 RPE 细胞 cDNA 为模板,分别以两个目的基因的引物进行 PCR 的结果

Fig. 5 RT-PCR products of sFlt-1(2-3) and sFlt-1(2-4) after infection

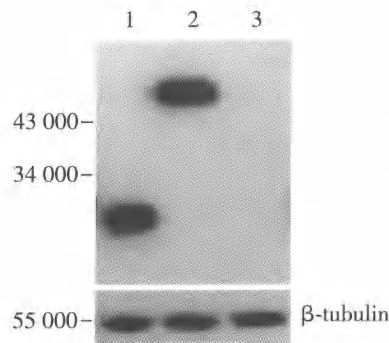


图 6 重组慢病毒感染 Lenti. sFlt-1(2-3) (1) 和 Lenti. sFlt-1(2-4) (2) 靶细胞后通过 Western blotting 检测 sFlt-1(2-3) 及 sFlt-1(2-4) 蛋白的表达 3 为感染空病毒 Lenti-GFP 的人 RPE 细胞的 Western blot 结果
Fig. 6 Western blot analysis of sFlt-1(2-3) and sFlt-1(2-4) proteins after infection 1: sFlt-1(2-3) 2: sFlt-1(2-4) 3: pRRL-GFP vector

VEGF 结合的能力,结合后不产生信号传导,故可与 VEGF 功能受体竞争结合配体,从而起到拮抗 VEGF 促新生血管形成等生物学效应的作用。sFlt-1 可拮抗 VEGF 的作用,主要通过两个机制,除了可高度结合 VEGF 竞争抑制 VEGF 与功能受体结合外,sFlt-1 还可与 VEGF 受体 Flt-1 及含激酶插入胞内区受体/胎肝激酶(kinase insert domain-containing receptor/fetal liver

kinase-1, KDR/Flk-1) 形成异源二聚体,从而阻滞 VEGF 正常的信号传导。sFlt-1 只具有 Flt-1 胞外区第 1 至第 6 免疫球蛋白样结构(Ig-like loop),其中 loop2-3 是发挥结合配体功能的主要功能区,而 loop4 虽然不直接参与和配体 VEGF 的结合,但是可协助并促进 sFlt-1 主要功能区域与 VEGF 的结合^[2]。因此,我们分别选择克隆 sFlt-1 基因的 loop2-3 和 loop2-4 区域,为今后探究与配体 VEGF 结合时最具亲和力的最小 sFlt-1 片段的作用奠定基础。同时,两个目的基因片段分别都引入了内质网滞留信号,即 KDEL 信号序列^[3]。携带 KDEL 信号后,sFlt-1 能在转染细胞的内质网上就与 VEGF 结合,将 sFlt-1 滞留于内质网管腔或内质网内膜上,大大增加了其与同源蛋白 VEGF 相互作用结合的机会,从而阻止细胞内源性 VEGF 的分泌^[4-6]。

基因转移是基因治疗的基础和关键。目前视网膜新生血管疾病的基因治疗大多采用腺病毒和腺相关病毒作为基因转移载体,然而腺病毒载体在体内不能实现目的基因长期稳定的表达,且反复应用易引起较严重的免疫反应,另外腺相关病毒载体插入基因片段较小,且转染效率低。新发展起来的慢病毒载体具有可以感染分裂期细胞和非分裂期细胞、转移外源性目的基因片段容量较大、目的基因表达时间长、不易诱发宿主免疫反应等优点,开始受到关注^[7-11]。

慢病毒作为基因转移载体在眼科视网膜新生血管疾病基因治疗中也有一定的优势。在诱导视网膜新生血管生成的病理条件如缺血缺氧状态下,除了视网膜血管内皮细胞及 RPE 细胞以外,视网膜神经细胞也会大量产生 VEGF^[12-13],促成视网膜新生血管的形成,由于慢病毒不仅可以转染分裂细胞并且可以转染非分裂细胞如神经细胞等,所以慢病毒可作为视网膜新生血管基因治疗的有效转移载体。此外,视网膜新生血管作为糖尿病视网膜病变、早产儿视网膜病变、年龄相关性黄斑病变等常见致盲性疾病共同的病理改变,其形成是机体对慢性缺血的一种适应性代偿反应。由于新生血管生长是一个较为长期的过程,采用新生血管抑制因子基因转移治疗上述疾病需要寻找有效稳定的载体。慢病毒能够介导外源基因在靶染色体上的稳定整合,从而可使转移的基因长期表达。因此慢病毒作为视网膜新生血管疾病基因治疗的转移载体可能具有很大的优势和潜力。

本实验选择 sFlt-1 的 loop2-3 区域和 loop2-4 区域编码序列设计引物,分别引入了慢病毒质粒 pRRL-GFP 质粒上的多克隆位点 SalI 和 BamHI 的基因序列以及内质网停滞信号 KDEL 序列,成功构建了慢病毒表达质粒 pRRL/sFlt-1(2-3)和 pRRL/sFlt-1(2-4)。经过酶切和测序鉴定,所携带的 sFlt-1 基因片段 sFlt-1(2-3)和 sFlt-1(2-4)序列分别与 GenBank 中标准 Flt-1 序列对比,结果完全一致,没有突变。慢病毒载体不易引起插入突变^[14],这是因为慢病毒在整合时,并不倾向于转录的起始位点,而是在基因在整个转录区域都可以整合,整合的慢病毒对启动子的激活机会非常低。然后将系统质粒与包装、包被质粒共转染人胚肾 293T 细胞,在细胞上清中收获只有 1 次感染能力而无复制能力的慢病毒 Lenti. sFlt-1(2-3)和 Lenti. sFlt-1(2-4)。病毒感染人 RPE 细胞后,能大量稳定地表达 sFlt-1(2-3)及 sFlt-1(2-4)的 mRNA 和蛋白。可见分别携带 sFlt-1 基因第 2-3 和第 2-4 免疫球蛋白样区域编码序列的慢病毒载体,在包装成病毒后能有效感染人类细胞,

为今后视网膜新生血管疾病的基因治疗研究提供了重要的依据。

慢病毒载体在眼科视网膜新生血管疾病基因治疗中仍处于起步阶段,可能具有较好的应用前景。另外由于长久以来治疗视网膜新生血管的方法,无论是实验室研究还是已经进入后期临床试验的研究,主要是集中于直接针对 VEGF 或针对其功能受体的,而较少关注 sFlt-1 的潜在性治疗意义,因此本实验为探究慢病毒介导 sFlt-1 基因片段对视网膜新生血管疾病的治疗作用以及比较 sFlt-1 基因 loop2-3 区域、loop2-4 区域作用的差别奠定了实验基础。

参考文献

- Liu T, Wu J, Huang Q, et al. Human amniotic epithelial cells ameliorate behavioral dysfunction and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model [J]. Shock, 2008, 29(5): 603-611
- Shibuya M. Structure and dual function of vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1) [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2001, 33(4): 409-420
- Lee MCS, Miller EA, Goldberg J, et al. Bi-directional protein transport between the Er and golgi [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004, 20: 87-123
- Luis AJ, Gonzalez MA, del Real G, et al. Novel interfering bifunctional molecules against the CCR5 coreceptor are efficient inhibitors of HIV-1 infection [J]. Mol Ther, 2003, 8: 475-484
- Steinberger P, Andris-Widhopf J, Buhler B, et al. Functional deletion of CCR5 by intracellular immunization produces cells refractory to CCR5-dependent HIV-1 infection and cell fusion [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 805-810
- Singh N, Amin S, Richter E, et al. Flt-1 intrareceptors inhibit hypoxia-induced VEGF expression in vitro and corneal neovascularization in vivo [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(5): 1647-1652
- Vigna E, Naldini L. Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy [J]. J Gene Med, 2000, 2(5): 308-316
- Bartoseh B, Cosset F L. Strategies for retargeted gene delivery using vectors derived from lentiviruses [J]. Curr Gene Ther, 2004, 4(4): 427-443
- Brun S, Faucon-Biguier N, Mallet J. Optimization of transgene expression at the posttranscriptional level in neural cells; implications for gene therapy [J]. Mol Ther, 2003, 7(6): 782-789
- Hawley RG. Progress toward vector design for hematopoietic stem cell gene therapy [J]. Curr Gene Ther, 2001, 1(1): 1-17
- Leurs C, Jansen M, Pollok KE, et al. Comparison of three retroviral vector systems for transduction of nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice repopulating human CD34+ cord blood cells [J]. Hum Gene Ther, 2003, 14(6): 509-519
- Naskar R, Thanos S. Retinal gene profiling in a hereditary rodent model of elevated intraocular pressure [J]. Mol Vis, 2006, 18(12): 1199-1210
- Xu J, Wang Y, Yang X, et al. Correlation of CD105 and vascular endothelial growth factor in laser-induced choroidal neovascularization in rats [J]. Yan Ke Xue Bao (Eng), 2006, 22(3): 166-183
- Sinn PL, Sauter SL, McCray PB, Jr. Gene therapy progress and prospects: development of improved lentiviral and retroviral vectors design, biosafety, and production [J]. Gene Ther, 2005, 12: 1089-1098

(收稿:2008-03-20 修回:2008-12-23)

(本文编辑:胡纯钢 刘 艳)