

表达增强型绿色荧光蛋白标记的 hBax 和 hHGF 双基因的慢病毒
载体构建*

李珂 常青[△] 徐平 高洪波 李贞福
(青岛大学医学院附属医院 山东 青岛 266071)

摘要 目的 构建绿色荧光蛋白标记的 hBax 和 hHGF 双基因共表达的重组慢病毒并鉴定。方法 通过重叠 PCR 技术构建 attB1-K-hBAX/T2A/eGFP/P2A/hHGF-attB2 基因片段,利用 gateway technology 构建慢病毒载体质粒 pLV.EX2d.null-EF1A>hBAX/T2A/eGFP/P2A/hHGF 和阴性对照质粒 pLV.EX2d.null-EF1A>eGFP 并测序,上述两种质粒分别与辅助质粒共转染 293FT 细胞包装病毒,荧光显微镜检测病毒滴度。结果:经鉴定慢病毒载体质粒构建正确,荧光显微镜检测 hBax 和 hHGF 共表达慢病毒滴度为 7.8×10^7 TU/mL,仅表达绿色荧光蛋白的阴性病毒滴度为 9×10^7 TU/mL。结论 表达增强型绿色荧光蛋白标记的 hBax 和 hHGF 双基因的慢病毒构建成功并获得高滴度的病毒感染液。

关键词 慢病毒载体 肝细胞生长因子 冠状动脉旁路移植术 再狭窄

中图分类号 Q75,Q78,R373.9 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)18-3473-05

Construction of EGFP Labeled Lentiviral Vector Carrying
hBax and hHGF Genes*

LI Ke, CHANG Qing[△], XU Ping, GAO Hong-bo, LI Zhen-fu

(Department of Cardiac Surgery, The Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao, Shandong, 266071, China)

ABSTRACT Objective: To construct and identify lentiviral vector expressing hBax and Hhgf fusion protein labeled with enhanced green fluorescence protein. **Methods:** The attB1-K-hBAX/T2A/eGFP/P2A/hHGF-attB2 gene fragment was obtained by overlap PCR method. Gateway technology was used to construct the pLV.EX2d.null-EF1A>hBAX/T2A/eGFP/P2A/hHGF plasmid and pLV.EX2d.null-EF1A>eGFP plasmid. After sequencing, the lenti virus was packaged through co-transfecting above-mentioned construct into human embryonic kidney cell line-293FT with helper plasmids. Then the virus titer was examined by fluorescence microscope. **Results:** The recombinant lentiviral transfer vector plasmids were constructed correctly, the titer of lentiviral-hBAX-eGFP-hHGF was 7.8×10^7 TU/mL, and the titer of lentiviral-eGFP was 9×10^7 TU/mL. **Conclusions:** The lentiviral vector was constructed and high titer of lentivirus particles were obtained successfully.

Key words: Lentiviral vector; Hepatocyte growth factor; Coronary artery bypass graft; Restenosis

Chinese Library Classification (CLC): Q75, Q78, R373.9 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)18-3473-05

前言

在冠心病的治疗手段中,外科手术治疗占有重要的地位,其中冠状动脉旁路移植术(CABG)作为外科治疗中的常规手段得到广泛应用。CABG术可改善病变区域的心肌供血,但是静脉血管桥的10年再狭窄率达到50%^[1],严重的影响了手术的远期疗效。冠状动脉旁路移植术后静脉移植术再狭窄的研究很多,涉及范围从细胞水平到分子水平、从形态到功能、从生物因素到理化因素,但比较公认的促再狭窄机制是内皮损伤和血管平滑肌细胞的异常增殖及迁移^[2,3]。静脉桥血管壁薄而柔软,中膜平滑肌少而结缔组织多,弹性小,动脉血中的各种理化因素作用于静脉血管导致内皮受损,刺激其表达血小板衍生生长因子、成纤维细胞生长因子、一氧化氮合酶、内皮素-1、前列环素、血管紧张素II等多种细胞因子,这些细胞因子的合成与释

放导致深层平滑肌细胞的增殖及迁移,最终使血管内膜增生^[4,5]。所以对再狭窄的防治必须从多基因多角度多层次共同切入,才能取得明显的效果。而目前的研究多集中在某个单一基因的作用上,而且多是在细胞水平进行研究。因此,研究结论往往不甚统一,作用不甚明显。本研究从促进内皮细胞修复,诱导平滑肌细胞凋亡并抑制平滑肌细胞增殖三方面多角度多层次入手,防治再狭窄。

Bax作为Bcl-2家族的一员,广泛存在于人体的多种组织中^[6],可引发细胞凋亡。肝细胞生长因子(HGF)是一种多功能的细胞因子,来源于间质细胞并具有多种生物学活性,对心血管系统有重要的保护作用^[7],能抑制细胞凋亡和组织重构,并能特异性的促进内皮细胞的增殖,而对平滑肌细胞的增殖无促进作用^[8]。本研究利用慢病毒的包装技术,以绿色荧光蛋白为报告基因,构建了表达hBax和hHGF双基因慢病毒,为进一步的细胞

* 基金项目 山东省自然科学基金(2005Zrb104001)

作者简介 李珂(1985-),男,硕士研究生,主要研究方向 冠心病的外科治疗。电话 18661661534,E-mail 11kemoshou@126.com

[△]通讯作者 常青,E-mail 1changqing20671@163.com

(收稿日期 2012-01-22 接受日期 2012-02-16)

和动物试验的开展提供有效的载体。

1 材料与方法

1.1 材料

母载体质粒 pLV.Des2d.null 及辅助包装元件质粒 pLV/helper-SL3、pLV/helper-SL4、pLV/helper-SL5 均购自赛业(广州)生物科技有限公司。293T 细胞、pDONR221、重组质粒 PIRES-Bax-HGF (本实验室提供)、3T3 感受态细胞 (invitrogen)、PCR 试剂盒 (Fermentas)、高保真 DNA 聚合酶 (takara)；

凝胶回收试剂盒 (QIAGEN) 质粒小提试剂盒 (TIANGEN) 引物合成及基因测序由生工生物工程(上海)有限公司完成。

1.2 构建慢病毒载体质粒 pLV.EX2d.null-EF1A>hBAX/T2A/eGFP/P2A/hHGF 和 pLV.EX2d.null-EF1A>eGFP

1.2.1 引物 利用重叠 PCR 扩增 attB1-Kozak-hBAX/T2A/eGFP/P2A/hHGF-attB2,使用 Primer、oligo 和 sequencher 软件,根据 genbank 上提供的 hHGF (NM_000601.4)、hBAX (NM_138761.3)和 2A (M95781.1) 的基因序列合成所需引物(引物见表 1)。

表 1 重叠 PCR 引物序列
Table 1 Overlap PCR primer sequence

引物名称 Primer name	引物序列 5'to 3' Primer sequence 5'to 3'
attB1-K-BAX	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTGCCACCATGGACGGGTCCGGGGA
T2A-BAX-R	CACGTCCCCGCATGTTAGAAGACTTCCCTGCCCTCTCCGGAGCCGCCCATCTTCTTCCAGATGG
T2A-eGFP-F	CTTCTAACATGCGGGGACGTGGAGGAAAAATCCCGGCCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
P2A-eGFP-R	CATCTCCTGCTTGCTTTAACAGAGAGAAGTTCGTGGCGCCGCTGCCCTTGACAGCTCGTCCATGC
P2A-HGF-F	TCTCTGTTAAAGCAAGCAGGAGATGTTGAAGAAAACCCCGGCCTATGTGGGTGACCAAACTCCTG
attB2-HGF	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTATGACTGTGGTACCTTATATGTT

1.2.2 载体构建中的 PCR 融合过程 ①用引物 attB1-Kozak-BAX 和 T2A-BAX-R, 以 PIRES-Bax-HGF 为模板,PCR 扩增出来的片段为 attB1-K-hBAX/T2A (说明:为了后续的融合,该片段在 3' 端带了部分 T2A 序列)。②用引物 T2A-eGFP-F 和 P2A-eGFP-R,以 pEGFP-N1 (序列接受号 U55762.1) 为模板,PCR 扩增出来的片段为 T2A/eGFP/P2A (说明:为了后续的融合,该片段在 5' 端带了部分 T2A 序列,在 3' 端带了部分 P2A 序列)。③用引物 P2A-HGF-F 和 attB2-HGF,以 PIRES-Bax-HGF 为模板,PCR 扩增出来的片段为 P2A/hHGF-attB2 (说明:为了后续的融合,该片段在 5' 端带了部分 P2A 序列),④用引物 at-

tB1-Kozak-BAX 和 attB2-HGF,以①②③回收产物为模板,PCR 扩增出来的片段为 attB1-K-hBAX/T2A/eGFP/P2A/hHGF-attB2 (图 1)。PCR 反应体系 5 × Primer STARTM Buffer(Mg2+ Plus) 10 μL,dNTP Mixture(10 μM) 4 μL,上下游引物各 1 μL,模板 DNA 1 μL,Primer STARTM HS DNA Polymerase 0.5 μL,补加 ddH2O 至总体积 50 μL;扩增程序 98 °C 3 min,98 °C 10 s,60 °C 10 s,72 °C 4 min,30 个循环后 72 °C 延伸 5 min。6 × loading buffer 终止反应,用 1 %的琼脂糖凝胶进行电泳,DNA 琼脂糖凝胶电泳回收参照 QIAquick 的琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒进行回收,-20 °C 冰箱保存。

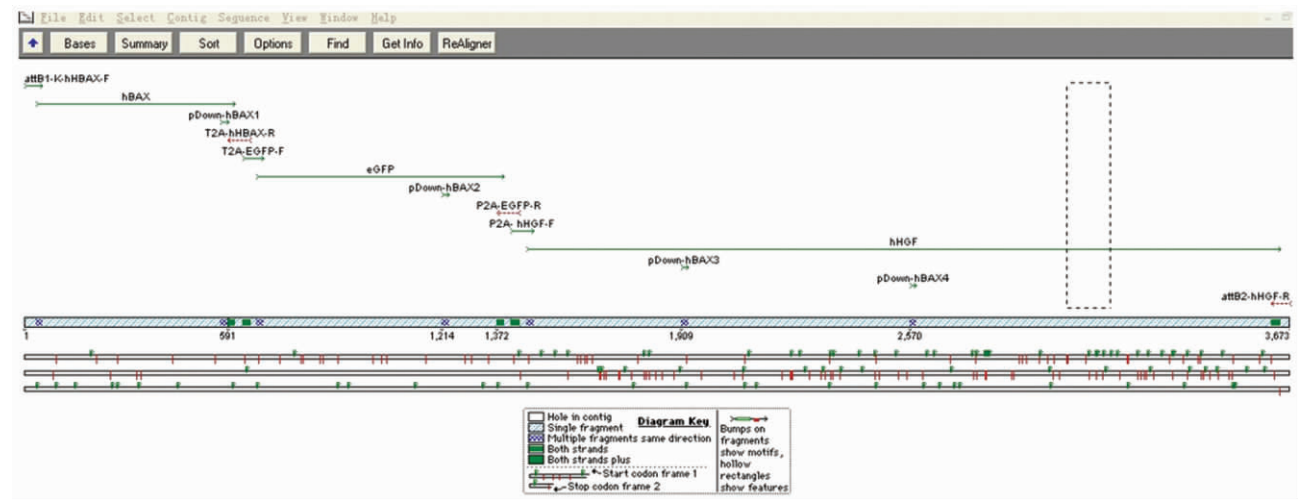


图 1 attB1-K-hBAX/T2A/eGFP/P2A/hHGF-attB2 PCR 融合示意图
Fig.1 attB1-K-hBAX/T2A/eGFP/P2A/hHGF-attB2 PCR fusion schemes

1.2.3 利用 Gateway Technology 构建 pDown-hBAX/T2A/ eGFP/P2A/hHGF 25 °C, BP 反应 1 h。反应体系为 attB1-K-hBAX/T2A/eGFP/P2A/hHGF-attB2,100ng pDONR221,100ng BP clonease,1 μL TE buffer,up to 5 μL。加入 0.5 μL 蛋白酶 K 于 37 °C

终止以上反应 10 min。转化 BP 反应产物到大肠杆菌 Stbl3,步骤为: a. 冰上溶解 1 管感受态; b. 把 2 μ L BP 反应物加入到 One Shot stb13 Chemically Competent Cells 中,冰上孵育 30 分钟; c. 42 $^{\circ}$ C 热击细胞 90 秒; d. 立即转移到冰上孵育 2 分钟; e. 加入 250 μ L S.O.C. medium,在 37 $^{\circ}$ C、225 r/min 的摇床里孵育 1 小时; f. 把 100 μ L 转化物涂到含有 50 μ g/mL Kan 的 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 孵育过夜。菌落 PCR 筛选阳性克隆。PCR 引物设计:引物 -F 为: XGGCCAGTCTTAAGCTCGGG; 引物 -R 为: AATACGACTCACTATAGGGGA。PCR 反应体系:灭菌水,16.1 μ L;10 $\times$ Taq Buffer with (NH₄)₂ SO₄,3 μ L; dNTP Mixture (10 μ M),3 μ L; MgCl₂,2 μ L; 引物 -F (10 μ M),1.2 μ L; 引物 -R (10 μ M),1.2 μ L; Taq DNA polymerase,1.5 μ L; 模板 DNA,2 μ L; 总体积,30 μ L。PCR 扩增程序:94 $^{\circ}$ C,3 min;94 $^{\circ}$ C,30 S;60 $^{\circ}$ C,30 S;72 $^{\circ}$ C,1 min (2 kb/min);29 个循环;72 $^{\circ}$ C,1.5 min。挑取阳性克隆质粒,送交阳性克隆测序。

1.2.4 利用 Gateway Technology 构建 pLV.EX2d.null-EF1A>hBAX/T2A/eGFP/P2A/hHGF 和 pLV.EX2d.null-EF1A>eGFP

少量提取阳性质粒 pUp-EF1A、pDown-hBAX/T2A/eGFP/P2A/hHGF、pDown-eGFP 和母载体质粒 pLV.Des2d.null。25 $^{\circ}$ C,LR 反应 16 h。反应体系 1: pUp-EF1A,12.61 ng; pDown-hBAX/T2A/eGFP/P2A/hHGF,20.84 ng; 母载体 pLV.Des2d.null,25.83 ng; LR clonase,1 μ L; TE buffer,up to 5 μ L。反应体系 2: pUp-EF1A,12.61 ng; pDown-eGFP,10.79 ng; 母载体 pLV.Des2d.null,25.83 ng; LR clonase,1 μ L; TE buffer,up to 5 μ L。加入 0.5 μ L 蛋白酶 K 于 37 $^{\circ}$ C 终止以上两个反应 10 min。转化 2 μ L LR 反应产物到 Stbl3,菌落 PCR 筛选阳性克隆。PCR 引物设计:引物 -F 为: CAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT; 引物 -R 为: GGAGCAACATAGTTAAGAATACC。PCR 反应体系:灭菌水,16.1 μ L;10 $\times$ Taq Buffer with (NH₄)₂ SO₄,3 μ L; dNTP Mixture (10 μ M),3 μ L; MgCl₂,2 μ L; 引物 -F (10 μ M),1.2 μ L; 引物 -R (10 μ M),1.2 μ L; Taq DNA polymerase,1.5 μ L; 模板 DNA,2 μ L; 总体积,30 μ L。PCR 扩增程序:94 $^{\circ}$ C,3 min;94 $^{\circ}$ C,30 S;60 $^{\circ}$ C,30 S;72 $^{\circ}$ C,1 min (2 kb/min);29 个循环;72 $^{\circ}$ C,1.5 min。挑取阳性克隆质粒,送交阳性克隆测序。

1.2.5 慢病毒的包装 取细胞状态良好,处于对数生长期的 293FT 细胞,细胞计数后,按照每个 10 cm 的培养皿 5×10^6 个细胞数接种于培养皿中,37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 的培养箱中培养过夜。第二天转染前去除旧的培养液,加入 5 mL 新鲜的含 10% 血清 DMEM 培养液,通过 Lipofectamine 2000,将 3 种辅助包装质粒和目的质粒(各 4 μ g)共转染 293FT 细胞。放置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中过夜培养。转染后一天,更换 10 mL 含 10% 血清 DMEM 培养液。放置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中继续培养。转染后 48 小时收集培养上清进行浓缩。加入 10 mL 新鲜的培养液继续培养,转染后 72 小时再次收集浓缩。浓缩步骤为: a.3000 r/min 低速离心 15 min,上清用 0.45 μ m 滤器进行过滤,以彻底去除细胞碎片; b.每个 UT 离心管装 20 mL 滤液,50000 $\times$ g 高速离心 90 min 沉淀病毒颗粒,弃去上清; c.每管沉淀用 200 μ L 培养液重悬病毒沉淀,分装进 2 个 0.5 mL 进口 AXYGEN 管中,每管 100 μ L。分装好的病毒放置 -80 $^{\circ}$ C 保存,

增强型绿色荧光蛋白标记的 hBax 和 hHGF 慢病毒命名为 lentiviral-hBAX-T2A-eGFP-P2A-hHGF (简称 lentiviral-hBAX-eGFP-hHGF),仅携带 eGFP 的空病毒命名为 lentiviral-eGFP。

1.2.6 病毒滴度测定 (1) 宿主细胞的准备 病毒感染前一天(第 1 天),胰酶消化细胞并计数细胞密度,按照合适的细胞密度接种到 6 孔板中,放置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱过夜培养,能使转染当天的融合度达到 30%-50%。(2) 病毒感染 a.感染当天(第 2 天),融解病毒,取 30 μ L 病毒原液,准备 10 倍稀释系列样品,稀释倍数从 10⁻³ 到 10⁻⁷。对于每一个稀释样品,用完全培养液稀释病毒至总体积 1 mL。b.去除细胞中的培养液,加入已含有不同病毒量的完全培养液。另外,保留一孔不添加病毒的细胞,作为空白对照组,每孔加入的培养液的体积应为 1 mL。放置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱过夜培养。c.感染后一天(第 3 天),去除含有病毒的培养液,加入 2 mL 新鲜的完全培养液。放置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱过夜培养。(3) 荧光计数 感染 3 天后进行荧光计数。

2 结果

2.1 PCR 扩增 attB1-K-hBAX/T2A/eGFP/P2A/hHGF-attB2

琼脂糖凝胶电泳 PCR 结果显示 3500~4000 bp 之间有单一亮带,与条带理论大小为 3673 bp 基本一致,因此对图谱中相应大小的条带进行切胶回收(图 2)。

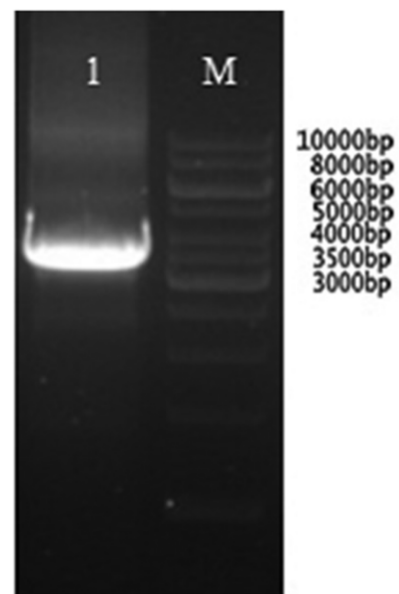


图 2 PCR 扩增 attB1-K-hBAX/T2A/eGFP/P2A/hHGF-attB2 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.2 Agarose gel electrophoresis results of PCR amplification attB1-K-hBAX/T2A/eGFP/P2A/hHGF-attB2

注:泳道 1:attB1-K-hBAX-T2A-eGFP-P2A-hHGF-attB2 的 PCR 产物;泳道 M:1 kb DNA Ladder

Note: Lane1: attB1-K-hBAX-T2A-eGFP-P2A-hHGF-attB2 PCR products; M: 1 kb DNA Ladder

2.2 菌落 PCR 筛选 pDown-hBAX/T2A/eGFP/P2A/hHGF

纯化回收基因片段 attB1-K-hBAX/T2A/eGFP/P2A/hHGF-attB2, 少量提取质粒 pDONR221, 通过 BP 反应构建出 at-

tB1-K-hBAX/T2A/eGFP/P2A/hHGF-attB2 并转化大肠杆菌,最后经菌落 PCR 筛选,PCR 产物条带理论大小为 3873 bp,与目的条带大小相符的克隆即为阳性克隆(图 3),挑取阳性克隆质粒并送交测序,测序结果证实 pDown-hBAX/T2A/eGFP/P2A/hHGF 构建准确无误,符合下一步实验要求。

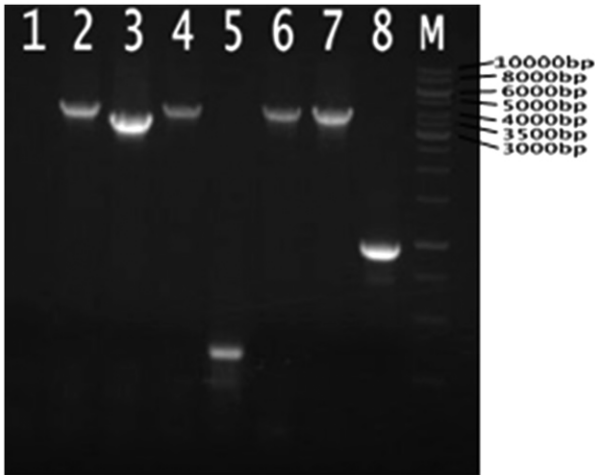


图 3 菌落 PCR 筛选 pDown- hBAX/T2A/eGFP/P2A/hHGF 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.3 Agarose gel electrophoresis results of Colonies PCR screening pDown- hBAX/T2A/eGFP/P2A/hHGF
注:泳道 1:阴性对照;泳道 2~泳道 8: pDown- hBAX/T2A/eGFP/P2A/hHGF①~⑦号克隆
Note: Lane1:negative control;Lane2~Lane8:pDown- hBAX/T2A/eGFP/P2A/hHGF①~⑦clones

2.3 菌落 PCR 筛选 pLV.EX2d.null-EF1A> hBAX/T2A/ eGFP/P2A/hHGF 和 pLV.EX2d.null-EF1A> eGFP

少量提取阳性质粒 pUp-EF1A、pDown - hBAX/T2A/eGFP/P2A/hHGF、pDown-eGFP 和母载体质粒 pLV.Des2d.null,通过 LR 反应构建 pLV.EX2d.null-EF1A>hBAX/T2A/eGFP/P2A/hHGF 和 pLV.EX2d.null-EF1A>eGFP,转化大肠杆菌后经菌落 PCR 筛选。pLV.EX2d.null-EF1A>hBAX/T2A/eGFP/P2A/hHGF 的 PCR 产物条带理论大小为 3743 bp,与目的条带大小相符的克隆即为阳性克隆(图 4)。pLV.EX2d.null-EF1A> eGFP 的 PCR 产物条带理论大小为 854 bp,与目的条带大小相符的克隆即为阳性克隆(图 5)。

2.4 病毒包装结果

包装转染 48 小时后荧光显微镜下可观察到绿色荧光,细胞荧光表达率达 90 %以上(图 6)。

2.5 滴度测定结果

经过荧光计数检测,HGF 和 Bax 共表达慢病毒滴度为 7.8×10^7 TU/mL,仅表达绿色荧光蛋白的阴性病毒滴度为 9×10^7 TU/mL。

3 讨论

基因转染的方法有很多,例如物理法、化学法及腺病毒载体转基因法等。物理法和化学法的转基因效率低 逆转录病毒只能感染分裂期细胞,且容纳外源性基因的能力差 腺病毒载体转基因法不能实现长时间的稳定表达。故本研究采用的是多

基因共表达的慢病毒载体,慢病毒属于逆转录病毒科,能感染的细胞类型广泛,既能感染分裂细胞又能感染不分裂的细胞,适合难转染的原代细胞和体内试验,慢病毒能整合到宿主细胞的染色体上并长期稳定表达,且具有低免疫原性,因此作为一种新型的基因转移载体有着广泛的前景。



图 4 菌落 PCR 筛选 pLV.EX2d.null-EF1A> eGFP 琼脂糖凝胶电泳结果
Fig.4 Agarose gel electrophoresis results of Colonies PCR screening pLV.EX2d.null-EF1A> eGFP

注:泳道 1 pLV.EX2d.null-EF1A>hBAX/T2A/eGFP/P2A/hHGF①号克隆;泳道 2 阴性对照
Note:Lane1:pLV.EX2d.null-EF1A>hBAX/T2A/eGFP/P2A/hHGF① clone;Lane2:negative control

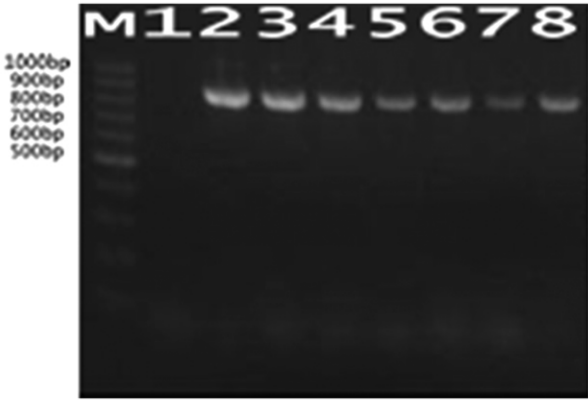


图 5 菌落 PCR 筛选 pLV.EX2d.null-EF1A>hBAX/T2A/eGFP/P2A/hHGF 琼脂糖凝胶电泳结果
Fig.5 Agarose gel electrophoresis results of Colonies PCR screening pLV.EX2d.null-EF1A> hBAX/T2A/eGFP/P2A/hHGF

注:泳道 1:阴性对照;泳道 2~泳道 8:pLV.EX2d.null-EF1A> eGFP ①~⑦号克隆
Note: Lane1:negative control;Lane2~Lane8: pLV.EX2d.null-EF1A> eGFP ①~⑦clones

多基因共表达载体构建策略有很多,本实验采取了口蹄疫病毒来源的 2A 序列链接目的基因,它是一种具有自我加工能

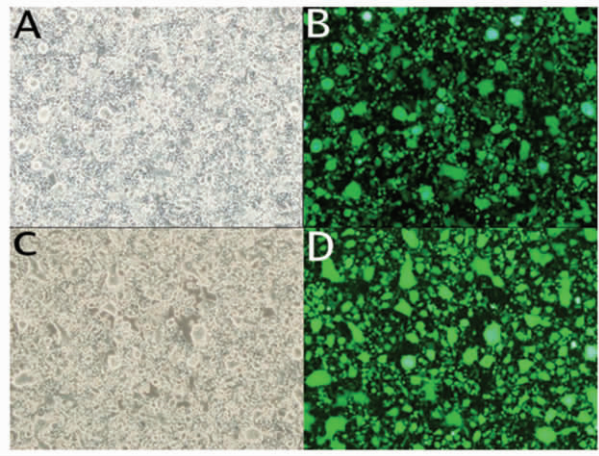


图 6 包装 48 小时后白光和荧光结果

Fig. 6 The white light and fluorescence results after packaged for 48 hours
Note: A and B are the white light and fluorescence results after the pLV.
EX2d.null-EF1A>hBAX/T2A/eGFP/P2A/hHGF packaged 48 hours
(100×); C and D are the white light and fluorescence results after the pLV.
EX2d.null-EF1A> eGFP packaged 48 hours(100×)

力的蛋白酶,将两基因分别克隆到 2A 序列的两侧,去除上游基因的终止密码形成单一的开放阅读框,翻译出的多聚蛋白可在编码 2A 区域的 C 末端被切割为两个蛋白,上游蛋白融合了 2A 的 C 端多肽,并释放出完整的下游蛋白,且上下游蛋白功能不受影响^[9],切割伴随翻译过程完成,切割活性高达 85 %-99 %。同时本实验在构建慢病毒载体时采用了 gateway 技术,能很好地避免传统方式构建载体时的反复酶切和连接过程,简单高效地完成了多基因共表达慢病毒载体的构建^[10]。

冠状动脉旁路移植术后移植静脉再狭窄的机制十分的复杂,目前其确切的分子机制至今不是很清楚,但血管内皮细胞的损伤和因此而导致的血管平滑肌细胞的过度增殖与迁移被认为是术后再狭窄的关键因素。Bax 是 Bcl-2 家族的一员,在体内分布广泛,它作为一种促凋亡的蛋白被广泛研究^[11]。Bax-Bax 同源二聚体能诱发凋亡过程,许多凋亡的细胞中都可检测到 Bax 的表达上调。肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 是由 α 亚基和 β 亚基通过二硫键而组成的异源二聚体,它是目前生物活性最广泛的生长因子之一,能抑制缺氧所导致的细胞凋亡^[12],并能促进内皮细胞的生长且这种促进作用类似且强于 VEGF^[13]。Yasuda 等^[14]发现 HGF 能特异性地促进内皮细胞增殖,而对平滑肌细胞无促增殖作用。Hironori 等^[15]发现在内皮细胞中 HGF 能通过影响 Bax 的凋亡通路来抑制细胞凋亡。

可见若能通过 Bax 和 HGF 两种基因共转染来实现促进内皮细胞增殖的同时抑制平滑肌细胞的增殖,那将更有效地防治 CABG 后静脉桥再狭窄,本实验成功包装了 hBax 和 hHGF 双基因共表达的慢病毒,为接下来研究其在二倍体细胞中的表达,对体外培养的内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞的影响以及后续的动物实验奠定了基础。

参考文献 (References)

[1] Mehta D, Lzzat M B, Bryan A J, et al. Towards the prevention of vein

graft failure[J]. Int J Cardiol, 1997, 62(Suppl 1): S55-63

[2] Huang T, Chang Q, Xu P. The influencing factor on restenosis of vein graft after coronary artery bypass grafts [J]. Medical Recapitulate, 2010,16(7):1043-1046

[3] Qiao A, Zeng Y, Xu X. Comparisons of Hemodynamics in 1-way and 2-way CABG[J].J Biomed Eng, 2006, 23(2): 295-299

[4] Friedl R, Li J, Schumacher B, et al. Intimal hyperplasia and expression of transforming growth factor-beta1 in saphenous veins and internal mammary arteries before coronary artery surgery [J]. Ann Thorac Surg,2004, 78: 1312-1318

[5] Bauters C, Isner JM. The biology of restenosis[J]. Cardiovascular Disease,1997,40(2):107-111

[6] Caton DA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease [J]. Lancet, 1993,341 (8855):1251-1259

[7] Nakamura Y, Morishita R, Higaki J, et al. Hepatocyte growth factor is a novel member of the endothelium-specific growth factors:additive stimulatory effect ofhepatocyte growthfactor with basic fibroblast growth factor but not with vascularendothelial growth factor [J]. Hypertens, 1996,14(9):1067-1072

[8] Nakamura Y, Morishita R, Nakamura S, et al. A cascular modulator, hepatocyte growth factor, is associated with systolic pressure [J]. Hypertesion, 1996, 28(3): 409-415

[9] Osborn M J, Panoskaltis-Mortari A, McElmurry RT, et al. A picornaviral 2A-like sequence-based tricistronic vector allowing for high-level therapeutic gene expression coupled to a dual-reporter system[J]. Molecular Therapy, 2005, 12(3): 569-574

[10] 顾洪生, 程志安, 李振宇, 等. 利用 gateway 技术构建腺病毒载体 pAd-LMP-1 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(24): 4425-4429

Gu Hong-sheng, Cheng Zhi-an, Li Zhen-yu, et al. Constructing a recombinant adenovirus vector pad-LMP-1 using Gateway technology [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2010, 14(24): 4225-4429

[11] Oltvai Z N, Milliman C L, Korsmeyer S J, et al. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death[J].Cell,1993,74(4): 609-619

[12] Hayashi S, Morishita R, Nakamura S, et al. Potential role of hepatocyte growth factor, a novel angiogenic growth factor, in peripheral arterial disease: downregulation of HGF in response to hypoxia in vascular cells[J]. Circulation, 1999,100(19 Suppl): 301-308

[13] Belle E, Witzenbichler B, Chen D, et al. Potentiated angiogenic effect of scatter factor/hepatocyte growth factor via induction of vascular endothelial growth factor: the case for paracrine amplification of angiogenesis[J]. Circulation, 1998,97:381-390

[14] Yasuda S, Noguchi T, Gohda M, et al. Single low dose administration of human recombinant hepatocyte growth factor attenuates intimal hyperplasia in a balloon-injured rabbit iliac artery mode [J]. Circulation, 2000, 101(21): 2546-2549

[15] Hironori Nakagami,Ryuichi Morishita, et al. Hepatocyte growth factor prevents endothelial cell death through inhibition of bax translocation from cytosol to mitochondrial membrane [J]. Diabetes, 2002, 51(8): 2604-2611