

· 核素报告基因显像 ·

$^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -亚锡葡庚糖酸钠结合 GGC 序列 监测基因治疗的实验研究

张国鹏 兰晓莉 何勇 陈铨 张永学

【摘要】 目的 构建以金属结合肽(双甘氨酸半胱氨酸,即 GGC 序列)为核素报告基因、人 VEGF₁₆₅ 为治疗基因的重组腺病毒载体,以 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -GH 为报告探针,探讨该报告系统监测治疗基因表达的可行性。方法 pcDNA3-VEGF₁₆₅ 质粒线性化后,将金属结合肽 GGC 序列连于 VEGF₁₆₅ 基因 C 端,通过内部核糖体切入位点(IRES)连接增强型绿色荧光蛋白(EGFP),构建重组腺病毒载体 Ad5-VEGF₁₆₅GGCmotif-IRES-EGFP (Ad5-VIE),同时构建腺病毒包装 EGFP (Ad5-EGFP)为对照。以不同感染复数(MOI=0,10,25,50,100) Ad5-VIE 感染大鼠骨髓间充质干细胞(MSC)后,用 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -GH 为报告探针,研究感染细胞摄取动力学(30,60,90 和 120 min)情况,以检测 GGC 序列在 MSC 中的表达,并与实时定量 PCR、Western-blot 蛋白印迹、免疫组织化学等方法鉴定的 VEGF₁₆₅ 表达进行对比分析。通过荧光显微镜及实时定量 PCR 检测 EGFP 在细胞中的表达。采用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理,组间比较运用独立样本成组 *t* 检验、*q* 检验和直线(Pearson)相关分析。结果 以 Ad5-VIE 感染 MSC 后,不同 MOI 摄取实验结果示细胞对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -GH 的摄取率随病毒 MOI 的增加而逐渐增加($r^2 = 0.86, P < 0.05$),并且在 MOI=100 时达到(7.94 ± 0.75)%;不同时间摄取实验示随 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -GH 孵育时间延长,细胞摄取率逐步增高,至 120 min 时达到(7.72 ± 0.22)%。Ad5-VIE 感染组与 Ad5-EGFP 感染组摄取率在各个不同时间点差异均有统计学意义($t = 15.10 \sim 54.92, P$ 均 < 0.05)。在 mRNA 水平上,VEGF₁₆₅ 及 EGFP 表达均随病毒 MOI 增加而增加($r^2 = 0.99, P < 0.05$)。不同 MOI 下细胞对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -GH 的摄取与 VEGF₁₆₅ 蛋白表达呈较好的相关性($r^2 = 0.90, P < 0.05$)。免疫组织化学检查结果表明人 VEGF₁₆₅ 目的基因在 MSC 中成功表达。荧光显微镜下可以观测到被感染细胞中的 EGFP 蛋白。结论 成功构建的重组腺病毒系统 Ad5-VIE 感染 MSC 对 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -GH 的摄取与 VEGF₁₆₅ 表达呈正相关。以 GGC 多肽为报告基因可以监测治疗基因 VEGF₁₆₅ 的表达,为核素报告基因显像提供了理论依据。

【关键词】 甘氨酸;半胱氨酸;肽类;基因;报告;葡庚糖酸盐;锝;大鼠

The experimental study of monitoring gene-based therapy with the binding of diglycylcysteine binding motifs and $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -glucoheptonate ZHANG Guo-peng, LAN Xiao-li, HE Yong, CHEN Quan, ZHANG Yong-xue. Department of Nuclear Medicine, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Hubei Key Laboratory of Molecular Imaging, Wuhan 430022, China

Corresponding author: LAN Xiao-li, Email: hzslx@163.com;ZHANG Yong-xue, Email: zhyx1229@163.com

【Abstract】 Objective To evaluate the feasibility of monitoring the gene expression of VEGF₁₆₅ via the diglycylcysteine (GGC) reporter gene system by reporter probe of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -GH. **Methods** DNA fragments encoding GGC binding motifs were prepared by PCR and positioned at the C end of VEGF₁₆₅ gene after the linearization of pcDNA3-VEGF₁₆₅ plasmid. A replication-defective adenovirus vector Ad5-VEGF₁₆₅ GGC motif-internal ribosomal entry site (IRES)-enhanced green fluorescent protein (EGFP) (Ad5-VIE) was constructed, with a cytomegalovirus (CMV) early promoter driving the expression of VEGF₁₆₅ gene, GGC motif and EGFP, under the aid of an IRES. A replication-defective adenovirus carrying the Ad5-EGFP was used as the control. Mesenchymal stem cells (MSC) were infected with the recombinant adenovirus at a multiplicity of infection (MOI) from 0 to 100 infectious units (0,10,25,50,100). The cellular uptake of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -GH in infected MSC were then studied at 30, 60, 90 and 120 min. VEGF₁₆₅ was detected by quanti-

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-9780.2011.02.014

基金项目:国家自然科学基金(30571816,30772208,30830041)

作者单位:430022 武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院核医学科、湖北省分子影像重点实验室

通信作者:兰晓莉,Email: hzslx@163.com;张永学,Email: zhyx1229@163.com

本文直接使用的缩略语:VEGF(vascular endothelial growth factor),血管内皮生长因子;GH(glucoheptonate),葡庚糖酸钠;PBS(phosphate-buffered solution),磷酸盐缓冲液

tative reverse transcriptase real-time PCR (RT-PCR), Western-blot, and immunohistochemistry. EGFP was observed by RT-PCR and fluorescence microscopy. The correlation analysis was studied between the cellular uptake of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -GH and the expression of VEGF₁₆₅. SPSS 13.0 was applied for statistical analysis. Independent samples *t*-test, *q*-test and Pearson correlation coefficient were used. **Results** After infected with different viral titer of Ad-VIE, the cellular uptake of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -GH increased with the increasing virus titer ($r^2 = 0.86, P < 0.05$), with the peak rate (7.94 ± 0.75)% at MOI = 100. In time-dependent uptake study, the cellular uptake rates increased rapidly with the time extension, and the highest uptake occurred at 120 min with the peak uptake rate (7.72 ± 0.22)%. The uptake rates of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -GH in Ad5-VIE-infected cells were significantly higher than those of Ad5-EGFP-transfected cells at all time points ($t = 15.10 - 54.92$, all $P < 0.05$). The VEGF₁₆₅ and EGFP mRNA levels increased with increasing virus titer, and the VEGF₁₆₅ mRNA correlated well with the EGFP mRNA ($r^2 = 0.99, P < 0.05$). After infected with different MOI of Ad5-VIE, good relationship was found between the cellular uptake of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -GH and the expression of VEGF₁₆₅ protein in MSC ($r^2 = 0.90, P < 0.05$). Immunohistochemistry showed VEGF₁₆₅ protein expressed obviously at Ad5-VIE-infected MSC, and the EGFP was observed by fluorescence microscopy. **Conclusions** The cellular uptake of $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -GH in Ad5-VIE-infected MSC are well correlated with the expression of VEGF₁₆₅ *in vitro*. The expression of therapeutic gene VEGF₁₆₅ can be monitored by the GGC peptide expression.

【Key words】 Glycine; Cysteine; Peptides; Gene, report; Glucoheptonate; Technetium; Rats

基因治疗在一些难治性疾病中具有良好的临床应用前景,但必须有有效手段监测治疗基因表达程度、持续时间、是否过表达等。核素报告基因显像技术是一种在体水平无创、反复、定量监测治疗基因的方法^[1,2]。本研究构建含有报告基因双甘氨酸半胱氨酸 (Gly-Gly-Cys, GGC) 序列和治疗基因人 VEGF₁₆₅ 的重组腺病毒载体 Ad5-VEGF₁₆₅ GGC motif-内部核糖体切入位点 (internal ribosomal entry site, IRES)-增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP), 即 Ad5-VIE, 使其感染骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 中。以 GGC 序列为报告基因, $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -GH 可以与 GGC 肽通过转整合作用相结合, 通过 $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -GH 在 MSC 的摄取动力学研究, 观察 GGC 与 VEGF₁₆₅ 表达的相关性, 探索 GGC 为报告基因监测治疗基因表达的可行性, 现报道如下。

材料与方法

一、材料

1. 雄性 SD 大鼠 (无特殊病原体级)。鼠龄为 4 ~ 6 周龄, 体质量 150 ~ 200 g, 由华中科技大学同济医学院动物中心提供。

2. 试剂。DMEM-F12 干粉培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司; 人淋巴细胞 Ficoil 分离剂购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司。Opti-MEM 无血清培养基及 Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司; 亚锡 GH 试剂盒 (含 GH 8 mg, 氯化亚锡 0.08 mg) 购自江苏省原子医学研究所江原制药厂; $\text{Na}^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4$ 新鲜洗脱液; 由 ^{99}Mo - $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 发生器制备, 北京原子高科股份有限公司提供; 快速薄层层析硅胶纸购自美国 Gelman Science 公司; 反转录试剂盒 (2 ×) 购自立陶

宛 Fermentas 公司; 实时定量 PCR 试剂盒 (SYBR Green I realtime PCR master mix) 购自日本 Takara 公司; 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 由美国 Bio-Rad 公司提供; 聚偏二氟乙烯膜购自美国 Bio-Rad 公司; 鼠抗人 VEGF₁₆₅ 单克隆抗体购自美 Abcom 公司; 聚乙二醇辛基苯基醚 (Triton X-100) 购自美国 Gibco 公司; 兔抗 β -actin 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 兔抗 CD₃₄、CD₄₄ 多克隆抗体和链霉素和素-生物素-过氧化物酶复合物试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司。增强型化学发光剂 (enhanced chemo-luminescence, ECL) 自显影试剂盒购自杭州碧云天生物技术研究所。

3. 仪器。GC-1200 γ 放射免疫计数器购自中国科技大学创新股份有限公司中佳分公司; 实时定量 PCR 仪为美国 Applied Biosystems 7500 系统。

二、方法

1. Ad5-VIE 的构建与鉴定。由北京本元正阳基因技术有限公司协助完成。首先化学合成 GGC 序列: 为含多个 GGC 的基序 (motif), 5' 端磷酸化的单链 DNA, 正义链: 5'-³P GGAGGAGGAGGATGTGGA-GGAGGATGTTGAGGATCC-3' 与其反义链: 5'-GGATCCTCAACATCCTCCTCCACATCCTCCTCCTCC-3' 退火成双链 DNA, 其次将 pcDNA3-VEGF₁₆₅ 质粒用限制性内切酶 NotI 线性化后, 加绿豆芽核酸酶 0.5 U, 核酸酶 S1 0.5 U 在 37 °C 分别消解 1, 1.5, 2, 2.5 和 3 min, 测序后筛选到 2 个终止码被删除的阳性管, 纯化后与第 1 步所获得的磷酸化双链 DNA 进行钝端连接 18 h, 以此为模板进行 PCR, 上游引物为 5'-GGAATTCATGAACCTTCTGCTGTCTTG-3', 下游引物为通用引物 BGH-R; 5'-CAAACAACAGATGGCTG-

GCAAC-3', 之后将 PCR 产物用 DNA 胶回收试剂盒纯化(即 VEGF₁₆₅ GGCmotif), 随后经过一系列酶切及连接反应, 构建同源重组腺病毒骨架质粒 pDC316-VEGF₁₆₅ GGCmotif-IRES-EGFP。重组质粒经 PCR、酶切、测序等鉴定证实正确, 并应用 HEK-293 细胞包装、纯化, 形成 Ad5-VIE 病毒。构建以腺病毒包装的 Ad5-EGFP 为对照组, 其所用质粒载体为 pDC316。

2. MSC 培养。SD 大鼠颈椎脱臼处死, 于体积分数 75% 的乙醇中浸泡 20 min, 无菌条件下分离其股骨和胫骨, 剪开骨髓端, 用无血清 DMEM/F12 培养基反复冲洗骨髓腔, 将骨髓冲洗液缓慢加入预先装有质量浓度为 1.077 g/ml 的 Ficoll 分离剂的离心管中, 使液面分界清楚, V(悬液): V(离心液) = 1: (1~2), 室温条件下 2000 r/min 离心 20 min(离心半径 17.2 cm), 无血清 DMEM/F12 培养基洗涤 2 次, 每次以 800 r/min 离心 10 min(离心半径 17.9 cm), 弃上清后, 加入含体积分数 15% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基, 吹打均匀制成细胞悬液, 以 3×10^5 个细胞/ml 的密度接种于 25 cm² 玻璃培养瓶中, 置 37 °C、体积分数 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。3~4 d 首次换液, 以后每 3 天换液 1 次。细胞达 70%~80% 融合时传代培养。取第 4 代细胞 CD₃₄、CD₄₄ 抗体, 用免疫组织化学法染色鉴定细胞。

3. Ad5-VIE 感染 MSC。取 2~4 代 MSC 以 2×10^5 个/孔接种于 24 孔板, 培养 24 h 后, 细胞融合度达 70%~80%。取其中 3 孔进行细胞计数, 其余孔吸去培养基, 以 PBS 洗涤细胞 2 次, 每孔加入无血清培养基 Opti-MEM 150 μl(盖满细胞表面即可), 将特定感染复数(multiplicity of infection, MOI)的 Ad5-VIE 加入培养孔中, 混匀, 每 15 min 1 次, 37 °C 轻柔持续晃动感染 2 h 后, 补足完全培养基至 500 μl/孔, 继续培养 48 h。

4. ⁹⁹Tc^m-GH 的制备与鉴定。按照试剂盒说明书制备。在试剂盒中加入新鲜淋洗的 Na⁹⁹Tc^mO₄ 洗脱液 740 MBq (<1 ml), 振摇混匀, 室温下静置 20 min。放化纯达到 90% 以上。

5. 感染 Ad5-VIE 的 MSC 摄取 ⁹⁹Tc^m-GH。实验一(细胞摄取动力学研究): 实验组以 Ad5-VIE 感染细胞(MOI = 100), 同时设对照组(以 Ad5-EGFP 感染细胞, MOI = 100)。感染 48 h 后进行细胞摄取实验: 每孔细胞以 PBS 洗涤 2 次, 加入 300 μl 新鲜培养基。加入 ⁹⁹Tc^m-GH 370 kBq/孔, 于 37 °C 分别孵育 30, 60, 90 和 120 min 后取样(每个时间点取 3 个平

行孔)。取样时吸去每孔中放射性培养基, 并用 PBS 洗涤 2 次, 然后以 1 mol/L NaOH 溶液 400 μl 裂解贴壁细胞, 收集各孔放射性培养基及细胞裂解产物至测量管, 测量各管放射性, 计算细胞摄取率。实验二(感染剂量-放射性摄取研究): 以 Ad5-VIE 和 Ad5-EGFP 分别感染细胞, MOI 分别为 0, 10, 25, 50, 100, 感染 48 h 后加入 ⁹⁹Tc^m-GH, 于 37 °C 培养 2 h 后进行细胞摄取实验, 余步骤同上。

6. 感染 Ad-VIE 后 MSC 表达 VEGF₁₆₅ 的反转录实时定量 PCR 鉴定。将 MSC 按 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板中, 细胞培养 24 h 后, 以不同 MOI(MOI = 0, 10, 25, 50, 100, 250, 500) Ad5-VIE 感染 MSC。48 h 后收集每孔细胞, 用 Trizol 试剂分别提取总 RNA, 以 Oligo dT 为引物反转录合成 cDNA 第 1 链。之后分别加入 VEGF₁₆₅、EGFP、3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 引物扩增, 以 GAPDH 作为内参。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。VEGF₁₆₅ 基因上游引物为 5'-ATGACGAGGGCTGGAGTGT-3', 下游引物为 5'-CATTACACGCTGCGGATCT-3', 扩增片段为 227 bp。EGFP 基因上游引物为 5'-TCGTGACCACCCTGACCTA-3', 下游引物为 5'-TCACCTTGATGCCGTTCTT-3', 扩增片段为 312 bp。管家基因 GAPDH 上游引物为 5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3', 下游引物为 5'-AGGGGCCATCCACA GTCTTC-3', 扩增片段为 258 bp。用 SYBR Green I 核酸荧光染料进行实时定量 PCR, 反应条件为 94 °C 15 s, 58 °C 15 s, 72 °C 30 s, 40 个循环。

7. 半定量 Western-blot 检测不同 MOI Ad5-VIE 感染 MSC 后 VEGF₁₆₅ 蛋白表达。收集病毒感染 48 h 后的 MSC, PBS 漂洗 3 次, 加入细胞裂解液, 提取胞质蛋白质, 采用二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)法, 用分光光度计测量每个样本的蛋白质含量, 确定上样量。以 SDS-PAGE 电泳法将蛋白质转入聚偏二氟乙烯膜, 用含质量分数 5% 脱脂奶粉的 TBST(Tris-buffered saline and Tween 20)缓冲液 4 °C 封闭 1 h, 加入鼠抗人 VEGF₁₆₅[V(抗体): V(抗体的稀释液) = 1: 1000] 单克隆抗体工作液(含质量分数 5% 牛血清白蛋白), 以免抗 β-actin 多克隆抗体做内参对照, 4 °C 孵育过夜, 取出膜, TBST 缓冲液洗 4 次, 每次 15 min, 加入碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 IgG [V(抗体): V(抗体的稀释液) = 1: 5000], 室温持续摇动 60 min, TBST 缓冲液洗 3 次, 每次 15 min, ECL 试剂暗室自显影。用凝胶图像成像系统进行扫描拍

照,用凝胶图像分析软件 Band Scan V5.0 分析各目标条带的灰度值,以 VEGF₁₆₅/β-actin 代表 VEGF₁₆₅ 的相对表达水平。

8. 细胞组织化学法鉴定 VEGF₁₆₅ 在 MSC 中的定位和表达。用链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物法检测重组腺病毒感染 MSC 后 VEGF₁₆₅ 的表达。将感染重组腺病毒后 MSC 制备细胞爬片,用 PBS (0.01 mol/L, pH 值 7.2) 冲洗,分别以质量分数 4% 多聚甲醛固定 30 min,体积分数 0.5 % Triton X-100 破膜 10 min,体积分数 3% 过氧化氢消除内源性过氧化物酶,质量分数 5% 牛血清白蛋白封闭 1 h,加入 V(抗体):V(抗体的稀释液)=1:100 鼠抗人 VEGF₁₆₅ 单克隆抗体,在 4 °C 孵育过夜,加入生物素化羊抗鼠二抗后再加入链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物,用新鲜配制的 3,3'-二氨基联苯胺/过氧化氢显色,同时用 PBS 作为一抗设置阴性对照。

9. 统计学处理。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 软件,2 组间比较采用成组 *t* 检验,各組间两两比较采用 *q* 检验,相关性研究采用 Pearson 相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。相关强度以积差相关系数的平方(r^2)表示。

结 果

1. Ad5-VIE 的构建。pDC316-hVEGF₁₆₅ GGC-IRES-EGFP 重组质粒构建完成后,经不同组合酶切鉴定分析证实构建正确,最后所得腺病毒产物经纯化后,滴度达 4.5×10^9 U/ml [半数组织培养感染剂量(tissue culture infective dose, TCID₅₀)法],对照组病毒 Ad5-EGFP 滴度为 1.4×10^{10} U/ml。

2. MSC 培养及鉴定。骨髓冲洗液经过 Ficoil 淋巴细胞分离液分离后所得细胞大部分为单个核 MSC,24 h 后细胞开始贴壁,细胞呈圆形,3~4 d 细胞形态发生变化,出现短梭形或短棒状细胞。接种后 1 周左右可见较大、较多集落,呈梭形,细胞放射状或同心圆状排列,10~15 d 长满瓶底。细胞传代后形态呈梭形,较均一。第 4 代 MSC 免疫组织化学结果显示:MSC 上 CD₃₄ 抗体染色阴性,而 CD₄₄ 抗体染色阳性(图 1)。

3. Ad5-VIE 感染 MSC 后摄取 ⁹⁹Tc^m-GH 的研究结果。(1)实验一,随时间延长,感染了含目的基因重组腺病毒的 MSC 对 ⁹⁹Tc^m-GH 的摄取率逐渐增高(表 1)。目的病毒组(Ad5-VIE)与对照病毒组(Ad5-EGFP) ⁹⁹Tc^m-GH 摄取率在各个不同时间点差异均有统计学意义($t = 15.10 \sim 54.92$, P 均 <

0.05)。感染目的病毒组各时间点之间摄取率差异具有统计学意义($F = 59.37 \sim 1922.33$, P 均 < 0.05)。

(2)实验二,细胞对 ⁹⁹Tc^m-GH 的摄取率随病毒 MOI 的增加而逐渐增加(表 2, $r^2 = 0.86$, $P < 0.05$),除 MOI 为 0 外,其他 MOI 条件下转染 Ad5-VIE 与 Ad5-EGFP 2 组的 ⁹⁹Tc^m-GH 摄取率之间差异均具有统计学意义($t = 10.91 \sim 16.83$, $P < 0.05$)。

表 1 Ad5-VIE(MOI=100)感染 MSC 后不同时间摄取 ⁹⁹Tc^m-GH 比较 %

组 别	时间(min)			
	30	60	90	120
Ad-VIE	1.60 ± 0.11	2.42 ± 0.15	4.20 ± 0.25	7.72 ± 0.22
Ad-EGFP	0.58 ± 0.04	0.61 ± 0.09	0.63 ± 0.07	0.65 ± 0.06

注:MOI 为感染复数,MSC 为骨髓间充质干细胞,Ad-VIE 为重组腺病毒载体 Ad-人 VEGF₁₆₅ 双甘氨酸半胱氨酸(GGC) motif-内部核糖体切入位点(IRES)-增强型绿色荧光蛋白(EGFP);数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $n = 3$

表 2 不同滴度 Ad5-VIE 感染 MSC 后摄取 ⁹⁹Tc^m-GH 比较 %

组 别	MOI				
	0	10	25	50	100
Ad-VIE	0.62 ± 0.07	2.20 ± 0.23	4.32 ± 0.21	6.91 ± 0.39	7.94 ± 0.75
Ad-EGFP	0.61 ± 0.05	0.67 ± 0.07	0.70 ± 0.07	0.68 ± 0.05	0.61 ± 0.06

注:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $n = 3$

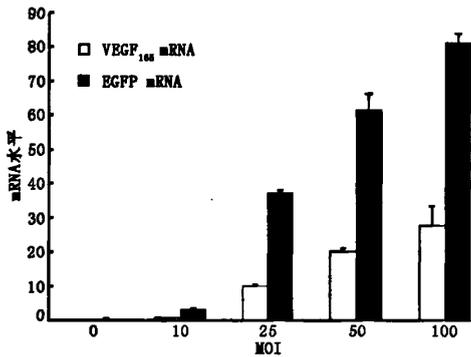
4. Ad5-VIE 感染 MSC 后 VEGF₁₆₅ 及 EGFP mRNA 的表达(图 2)。经实时 PCR 检测,MOI = 0~100 之间,VEGF₁₆₅ 与 EGFP 的 mRNA 表达逐渐增高。随着 Ad5-VIE MOI 增加,VEGF₁₆₅ mRNA 和 EGFP mRNA 的表达均增高(r^2 值分别为 0.91 和 0.90, P 均 < 0.05)。此外,VEGF₁₆₅ mRNA 与 EGFP mRNA 表达之间呈显著正相关, $y = 3.0381x + 2.1448$ ($r^2 = 0.99$, $P < 0.05$)。

5. Ad5-VIE 转染 MSC 后 VEGF₁₆₅ 蛋白及 EGFP 蛋白的表达(图 3)。普通光学显微镜下可见感染 Ad-VIE 组 MSC 胞质中有棕黄色深染颗粒,而在未感染病毒组胞质中并未观察到棕黄色深染颗粒,荧光显微镜下可见 MSC 胞质中 EGFP 正常表达。

6. Ad5-VIE 感染 MSC 后 Western-blot 检测 VEGF₁₆₅ 蛋白表达。感染 Ad5-VIE 组在 43 kd 处出现特异性条带,而感染对照病毒 Ad5-EGFP 组及空白对照组未出现特异性条带。通过 Bindscan 凝胶分析系统获得目的蛋白 VEGF₁₆₅ 与内参灰度比值,结果示 Ad5-VIE 以不同 MOI 感染 MSC 48 h 后,细胞胞质中 VEGF₁₆₅ 蛋白表达逐步上升($r^2 = 0.94$, $P <$



图1 第4代骨髓间充质干细胞(MSC)免疫组织化学方法鉴定结果。a. MSC(×200);b. CD₃₄抗体阴性(×200);c. CD₄₄抗体阳性(×100)



注:VIE: VEGF₁₆₅ 双甘氨酸半胱氨酸(GGC) motif-内部核糖体切入位点(IRES)-增强型绿色荧光蛋白(EGFP)

图2 不同感染复数(MOI)腺病毒载体 Ad5-VIE 感染 MSC 后 VEGF₁₆₅ 及 EGFP mRNA 水平

0.05),而在对照病毒 Ad5-EGFP 组及空白对照组未见表达。不同 MOI 感染 Ad5-VIE 组间两两比较 VEGF₁₆₅ 蛋白表达差异具有统计学意义($q = 8.3 \sim 587.9, P$ 均 < 0.05)。

7. Ad5-VIE 感染 MSC 后胞质中 VEGF₁₆₅ 蛋白与⁹⁹Tc^m-GH 摄取之间相关性分析。VEGF₁₆₅ 与内参

灰度比值与细胞摄取率呈正相关, $y = 10.403x + 0.7246 (r^2 = 0.90, P < 0.05)$ 。

讨论

心脑血管缺血性疾病、神经精神疾病等的基因治疗临床应用是近年来研究的热点,其中 VEGF 基因由于其可促进血管内皮新生而用于治疗缺血性疾病,已进入临床 I ~ II 期试验,并取得一定疗效^[3-4]。但 VEGF 可促进血管通透性增加,导致血管源性水肿,同时由于新生血管不成熟,可能引发血管瘤等,都将影响 VEGF 基因治疗作用^[5]。报告基因显像技术可在体外无创性监测治疗基因在靶区的表达情况、持续时间、是否过表达等。目前主要有放射性核素显像、光学成像及 MRI,其中放射性核素报告基因显像灵敏度较高($10^{-12} \sim 10^{-10}$ mol/L),是最适合人体的显像技术之一^[6]。报告基因显像系统有 3 种不同的类型:酶-底物(enzyme-substrate)系统、受体-配体(receptor-ligand)系统、转运体-底物系统^[7-8],但酶-底物系统有病毒源性,受体-配体及转运体底物系统为人体固有,其分布广泛、生物学过程特异等限制了这 3 种系统的应用^[9]。

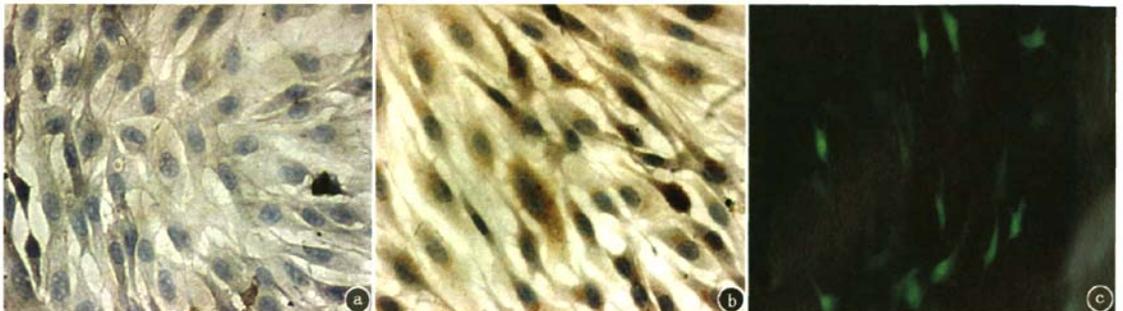


图3 感染 Ad5-VIE 后的 MSC 免疫组织化学染色及荧光显微镜观察图。a. 普通光学显微镜下正常 MSC 空白对照(×200);b. Ad5-VIE 感染(MOI=100) MSC 48 h 后普通光学显微镜下 VEGF₁₆₅ 表达情况(×200);c. Ad5-VIE 感染(MOI=100) MSC 48 h 后荧光显微镜下 EGFP 表达情况(×200)

Bogdanov 等^[10-11]研究表明,某些 C 末端融合肽与⁹⁹Tc^mO³⁺有很高的亲和力。这种肽被称为金属结合肽,其在结构上有连续的重复 GGC 序列,具有明显的转螯合特性。含一个或者多个 GGC 序列的肽能从⁹⁹Tc^m-GH 中迅速夺取⁹⁹Tc^mO³⁺,从而使⁹⁹Tc^m稳定结合在 GGC 序列中半胱氨酸巯基上,形成亲和力高的 GGC-⁹⁹Tc^mO³⁺螯合物。该研究还将 GGC 序列与绿色荧光蛋白基因融合(该肽的表达不影响上游绿色荧光蛋白基因编码蛋白的性状),用体外感染细胞实验证实了这种方法可行。本研究对 VEGF₁₆₅ 编码基因序列进行了修饰,在其 C 端连接 GGC 肽编码基因序列。通过 IRES 共表达载体将修饰后 VEGF₁₆₅ 与 EGFP 连接起来,构建共表达腺病毒载体 Ad5-VIE。据 GGC 肽序列与⁹⁹Tc^mO³⁺的高亲和力,通过体外摄取实验监测治疗基因 VEGF₁₆₅ 在 MSC 中的表达,结果表明构建的重组腺病毒载体具备感染 MSC 的能力,并且其表达与病毒滴度及 VEGF₁₆₅ 的表达之间具有较好的相关性。PCR、Western-blot 免疫印迹和细胞组织化学检查结果表明,VEGF₁₆₅ 蛋白可以在 MSC 中正常表达。对感染 Ad5-VIE 的 MSC 摄取实验证实 GGC 肽表达后可与⁹⁹Tc^m-GH 相结合,表明经过 GGC 多肽修饰后的 VEGF₁₆₅ 重组腺病毒载体可同时独立表达 GGC 和 VEGF₁₆₅,为进一步行报告基因核素显像证实 VEGF₁₆₅ 表达程度提供了依据。

本研究结果表明病毒转染 MSC 后,VEGF₁₆₅ 与 GGC 肽可以共表达,并且二者之间的表达呈正相关,故可推论以 GGC 肽为报告基因和以⁹⁹Tc^m-GH 为报告探针构建的 GGC 肽/⁹⁹Tc^m-GH 报告基因系统可作为一种监测治疗基因表达的核素报告基因显像方法。此系统中,报告基因和探针均制备简单易得、价廉,可采用商品化的 GH 试剂盒,并应用于 SPECT 显像,有利于临床推广。而目前常用的 I 型单纯疱疹病毒胸苷激酶报告系统中,放射性探针的制备较繁琐、困难,费用较贵,不利于广泛使用。

腺病毒载体尽管存在转导效率高、携带 DNA 容量较大、制备较易等优点^[12],但其不能在感染后长期稳定表达。因此,报告探针体外监测时程可能较

短,需应用构建腺相关病毒或者慢病毒作为载体,以获得对治疗基因长时间的监测。另外,本研究中采用了具有多向分化潜能的 MSC^[13],望能为报告基因显像监测基因联合干细胞治疗提供依据。

参 考 文 献

- [1] Matsumoto R, Omura T, Yoshiyama M, et al. Vascular endothelial growth factor-expressing mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of acute myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25: 1168-1173.
- [2] Jaffer FA, Libby P, Weissleder R. Molecular imaging of cardiovascular disease. *Circulation*, 2007, 116: 1052-1061.
- [3] Wu JC, Bengel FM, Gambhir SS. Cardiovascular molecular imaging. *Radiology*, 2007, 244: 337-355.
- [4] Kilarski WW, Samolov B, Petersson L, et al. Biomechanical regulation of blood vessel growth during tissue vascularization. *Nat Med*, 2009, 15: 657-664.
- [5] Peters S, Cree IA, Alexander R, et al. Angiopoietin modulation of vascular endothelial growth factor: effects on retinal endothelial cell permeability. *Cytokine*, 2007, 40: 144-150.
- [6] Lewis MR. A "new" reporter in the field of imaging reporter genes: correlating gene expression and function of the sodium/iodide symporter. *J Nucl Med*, 2006, 47: 1-3.
- [7] Serganova I, Ponomarev V, Blasberg R. Human reporter genes: potential use in clinical studies. *Nucl Med Biol*, 2007, 34: 791-807.
- [8] Lan X, Yin X, Wang R, et al. Comparative study of cellular kinetics of reporter probe [¹³¹I] FIAU in neonatal cardiac myocytes after transfer of HSV1-tk reporter gene with two vectors. *Nucl Med Biol*, 2009, 36: 207-213.
- [9] Kenanova V, Barat B, Olafsen T, et al. Recombinant carcinoembryonic antigen as a reporter gene for molecular imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2009, 36: 104-114.
- [10] Bogdanov A Jr, Simonova M, Weissleder R. Design of metal-binding green fluorescent protein variants. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1397: 56-64.
- [11] Bogdanov A Jr, Petherick P, Marecos E, et al. *In vivo* localization of diglycylcysteine-bearing synthetic peptides by nuclear imaging of oxotechnetate chelation. *Nucl Med Biol*, 1997, 24: 739-742.
- [12] 尹小花,兰晓莉,王瑞华,等.¹³¹I-FIAU 在不同载体介导的 HSV1-tk 转导心肌细胞中的实验研究. *中华核医学杂志*, 2009, 29: 126-130.
- [13] Willmann JK, Paulmurugan R, Rodriguez-Porcel M, et al. Imaging gene expression in human mesenchymal stem cells: from small to large animals. *Radiology*, 2009, 252: 117-127.

(收稿日期:2010-08-20)