

· 论 著 ·

# 携带人金属蛋白酶组织抑制剂 1 重组腺病毒的构建及在人脐静脉内皮细胞中的表达\*

李 汇<sup>1</sup>, 毛用敏<sup>2△</sup>, 赵莉莉<sup>2</sup>, 崔让庄<sup>2</sup>, 王佩显<sup>1</sup>

(1. 天津医科大学 300070; 2. 天津市胸科医院 300051)

**摘要:**目的 构建携带人金属蛋白酶组织抑制剂 1(TIMP1)的重组腺病毒 AdV-hTIMP1, 感染体外培养的人脐静脉内皮细胞 CRL-1730, 观察其 mRNA 表达情况。方法 应用 AdEasy 复制缺陷型腺病毒载体系统在大肠埃希菌 BJ5183 中通过同源重组构建 Ad-hTIMP1 和对照 Ad-Track。阳离子脂质体法将重组腺病毒转染到人胚胎肾细胞(HEK293T)中进行包装和扩增。纯化后 PCR 鉴定 hTIMP1 目的基因, OD<sub>260</sub> 法测定滴度, 透射电镜观察腺病毒形态。将人脐静脉内皮细胞 CRL-1730 分为 3 组, 空白对照组、Track 对照组和 TIMP1 实验组, 感染 48 h 后收集细胞, 半定量 PCR(RT-PCR)法检测内皮细胞中 TIMP1 mRNA 的表达情况。结果 重组腺病毒 Ad-hTIMP1 的滴度为  $1.9 \times 10^{12}$  v. p/mL。其感染人脐静脉内皮细胞 CRL-1730 后, 实验组 TIMP1 mRNA 的表达明显升高( $P < 0.05$ )。结论 成功构建了携带 hTIMP1 基因的重组腺病毒 Ad-hTIMP1, 成功感染了体外培养的人脐静脉内皮细胞 CRL-1730, 使细胞中 hTIMP1 过表达, 为心血管疾病的基因治疗提供平台。

**关键词:**腺病毒, 人; 金属蛋白酶组织抑制剂 1; 基因治疗

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.08.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)08-0841-04

## Construction of recombinant adenovirus with human tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and its expression in human umbilical vein endothelial cells\*

Li Hui<sup>1</sup>, Mao Yongmin<sup>2△</sup>, Zhao Lili<sup>2</sup>, Cui Rangzhuang<sup>2</sup>, Wang Peixian<sup>1</sup>

(1. General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China; 2. Tianjin Chest Hospital, Tianjin 300051, China)

**Abstract: Objective** To construct recombinant adenovirus (AdV) with human tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (hTIMP1), transfect *in vitro* cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) human umbilical vein endothelial cells CRL-1730 for observing the mRNA expression. **Methods** The AdEasy system was adopted to create recombinant adenovirus Ad-hTIMP1 and Ad-Track. The adenovirus vector was then packaged and amplified in HEK293 cells. They were purified and then identified by electronic microscope. According to the interference, all the cells were divided into 3 groups: the blank group, Track group and TIMP1 group. Cells were collected after transfection for 48 h. RT-PCR was used to detect the expression of TIMP1 mRNA. **Results** The titer of Ad-hTIMP1 was  $1.9 \times 10^{12}$  v. p/mL. In transfection with Ad-hTIMP1, the expression of TIMP1 mRNA in the TIMP1 group was obviously increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The recombinant adenoviral vector carrying hTIMP1 was successfully constructed. The overexpression of Ad-hTIMP1 in human umbilical vein endothelial cells CRL-1730 could be detected, and provides the platform for the gene therapy of cardiovascular diseases.

**Key words:** adenovirus, human; tissue inhibitor of metalloproteinase-1; gene therapy

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)是降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分的主要酶系<sup>[1]</sup>, 金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMPs)是 MMPs 的内源性特异性抑制剂<sup>[2]</sup>。近年研究发现, MMPs/TIMPs 的比例失衡与动脉粥样硬化、冠状动脉介入术后再次狭窄以及心脏重塑等病理过程密切相关<sup>[3]</sup>。以腺病毒(adenovirus, AdV)为载体介导 TIMP1 到靶细胞, 调节 ECM 的生成和降解, 从而调节粥样斑块的稳定性可能成为冠心病基因治疗的新方法<sup>[4]</sup>。本研究构建携带人基质金属蛋白酶组织抑制剂因子 1(human tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, hTIMP1)基因片段的重组腺病毒 Ad-hTIMP1<sup>[5]</sup>, 并成功感染体外培养的人脐静脉内皮细胞 CRL-1730, 从而为进一步的在体实验提供平台, 为基因治疗动脉粥样硬化, 稳定粥样斑块提供靶基因的线索。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** AdEasy 复制缺陷型腺病毒载体系统(穿梭质粒 pAd-Track-CMV 和骨架质粒 pAdEasy-1)以及包装细胞系人胚肾细胞(human embryonic kidney 293T, HEK293T)购自北京大学实验室; pUCm-T 载体质粒, BJ 5183 菌株, JM109 菌株和 DH5 $\alpha$  菌株均为本实验室保存。TaqDNA 聚合酶为本实验室提取保存, 限制性内切酶 Bgl II、Not I 和 DNA marker 购自 TakaRa 生物工程(大连)有限公司, PacI 购自 NEB 公司; T4 DNA 连接酶、高纯度质粒柱式提取试剂盒和脂质体购自 Invitrogen 公司, 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和 DMEM 高糖培养液购自美国 Gibco 公司; PCR 引物由上海生工公司合成。DNA 测序由北京三博远志生物工程公司完成。

### 1.2 腺病毒重组质粒的构建

**1.2.1 pUC-hTIMP1 重组质粒的构建** Genebank 中搜索人

TIMP1 序列,设计上游引物为:5'-AGA ACC CAC CAT GGC CCC CT-3';下游引物为:5'-GAT TCA GGC TAT CTG GGA CCG-3'。从人心肌细胞中提取总 RNA,反转录 PCR(reverse transcription-PCR,RT-PCR)得到人 TIMP1 的基因片段,连接到 pUCm-T 载体质粒中,转化入感受态 JM109 细胞,NcoI 酶切鉴定正确后行二次转化入 JM109 进行扩增,测序正确后提质粒 pUC-hTIMP1。

**1.2.2 穿梭质粒 pAdTrack-CMV-hTIMP1 的构建** 分别用 BglII 和 Not I 双酶切 pUC-hTIMP1 和穿梭质粒 pAdTrack-CMV 并凝胶回收 hTIMP1 片段和开环质粒 pAdTrack-CMV,连接后转化 JM109 感受态细胞,酶切鉴定正确后二次转化 JM109 扩增,Pme I 酶切使之线性化,命名为重组质粒 pAdTrack-CMV-hTIMP1。

**1.2.3 同源重组构建重组腺病毒质粒 pAdEasy-GFP-hTIMP1** 电穿孔法(2 500 V,5 ms)将 Pem I 酶切线性化的 pAdTrack-CMV-hTIMP1 重组质粒和 pAdTrack-CMV(空载体阴性对照)分别转化到含有 pAdEasy-1 的电感受态 BJ5183 中,筛选后 BamHI 和 Pac I 酶切鉴定。选取重组正确的质粒(pAd-hTIMP1 和 pAd-Track)在 DH5 $\alpha$  菌中大量扩增,高纯度质粒柱式提取试剂盒提取质粒,Pac I 酶切线性化后凝胶回收较大片段。

**1.3 重组腺病毒在 293T 细胞中包装和扩增**

**1.3.1 阳离子脂质体法将重组腺病毒转染 293T 细胞进行包装** 转染前 1 d,将 2 个 60 mm 培养皿中 HEK293T 细胞调整为  $0.6 \times 10^6$  个细胞/皿,转染当天应用脂质体 lipofectamine 2000 及 Plus reagent 将 pAd-hTIMP1 和 pAd-Track 转染到两皿中,24 h 后荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)表达,倒置相差显微镜下观察细胞病变效应(cytopathogenic effect,CPE)。于转染后第 9 天收集细胞,反复冻融法得到重组腺病毒 Ad-hTIMP1 和 Ad-Track 上清液。

**1.3.2 包装好的重组腺病毒感染 293T 细胞进行扩增** 取病毒上清液的 1/3 感染 293T 细胞,感染后第 3 天反复冻融法收集重组腺病毒上清液,反复感染 4 次于 293T 细胞中扩增病毒到所需滴度。

**1.3.3 重组腺病毒的纯化和观察** CsCl 密度梯度离心法纯

化重组腺病毒颗粒,采用 OD<sub>260</sub> 法测定腺病毒的滴度。并用透射电镜观察腺病毒形态。

**1.4 腺病毒介导 TIMP1 在内皮细胞中的表达**

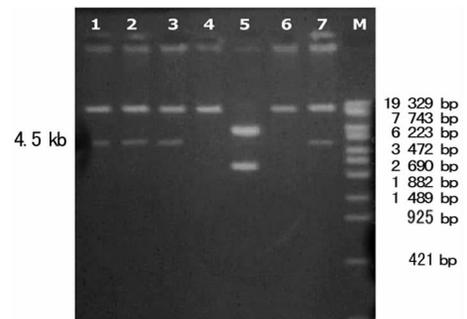
**1.4.1 分组** 体外培养人脐静脉内皮细胞 CRL-1730,将之分到 6 孔板中( $2.4 \times 10^5$  细胞/孔)。分为空白对照组、Track 对照组和 TIMP1 实验组,每组 4 个复孔。Ad-Track 感染 Track 对照组,Ad-hTIMP1 感染 TIMP1 实验组。48 h 后观察并收集细胞。

**1.4.2 RT-PCR 法扩增细胞 TIMP1 基因片段**,以 GAPDH 为内参照 采用 UNIQ-10 柱总 RNA 抽提试剂盒提取各组人脐静脉内皮细胞 CRL-1730 中的总 RNA,反转录得到 cDNA,PCR 扩增 TIMP1 基因片段。2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。以电泳条带的灰度代表 mRNA 含量,目的基因与内参电泳条带灰度比值反应目的基因的相对值。采用 Gel-pro3.1 凝胶成像系统对结果进行分析。

**1.5 统计学处理** 应用 SPSS17.0 软件进行统计学数据分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间比较采用单因素方差分析和 LSD 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

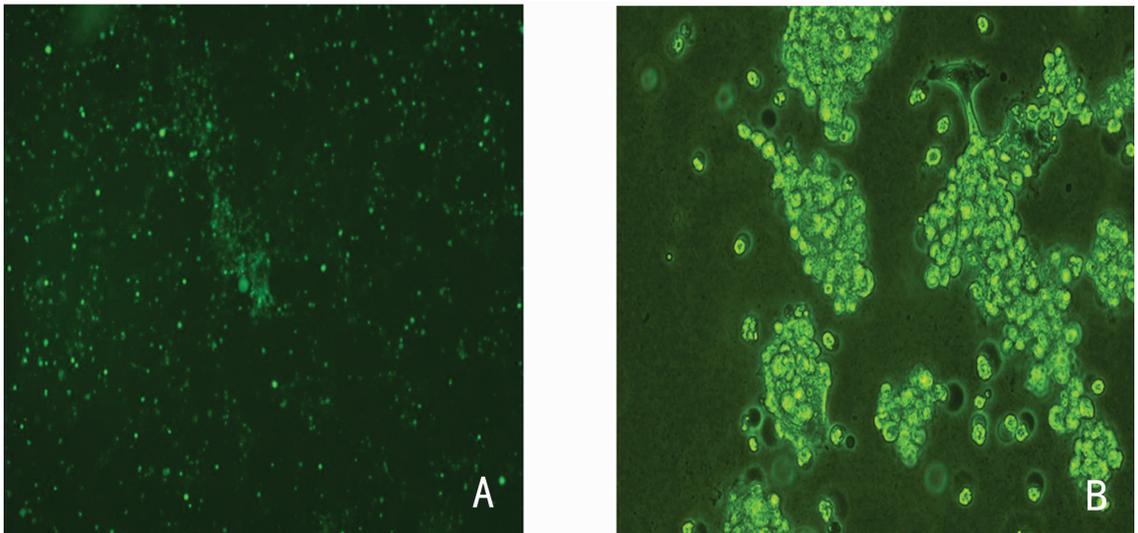
## 2 结果

**2.1 pAdEasy-GFP-hTIMP1 重组质粒 Pac I 酶切鉴定** RT-PCR 法从人心肌细胞中扩增 hTIMP1,可以得到 637 bp 的特异带。在 pAd-Track-CMV 上有 2 个 Pac I 的酶切位点,将重组子切为一个大片段和一个约 4.5 kb 的小片段(图 1)。



1~3:重组成功的 Ad-hTIMP1;4、6:pAdEasy-1;5:pAdTrack-CMV;7:重组成功的 Ad-Track;M:Marker。

图 1 Pac I 酶切 pAd-hTIMP1 和 pAd-Track 重组质粒

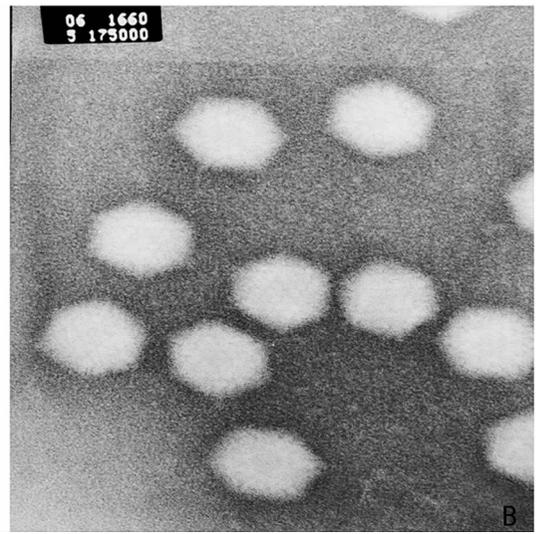
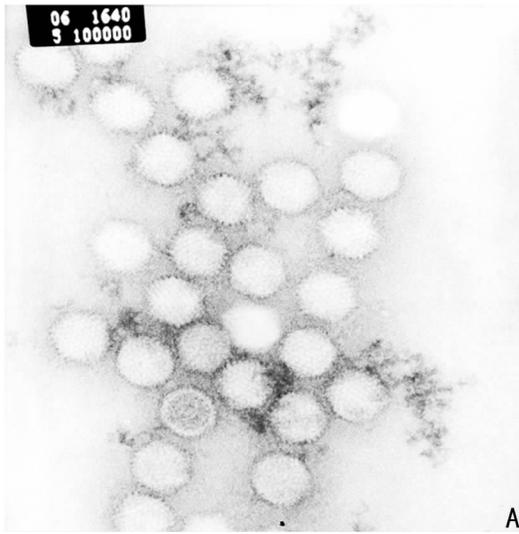


A:第 5 天荧光出现“彗星状”改变(荧光显微镜,×40);B:第 3 天细胞出现典型“细胞病变效应”(荧光显微镜,×200)。

图 2 转染 Ad-hTIMP1 重组腺病毒

**2.2 293T 细胞中包装并扩增腺病毒 重组腺病毒转染 293T 细胞后,第 4~5 天荧光显微镜下可观察到 GFP 呈“彗星状”改变,感染 293T 细胞后第 3 天可以观察到典型的 CPE(图 2),纯化后 OD<sub>260</sub> 法测得重组腺病毒 Ad-hTIMP1 的滴度为  $1.9 \times 10^{12}$  v. p/mL,对照重组腺病毒 pAd-Track 的滴度为  $0.6 \times 10^{12}$  v. p/mL。透射电镜下见病毒颗粒直径约 90 nm,呈多面体形**

状,绝大多数病毒颗粒完整(图 3)。腺病毒裂解液 TIMP1 PCR,2%琼脂糖凝胶电泳图(图 4)。TIMP1 实验组内皮细胞 TIMP1 mRNA 的表达( $1.062 \pm 0.083$ )明显高于空白对照组( $0.449 \pm 0.128$ )和 Track 对照组( $0.365 \pm 0.164$ ), $P < 0.05$ ,见图 5。重组腺病毒感染体外培养的人脐静脉内皮细胞人脐静脉内皮细胞 CRL-1730(图 6)。



A:×10 万;B:×17.5 万。

图 3 Ad-hTIMP1 病毒颗粒透射电镜图

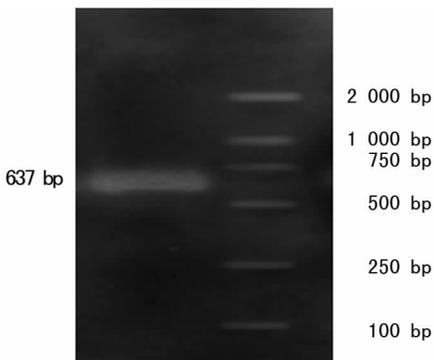
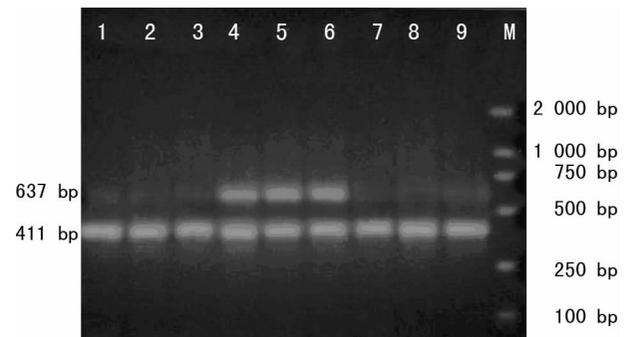
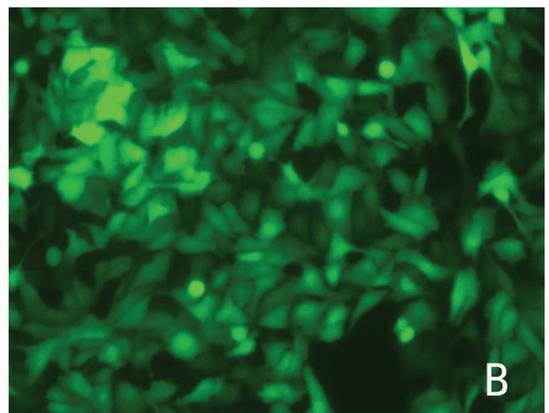
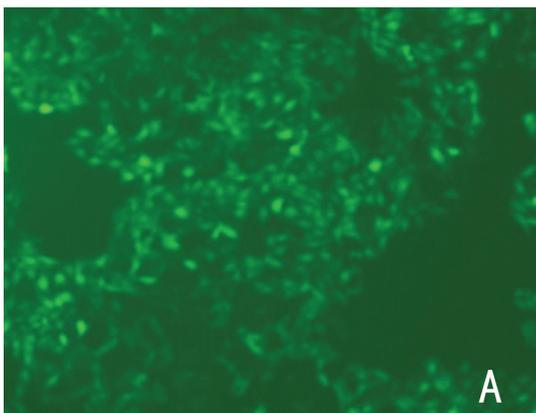


图 4 腺病毒裂解液 TIMP1 PCR 扩增片段 (可见 637 bp 的特异条带)



1~3:空白对照组;4~6:实验组;7~9:Track 对照组;M:marker。

图 5 3 组 TIMP1 2%琼脂糖凝胶水平电泳图



A:×40;B:×200。

图 6 重组腺病毒感染体外培养的人脐静脉内皮细胞人脐静脉内皮细胞 CRL-1730 荧光表达情况(倒置荧光显微镜)

### 3 讨 论

MMPs 是一类以  $Zn^{2+}$  为辅助因子的蛋白水解酶家族,在体内主要降解 ECM。既往研究表明,AS 斑块损伤部位 MMPs 表达升高,包括属于间质胶原酶的 MMP1、属于明胶酶的 MMP2 和 MMP9,以及属于基质降解酶的 MMP3,而 TIMP1 和 TIMP2 等表达减少<sup>[6-7]</sup>。Galis 等<sup>[8]</sup>在冠状 AS 中检测到 MMPs 与 TIMPs 的比例失调,认为调节两者之间的比例可起到治疗 AS 的作用。

Rouis 等<sup>[9]</sup>报道腺病毒介导 TIMP1 过表达可以减轻 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠的颈动脉粥样硬化损伤程度,并推测此作用是由于 TIMP1 抑制 MMPs 活性保护了细胞外基质,进而抑制了平滑肌细胞的移行所致。该研究中,小鼠喂食 6 周高胆固醇饮食后注射携带 TIMP1 的重组腺病毒,4 周后加以评估。发现动脉粥样硬化斑块的损伤面积明显减小。这与之前研究小鼠转基因过表达人 TIMP1 抑制 MMPs 表达的结果相一致<sup>[10-11]</sup>。另外,转染携带 TIMP1 的重组腺病毒(Ad-TIMP1)使猪主动脉内皮细胞过表达 TIMP1,可以减少细胞移行及对细胞外基质的侵袭<sup>[12]</sup>。随着分子生物学技术的进步,利用分子生物学技术使局部 TIMP1 过表达,为人们治疗 AS 带来希望<sup>[13]</sup>。

本研究采用 He 等<sup>[5]</sup>于 1998 年建立的技术方案,成功地进行了携带人 TIMP1 的重组腺病毒的构建,并采用 Zeng 等<sup>[14]</sup>报道的两步转化法,即将 pAdEsay-1 质粒先转化入 BJ5183 大肠埃希菌,并制备其电转化感受态细胞,再利用电转化仪将 pAd-Track-CMV 转入该菌,进而与细胞内的 pAdEsay-1 进行同源重组。这种方法与一步转化法相比,可以大大提高同源重组的效率,缩短实验时间<sup>[15]</sup>。

本研究发现,重组 Ad-hTIMP1 可以成功感染内皮细胞使实验组细胞内 TIMP1 过表达。为 TIMP1 作为靶基因用于稳定动脉粥样斑块的基因治疗奠定了基础。

#### 参考文献:

[1] Watanabe N, Ikeda U. Matrix metalloproteinases and atherosclerosis[J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2004, 6(2): 112-120.

[2] Reis ST, Pontes-Junior J, Antunes AA, et al. MMP-9 overexpression due to TIMP-1 and RECK under-expression is associated with prognosis in prostate cancer[J]. *Int J Biol Markers*, 2011, 26(4): 255-261.

[3] Liu P, Sun M, Sader S. Matrix metalloproteinases in cardiovascular disease[J]. *Can J Cardiol*, 2006, 22(Suppl B): 25B-30B.

[4] Gaffney MM, Hynes SO, Barry F, et al. Cardiovascular gene therapy: current status and therapeutic potential[J]. *Br J Pharmacol*, 2007, 152(2): 175-188.

[5] He TC, Zhou S, Costada LT, et al. A simplified system for generation recombinant adenoviruses[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(5): 2509-2514.

[6] Wågsäter D, Zhu C, Björkegren J, et al. MMP-2 and MMP-9 are prominent matrix metalloproteinases during atherosclerosis development in the Ldlr(-/-) Apob(100/100) mouse[J]. *Int J Mol Med*, 2011, 28(2): 247-253.

[7] Heo SH, Cho CH, Kim HO, et al. Plaque rupture is a determinant of vascular events in carotid artery atherosclerotic disease: involvement of matrix metalloproteinases 2 and 9[J]. *J Clin Neurol*, 2011, 7(2): 69-76.

[8] Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques[J]. *J Clin Invest*, 1994, 94(6): 2493-2503.

[9] Rouis M, Adamy C, Duverger N, et al. Adenovirus-mediated overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 reduces atherosclerotic lesions in apolipo protein E-deficient mice[J]. *Circulation*, 1999, 100(5): 533-540.

[10] Watanabe M, Yakahashi Y, Ohta T, et al. Inhibition of metastasis in human gastric cancer cells transfected with tissue inhibitor of metalloproteinase-1 gene in nude mice[J]. *Cancer*, 1996, 77(8 Suppl): 1676-1680.

[11] Alexander CM, Howard EW, Bissel M, et al. Rescue of mammary epithelial cell apoptosis and entactin degradation by a tissue inhibitor of metalloproteinases-1 transgene[J]. *J Cell Biol*, 1996, 135(6): 1669-1677.

[12] Fernandez HA, Kallenbach K, Seghezzi G, et al. Inhibition of endothelial cell migration by gene transfer of tissue inhibitor of metalloproteinases-1[J]. *J Surg Res*, 1999, 82(2): 156-162.

[13] Beaudoux JL, Giral P, Bruckert E, et al. Matrix metalloproteinases and atherosclerosis. Therapeutic aspects[J]. *Ann Biol Clin*, 2003, 61(2): 147-158.

[14] Zeng M, Smith SK, Siegel F, et al. AdEasy system made easier by selecting the viral backbone plasmid preceding homologous recombination[J]. *Biotechniques*, 2001, 31(2): 260-262.

[15] 尹冰楠, 李冬田, 李秋香. 一种简易、廉价、高效构建重组腺病毒载体的方法[J]. *天津医科大学学报*, 2005, 11(2): 171-174.

(收稿日期:2012-10-22 修回日期:2012-11-13)

欢迎投稿

欢迎订阅