

野生型及 c.454C > T 突变型人血管内皮生长因子 A 基因重组真核表达载体的体外表达

吴 勇¹, 刘学刚², 赵 武¹, 徐家丽¹, 郭嘉诚¹, 李慧敏¹, 丁周志¹, 王亚明¹, 宋 伟³

[摘要] **目的:** 探讨野生型和 c.454C > T 突变型人血管内皮生长因子 A (VEGFA) 基因重组真核表达载体 (pEGFP-VEGFA) 体外表达有无差异。 **方法:** 用脂质体法将野生型和突变型 pEGFP-VEGFA 转染人胚胎肾细胞 (HEK293T), 采用荧光显微镜观察重组载体 VEGFA 和增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 的融合蛋白的表达, 以实时荧光定量 PCR 法检测 VEGFA mRNA 的表达。 **结果:** 在经转染的 HEK293T 细胞内观察到绿色荧光, 转染后 48 h 突变型 pEGFP-VEGFA 转染组荧光强度低于野生型 pEGFP-VEGFA 转染组。突变型 pEGFP-VEGFA 转染组 VEGFA mRNA 表达明显低于野生型 pEGFP-VEGFA 转染组 ($P < 0.01$)。 **结论:** 在 HEK293T 细胞中, 初步表明 VEGFA 突变体导致 VEGFA mRNA 和蛋白的表达水平均下调, 为进一步研究 VEGFA c.454C > T 突变体在先天性左心室流出道病变发生中的作用奠定了基础。

[关键词] 血管内皮生长因子 A; 突变; 遗传载体; 实时荧光定量聚合酶链反应; 左心室流出道梗阻

[中图分类号] Q 71 **[文献标志码]** A **DOI:** 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2015.02.003

The expression of recombinant eukaryotic expression vector of wild type and c.454C > T mutant human VEGFA gene in vitro

WU Yong¹, LIU Xue-gang², ZHAO Wu¹, XU Jia-li¹, GUO Jia-cheng¹, LI Hui-min¹, DING Zhou-zhi¹, WANG Ya-ming¹, SONG Wei³

(1. Department of Pediatrics, 2. Department of Cardiothoracic Surgery,

3. Department of Echocardiography, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004, China)

[Abstract] **Objective:** To explore whether there is a difference between the expression of recombinant eukaryotic expression vector of wild type and c.454C > T mutant human VEGFA gene (pEGFP-VEGFA) *in vitro*. **Methods:** The wild-type and mutant-type pEGFP-VEGFA were transfected into the HEK293T cells by lipofectin reagents, and the expressions of fusion proteins (EGFP and VEGFA) were observed under the fluorescence microscopy after 24 and 48 h post-transfection. VEGFA mRNA expressions were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. **Results:** Green fluorescences were observed in the HEK293T cells transfected with wild-type and mutant-type pEGFP-VEGFA. The intensity of fluorescence in HEK293T cells transfected with mutant-type pEGFP-VEGFA was lower than that transfected with wide-type pEGFP-VEGFA at 48 h post-transfection. The mRNA level of VEGFA in HEK293T cells transfected with mutant-type pEGFP-VEGFA was significantly lower than that transfected with wide-type pEGFP-VEGFA ($P < 0.05$). **Conclusions:** The recombinant eukaryotic expression vectors of human wild-type and mutant-type pEGFP-VEGFA have transiently expressed in HEK293T cells. Our findings preliminarily show that VEGFA mutant leads to down-regulation of VEGFA mRNA and protein expression level in HEK293T cells, which lays a foundation to further study the role of VEGFA c.454C > T mutant in the development of congenital left ventricular outflow tract obstruction.

[Key words] vascular endothelial growth factor A; mutation; genetic vectors; real time fluorescence quantitative PCR; left ventricular outflow tract obstruction

左室流出道梗阻 (left ventricular outflow tract obstruction, LVOTO) 是一类常见的先天性心脏病, 占先天性心脏病发病总数的 14%, 其遗传率高达

0.71% ~ 0.90%^[1]。Zhao 等^[2] 于 2010 年首次报道血管内皮生长因子 A (vascular endothelial growth factor A, VEGFA) 基因 c.454C > T 无义突变可能与 LVOTO 发生有关。我们在前期研究中已经成功构建人野生型和突变型 (c.454C > T) VEGFA 基因重组真核表达载体 (pEGFP-VEGFA)^[3], 本研究旨在进一步比较 2 种重组载体在人胚胎肾细胞 (HEK293T) 中 mRNA 和蛋白的表达水平, 为研究 VEGFA c.454C > T 突变体在 LVOTO 病变发生机制提供依据。

[收稿日期] 2013-08-31

[基金项目] 安徽省自然科学基金面上项目 (11040606M198)

[作者单位] 蚌埠医学院第一附属医院 1. 儿科, 2. 心胸外科, 3. 超声心动图室, 安徽蚌埠 233004

[作者简介] 吴 勇 (1981 -), 男, 硕士研究生。

[通信作者] 赵 武, 博士, 主任医师, 教授. E-mail: jellifish@163.com

1 材料与方法

1.1 材料 无内毒素质粒大提试剂盒、SuperReal PreMix (SYBR Green) 试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; ReverTra-Plus (高保真 RT-PCR 试剂盒) 购自东洋纺(上海)生物科技有限公司; TRIzol 总 RNA 抽提试剂、Lipofectamine 2000、Opti-MEM 购自 Invitrogen 公司(Carlsbad, CA); 无支原体胎牛血清(FBS) 购自浙江天杭生物科技有限公司; 胰蛋白酶购于江苏碧云天公司; 高糖 DMEM 培养基购自美国 Hyclone 公司。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 pEGFP-VEGFA 转染 HEK293T 细胞 将含有目的质粒的细菌接种于含卡那霉素(50 mg/L) 的 100 ml LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 摇菌过夜, 无内毒素质粒大提试剂盒提取质粒。复苏冻存于液氮中的 HEK293T 细胞, 将其培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中。置 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养, 当 HEK293T 细胞处于对数生长期时, 细胞胰酶消化计数(密度为 5×10^5 /L), 取 2 ml 接种于 6 孔培养板中, 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 24 h 后细胞融合生长至 90% ~ 95%, 分别将 4 μg 重组质粒 pEGFP-VEGFA^[3] 和 8 μl 脂质体溶于 250 μl OPTI-MEM 培养基中, 轻混匀, 5 min 后将两者混合, 置室温孵育 20 min, 制备复合物。将复合物按每孔 500 μl 加入到 6 孔板中, 于 37 °C、5% CO₂ 培养 6 h, 然后更换含 10% 胎牛血清的新鲜 DMEM 培养基 2 ml 继续培养。转染 24 ~ 48 h 后通过荧光显微镜直接观察瞬时转染情况, 实验中同时设置未转染组作为对照组。

1.2.2 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 技术检测 VEGFA 基因转录水平表达 重组载体瞬时转染 48 h 后分别取 6 孔板中 HEK293T 细胞, 按 TRIzol 试剂盒说明书提取细胞总 RNA, 用紫外分光光度计测定其浓度和纯度。按逆转录试剂盒说明书合成 cDNA, 逆转录的 cDNA 用于 PCR 反应; 采用在线 Primer3 引物设计软件设计 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 扩增 VEGFA 的引物序列, 上游引物: 5'-GAG GGC AGA ATC ATC ACG AA-3', 下游引物: 5'-TTG GAC TCC TCA GTG GGC A-3', 扩增产物长度 205 bp。内参 Homo sapiens actin 的引物序列, 上游引物: 5'-GCT ACG AGC TGC CTG ACG-3', 下游引物: 5'-TCG TGG ATG CCA CAG GAC-3', 扩增产物长度 112 bp; 将扩增较好的对照组、野生型 pEGFP-VEGFA 组和突变型 pEGFP-VEGFA 组 cDNA 部分等

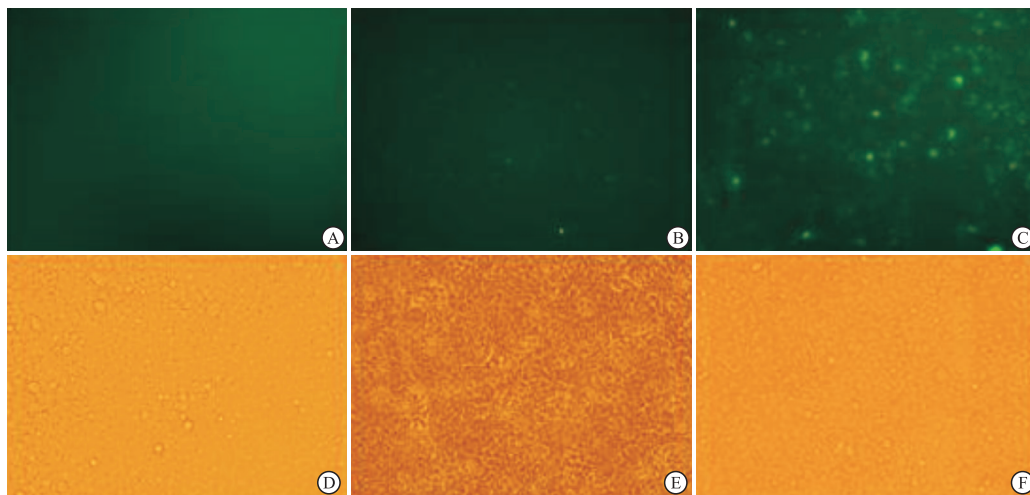
体积混合, 10 倍梯度稀释, 自定义其浓度为 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 , 作为目的基因和内参基因的标准品。SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 反应体系: $2 \times$ SuperReal PreMix 12.5 μl, 上游引物(10 mmol/L) 0.75 μl, 下游引物(10 mmol/L) 0.75 μl, cDNA 1 μl, $50 \times$ ROX Reference Dye 0.5 μl, Rnase-free ddH₂O 9.5 μl。将制备好的标准品和检测样本上机 (ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪)。反应条件: 预变性 95 °C 15 min, 变性 95 °C 10 s, 退火/延伸 60 °C 40 s; 扩增完毕后进行融解曲线分析, 并观察其是否为单峰曲线。根据标准品的扩增情况绘制标准曲线, 检测扩增效率。PCR 结果表示: 以 β-actin 为内参基因, 目的基因 VEGFA 的表达量 = $2^{-\Delta\Delta CT}$, $\Delta\Delta CT = (\text{目的基因 CT} - \text{内参基因 CT})_{\text{实验组}} - (\text{目的基因 CT} - \text{内参基因 CT})_{\text{对照组}}$, $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示实验组目的基因相对于对照组的倍数, 使用这一方法可以直接得到目的基因相对于内参基因的定量^[4]。

1.3 统计学方法 采用秩和检验和两两比较秩和检验。

2 结果

2.1 荧光显微镜检测 pEGFP-VEGFA 在 HEK293T 细胞中的表达 将野生型和突变型重组表达载体 pEGFP-VEGFA 转染 HEK293T 细胞, 转染 48 h 后在荧光显微镜下可见细胞内较强的绿色荧光, 表明 pEGFP-VEGFA 已成功转入 HEK293T 细胞, 并在细胞内获得瞬时表达。野生型 pEGFP-VEGFA 转染组荧光强度高于突变型 pEGFP-VEGFA 转染组, 表明突变型 pEGFP-VEGFA 转染组的增强型绿色荧光蛋白表达少于野生型 pEGFP-VEGFA 转染组, 提示突变型 pEGFP-VEGFA 转染组的 VEGFA 蛋白表达少于野生型 pEGFP-VEGFA 转染组。而空白对照组在荧光显微镜下未检测到绿色荧光(见图 1)。

2.2 实时荧光定量 PCR 技术检测 VEGFA 基因表达 对标准品 cDNA 分别用 VEGFA 和 β-actin 基因引物进行扩增, 得到较好的 S 型扩增曲线、融解曲线和标准曲线。VEGFA 基因标准曲线方程斜率 (Slope) = -3.403, 相关系数 (r^2) = 1, 扩增效率 (Eff) = 96.74% (见图 2); β-actin 基因标准曲线方程 Slope = -3.364, $r^2 = 0.999$, Eff = 98.282% (见图 3)。VEGFA 和 β-actin 基因的标准曲线均显示线性关系良好; r^2 均 > 0.99, 表明扩增结果可信度较高; Eff 较均接近 1, 表明扩增反应较理想。标准品 VEGFA、β-actin 基因扩增的 ΔCT 值与 cDNA 稀释



A、D:对照组暗视场、明视场; B、E:突变型pEGFP-VEGFA组转染48 h暗视场、明视场; C、D:野生型pEGFP-VEGFA组转染48 h暗视场、明视场

图1 荧光显微镜检测pEGFP-VEGFA在HEK293T细胞中的表达

倍数的对数值呈线性关系,经回归方程分析,斜率为 -0.0388 ,表明两种基因的扩增效率基本相同(见图4),可以用于 $\Delta\Delta\text{CT}$ 法分析基因相对表达量^[4]。对检测样本分别用 VEGFA、 β -actin 基因引物进行扩增,可以得到两组 VEGFA 和 β -actin 基因的典型“S”型扩增曲线和融解曲线。扩增曲线的横坐标为循环次数,纵坐标为荧光强度。对融解曲线分析发现 VEGFA 和 β -actin 的 PCR 产物均呈较为锐利的单一峰,说明引物特异性较好,测定结果准确可靠(见图5)。对照组、野生型 pEGFP-VEGFA 转染组和突变型 pEGFP-VEGFA 转染组 VEGFA mRNA 表达差异有统计学意义($P < 0.01$)。其中,对照组 VEGFA mRNA 表达均明显低于突变型 pEGFP-VEGFA 转染组和野生型 pEGFP-VEGFA 转染组($P < 0.01$),突变型 pEGFP-VEGFA 转染组 VEGFA mRNA 表达亦明显低于野生型 pEGFP-VEGFA 转染组($P < 0.01$)(见表1)。

表1 对照组、野生型和突变型 pEGFP-VEGFA 转染组中目的基因 VEGFA mRNA 相对定量分析($n_i = 10$)

分组	秩和(Ri)	平均秩和(\bar{R}_i)	Hc	P
对照组	55	5.5		
突变型 pEGFP-VEGFA 转染组	155	15.5 **	25.81	<0.01
野生型 pEGFP-VEGFA 转染组	255	25.5 ** $\Delta\Delta$		

两两比较秩和检验:与对照组比较 ** $P < 0.01$,与突变型 pEGFP-VEGFA 转染组比较 $\Delta\Delta P < 0.01$

3 讨论

LVOTO 包括从解剖左心室流出道一直延伸到降主动脉弓的一组狭窄性病变,包括左心发育不良综合征、主动脉瓣狭窄、主动脉瓣下狭窄、主动脉瓣

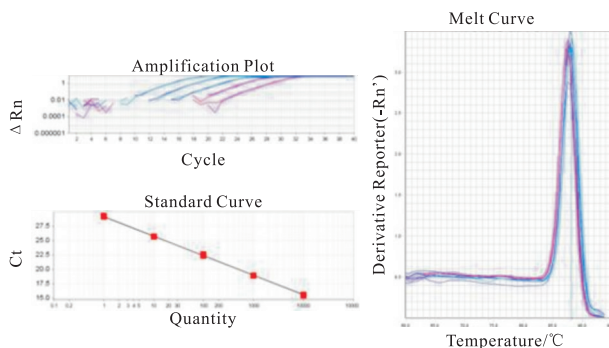


图2 标准品VEGFA基因扩增曲线、融解曲线和标准曲线

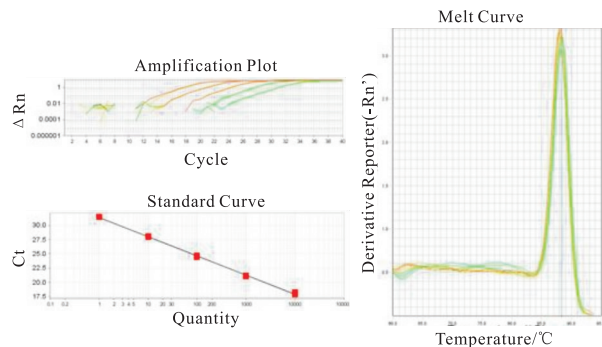


图3 标准品actin基因扩增曲线、融解曲线和标准曲线

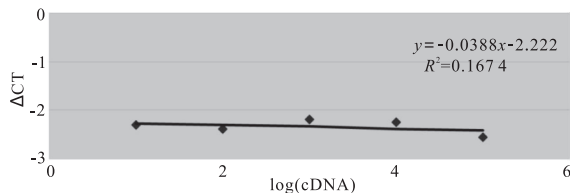
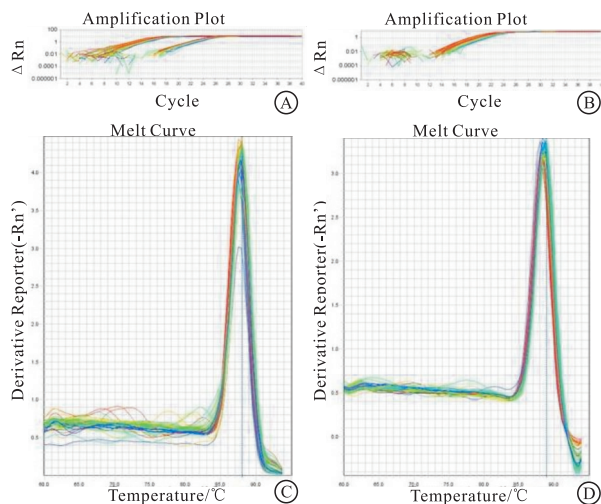


图4 标准品 cDNA 浓度梯度的log值对 VEGFA 与 actin 基因的 ΔCT 值作图

上狭窄、二叶式主动脉瓣、主动脉缩窄和主动脉弓中断^[5-7]。所有的 LVOTO 病变将引起左室后负荷增加,如病变严重未经治疗,将导致左心室代偿性肥厚,最终引起左心室扩张和左心室衰竭^[5]。LVOTO



A、C:样本VEGFA基因荧光定量PCR扩增曲线和融解曲线;
B、D:样本actin基因荧光定量PCR扩增曲线和融解曲线
图5 检测样本VEGFA基因和actin基因荧光定量PCR扩增曲线和融解曲线结果

病变常呈家族聚集性发病^[1,6],被认为是一组遗传实体^[7]。Zhao等^[2]于2010年对192例LVOTO患儿进行了VEGFA基因测序分析,首次报道VEGFA基因突变可能与LVOTO发生有关。然而VEGFA基因突变促进LVOTO的发生机制还未完全明确,有待于进一步研究。我们在前期研究中,成功构建了野生型和c.454C>T突变型pEGFP-VEGFA^[3]。为进一步研究VEGFA c.454C>T突变体在LVOTO病变发生中的作用打下基础,本研究比较了2种重组载体在HEK293T中VEGFA mRNA和蛋白的表达水平。

HEK293T细胞是由HEK293细胞衍生出的一种真核细胞系,是瞬时表达的首选细胞。在经转染的HEK293T细胞内观察到绿色荧光,而且野生型pEGFP-VEGFA转染组荧光强度明显高于突变型pEGFP-VEGFA转染组,表明突变型pEGFP-VEGFA转染组的EGFP表达少于野生型pEGFP-VEGFA转染组,提示突变型pEGFP-VEGFA转染组的VEGFA

蛋白表达少于野生型pEGFP-VEGFA转染组。

本研究采用SYBR Green I染料法对VEGFA基因进行了相对定量,结果突变型pEGFP-VEGFA转染组中VEGFA mRNA表达明显低于野生型pEGFP-VEGFA转染组($P < 0.01$),表明VEGFA突变体导致VEGFA mRNA的表达水平下调。

综上所述,在HEK293T细胞中,VEGFA突变体导致VEGFA mRNA和蛋白的表达水平均下调,为进一步研究VEGFA c.454C>T突变体在LVOTO病变中的作用打下了基础。

[参 考 文 献]

- [1] McBride KL, Pignatelli R, Lewin M, *et al.* Inheritance analysis of congenital left ventricular outflow tract obstruction malformations: Segregation, multiplex relative risk, and heritability [J]. *Am J Med Genet A*, 2005, 134A(2): 180-186.
- [2] Zhao W, Wang J, Shen J, *et al.* Mutations in VEGFA are associated with congenital left ventricular outflow tract obstruction [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 396(2): 483-488.
- [3] 吴勇, 刘学刚, 郭嘉诚, 等. 野生型及突变型人血管内皮生长因子A真核表达载体的构建与鉴定 [J]. *蚌埠医学院学报*, 2013, 38(9): 1077-1080.
- [4] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [5] Aboulhosn J, Child JS. Left ventricular outflow obstruction: subaortic stenosis, bicuspid aortic valve, supravalvar aortic stenosis, and coarctation of the aorta [J]. *Circulation*, 2006, 114(22): 2412-2422.
- [6] Wessels MW, Berger RM, Frohn-Mulder IM, *et al.* Autosomal dominant inheritance of left ventricular outflow tract obstruction [J]. *Am J Med Genet A*, 2005, 134A(2): 171-179.
- [7] Kerstjens-Frederikse WS, Du Marchie Sarvaas GJ, Ruiters JS, *et al.* Left ventricular outflow tract obstruction: should cardiac screening be offered to first-degree relatives? [J]. *Heart*, 2011, 97(15): 1228-1232.

(本 文 编 辑 刘 梦 楠)

(上接第147页)

- [7] 付静静, 张玲玲, 魏摇伟. 树突细胞在类风湿性关节炎病理机制中的免疫原性和耐受性双重作用 [J]. *中国药理学通报*, 2012, 28(9): 1185-1188.
- [8] 来福祺, 王丽君. 树突状细胞生物学特性与功能研究 [J]. *中国护理杂志*, 3(12): 17-18.
- [9] Guzman CA, Domann E, Mohde M, *et al.* Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin, the major virulence determinant of *listeria monocytogenes* [J]. *Mol Microbiol*, 1996, 20(1): 119-126.
- [10] Figdor CG, de Vries IJ, Lesterhuis WJ, *et al.* Dendritic cell immunotherapy: mapping the way [J]. *Nature Med*, 2004, 10

(5): 475-480.

- [11] Isomura I, Morita A. Regulation of NF- κ B Signaling by Decoy oligodeoxy-nucleotides [J]. *Microbiol Immunol*, 2006, 50(8): 559-563.
- [12] 胡恒贵, 尹向飞, 蒋红梅. 核因子- κ B 诱骗剂处理的 DC 对胶原诱导性关节炎大鼠外周血 IFN- γ 、IL-10、抗 II 型胶原抗体水平的影响 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2011, 31(10): 870-874.
- [13] 赵毅, 余克强, 李娟. 青藤碱对类风湿关节炎树突状细胞核转录因子- κ B 活性的影响 [J]. *广东医学杂志*, 2006, 27(1): 55-57.

(本 文 编 辑 刘 璐)