

# 人血管内皮生长因子的克隆表达及活性鉴定

李子俊<sup>1</sup>, 胡品津<sup>1</sup>, 余细勇<sup>2</sup>

(1. 中山医科大学附属第一医院消化内科, 广东 广州 510080; 2. 广东省心血管研究所, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】克隆人血管内皮生长因子 165 基因, 并测定蛋白质的表达及鉴定其活性。【方法】用 PCR 法从人心脏 cDNA 文库中钓取目的基因 VEGF165, 插入质粒 PUC19 中并测序鉴定。构建真核表达重组质粒 AdtrackCMV-VEGF165 转染 293 细胞, 用 RNA 斑点杂交和 Western blot 方法检测 VEGF165 基因表达, 并通过 Miles 试验检测 VEGF165 蛋白活性。【结果】PCR 产物为 582 bp, 测序结果表明其序列正确, 在 RNA 和蛋白水平检测到 VEGF165 基因表达, VEGF165 蛋白相对分子质量为 22 ku, 具有生物学活性。【结论】成功地克隆了有表达生物学活性的 VEGF 165 基因。

**关键词:** 内皮生长因子; 克隆; 分子; 基因表达

中图分类号: Q786 R392 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2001)03-0177-03

## Cloning, Expression and Activity Detection of Vascular Endothelial Growth Factor

LI Zi-jun<sup>1</sup>, HU Ping-jin<sup>1</sup>, YU Xi-yong<sup>2</sup>

(1. Department of Gastroenterology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China; 2. Guangdong Cardiovascular Institute, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】To clone, express and detect activity of VEGF165. 【Methods】Using human heart cDNA library as template, amplified the VEGF gene by PCR. The PCR product was ligated to PUC19 plasmid and sequenced. A eukaryotic expression plasmid AdtrackCMV harbouring VEGF165 was constructed., then transformed into 293 cells. RNA dot blot and Western blotting were performed to demonstrated whether the tranfermants expressed VEGF165 at mRNA and protein level respectively. Furthermore the bio-activity of VEGF165 was preliminarily detected with Miles test. 【Results】Sequence of 582bp VEGF165 cDNA was proved correct by sequencer analysis. The expression of VEGF165 mRNA was identified by RNA dot blot, Western blotting indicated that the molecular weight of VEGF165 protein was 22ku. VEGF165 also is of vascular permeability. 【Conclusion】VEGF165 gene has been successfully cloned and expressed, which makes a basis for the further study *in vivo*.

**Key words:** endothelial growth factors; clone, molecular; gene expression

经颈静脉肝内门腔静脉分流术(transjugular intrahepatic portosystemic shunts, TIPS)是一项专门治疗门脉高压及并发症的介入技术,其术后分流道狭窄或闭塞率高,严重阻碍了TIPS的临床应用和发展<sup>[1]</sup>。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)可特异地作用于血管内皮细胞,强烈地促进其增殖,并且防止血小板的粘附和

血栓的形成,进而显著地抑制内膜下的和再狭窄发生<sup>[2]</sup>。本研究克隆了VEGF基因,构建真核表达质粒AdtrackCMV,采用阳离子脂质体Lipofectamin介导VEGF基因体外转导293细胞,并通过RNA斑点杂交和Western blot法分别检测VEGF的mRNA和蛋白表达,为转VEGF基因促进血管内皮细胞生长,进而防治分流道狭窄作准备。

收稿日期: 2000-09-13

基金项目: 广东省科委重点攻关科题(A1998014)

作者简介: 李子俊(1964-)男,江西九江人,主治医师,博士生。

## 1 材料和方法

### 1.1 质粒, 细胞, 试剂

含有绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, GFP)筛选基因的真核表达载体 pAdtrackCMV 为加拿大陈火胜博士惠赠, 293 细胞购自美国 ATCC 公司。阳离子脂质体 Lipofectamin 购自 Gibicol 公司, VEGF 鼠抗人的单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。Western blot 发光底物显迹液购自 Promega 公司。

### 1.2 VEGF165 的克隆及测序

用 PCR 法从人心脏 cDNA 文库中钓取目的基因 VEGF165。PCR 引物为: 5' TAGTCGACAT-GAACTTCTCTGCTG3'; 5' ATAAGCTTTCAC-CGCCTT3'。PCR 反应条件: 95 °C 变性 1 min; 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 5 min, 共 41 个循环; 16 °C 延伸 30 min。用 *Hind* III 和 *Sal* I 酶切测序质粒 PUC19 和 PCR 产物 VEGF165, 再用 T4 连接酶连接, 将连接后的产物转化 *E. coli* DH<sub>5a</sub>, 筛选鉴定含重组质粒 PUC19-VEGF165 的阳性菌株, 送于大连宝生生物公司测序, 结果与 GENE BANK 的 VEGF165 序列比较。

### 1.3 AdtrackCMV-VEGF165 真核表达质粒的构建

质粒 PUC19-VEGF165 和真核表达质粒 Ad-trackCMV 分别用 *Hind* III 和 *Sal* I 双酶切, 回收纯化目的基因片段 VEGF165 和线性化的质粒 Ad-trackCMV, 两者再用 T4 DNA 连接酶连接。将产物转化 *E. coli* DH<sub>5a</sub>。提取质粒分别用 *Hind* III 和 *Sal* I 酶切, 进行筛选鉴定。

### 1.4 AdtrackCMV-VEGF165 转染 293 细胞

用 Lipofectamin 将 AdtrackCMV-VEGF165 导入 293 细胞。转染步骤按说明书进行。转染 48 h 后于倒置荧光相差显微镜下观察 293 细胞有无绿色荧光。

### 1.5 VEGF165 mRNA 的检测

质粒 PUC19-VEGF 用 *Hind* III 和 *Sal* I 酶切, 回收纯化 VEGF 基因片段作为 DNA 探针, 对细胞总 RNA 进行斑点杂交分析。随机引物标记探针及核酸杂交按 Roche 公司地高辛标记及检测试剂盒说明书进行。

### 1.6 VEGF165 蛋白的检测

用 Western blot 法检测 293 细胞中 VEGF165 蛋白的表达。转染 48 h 后, 采用三去污裂解液裂

解并提取 293 细胞的蛋白, 同时取未转染的 293 细胞蛋白作为阴性对照。在 100 g/L SDS-PAGE 中电泳, 然后转至 PVDF 膜, 用 1:200 VEGF 鼠抗人的单克隆抗体为一抗, 辣根过氧化物酶(HRPO)抗 Ig 抗体偶连物为二抗, 充分洗膜后, 加入发光底物显迹液, 曝光显影。

### 1.7 Miles 法<sup>[3]</sup> 检测 VEGF165 蛋白活性

200 g 左右的 SD 大白鼠, 由尾静脉注射 5 g/L 的 evens blue 1 mL, 30 min 后, 取上述转染细胞的培养上清, 分别以 100 μL、50 μL 及 25 μL, 用生理盐水稀释至 100 μL, 皮下注射于大白鼠去毛背部; 注射皮丘直径大小为 1.0 cm, 同时取未转染的 293 细胞的培养上清和生理盐水作为对照。15 min 后, 观察皮下有无蓝斑出现及其范围和着色强度。

## 2 结果

### 2.1 克隆 VEGF165 的序列测定

用 PCR 法获得的 VEGF165 cDNA 片段为 582 bp, 将其插入测序质粒 PUC19, 用 *Hind* III 和 *Sal* I 酶切重组 PUC19-VEGF165, 经琼脂糖凝胶电泳分析, 得到两个片段, 分别为 582 bp 的 VEGF165 cDNA 和 2.68 kb PUC19 线性质粒, 结果与理论值相符(图 1)。VEGF165 测序的结果与 GENE BANK 的 VEGF165 序列比较, 完全一致。

### 2.2 AdtrackCMV-VEGF165 载体鉴定

pAdtrackCMV 是带有绿色荧光蛋白 GFP 作为筛选标志的大小为 9.92 kb 真核表达载体。按照上述的克隆策略, 成功地获得了含 VEGF cDNA 的重组质粒 AdtrackCMV-VEGF165(图 1)。

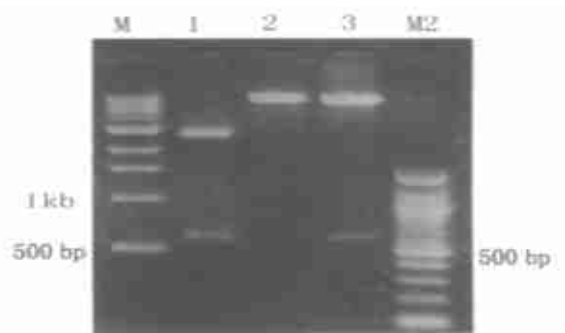


图 1 重组质粒限制性酶切电泳图谱

Fig. 1 The electrophoresis pattern of restrictive fragments of recombinant plasmid

M 1: 1 kb ladder marker; 1: PUC19-VEGF165 cut by *Sal* I and *Hind* III; 2: pAdtrackCMV; 3: pAdtrackCMV-VEGF165 cut by *Sal* I and *Hind* III; M 2: 100 bp ladder marker

### 2.3 转染的 293 细胞的观察

转染 48 h 后于倒置荧光相差显微镜下观察 293 细胞,可见在黑色的背景下散在分布发有绿色荧光的 293 细胞(图 2),表明已成功地将质粒转入 293 细胞并获得荧光蛋白表达。

### 2.4 转染 293 细胞中 VEGF165 mRNA 的检测

斑点杂交分析的结果表明:在等量总 RNA 点膜的条件下,转染的 293 细胞的杂交信号明显强于未转染的 293 细胞(图 3)。

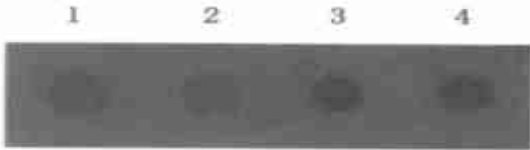


图 3 VEGF165 mRNA 的检测

Fig. 3 Detection of VEGF165 mRNA

1: 20  $\mu$ g RNA of 293 cell; 2: 40  $\mu$ g RNA of 293 cell; 3: 20  $\mu$ g RNA of 293 cell transfected pAdtrackCMV-VEGF165; 4: 40  $\mu$ g RNA of 293 cell transfected pAdtrackCMV-VEGF165

### 2.5 转染的 293 细胞中 VEGF165 蛋白表达鉴定

Western blot 检测结果表明:转染 VEGF165 基因的 293 细胞在 22 ku 处有明显的阳性条带,而未转染的 293 细胞则为阴性(图 4)。

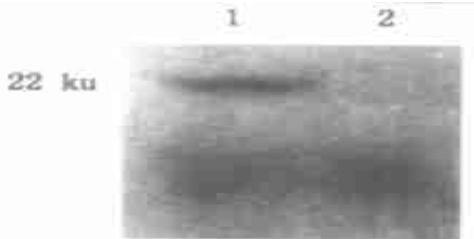


图 4 VEGF165 蛋白的检测

Fig. 4 Detection of VEGF165 protein

1: 293 cell transfected pAdtrackCMV-VEGF165; 2: 293 cells

### 2.6 VEGF165 表达蛋白的活性鉴定

Miles 试验的结果显示:5 g/L evens blue 注射 30 min 后,用转染 AdtrackCMV-VEGF165 细胞培养上清 100  $\mu$ L 局部皮下注射,10 min 左右见其所形成的皮丘变为蓝色。当细胞培养上清浓度连续成倍稀释时,出现蓝斑的时间也相应延长,蓝斑范围缩小,而注射未转染的 293 细胞的培养上清和生理盐水的对照组,未有蓝斑出现(图 5)。结果说明转染 AdtrackCMV-VEGF165 细胞培养上清有血管通透性作用。

## 3 讨论

生,它是一种特异功能的 EC 促分裂剂,可以促进内皮新生和血管生长,但不能促进其它类型细胞增殖。这是 VEGF 的一个显著的特点。此外,VEGF 还是促进纤溶酶活性,防止血栓形成,增加毛细血管通透性和舒张血管的作用,因此 VEGF 在治疗人体缺血性心血管疾病和防止血管介入术后血管再狭窄中具有十分重要的意义<sup>[4]</sup>。由于 VEGF 蛋白的应用存在全身副作用,需要反复应用,价格较质粒 DNA 昂贵,为此,目前倾向于以 VEGF 基因代替 VEGF 蛋白行基因治疗<sup>[5]</sup>。

本研究由人心脏 cDNA 文库中钓取 582 bp VEGF165 cDNA,并将其插入测序质粒 PUC19 中进行测序,结果显示其核苷酸序列与 GENE BANK 的 VEGF165 的序列完全一致。构建的真核表达载体 pAdtrackCMV-VEGF165 由于含有 GFP 筛选标志,结果在转染 293 细胞 48 h 后,观察到约有 30% 的 293 细胞发出绿色荧光,说明转染成功且转染率较高。采用 RNA 斑点杂交和 Western blot 法在 RNA 水平和蛋白水平均检测到 VEGF 的表达。在 SDS-PAGE 蛋白电泳中,由于 VEGF165 蛋白的二硫键被还原,而得到相对分子质量为 22 ku 的单亚基团的 VEGF165 蛋白。通过收集转染 VEGF 细胞的培养上清,进行血管通透性实验,证明转染了 pAdtrackCMV-vegf165 的 293 细胞能产生分泌型的 VEGF165 蛋白,且具有生物学活性,从而为下一步进行动物实验奠定基础。

(本文图 2, 5 见插页 2)

### 参考文献:

- [1] 朱应合,徐克,吴恩惠. Tipss 分流道再狭窄与再闭塞的研究进展[J]. 国外医学临床放射学分册,1997,2(20):72.
- [2] Van Belle E, Tio F O, Confinhal T, *et al.* Stent endothelialization, time course impact of local catheter delivery, feasibility of recombinant protein administration, and response to cytokine expedition[J]. Circulation, 1997, 95(2): 438.
- [3] Miles A A, Miles E M. Cascular reactions to histomine, histamine liberation and leukotaxine in the skin of guinea pigs[J]. J Physiol, 1952, 118(4): 228.
- [4] 高炜,霍勇,朱果美,等. 再狭窄的细胞和分子生物学[J]. 中国介入心脏病学杂志,1997,5(2): 84.
- [5] 上野光. 血管新生疗法-基因治疗的展望[J]. 日本医学介绍,1999,20(5): 200.

## 人血管内皮生长因子的克隆表达及活性鉴定 (正文见第 177 页)

Cloning, Expression and Activity Detection of Vascular Endothelial Growth Factor (Text in page 177)



图 2 转染 pAdtrack CMV - VEGF165 的 293 细胞  
Fig. 2 The picture of 293 cells transfected with pAdtrack-CMV - VEGF165 glowing green fluorescence

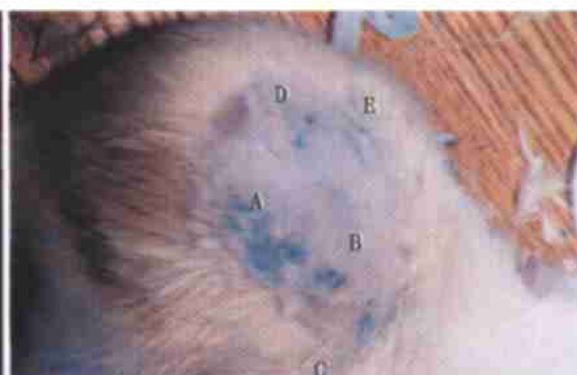


图 5 VEGF 165 蛋白活性的检测  
Fig. 5 Detection of bioactivity of VEGF165 with Miles test A, B, C: 100  $\mu$ L, 50  $\mu$ L and 25  $\mu$ L culture supernatant from 293 cell transfected pAdtrackCMV - VEGF165 respectively; D: 100  $\mu$ L culture supernatant from 293 cell; E: 100  $\mu$ L normal saline

## 支架植入对兔血管平滑肌细胞 PCNA 和 Cyclin E 表达及细胞凋亡的影响 (正文见第 180 页)

Effect of Stent Implantation on the Expression of PCNA and Cyclin E and Apoptosis in Rabbit Vascular Smooth Muscle Cells (Text in page 180)

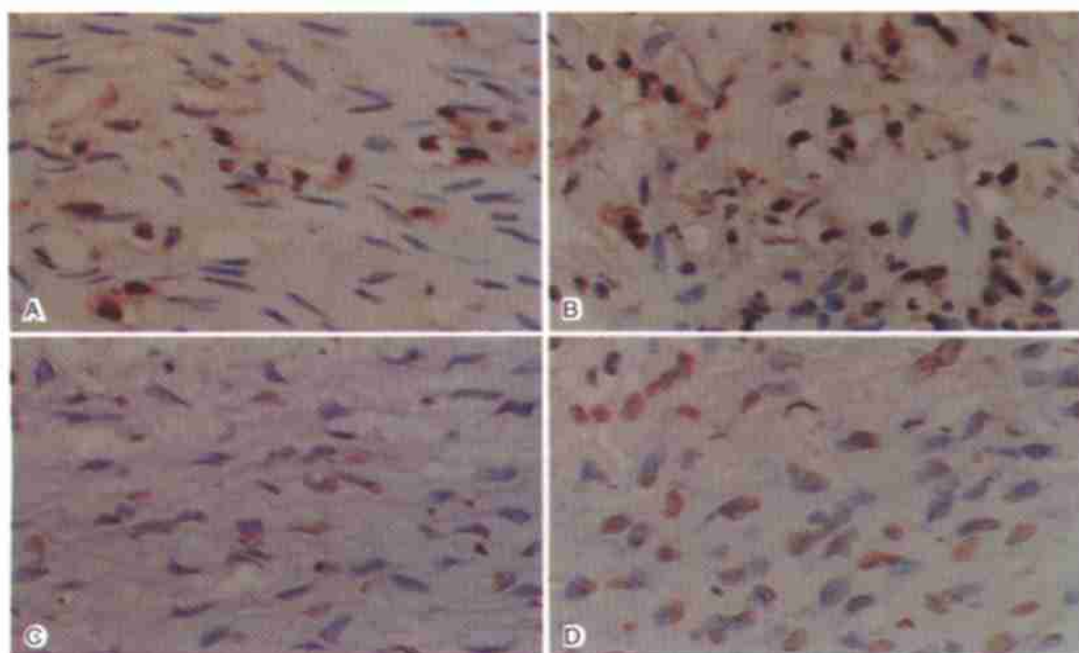


图 1 术后第 7 天球囊组和支架组中膜平滑肌细胞增殖与凋亡的表达  
Fig. 1 The expression of proliferation and apoptosis in media smooth muscle cells of balloon group and stent group on 7th day  
A: The expression of PCNA in balloon group (LSAB  $\times$  400); B: The expression of PCNA in stent group (LSAB  $\times$  400); C: Apoptosis in balloon group (TUNEL  $\times$  400); D: Apoptosis in stent group (TUNEL  $\times$  400)