

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)22-2025-04

## 携带靶向干扰 VEGF 基因 shRNA 重组腺相关病毒载体的构建和制备

王卫东<sup>1</sup> 陈长生<sup>2</sup> 蒋立新<sup>3</sup> 陆兵勋<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>南方医科大学附属南方医院神经内科, 广东 广州 510515, <sup>2</sup>第四军医大学卫生统计学教研室, 陕西 西安 710033, <sup>3</sup>国家 863 计划生物领域病毒基因载体研发基地, 北京 100176 )

## Construction and preparation of recombinant adeno-associated virus vector for expressing shRNA targeting VEGF165 mRNA

WANG Wei-Dong<sup>1</sup>, CHEN Chang-Sheng<sup>2</sup>, JIANG Li-Xin<sup>3</sup>, LU Bing-Xun<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China, <sup>2</sup>Department of Health Statistics, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China, <sup>3</sup>R&D Base of Viral Gene Vector under the National Hitech Research and Development Program of China 863 Project, Beijing 100176, China

**【Abstract】** AIM: To construct and prepare the recombinant adeno-associated virus (AAV) vector for expressing short hairpin RNA (shRNA) targeting VEGF165 mRNA. METHODS: By inserting the sequence that contained EGFP-U6-shRNA (targeting VEGF165 mRNA) into the *EcoRI* and *SalI* site of vector plasmid pSNAV2.0-lacZ- $\alpha$ , we constructed the recombinant vector of plasmid pSNAV2.0-EGFP-U6-shRNA(VEGF165). The recombinant vector of plasmid, BHK cell lines and helper virus HSV1-RapCap/ $\Delta$ UL2 were used for the package of the serotype 2 of recombinant adeno-associated virus(rAAV2) vector. The identity, viral purity, titer, EGFP activity of rAAV2 viral stock were analyzed by the methods of PCR, SDS-PAGE, dot-blot, and virus infection, respectively. RESULTS: The results of PCR and SDS-PAGE indicated that the shRNA fragment targeting VEGF165 was successfully packaged into rAAV2, and the viral purity of rAAV2 was above 98%. The titer of rAAV2 was approximately  $3 \times 10^{14}$  v. g. (vector genomes)/L, and the positive rate of rAAV2 infected cells was over 30%. CONCLUSION: The viral vector of rAAV2-EGFP-U6-shRNA(VEGF165) is successfully prepared. This viral vector will serve to interpret the role of VEGF in biological events after cerebral ischemic injury by specially inhibiting the expression of VEGF gene.

**【Keywords】** vascular endothelial growth factors; adeno-associated virus; genetic vectors; RNA interference; short hairpin RNA

**【摘要】**目的: 构建并制备携带靶向干扰 VEGF165 基因 shRNA 的重组腺相关病毒载体。方法: 将 PCR 法扩增所得 EGFP-U6-shRNA(VEGF165) 片段插入载体质粒 pSNAV2.0-lacZ- $\alpha$  的 *EcoRI* 和 *SalI* 酶切位点, 构建重组质粒 pSNAV2.0-EGFP-U6-shRNA(VEGF165)。以 HSV1-RapCap/ $\Delta$ UL2 为辅助病毒, 包装 rAAV2-EGFP-U6-shRNA(VEGF165) 病毒。对所获病毒载体进行 PCR, SDS-PAGE 鉴定分析、滴度测定和 EGFP 的活性检测。结果: PCR, SDS-PAGE 鉴定分析结果表明靶向干扰 VEGF165 基因的 shRNA 片段成功包装入重组 AAV2 载体, 病毒纯度在 98% 以上。点杂交法测定重组病毒载体基因组滴度约为  $3 \times 10^{14}$  v. g. (vector genomes)/L。EGFP 活性检测显示重组 AAV2 感染细胞阳性率在 30% 以上。结论: 成功制备了 rAAV2-EGFP-U6-shRNA(VEGF165) 病毒载体, 为通过 RNA 干扰技术特异性抑制 VEGF 基因的表达来阐明 VEGF 在缺血性脑损伤后各种生物学事件中的作用奠定了实验基础。

**【关键词】** 血管内皮生长因子类 腺相关病毒 遗传载体 RNA 干扰 短发卡样 RNA

**【中图分类号】** R743.32 Q782 **【文献标识码】** A

## 0 引言

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种高度保守的肝素结合蛋白, 具有诱导血管生成、增加血管通透性和促进血管内皮细胞增殖、迁移的生理作用。但相关的一些实验研究也发现, 在培养的神经胶质细胞、心肌细胞和角膜细胞中也有 VEGF 存在, 并且这些 VEGF 的存在与新血管的形成无关。随着对 VEGF 的深入研究, 人们进一步发现缺血性脑损伤可诱导脑内 VEGF mRNA 和 VEGF 表达水平的升高, 对抗缺血所致的损害、发挥神经保护作用<sup>[1-2]</sup>。本研究中, 我们设计、构建了携带靶向干扰 VEGF 基因的短发卡样 RNA(short hairpin RNA, shRNA)腺相关病毒(Adeno-associated virus)载体, 为探讨 VEGF 神经保护作用机制的相关研究提供基本实验工具。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 载体质粒 pDC316-EGFP-U6-shRNA(VEGF<sub>165</sub>) pSNAV2.0-lacZ- $\alpha$ , BHK 细胞由本元正阳基因技术公司保存提供。感受态大肠杆菌 DH-5 $\alpha$  购

收稿日期 2007-09-07; 接受日期 2007-10-16

作者简介: 王卫东, 博士生(导师陆兵勋), 副主任医师。Tel: (020)

61641965 Email: wj120019@msn.com

自天根生化公司. 各种限制性内切酶, T4 DNA 连接酶购自大连宝生物有限公司. 琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司, 质粒提取采用 Viogrous 公司的质粒小量提取试剂盒. 转染试剂为 Viogrous 公司的 VioFect 转染试剂.

## 1.2 方法

1.2.1 重组质粒 pSNAV2.0-EGFP-U6-shRNA (VEGF165) 构建及鉴定 ① 自行设计一对引物(引物序列为 F: 5'GCCAGAATTCATGGTGAGCAAGGGC-GAGGAGC 3' R: 5'CTGCGTCGACCCCAAGTGGAAA-GACGCGCA 3'), 其中上游引物引入 *EcoRI* 位点, 下游引物引入 *SaII* 位点, 引物合成由上海英俊公司完成. ② PCR 法扩增 EGFP-U6-shRNA(VEGF165) 片段: 以 pDC316-EGFP-U6-shRNA(VEGF165) 质粒为模板, 使用前面自行设计的引物. 以 *EcoRI* 和 *SaII* 双酶切扩增产物和 pSNAV2.0-lacZ- $\alpha$  载体质粒. 获得的酶切产物 T4 DNA 连接酶作用下 25°C 室温连接 1~2 h. 取 5  $\mu$ L 连接产物转化, 次日挑取多个单克隆菌落, 分别进行 PCR 扩增. 鉴定引物序列为 ID-F 5'TGTAGAG-TTTTACTTGCTT 3'; ID-R: 5'CATATACGATACAAG-GCTG 3'. 取可扩出大小约 500bp 条带的单克隆菌落, 37°C 摇床中振荡培养 18 h 提取重组质粒, 再次行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳确定质粒构建成功.

1.2.2 rAAV2-EGFP-U6-shRNA(VEGF165) 载体细胞株的建立和病毒生产 参考文献 [3].

1.2.3 shRNA(VEGF165) 的鉴定和 SDS-PAGE 分析 取 10  $\mu$ L 获得的 rAAV2-EGFP-U6-shRNA(VEGF165) 病毒液 100°C 煮沸 10 min, 冰水浴. 取 1  $\mu$ L 为模板, 使用前述鉴定引物进行 PCR 扩增. 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 确定靶向干扰 VEGF165 基因的 shRNA 被包装入 rAAV2 病毒.

1.2.4 重组病毒 SDS-PAGE 分析病毒纯度 灌制 SDS-PAGE 分离胶和积层胶, 取病毒原液 10  $\mu$ L 2  $\times$  loading buffer 混合后, 于 100°C 煮沸 5 min, 冰水浴. 取 10  $\mu$ L 加样常规电泳约 2 h, 考马斯亮蓝振荡染色, 脱色液脱色. Alpha imager 图像扫描仪检测病毒纯度.

1.2.5 重组病毒物理滴度测定 采用点杂交法测定重组病毒的物理滴度(以载体基因组数量/L 表示, 即 v. g./L). 具体方法步骤简述如下: ① PCR 方法标记探针. 以 pSNAV2.0-EGFP 质粒 DNA 为模板, 引物序列: CMV-F 5'CGGTGCTTCTATGGAGGT 3'; CMV-R 5'GGCAGTACATCTACGTATTAG 3'. ② 探针回收、纯化. 向 50  $\mu$ L 的 PCR 反应溶液中加入 5  $\mu$ L 4 mol/L LiCl 和 150  $\mu$ L 预冷的无水乙醇, 置于 -20°C 2 h, 12000 r/min 4°C 离心 10 min, 700 mL/L 乙醇洗涤沉

淀、纯化, 20  $\mu$ L pH 8.0 的 TE 缓冲液重悬备用. ③ 取待检病毒样品 10  $\mu$ L, 加入 9  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 1  $\mu$ L Dnase I (总体积 20  $\mu$ L) 37°C 孵育 1 h. 将病毒样品和经定量后按 2 倍比梯度稀释的阳性对照质粒 (pSNAV2.0-EGFP, 4.1 mg/L) 于 100°C 煮沸 10 min, 立即置于冰水中; ④ 将 2 倍比梯度稀释对照质粒各取 1  $\mu$ L, 点一排于尼龙膜上, 变性后病毒样品点于尼龙膜上另外一排, 120°C 烤膜 20 min, 68°C 预杂交 2~4 h, 68°C 杂交过夜(16~20 h). 洗膜、检测、显色. 将病毒样品 DNA 杂交信号与阳性对照质粒 DNA 杂交信号相比较, 确定重组病毒物理滴度.

1.2.6 重组病毒 EGFP 的活性检测 取  $5 \times 10^4$  孔细胞接种于 24 孔细胞培养板, 常规培养 24 h 后, 取其中三孔消化、计数, 取均数为每孔大致细胞数. 据重组病毒滴度和细胞数/孔, 按 MOI 梯度值 ( $2 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^4$ ) 确定重组病毒加样量. 阳性对照病毒为 rAAV2-EGFP(本元正阳基因技术有限公司提供, 物理滴度为  $1 \times 10^{15}$  v. g./L) 加样 MOI 值为  $1 \times 10^5$ .

## 2 结果

2.1 重组质粒 pSNAV2.0-EGFP-U6-shRNA(VEGF165) 构建及鉴定 重组质粒 pSNAV2.0-EGFP-U6-shRNA(VEGF165) 的结构见图 1, 该重组质粒通过 PCR 可扩出大小约 500 bp 预期条带(图 2), 质粒构建正确.

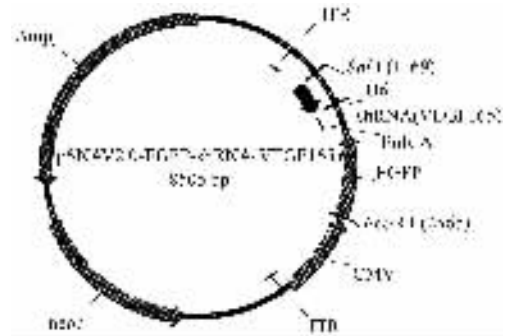


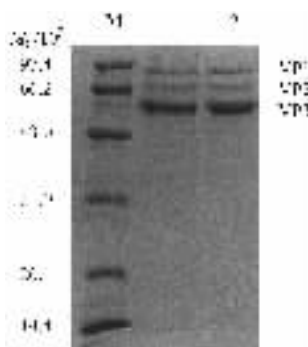
图 1 重组质粒 pSNAV2.0-EGFP-U6-shRNA(VEGF165) 的结构图



M: marker; P: 阳性对照质粒 pDC316-EGFP-U6-shRNA(VEGF165); 1, 2 pSNAV2.0-EGFP-U6-shRNA(VEGF165) 复孔.

图 2 pSNAV2.0-EGFP-U6-shRNA(VEGF165) 质粒 PCR 鉴定电泳图

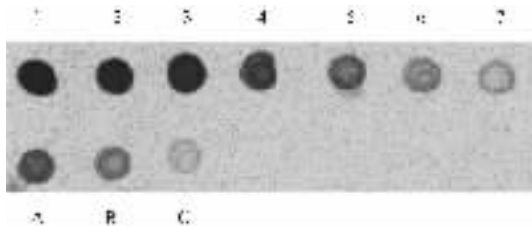
**2.2 重组病毒基因组中 shRNA( VEGF165 )的鉴定和 SDS-PAGE 分析** 取病毒原液使用鉴定引物进行 PCR 鉴定显示同样可扩出大小约 500 bp 的条带,表明靶向干扰 VEGF165 基因的 shRNA 被准确包装入 rAAV2 病毒中。图像扫描仪扫描分析 SDS - PAGE 电泳结果,显示病毒外壳蛋白 VP1, VP2 和 VP3 三条特征带明显,无明显杂带,病毒纯度在 98% 以上(图 3)。



M marker 1 2 病毒样品.

图 3 重组病毒 SDS-PAGE 电泳图

**2.3 重组病毒物理滴度测定** 根据病毒原液样品杂交信号 A, B 强度判断,纯化后重组病毒基因组滴度约为  $3 \times 10^{14}$  v. g./L.



1~7 分别为  $3 \times 10^{15}$ ,  $2 \times 10^{15}$ ,  $1 \times 10^{15}$ ,  $5 \times 10^{14}$ ,  $2.5 \times 10^{14}$ ,  $1.25 \times 10^{14}$ ,  $6.25 \times 10^{13}$  v. g./L. A 病毒原液; B 病毒稀释 2 倍; C 病毒稀释 4 倍。

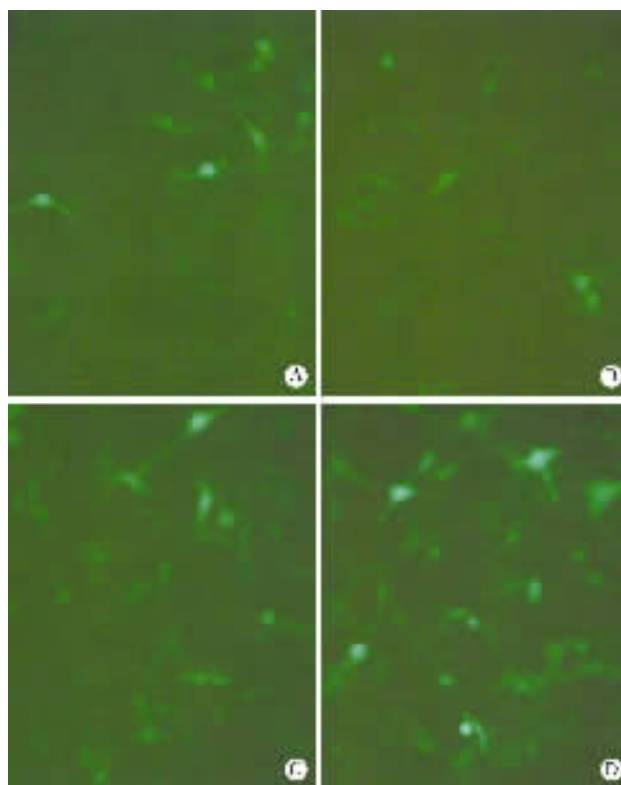
图 4 重组病毒纯化后测定滴度 dot blot 图

**2.4 重组病毒 EGFP 活性检测** 重组病毒各 MOI 梯度的 EGFP 活性不一(表 1, 图 5)。

表 1 重组病毒 EGFP 的活性检测结果

MOI 梯度	加入病毒体积( $\mu$ L )	24 h 荧光细胞数( % )	48 h 荧光细胞数( % )
重组病毒 $2 \times 10^5$	200	30	40
重组病毒 $1 \times 10^5$	100	30	40
重组病毒 $5 \times 10^4$	50	10	30
阳性对照病毒 $1 \times 10^5$	10	70	90

加样前细胞计数  $1 \times 10^5$ ; 阳性对照病毒为 rAAV2-EGFP, 滴度为  $1 \times 10^{15}$  v. g./L.



A 重组病毒感染细胞 24 h 后; B 重组病毒感染细胞 48 h 后; C 阳性对照病毒感染细胞 24 h 后; D 阳性对照病毒感染细胞 48 h 后. MOI 值均为  $1 \times 10^5$ .

图 5 重组病毒和阳性对照病毒感染细胞荧光照片  $\times 100$

### 3 讨论

RNA 干扰( RNA Interference, RNAi )是一种由双链小片段 RNA 触发序列特异性的 mRNA 通过递进式剪切、形成强有效瀑布效应方式进行降解,进而导致转录后基因沉默的保守现象,是在转录后水平封闭基因表达的有效方法<sup>[4-5]</sup>。RNA 干扰片段主要通过体外化学合成、体外转录和表达载体在细胞内直接生成等几种方式形成。其中通过质粒或病毒等表达载体体内转录的方法成为 RNAi 技术运用的主要手段<sup>[6]</sup>。

由于目前研究认为 VEGF 分子众多亚型中 VEGF165 是最主要的控制蛋白,也是在神经系统起主要作用的亚型,因此,如果希望采用通过 RNA 干扰技术特异性抑制 VEGF 基因的表达来阐明 VEGF 在缺血性脑损伤后各种生物学事件中的作用就必需构建含有靶向 VEGF165 基因的短发夹片段的载体系统<sup>[4,7]</sup>。从人体中分离出的 2 型腺相关病毒载体系统安全性好、宿主范围广,即可感染分裂细胞,也可感染静止期细胞,并且对神经系统组织亲嗜性好,可长期稳定地表达外源基因,是目前神经系统相关研究中应用最为广泛的载体系统<sup>[4,6]</sup>。我们使用以前筛选、

构建的 pDC316-EGFP-U6- shRNA( VEGF165 )质粒, 即含有经体外验证、筛选出的可有效抑制 VEGF165 基因表达的 shRNA 序列之质粒, 按相关文献中的方法<sup>[3]</sup>进行病毒包装生产。所获产品经鉴定显示靶向干扰 VEGF165 基因的 shRNA 被准确包装入 rAAV2 病毒中。病毒纯度在 98% 以上。滴度经点杂交法估算约为  $3 \times 10^{14}$  v. g./L。同时, 对该重组病毒所含报告基因 EGFP 活性进行检测, 显示该重组病毒感染效率较高。成功制备了靶向干扰 VEGF165 基因的 2 型重组腺相关病毒载体。经与国内外相关文献报道中有关资料<sup>[8]</sup>进行比较, 可以用于神经系统相关的实验研究。

## 【参考文献】

- [1] Sun FY, Guo X. Molecular and cellular mechanisms of neuroprotection by vascular endothelial growth factor [J]. J Neurosci Res, 2005, 79(1-2): 180-184.
- [2] 陶思丰, 陈力, 许远, 等. 携载 VEGF 基因的聚四氟乙烯血管

- 材料对 endothelial 细胞生长的促进作用[J]. 第四军医大学学报, 2006, 27(12): 1074-1076.
- [3] 吴小兵, 董小岩, 武志坚, 等. 一种快速高效分离和纯化重组腺病毒伴随病毒载体的方法[J]. 科学通报, 2000, 45: 2071-2075.
- [4] 刘军, 郭颖, 薛采芳, 等. 哺乳动物细胞 siRNA 表达载体的构建及鉴定[J]. 第四军医大学学报, 2003, 24(24): 2235-2237.
- [5] Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, et al. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways [J]. Nature, 2006, 441(7092): 537-541.
- [6] Gorbatyuk M, Justilien V, Liu J, et al. Suppression of mouse rhodopsin expression in vivo by AAV mediated siRNA delivery [J]. Vision Res, 2007, 47(9): 1202-1208.
- [7] During MJ, Cao L. VEGF, a mediator of the effect of experience on hippocampal neurogenesis [J]. Curr Alzheimer Res, 2006, 3(1): 29-33.
- [8] Babcock AM, Standing D, Bullshields K, et al. In vivo inhibition of hippocampal Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II by RNA interference [J]. Mol Ther, 2005, 11(6): 899-905.

编辑 袁天峰

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2007)22-2028-01

## 闭式乳突根治术联合鼓室成形术治疗胆脂瘤型中耳炎 35 例

李易洛, 洪爱珍

(咸阳市第一人民医院耳鼻喉科, 陕西 咸阳 712000)

【关键词】乳突炎, 乳突根治术, 闭式, 鼓室成形术

【中图分类号】R764 【文献标识码】B

1 临床资料 我科 1999-01/2006-06 收入住院的胆脂瘤型中耳乳突炎患者 35 例, 均采用闭式乳突根治术联合鼓室成形术。35 例患者均鼓膜松弛部穿孔或紧张部边缘性小穿孔, 耳咽鼓管通畅, 功能良好, 听力检查气导在 35 dB 以上, 骨导在 20 dB 以上。手术采用耳后切口, 凿开鼓室及乳突腔, 充分暴露鼓室。在耳科显微镜下用电骨钻、刮匙、耳息肉钳彻底清除乳突、鼓室、鼓室及面神经隐窝内的胆脂瘤, 增生肉芽组织及坏死变性组织等, 用弯形钩状钝头探针探查中耳结构是否正常。切取同侧颞肌瓣堵塞乳突腔, 根据中耳情况用自体听小骨或人工听小骨(生物陶瓷)重新组建听骨链, 听骨链重建完成后, 在听骨链周围鼓室内放入浸有抗生素液的小块明胶海绵, 一期完成乳突根治术和鼓室成形术。结果所有患者均在术后 2 mo 获得干耳, 检查听力均提高 15 dB 以上, 预防了颅内各种并发症。其中有 3 例在手术后 2 a 病情复发, 听力明显下降, 外耳道及鼓室有脓性分泌物。经再次开放性中耳乳突根治术治愈, 但听力造成永久性损伤。

2 讨论 胆脂瘤型中耳乳突炎是耳鼻喉科的一种常见疾病,

如果治疗不得当不及时, 胆脂瘤受到感染刺激其代谢更为活跃, 胆脂瘤不断扩大直接压迫骨质引起骨质破坏, 同时产生一种蛋白分解酶, 使胆脂瘤物质分解腐化, 进一步加重骨质破坏, 危及生命<sup>[1]</sup>。一般采用传统的开放式中耳乳突根治术治疗, 但是听力常受到损害, 影响患者的术后生活质量。随着医学技术的推广, 其手术方式发生了很大的变革。现代耳科手术的目的是清除鼓室、鼓室、乳突腔的病灶, 治疗或预防各种颅内并发症, 获得干耳, 尽力保留与传音功能有关的中耳结构, 并重建中耳结构, 提高听力。

闭式乳突根治术联合鼓室成形术的适应证: ①单纯型中耳炎, 骨瘤型及胆脂瘤型中耳炎鼓膜穿孔较小者、听力损失较轻者; ②胆脂瘤型中耳炎和慢性中耳乳突炎有鼓室成形术的条件者; ③上鼓室胆脂瘤, 但乳突气房气化良好者; ④中鼓室病变较轻, 耳咽鼓管功能良好者。手术禁忌证: ①耳咽鼓管功能差者; ②慢性中耳炎, 急性发作期; ③鼓膜大穿孔, 中耳病变严重者; ④严重高血压、心脏病、糖尿病、凝血功能不良者; ⑤年龄大于 60 岁者。此手术方式的优点: ①能较好地维持耳部外耳道美观, 保留了外耳道的生理功能, 避免遗留开放性的乳突腔, 术后无需经常清理术腔的干痂及分泌物; ②创伤较小, 见效快, 术后干耳恢复快, 便于治疗与护理, 有利于建立接近正常的中耳腔和重建传音结构, 术后一般听力提高 15 dB 以上, 患者容易接受。但此手术方式视野局限, 术腔窄小, 清除病灶不易彻底, 需要细心和耐心, 手术时间相对较长, 对技术操作要求熟练, 否则会引起较多并发症及副损伤。

我科 6 a 多来, 通过采用闭式乳突根治术联合鼓室成形术治疗胆脂瘤型中耳炎取得了较好的效果。我们认为这种手术方式实用、可靠、可行, 是胆脂瘤型中耳炎患者的最佳选择方法。

## 【参考文献】

- [1] 黄鹤年. 现代耳鼻喉头颈外科学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2003 600-601.

编辑 袁天峰

收稿日期 2007-10-15; 接受日期 2007-11-05

作者简介 李易洛, 本科, 副主任医师. Tel: (029) 33280050