

## · 实验研究 ·

# 携载人基质金属蛋白酶组织抑制剂-2 基因重组腺病毒载体的构建

赵新 景在平 廖明芳 张素贞

【摘要】 目的 构建携载人基质金属蛋白酶组织抑制剂-2(hTIMP-2)基因的重组腺病毒载体,为基因治疗提供实验基础。方法 利用基因重组技术将腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 以及线性化的重组穿梭质粒 pTrack-CMV-hTIMP-2 共转化 BJ5183 受体菌并在其中发生同源重组,利用重组前后抗性的改变筛选出重组子,重组腺病毒质粒 AdhTIMP-2 经过 293 细胞的包装、扩增和纯化后,测定病毒滴度。一步法提取细胞总 RNA,RT-PCR 检测 hTIMP-2 的 mRNA。收集细胞上清,进行 Western 杂交检测 TIMP-2 蛋白。结果 得到了携带 hTIMP-2 基因的重组腺病毒,纯化后滴度为  $4 \times 10^{11}$  pfu/ml,应用 RT-PCR 和 Western blot 方法,在转染 293 细胞后 24h 即可检测到 hTIMP-2 的表达。结论 成功地构建了携带 hTIMP-2 的重组腺病毒载体,为下一步的基因治疗提供了基础。

【关键词】 基质金属蛋白酶组织抑制剂 腺病毒载体 基因治疗

The construction of adenovirus vector carrying human tissue inhibitor of metalloproteinase-2 gene ZHAO Xin, JING Zaiping, LIAO Mingfang, et al. Department of Vascular Surgery, Changhai Hospital, The Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

【Abstract】 Objective To construct an adenoviral vector carrying human tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) gene for gene therapy. Methods A recombinant adenovirus (AdhTIMP-2) containing human TIMP-2 cDNA fragment was generated by homologous recombination in BJ5183 bacteria. Recombinant plasmids were screened by alteration of antibiotic. The adenovirus vector was then packaged and amplified in 293 cells. The expression of TIMP-2 was detected by the techniques of Western blot and RT-PCR. Results The recombinant adenoviral vector carrying human TIMP-2 was constructed. The titer was  $4 \times 10^{11}$  pfu/ml after purification. The expression of TIMP-2 gene in 293 cells was detected by RT-PCR. After the 293 cells were transfected with AdhTIMP-2 24 hours, TIMP-2 protein could be detected in the medium by Western blot. Conclusions The recombinant adenoviral vector carrying human TIMP-2 is successfully constructed and paved the way for further application in vascular disease gene therapy.

【Key words】 Tissue inhibitor of metalloproteinase; Adenoviral vector; Gene therapy

基因治疗是将重组的基因物质导入患者细胞内达到治疗目的。目前可以通过多种途径或载体将重组的基因物质导入体细胞内,改变基因或蛋白表达,从而达到改变疾病病理过程的目的。本研究采用 AdEasy<sup>TM</sup>系统成功构建了携载人基质金属蛋白酶组织抑制剂-2(hTIMP-2)基因的腺病毒,为下一步基因治疗研究奠定了基础。

## 材料和方法

### 一、材料

作者单位 200433 上海 第二军医大学附属长海医院血管外科,全军血管外科研究所  
万方数据

细菌同源重组系统,包括大肠埃希菌 BJ5183, DH5 $\alpha$  和穿梭质粒 pAdTrack-CMV 以及腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1, pGEM4-hTIMP-2 克隆质粒载体,中间质粒 pBluescript。各种限制性内切酶购自 Takara 公司,质粒提取试剂盒购自 Qiagen 公司,DMEM/小牛血清,TRIzol 总 RNA 提取试剂,Superscript II 逆转录酶,Taq 酶和转染试剂 Lipofectamine 为 Gibco 公司产品。HEK293 细胞为本中心保存,常规细胞培养体系为含 15% 热灭活新鲜小牛血清的 DMEM 培养液,于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。

### 二、方法

(一) 腺病毒穿梭质粒的构建 将含 791bp 全

长 hTIMP-2 cDNA 片段的 pGEM4-hTIMP-2 克隆质粒用 EcoR I 和 Xba I 双酶切后装入中间质粒 pBluescript, 建成 pBluescript-hTIMP-2, 转化 DH5 $\alpha$  后摇菌扩增。TIMP-2 cDNA 用 Sal I 和 Xba I 双酶切从中间质粒 pBluescript-hTIMP-2 上切下, 将酶切回收产物与 pAdTrack-CMV 质粒用 Sal I 和 Xba I 双酶切后, T4 DNA 连接酶 16℃ 连接过夜, 将目的基因正向插入穿梭质粒 pAdTrackCMV Sal I/Xba I 多克隆位点之间, 构建成 pAdTrackCMV-hTIMP-2 穿梭质粒。以重组载体转化 JM109 大肠埃希菌, 筛选阳性克隆, 抽质粒后用 EcoR V/Bgl II 双酶切鉴定。

(二) 电穿孔感受态细菌的制备 在 BJ5183 菌生长到 D550 约 0.8, 收集细菌, 用 10% 预先冰浴的甘油洗 2 次, 分装成 20 $\mu$ l/管, -80℃ 保存。

(三) 细菌内的同源重组产生重组腺病毒质粒 参照 AdEasy<sup>TM</sup> 系统操作说明, 将 1 $\mu$ l 重组正确的 pAdTrack-CMV-TIMP-2 质粒和 pAdTrack-CMV (空载体阴性对照) 分别经 Pme I 内切酶线性化, 乙醇沉淀后与 0.1 $\mu$ g 超螺旋 pAdEasy-1 质粒在 2500V 200 $\Omega$  25 $\mu$ F 条件下, 电穿孔共转化 BJ5183 感受态菌。25 $\mu$ g/ml 卡那霉素 LB 培养基平板筛选, 16~20 h 后挑克隆, 抽质粒 0.8% 琼脂糖电泳鉴定; 将鉴定为正确的重组子(AdhTIMP-2 和 AdTrec)转化 DH10B 菌大量扩增。

(四) 293 细胞中扩增重组腺病毒 常规培养 293 细胞至 50%~70% 融合。按照 Lipofectamine 操作说明将 4 $\mu$ g PacI 酶切后的重组腺病毒质粒 AdhTIMP-2 和 AdTrec 转染 293 细胞, 3 d 后荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白(GFP)的表达; 7~10 d 后, 收集细胞, 反复冻融 3~4 次, 取 1/3 病毒上清液再感染 293 细胞大量扩增, 3~4 d 后收集细胞, PBS 重悬, 反复冻融, 反复感染-收集-冻融 3 次, 得到滴度更高的病毒, CsCl 梯度离心纯化病毒。

(五) 病毒滴度测定 293 细胞接种 24 孔板, 生长至 50%~70% 丰富度时, 待测病毒上清液倍比稀释后感染, 2d 后根据 GFP 的个数计算腺病毒滴度 pfu/ml。

(六) RT-PCR 检测 293 细胞中 hTIMP-2 的表达 参照文献<sup>[1]</sup>设计 TIMP-2 引物: Sense primer, CCG AAT TCT GCA GCT GCT CCC CGG TGC ACC CG; Antisense primer, GGA AGC TTT TAT GGG TCC TCG ATG TCG AG. 扩增产物为 590 bp 片段。取转染后 293 细胞, TRIzol 一步法提取细

胞总 RNA, 逆转录反应 42℃ 1 h, 取 1/10 体积逆转录产物为模板进行 PCR 反应, 条件为 94℃ 20s, 65℃ 30s, 72℃ 60s, 25 个循环, 扩增产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。

(七) 293 细胞中重组腺病毒体外表达的 Western blot 测定 小鼠抗人 TIMP-2 单克隆抗体购自美国 Chemicon 公司, 辣根过氧化物酶结合的抗鼠 IgG 二抗购自 Santa Cruz 公司, ECL 化学发光显色试剂盒为 Pierce 公司产品。取转染 AdhTIMP-2 的 293 细胞裂解产物进行 Western blot 检测, 步骤如下: 取 20 $\mu$ l 裂解上清进行 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 将蛋白电转至硝酸纤维素膜上, 脱脂奶粉封闭后, 加入 1:1 000 TIMP-2 单抗孵育, 用 1:2 000 二抗结合, 加入 ECL 试剂反应后暗室压片照相。

## 结 果

### 一、酶切鉴定结果

酶切鉴定的结果见图 1。重组的穿梭质粒 pTrack-hTIMP-2 和腺病毒 AdhTIMP 含有人 TIMP-2 全长基因。

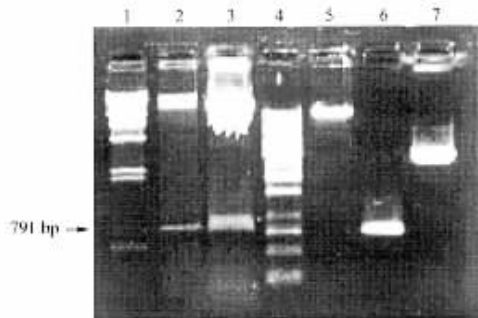


图 1 腺病毒重组子的 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析

1:  $\lambda$  DNA/Hind III 标志; 2: AdhTIMP-2 EcoR I 和 Xba I 双酶切; 3: pAdTrackCMV-hTIMP-2 Sal I 和 Xba I 双酶切; 4: 1 kb 标志; 5: pAdTrackCMV Sal I 和 Xba I 双酶切回收片段; 6: TIMP-2 酶切回收片段; 7: pBluescript 酶切回收片段

二、细菌内的同源重组产生重组腺病毒重组质粒 将酶切产物与 pTrack 质粒重组, 产生 pTrack-hTIMP-2; 用 1 $\mu$ l Pme I 内切酶线性化 pTrack-hTIMP-2 与 0.1 $\mu$ g 超螺旋 pAdEasy-1 质粒共转化 BJ5183 菌, 由于 pAdEasy-1 是氨苄青霉素抗性, 因此只有通过两个质粒上的同源序列在 BJ5183 菌内产生的重组体或穿梭质粒本身才有卡那霉素抗性, 结果得到了 30 个克隆, 随机挑取 8 个克隆抽质粒, 电泳结果证明其中有 4 个为重组质粒 AdhTIMP-2。(图 2)

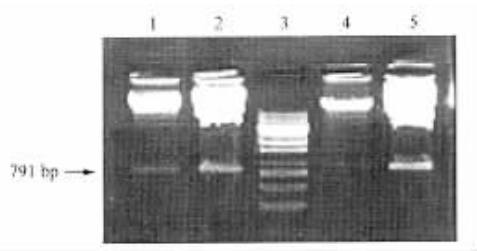


图 2 重组腺病毒筛选与初步酶切鉴定

1、2、4、5 重组腺病毒酶切鉴定,其中 1、2、5 为阳性重组子 3.1kb 标志



图 3 293 细胞转染 AdhTIMP 后 1d 细胞形态及 GFP 的表达(×400)

四、重组腺病毒体外表达的 Western blot 测定

取 20μl 上清进行 Western blot 检测发现,在病毒感染 24h 后即有 TIMP-2 蛋白表达,随后进一步增高。(图 5)

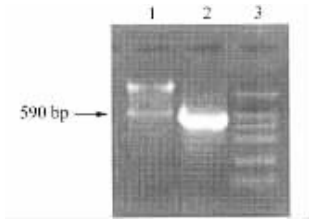


图 4 RT-PCR 检测 hTIMP-2 基因在转染后的 293 细胞中表达  
1 pGEM4-hTIMP-2 质粒 EcoR I/Xba I 双酶切 2 RT-PCR 产物 3, 100bp 标志

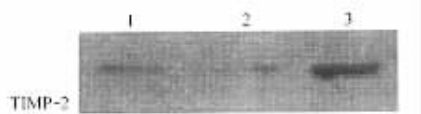


图 5 Western blot 检测 293 细胞转染后裂解上清液中 hTIMP-2 蛋白表达

1、2、3 分别为 1d、2d、3d 的上清液

讨 论

目前,基因治疗绝大多数针对各种恶性肿瘤,针对心血管疾病的基因治疗约占总数的 3%~5%,所针对的疾病主要包括静脉移植血管内膜增生性再狭窄、动脉损伤后内膜增生、动脉粥样硬化、下肢缺血性疾病、冠心病等。

293 细胞中产生重组腺病毒(AdhTIMP 和 AdTrc) 4μg AdhTIMP 质粒 PacI 酶切后转染 293 细胞 2d 后荧光显微镜观就可见约 20% 的细胞有 GFP 表达(图 3),最后经 CsCl 梯度离心纯化,病毒滴度测定为  $4 \times 10^{11}$  pfu/ml,纯化前为  $6 \times 10^9$  pfu/ml。

三、RT-PCR 检测 hTIMP-2 的表达

提取 AdhTIMP 转染后的 293 细胞总 RNA, RT-PCR 检测到了 TIMP-2 的 mRNA。(图 4)

基因治疗血管疾病具有独特的理论上和实际应用的优势。首先,通过导管技术可以直接到达血管局部。其次,血管组织在手术时暴露在外,便于直接进行基因操作,尤其是在进行旁路手术时静脉移植植物可以在体外进行基因转染。另外,由于血管平滑肌细胞的迁移和增殖对增生性再狭窄来说似乎是短暂和早期的过程<sup>[2]</sup>,基因只需在有限的时间内表达即可防治血管成形术或静脉移植术后内膜增生性再狭窄。再者,血管成形术时内皮细胞的损伤和去内皮化可导致血管平滑肌细胞暴露增强,因此提高了转染的效率。最后,血管疾病发病的局限性使基因导入更加简单有效。

腺病毒是基因治疗常用的病毒载体,它具有滴度高,感染细胞范围广和感染不受细胞周期限制等优点。产生重组腺病毒的传统方法是在哺乳动物包装细胞 293 或 911 内的同源重组,通过筛选空斑来鉴定扩增重组子,虽然该方法属经典有用的技术,但哺乳动物细胞内同源重组效率低,需要多次的空斑纯化及病毒产生的周期太长等缺点限制了腺病毒载体的更广泛的应用。本研究采用了一种新的载体产生系统<sup>[3]</sup>,以细菌中高效的同源重组机制代替哺乳动物细胞内同源重组,并在同源重组时整合入报告基因绿色荧光蛋白(GFP),可以直接观察转染与感染的效率,极大的简化了腺病毒的重组过程,使研究过程得到简化,提高了效率。以上特点极大的方便

了重组腺病毒在基因治疗中的应用。

基质金属蛋白酶(MMPs)在大多数血管疾病如动脉粥样硬化、血管损伤后再狭窄、移植血管新生内膜形成及动脉瘤的发病过程中具有重要的作用。应用基因转染技术将基因转染至血管使其在局部高表达,从而抑制 MMPs 的作用成为基因治疗血管疾病研究的热点<sup>[4]</sup>。TIMP-2 基因位于染色体 17q25,它编码一  $21 \times 10^3$  u、分泌性、可溶性的蛋白。TIMP-2 蛋白能与 MMP-2 前体的血红素结合区域结合,调节 MMP-2 的激活。本研究采用 RT-PCR 及 Western blot 技术在转染 Adh AIMP-2 TIMP-2 的 293 细胞中检测到 TIMP-2 基因表达,证明病毒扩增成功,为下一步转染其他细胞奠定了物质基础。

AIMP-2 进一步的实验包括培养血管平滑肌细胞,体外转染 AdhTIMP-2 后观察对细胞的影响,

并构建各种血管疾病的动物模型,为基因治疗血管疾病进行深入的探索,目前这些工作正在进行。

### 参 考 文 献

- 1 Stetler-Stevenson WG, Brown PD, Onisto M, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 mRNA expression in tumor cell lines and human tumor tissues. J Biol Chem, 1990 265 :13933-13938.
- 2 Faries PL, Marin ML, Veith FJ, et al. Immunolocalization and temporal distribution of cytokine expression during the development of vein graft intimal hyperplasia in an experimental model. J Vasc Surg, 1996 24 :463-471.
- 3 He TC, Zhou S, Costa LT, et al. A simplified system for generating recombinant adenovirus. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95 : 2509-2514.
- 4 George SJ, Lloyd CT, Angelini GD, et al. Inhibition of late vein graft neointima formation in human and porcine models by adenovirus-mediated overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinase-3. Circulation, 2000, 101 296-304.

(收稿日期 2002-11-17)

## · 病例报告 ·

# 肺癌气管狭窄置入支架后纵隔转移压迫食管狭窄置入食管支架一例

孙兴旺 马彪

患者女, 58 岁, 因左肺中心型肺癌伴纵隔转移 12 个月, 吞咽困难 2 周来我院就诊, 该患者于 2001 年 10 月因胸闷, 呼吸困难 5 个月, 来院诊治。我院支气管镜检查: 见气管下端后壁可见小丘状新生物, 管腔左、右壁黏膜增生、肥厚, 管腔明显狭窄, 左主支气管开口被新生物部分堵塞, 右上叶支气管轻度狭窄。随即置入气管支架(见图 1), 支架位置及膨胀较好, 气管下端管腔通畅, 呼吸困难消失。近 2 周患者明显吞咽困难, 进食流质即有呕吐, 食管造影可见食管上段有明显外压性狭窄, 随即置入食管被覆内支架, 术后即刻食管造影见支架位置及膨胀较好, 造影剂通过食管顺利(见图 2)。

讨论 气管支架治疗气管及支气管狭窄能有效改善和解除呼吸困难。气管和食管狭窄分别置入内支架是一种姑息治疗方法, 暂时解决呼吸和吞咽困难, 延长患者生命, 提高了生存质量。当患者有以下情况均可以同时置入内支架: ①肺部恶性肿瘤侵犯、压迫气管或支气管引起气管或支气管狭窄, 同时恶性肿瘤转移或侵犯食管狭窄者。②食管恶性肿瘤引起食管狭窄, 同时恶性肿瘤转移或侵犯气管或支气管狭窄者。③外伤或剧烈呕吐导致食管自发性破裂时, 气管有狭窄者。



图 1 气管支架植入后, 食管造影可见食管上段明显狭窄



图 2 可见食管上段及主气管内分别植入了内支架

(收稿日期 2003-04-07)



# 携载人基质金属蛋白酶组织抑制剂-2基因重组腺病毒载体的构建

作者：[赵新](#)，[景在平](#)，[廖明芳](#)，[张素贞](#)  
作者单位：[200433, 上海, 第二军医大学附属长海医院血管外科, 全军血管外科研究所](#)  
刊名：[介入放射学杂志](#)   
英文刊名：[JOURNAL OF INTERVENTIONAL RADIOLOGY](#)  
年，卷(期)：2003, 12(4)  
被引用次数：1次

## 参考文献(4条)

1. [Stetler-Stevenson WG, Brown PD, Onisto M](#) Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 mRNA expression in tumor cell lines and human tumor tissues 1990
2. [Faries PL, Marin ML, Veith FJ](#) Immunolocalization and temporal distribution of cytokine expression during the development of vein graftIntimal hyperplasiaIn an experimental model 1996
3. [HeTC, Zhou S, Costa LT](#) A simplified system for generating recombinantAdenovirus 1998
4. [George SJ, Lloyd CT, Angelini GD](#) Inhibition of late vein graft neointima formationIn human and porcine models by adenovirus-mediated overexpression of tissueInhibitor of metalloproteinase-3 2000

## 相似文献(3条)

1. 期刊论文 [赵新](#), [张培瑞](#), [俞祥海](#), [廖明芳](#), [张素贞](#), [景在平](#), [ZHAO Xin](#), [ZHANG Pei-rui](#), [YU Xiang-hai](#), [LIAO Ming-fang](#), [ZHANG Su-zhen](#), [JING Zai-ping](#) 腺病毒介导TIMP-2基因转染抑制大鼠腹主动脉肌细胞外基质降解的实验研究 - 中国普外基础与临床杂志2007, 14(3)

目的 利用大鼠腹主动脉瘤模型,在腹主动脉局部灌注携载基质金属蛋白酶组织抑制剂-2 (TIMP-2) 基因的腺病毒溶液,应用形态学及组织病理学手段评价其对血管壁基质降解的影响.方法 建立大鼠腹主动脉瘤弹力蛋白酶灌注模型,将通过基因重组技术构建成功的腺病毒质粒AdTIMP-2灌注至主动脉局部.2周后处死大鼠,取动脉标本行多聚甲醛灌注固定,常规石蜡包埋,对标本进行大体观察、组织病理学常规及特殊染色观察.结果 灌注后14 d AdCMV组和PBS组腹主动脉直径分别为(3.52±0.11)mm和(3.43±0.09)mm,明显大于AdTIMP-2组的(2.33±0.06)mm, P<0.05;腹主动脉直径增加百分比AdTIMP-2组为(48±4)%,明显低于AdCMV组的(120±6)%和PBS组的(118±5)%, P<0.05;AdTIMP-2组的8只大鼠均未见腹主动脉瘤形成,而AdCMV组和PBS组8只大鼠均见主动脉形成瘤样扩张;AdTIMP-2组中层弹力纤维及胶原纤维保存较完整,破坏较轻,在动脉外膜可见炎症细胞浸润.结论 腺病毒介导的TIMP-2基因转染可以恢复由蛋白溶解酶引起的细胞外基质降解,阻止动脉瘤的形成,为治疗腹主动脉瘤提供了新的策略.

2. 期刊论文 [赵新](#), [俞祥海](#), [张培瑞](#), [崔佳森](#), [景在平](#), [廖明芳](#), [张素贞](#) 基质金属蛋白酶组织抑制剂-2基因转染对平滑肌细胞的影响 - 中华实验外科杂志2005, 22(6)

目的探讨基质金属蛋白酶组织抑制剂(TIMP)-2基因对体外培养大鼠主动脉平滑肌细胞(SMCs)增殖和迁移能力的影响.方法利用重组腺病毒载体,将目的基因导入宿主细胞,建立转基因细胞株.应用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和酶联免疫吸附试验(ELISA)检测TIMP-2表达.同时应用细胞直接计数法和侵袭小室研究转染细胞体外增殖和侵袭情况.结果转染TIMP-2基因的平滑肌细胞基因组中存在有590 bp目的基因特异性片断,TIMP-2蛋白在转染后平滑肌细胞中获得稳定表达和分泌.转染后平滑肌细胞生长受到明显抑制. AdhTIMP-2组透过人工基底膜的细胞数为21.38±12.81,与正常对照组和AdCMV组(53.64±11.27, 44.23±12.75)比较,差异有统计学意义(P<0.05).结论重组腺病毒载体介导TIMP-2基因转染对体外生长主动脉平滑肌细胞增殖和侵袭有明显抑制作用.

3. 学位论文 [赵新](#) 腺病毒介导基质金属蛋白酶组织抑制剂2基因转染抑制主动脉细胞外基质降解的实验研究 2003

该课题主要目的:基质降解是目前主动脉疾病研究的一个新热点.该实验旨在构建携带抑制血管壁细胞外基质降解的基因——基质金属蛋白酶组织抑制剂-2(TIMP-2)的复制型缺陷型重组腺病毒载体AdTIMP-2,在体外研究证实它能够有效转染主动脉平滑肌细胞(SMC),成功表达TIMP-2蛋白质,并对血管SMC具有抑制增殖、侵袭作用的基础上,构建大鼠腹主动脉瘤模型,将腺病毒溶液直接灌注到主动脉局部,观察到腹主动脉瘤形成过程中细胞外基质降解的作用.该课题主要方法:1.携载TIMP-2基因的腺病毒载体(pAdEasy-1/TIMP-2)的构建:从含有TIMP-2目的基因的质粒pGEM/TIMP-2中纯化回收目的基因,继而再将其定向插入到复制缺陷型腺病毒载体pAdEasy-1,通过酶切鉴定挑选重组正确的克隆.应用电穿孔法转染感受态细胞,通过脂质体介导将重组腺病毒转进HEK293包装细胞,进一步大量制备重组腺病毒,并纯化和测定滴度.同时对其使用的安全性进行评价.2. AdTIMP-2体外转染主动脉平滑肌细胞及其对靶细胞的作用;分离培养大鼠主动脉SMC,以不同MOI值的AdTIMP-2转染SMC,应用免疫荧光染色标记被转染的细胞,测定转染效率.以逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)和Western杂交分别检测AdTIMP-2转染SMC后TIMP-2 mRNA的转录及TIMP-2蛋白的表达,以酶联免疫吸附实验(ELISA)检测细胞培养上清中TIMP-2蛋白的分泌.用MTT法测定AdTIMP-2转染大鼠主动脉SMC后TIMP-2对细胞增殖能力的影响.采用体外侵袭小室(Boyden Chamber)的方法研究TIMP-2对SMC侵袭能力的影响.应用凝胶电泳谱学分析(Zymography)的方法检测了AdTIMP-2转染后SMC分泌MMPs的改变.还检测了目的基因转染后细胞凋亡程度的改变.3. AdTIMP-2转染抑制主动脉基质降解的作用;用猪胰腺弹力蛋白酶灌注法建立大鼠腹主动脉瘤模型.于主动脉局部灌注高浓度AdTIMP-2重组腺病毒溶液,注射后14天测定主动脉直径改变;组织病理学观察主动脉炎症反应和基质降解程度;抗TIMP-2、MMP-2抗体免疫组织化学染色检测TIMP-2及MMP-2蛋白在主动脉组织中的表达;应用组织原位杂交技术检测转染后主动脉组织中的TIMP-2 mRNA及MMP-2 mRNA的表达情况.该课题主要结论如下:1.利用细菌内同源重组的方法能够高效的构建携载目的基因的重组腺病毒载体,重复性好,流程相对简单,所得到的重组腺病毒滴度高、纯度好、毒性低.2.我们构建的携带TIMP-2基因的腺病毒载体,能高效地转染培养的大鼠主动脉SMC. SMC能够表达、分泌TIMP-2蛋白.转染后SMC分泌活性MMPs的能力减低. TIMP-2基因具有明显抑制血管SMC增殖和迁移的作用.3.应用弹力蛋白酶灌注法建立的大鼠腹主动脉瘤模型更接近人类腹主动脉瘤的病理改变.首次应用TIMP-2基因转染大鼠主动脉,并证明其能够明显抑制主动脉基质降解和动脉瘤形成.

## 引证文献(1条)

1. [赵新](#). [张培瑞](#). [俞祥海](#). [廖明芳](#). [张素贞](#). [景在平](#) [腺病毒介导TIMP-2基因转染抑制大鼠腹主动脉细胞外基质降解的实验研究](#)[期刊论文]-[中国普外基础与临床杂志](#) 2007 (3)

本文链接: [http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_jrfsxzz200304018.aspx](http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_jrfsxzz200304018.aspx)

授权使用: 西安交通大学(xajtdx), 授权号: 0b809888-a3df-4a26-b095-9e4100c92f1b

下载时间: 2010年12月3日