

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61L 27/38 (2006.01)

A61L 27/54 (2006.01)



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710078299.2

[43] 公开日 2007年8月22日

[11] 公开号 CN 101020081A

[22] 申请日 2007.3.16

[21] 申请号 200710078299.2

[71] 申请人 重庆大学

地址 400044 重庆市沙坪坝区沙正街174号

[72] 发明人 杨应斌 蔡绍哲 杨力 蔡绍晖  
于淑惠 李军华

[74] 专利代理机构 重庆市恒信知识产权代理有限公司

代理人 刘小红

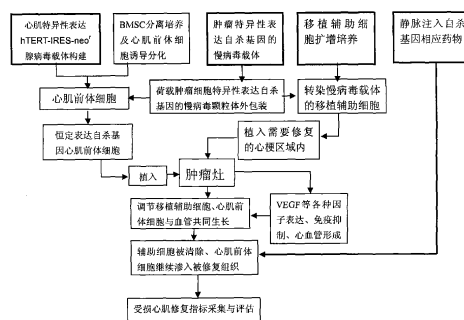
权利要求书1页 说明书23页 附图5页

## [54] 发明名称

一种用于梗死心肌修复与血管重建的细胞移植组合物

## [57] 摘要

本发明的目的是提供一种用于梗死心肌修复与血管重建的细胞移植组合物，该组合物包括移植辅助细胞，以及体外制备心肌前体细胞的基因工程载体。移植辅助细胞具有植入到心梗区瘢痕组织后，可以促进心梗区血管的生成，同时提高心肌前体细胞移植成活率的作用；基因工程载体用于体外从病人(或动物)骨髓干细胞中制备出心肌修复的高纯度心肌前体细胞。本发明组合物还包括与上述基因工程载体上的自杀基因相对应的药物，用于在移植辅助细胞与心肌前体细胞植入心梗区内并形成自己的血管系统后，将移植辅助细胞及发生瘤变的心肌组织前体细胞从宿主体内清除。由于心肌前体细胞可以来源于病人的骨髓，所以不需要免疫抑制剂来维持心肌前体细胞的存活。



1、一种用于梗死心肌修复与血管重建的细胞移植组合物，该组合物包括移植辅助细胞、以及体外制备的心肌前体细胞的基因工程载体；所述移植辅助细胞是经过表达自杀基因的病毒载体转染后筛选得到的，能够稳定表达自杀基因产物的人或动物的肝窦内皮细胞株或其他肿瘤细胞株；所述基因工程载体包括心肌细胞特异性启动子及内部核糖体进入位点序列调控新霉素抗性基因和端粒酶催化亚基同时表达的双顺反子腺病毒载体，以及肿瘤细胞特异性启动子调控自杀基因表达的慢病毒载体。

2. 如权利要求1所述用于梗死心肌修复与血管重建的细胞移植组合物，其特征是：组合物中还包括与自杀基因相对应的药物。

3. 如权利要求1或2所述用于梗死心肌修复与血管重建的细胞移植组合物，其特征是：所述肿瘤细胞特异性启动子选自端粒酶催化亚基启动子、甲胎蛋白启动子、癌胚抗原启动子、前列腺特异性启动子、视黄酸效应生长/分化因子启动子、肾细胞因子启动子、络氨酸激酶启动子、人工合成肿瘤细胞特异性表达启动子中的一种。

4. 如权利要求1或2所述用于梗死心肌修复与血管重建的细胞移植组合物，其特征是：所述心肌细胞特性启动子选自MHC启动子、MLC2v启动子中的一种。

5. 如权利要求1或2所述用于梗死心肌修复与血管重建的细胞移植组合物，其特征是：所述自杀基因选自胞嘧啶脱胺酶基因、单纯疱疹病毒的胸苷激酶基因、水痘疱疹病毒胸苷激酶基因、细胞色素P450 2B1基因、核苷磷酸化酶基因中的一种。

6. 如权利要求3所述用于梗死心肌修复与血管重建的细胞移植组合物，其特征是：所述人工合成的肿瘤细胞特异性表达启动子为人工合成核苷酸的序列，其核苷酸组成为SEQ ID No. 3。

7. 如权利要求1或2所述用于梗死心肌修复与血管重建的细胞移植组合物，其特征是：所述肿瘤细胞特异性启动子调控自杀基因表达的慢病毒载体的核苷酸组成为SEQ ID No. 4。

8. 如权利要求2所述用于梗死心肌修复与血管重建的细胞移植组合物，其特征是：所述与自杀基因相对应的药物选自5-氟胞嘧啶、丙氧鸟苷、无环鸟苷、6-甲氧嘌呤阿拉伯糖苷、环磷酰胺、6-甲基嘌呤脱氧核苷中的一种。

## 一种用于梗死心肌修复与血管重建的细胞移植组合物

### 技术领域

本发明属于生物技术领域。涉及一种用于梗死心肌修复与血管重建的细胞移植组合物。

### 背景技术

现有技术中细胞移植的意义及其存在问题：

目前对心肌损伤而引起的充血性心力衰竭（CHF）还缺乏有效的治疗药物和治疗手段，由于成年哺乳类动物的心肌细胞不能再生，心肌细胞丢失而导致的 CHF 是一个不可逆转的病理过程，所以细胞移植是未来治疗 CHF 的根本方法。

细胞移植的关键是解决细胞来源的问题。由于干细胞具有分化成各种组织细胞的潜力，特别是骨髓干细胞（Bone marrow stem cells, BMSC），具有取材方便，还可以实现自体移植，不需要免疫抑制剂进行维持移植物存活等优点，而被认为是一种理想的用于组织修复的种子细胞。据目前的研究表明，利用 BMSC 中的骨髓间充质干细胞（Mesenchymal stem cells, MSCs）在体外的诱导分化培养可以得到心肌组织前体细胞，如利用特定的化学诱导剂 5-AZA 和 bFGF 诱导 MSCs 在体外分化成心肌样细胞（裴雪涛、牛丽丽等，成年人骨髓间充质干细胞体外扩增和定向诱导分化为心肌样细胞的方法，中国专利公开号：CN 1536076A）等。

但是，这并不意味着我们就可以得到大量的可以用于移植修复的组织前体细胞。由于 BMSC 在体外诱导分化成各种组织前体细胞的过程中，并非所有的 BMSC 都可以分化为我们所需要的目的细胞。所以，在一个 BMSC 的诱导分化培养体系中，往往含有未分化的 BMSC 以及多种多样的组织前体细胞，我们所需要的心肌组织前体细胞只占其中的一部分。如果将没有经过筛选纯化的组织前体细胞移植入体内后，就可能导致植入细胞在体内发生瘤变，从而给病人带来潜在的危险。所以，如何从 BMSC 的诱导分化培养产生的混合细胞体系中，将心肌前体细胞分离纯化出来，才是解决细胞来源问题的关键。关于细胞的分离纯化方法，目前最常采用的方法是基于细胞表面特异性蛋白标志的流式细胞技术。然而不幸的是：心肌前体细胞表面上，到底存在何种特异性的特异性蛋白标志，至今还存在学术上的争论。

为了能够从干细胞分化后的培养体系中得到纯化了的的心肌前体细胞，Klug 和 Field 等用含  $\alpha$ -心肌肌凝蛋白重链（MHC）启动子驱动氨基糖苷磷酸基转移酶  $neo^r$  的

表达载体，转入胚胎干细胞的诱导分化培养体系中，然后再用 G418 进行筛选，从而成功地分离纯化出心肌前体细胞（J. Clin. Invest. 98:216, 1996）。也许 Klug 和 Field 的方法，是从干细胞体外诱导分化体系分离纯化出符合细胞移植要求的心肌组织前体细胞的一种理想方法。

但是该方法只适用于从胚胎干细胞分化培养体系中分离纯化心肌前体细胞，却很难适用于从 BMSC 分化培养体系中分离纯化出心肌所需要修复的细胞。这是因为胚胎干细胞具有强大的体外扩增能力，而 BMSC 的体外扩增能力非常有限，一般在体外进行有限的 10~20 次传代，满足不了基因工程操作所需要的要求。特别是 BMSC 分化后，细胞很快就凋亡了，根本就不可能进行转基因后的阳性细胞克隆筛选培养。

### 端粒酶与细胞扩增

端粒酶（Telomerase）在保持端粒稳定、基因组完整、细胞长期的活性和潜在的继续增殖能力等方面有重要作用。哺乳动物体内绝大多数组织细胞，在动物出生以后就丧失了端粒酶活性，因而组织细胞在体外只能进行有限传代的培养，这就制约了基因工程技术在动物组织细胞上的应用。一般认为，端粒酶活性的再活化，可以维持端粒的长度，而延缓细胞进入克隆性的老化，是维持细胞不老的关键步骤。很多研究表明，在端粒酶活性丧失的组织细胞中重建端粒酶的活性以后，可导致细胞的体外扩增能力增加，同时保持原有细胞的功能不变。

端粒酶活性再活化后，细胞就会继续地进行分裂克隆，但是与此同时，细胞发生瘤变致癌的风险也相对提高了，这是因为细胞不受控制地分裂对个体而言极具侵略和破坏性。然而，适度一过性地提高组织细胞中的端粒酶活性，可以在提高细胞体外扩增能力，便于基因工程操作的同时，还能增加细胞在移植后与机体组织的整合能力。

### 细胞移植初始无功能

细胞移植与器官移植最大的不同之处在于，植入器官具有完整的解剖结构，手术完成后，植入的器官可以通过自身的血管系统获取成活所需要的营养物质。而植入细胞进入机体后，只能依靠植入环境中的组织液提供养料和氧份。所不幸的是，大多数情况下细胞需要植入的环境，都是一些组织损伤后形成的瘢痕组织，如：梗死心肌的瘢痕组织等，在这些组织内往往血管分布稀少，除了肿瘤细胞外，正常细胞在植入的初期很难在这些组织内成活下来。因此，心肌损伤后瘢痕组织内的血管系统重建，是心肌前体细胞移植成活的关键。

综上所述，如何有效解决干细胞分化后，如何筛选纯化心肌组织前体细胞、如何在坏死组织部位重建心血管、以及如何有效控制细胞在植入体内后发生瘤变，是细胞移植治疗充血性心率衰竭的关键。故本发明提供一种用于梗死心肌修复与血管重建的细胞移植组合物，无疑对充血性心力衰竭患者带来了希望。

## 发明内容

本发明的目的是提供一种用于梗死心肌修复与血管重建的细胞移植组合物，该组合物包括移植辅助细胞，以及体外制备心肌前体细胞的基因工程载体。移植辅助细胞具有植入到心梗区瘢痕组织后，可以促进心梗区血管的生成，同时提高心肌前体细胞移植成活率的作用；基因工程载体用于体外从病人（或动物）骨髓干细胞中制备出心肌修复的高纯度心肌前体细胞。

本发明组合物还包括与上述基因工程载体上的自杀基因相对应的药物，用于在移植辅助细胞与心肌前体细胞植入心梗区内并形成自己的血管系统后，将移植辅助细胞及发生瘤变的心肌组织前体细胞从宿主体内清除。由于心肌前体细胞可以来源于病人的骨髓，所以不需要免疫抑制剂来维持心肌前体细胞的存活。

为实现上述目的而采用的技术方案是这样的：即提供一种用于梗死心肌修复与血管重建的细胞移植组合物，该组合物包括移植辅助细胞、以及体外制备的心肌前体细胞的基因工程载体；所述移植辅助细胞为人或动物的肝窦内皮细胞株或其他肿瘤细胞株、经过表达自杀基因的病毒载体转染后经筛选得到的，能够稳定表达自杀基因产物的细胞；所述基因工程载体包括转心肌细胞特异性启动子及内部核糖体进入位点序列（IRES）调控新霉素抗性基因和端粒酶催化亚基表达的双顺反子腺病毒载体，以及肿瘤细胞特异性启动子调控自杀基因表达的慢病毒载体。

组合物中还包括与所述自杀基因相对应的药物。

上述组合物中：所述肿瘤细胞特异性启动子选自端粒酶催化亚基启动子、甲胎蛋白启动子、癌胚抗原启动子、前列腺特异性启动子、视黄酸效应生长/分化因子启动子、肾细胞因子启动子、络氨酸激酶启动子、以及人工合成上述肿瘤细胞特异性启动子突变序列中的一种。

所述心肌细胞特性启动子选自心肌肌凝蛋白重链（MHC）启动子、心肌肌凝蛋白轻链2（MLC2v）启动子中的一种。

所述自杀基因选自胞嘧啶脱氨酶基因、单纯疱疹病毒的胸苷激酶基因、水痘疱疹病毒胸苷激酶基因、细胞色素 P450 2B1 基因、核苷磷酸化酶基因中的一种。

所述与自杀基因相对应的药物选自 5-氟胞嘧啶、丙氧鸟苷、6-甲氧嘌呤阿拉伯糖苷、环磷酰胺、6-甲基嘌呤脱氧核苷中的一种。

上述组合物可以通过目前成熟的基因工程及组织培养技术制备，其中：

1. 所述移植辅助细胞的制备过程包括：（1）人肝窦内皮细胞株（或其他肿瘤细胞）的体外培养；（2）用表达自杀基因的病毒载体转染步骤（1）所述的细胞；（3）用步骤（2）所述病毒载体上真核抗性基因所对应的抗生素培养基进行筛选培养；（4）将步骤（3）得到的细胞进行自杀基因表型鉴定；（4）将能够稳定表达自杀基因产物的细胞克隆按常规方法进行扩大培养；（5）移植前用 PBS 冲洗（4）所得到的细胞；

2. 所述双顺反子的腺病毒穿梭质粒载体构建：

（1）根据 NCBI 中所查到的 MHC 或 MLC2v 启动子序列为依据进行 PCR 引物设计，并从人（或动物）组织细胞基因组 DNA 中扩增出不同长度的 MHC 或 MLC2v 启动子片段；将 MHC 或 MLC2v 启动子片段插入无启动子腺病毒穿梭质粒载体中；在 MHC 或 MLC2v 启动子的 3' 端插入报告基因；将新构建好的腺病毒穿梭质粒载体与腺病毒基因组质粒在体外包装成腺病毒颗粒；将包装得到的腺病毒颗粒与含有心肌细胞或心肌前体细胞的培养体系共同培养；培养 24~48 小时后，检测报告基因的表达，选择具有较强心肌细胞特异性表达报告基因的最短的 MHC 或 MLC2v 启动子片段用于下一步的操作。（2）在普通无启动子腺病毒穿梭质粒载体（如：pdc312 等可以从市场购得）上的多克隆位点 5' 端插入 MHC 或 MLC2v 启动子片段；（3）将 IRES 片段插入到 MHC 或 MLC2v 启动子片段与 PolyA 片段的中间；（4）在 MHC 或 MLC2v 启动子片段与 IRES 片段之间插入 hTERT 编码序列；（5）在 IRES 与 PolyA 片段之间插入 neo<sup>r</sup> 编码序列；（6）最后用 PCR 对上一步操作所得到的质粒载体进行鉴定。

3. 所述肿瘤特异性表达 CD 慢病毒载体构建：（1）根据 NCBI 中所记载的端粒酶催化亚基启动子、甲胎蛋白启动子、癌胚抗原启动子、前列腺特异性启动子、视黄酸效应生长/分化因子启动子、肾细胞因子启动子、络氨酸激酶启动子、人工合成肿瘤细胞特异性启动子序列的其中一种进行引物设计，从人或动物的基因组 DNA 中扩增启动子片段，或采用人工合成肿瘤细胞特异性启动子片段；（2）用此片段取代慢病毒载体的启动子片段；（3）在上一步操作所得到的载体的肿瘤细胞特异性启动子的 3' 端，接入报告基因；（4）将上一步操作所得到的载体与相应的包装质粒在体外进行病毒颗粒包装，并将得到的病毒颗粒去感染肿瘤细胞与正常组织原代培养的细胞；（5）病毒颗粒感染细胞 24~48 小时后，检测各个培养细胞的报告基因表达情况，并选择肿瘤细胞特异表达报告基因的载体用于下一步的操作。（6）根据 NCBI 所记载的胞嘧啶脱胺酶基因、

单纯疱疹病毒的胸苷激酶基因、水痘疱疹病毒胸苷激酶基因、细胞色素 P450 2B1 基因、核苷磷酸化酶编码序列中的一种进行引物设计，并用 PCR 扩增相应的自杀基因片段；

(7) 将自杀基因片段插入并取代步骤 (3) 所得载体中的报告基因片段，从而得到新序列肿瘤特异性表达自杀基因的慢病毒载体；

4、所述与自杀基因相对应的药物：可以通过任何药物品市场获取。

上述组合物在梗死心肌修复与血管重建中的使用过程：

(1) 用组合物提供的双顺反子穿梭质粒载体和肿瘤细胞特异性表达自杀基因慢病毒载体按常规方法分别包装成腺病毒颗粒与慢病毒颗粒，并分离浓缩腺病毒颗粒和慢病毒颗粒；

(2) BMSC 的分离培养；

(3) 用 5-Az 诱导体外培养的 BMSC 分化；

(4) 用腺病毒颗粒和慢病毒颗粒转染分化后的 BMSC；

(5) 转染病毒后，将 BMSC 转入含 G418 和与慢病毒载体上真核抗性基因（如：blastocidin 等）相应抗生素的培养基中进行筛选培养，得到的心肌前体细胞用 PBS 清洗掉真核抗生素后，即可用于移植手术。

(6) 将发明组合物中的移植辅助细胞手术多点植入患者心梗区内，并每天肌肉注射环孢素 A 1mg/公斤体重；

(7) 用超声波检测仪或 CT 等监测移植辅助细胞的生长，当移植部位形成直径为 3~5 毫米大小的肿瘤灶时，将操作步骤 (5) 所得到的细胞植入肿瘤灶内；

(8) 心肌细胞植入 1~2 周后，静注或肌注适量与自杀基因相对应的药物如：5-氟胞嘧啶等，连续用药至移植辅助细胞被完全清除。

本发明的有益效果如下：

该组合物包括移植辅助细胞，以及体外制备心肌前体细胞的基因工程载体，其中移植辅助细胞具有植入到心梗区瘢痕组织后，可以促进心梗区血管的生成，同时提高心肌前体细胞移植成活率的作用；基因工程载体，可以从病人（或动物）骨髓干细胞中制备出心肌修复的高纯度心肌前体细胞。利用本发明方法获取的心肌前体细胞在心梗区内移植成活并形成移植辅助细胞与心肌前体细胞自己的血管系统后，可以用特定的药物将移植辅助细胞及发生瘤变的心肌组织前体细胞从宿主体内清除。因而，采用

本发明组合物进行梗死心肌修复及血管重建，不但具有心肌前体细胞移植成活率高，而且还避免了骨髓干细胞由于分化未尽等因素，而造成在植入体内后发生瘤变的潜在危险，因而具有使用安全的特点。

## 附图说明

图 1: 本发明用于梗死心肌修复与血管重建的细胞移植实施应用方案流程图。

图 2: 在体外培养的 BMSC 中加入 5-氮杂胞苷进行诱导分化培养 72 小时后细胞图 (10×20)

图中所示，用文献记载方法分离培养 BMSC 传二代细胞，在加入 5-Az 诱导分化培养 48 小时后，大多数的细胞形体变宽，已经开始出现衰老迹象，细胞很难再继续增殖。

图 3: 加入 5-氮杂胞苷同时转染腺病毒 Ad-MHCp-hTERT-IRES-neo<sup>r</sup> 后，细胞培养 72 小时图 (10×20)

图中所示，用本发明提供方法分离培养 BMSC 传二代细胞，在加入 5-Az 诱导分化培养 48 小时后，绝大多数细胞体形呈长梭状，细胞的数量明显增多，显示出较强的扩增能力。

图 4: 转染腺病毒 Ad-MHCp-hTERT-IRESneo 后，心肌前体细胞端粒酶活性测定 TRAP 图。图中所示，和转染前对照组相比较，含 MHC 启动子驱动 hTERT 表达的腺病毒颗粒，转染心肌前体细胞 24 小时后，细胞端粒酶的活性就得到显著的提高。72 小时后细胞端粒酶活性达到最高。

图 5: G418 及 blasticidin 双抗筛选 48 小时后细胞图 (10×20)。图中所示，加入 5-氮杂胞苷同时转染重组腺病毒及慢病毒颗粒后的 BMSC，在加入 G418 及 blasticidin 双抗筛选培养 48 小时后，大部分的细胞被杀死而呈悬浮状态。

图 6: G418 及 blasticidin 双抗筛选 72 小时后细胞图 (10×20)。图中所示，加入 5-氮杂胞苷同时转染重组腺病毒及慢病毒颗粒后的 BMSC，在加入 G418 及 blasticidin 双抗筛选培养 72 小时后，有部分细胞聚集在一起，且出现高频蠕动。

图 7: 加入 G418 及 blasticidin 进行双抗筛选 96 小时后心肌前体细胞图 (10×20)。图中所示，加入 5-氮杂胞苷同时转染重组腺病毒及慢病毒颗粒后的 BMSC，在加入 G418 及 blasticidin 双抗筛选培养 96 小时后，细胞开始出现明显的心肌细胞外形特征，在细胞与细胞之间，甚至出现类似闰盘的结构。

图 8: pdc315-MHCp-EGFP 腺病毒颗粒感染 BMSC 分化 72 小时后细胞共聚焦显微镜

图(10×63)。图中所示,加入5-氮杂胞苷同时转染重组腺病毒及慢病毒颗粒后的 BMSC,经过 pdc315-MHCp 腺病毒颗粒感染后,部分细胞有 EGFP 的表达,且表达 EGFP 的细胞具有心肌细胞的形状。

图 9: 重组 hTERT 启动子功能鉴定的激光共聚焦显微镜图(10×63)。其中的图 A 所示,荷载有 hTERT 启动子驱动 EGFP 表达的慢病毒颗粒,在感染端粒酶阳性的肿瘤细胞后,能表达出肉眼可见的 EGFP; 图 B 所示,荷载有 hTERT 启动子驱动 EGFP 表达的慢病毒颗粒,在感染端粒酶阴性的正常组织原代培养细胞后,不能表达可见的 EGFP; 说明了人工合成的 hTERT 启动子在端粒酶阳性肿瘤细胞中有很强的特异性表达活性。

### 具体实施方式

本发明的上述内容可以通过下面非限定性的实施例进一步说明。实施所需要组合物之外的材料均属可购取的商品。

#### 应用实施举例 1: 利用所述组合物修复大鼠梗死心肌及血管重建

1. 心肌梗死大鼠模型建立: 取体重 200 克左右的 SD 大鼠,用乙醚麻醉后,固定于台面上,接上大鼠专用呼吸机。用毛剪将胸部毛剪干净并消毒后,外科手术打开胸腔,暴露心脏。用丝线结扎冠状动脉的左前降支后,用手挤压胸腔排出空气,然后缝合胸腔。两个月后,即可用于下一步操作。

2. 大鼠心肌细胞特异性表达 hTERT 和 neor 的腺病毒双顺反子的腺病毒穿梭质粒载体制备: (1) 用大鼠基因组 DNA 作模板,根据 NCBI 中所载序列 X04267 进行引物设计,其中上游引物为: 5'-CGGTCTAGATGGGAGGAAGAGGC 3', 下游引物为: 5'-TTGAATTCGTTGGCTGCAAAACA-3', 用 PCR 方法扩增大鼠心肌肌凝蛋白重链 (MHC) 启动子序列。见序列 SEQ ID NO: 1。 (2) 然后将步骤 (1) 启动子片段取带腺病毒穿梭质粒 pdc315 的 mCMV 启动子,并在其多克隆位点上插入报告基因 EGFP 片段,得到的新载体命名为: pdc315-pMHC-EGFP。将其进行病毒颗粒包装后,转染 BMSC 诱导分化后的细胞培养体系,并用共聚焦荧光显微镜鉴定 EGFP 的表达,结果见图 8。 (3) 用限制性内切酶 EcoRI, Not I 消化质粒 pGRN145(可以从市场购得)和质粒 pIRESneor3,电泳并凝胶回收 hTERT 片段和线性 pIRESneor3 片段,用 T4 连接酶将 hTERT 片段和线性 pIRESneor3 片段连接起来,得到的腺病毒穿梭质粒命名为: pHtert-IRES-neo<sup>r</sup>; (4) 用限制性内切酶 EcoRI, XbaI 消化质粒 pHtert-IRES-neo<sup>r</sup>,用 EcoRI, NheI 消化质粒消化腺病毒穿梭质粒

pd315-pMHC, 分别回收 hTERT-IRES- neo<sup>r</sup> 片段, 和线性腺病毒穿梭质粒 pd315-pMHC 片段, 并用 T4DNA 连接酶将回收的两片段进行连接, 得到的重组质粒命名为: pd315-pMHC-hTERT-IRES- neo<sup>r</sup>, 即是本发明所述心肌细胞特异性表达 hTERT 和 neo<sup>r</sup> 的腺病毒双顺反子的腺病毒穿梭质粒载体, 其核苷酸序列见序列表 SEQ ID NO. 2。

3. 肿瘤特异性表达 CD 及 EGFP 慢病毒载体构建: (1) 以 NCBI 中序列 AB016767 的第 2930~3762 之间的碱基序列为基础进行启动子序列设计, 为了提高启动子在肿瘤细胞中的转录活性, 同时降低在端粒酶阴性细胞中的表达活性, 在序列的内部插入了一些顺式作用元件序列 (见序列表 SEQ ID NO:3.); 为了下一步能够方便地取代慢病毒载体上的启动子, 在序列的 5' 端引入了 ClaI 限制性内切酶位点识别序列, 在序列的 3' 端引入了 BamHI 限制性内切酶位点识别序列, 最后采用人工化学合成法合成, 并将其亚克隆入 PUC57 中, 命名为 PUC57-phTERT; (2) 根据 NCBI 注册的序列 S56903, 进行引物设计, 为了方便与载体进行连接, 我们在上游引物的 5 端引入 BamHI 限制性内切酶识别位点序列, 在下游引物的 5 端引入 AgeI 限制性内切酶识别位点序列, 因而, 上游引物为: 5' -ATAGGATCCGACAGCAGCAATGAC-3', 下游引物为: 5' -TATACCGGTGCGTTGGAGGAAT-3'。然后进行 PCR 扩增; (3) 用 PCR 方法用扩增 EGFP 片段, 其上游引物为: 5' -CACCATGGTGAGCAAGGGC-3', 下游引物为: 5' -ACAACACTCAACCCTATCTCGGTCT-3', PCR 产物与试剂盒 pLenti6/V5 Directional TOPO® Cloning Kit (可从 Invitrogen 公司购买) 中的线性慢病毒载体进行 TOP 连接, 得到的载体命名为 pLenti-EGFP; (4) 用限制性内切酶 BamH I、Age I 消化步骤 (2) 的 PCR 产物, 以及慢病毒载体 plenti-EGFP, 最后用琼脂糖凝胶电泳方法分别回收 CD 片段和线性载体片段; 用 T4 DNA 连接酶将 CD 片段和线性载体片段进行连接, 得到的表达 CD 的慢病毒载体质粒命名为: pLenti-CMVp-CD; (5) 用限制性内切酶 Cla I、BamH I 消化步骤 (1) 所得质粒 PUC57-phTERT, 以及慢病毒载体 pLenti-CMVp-CD, 分别用凝胶电泳回收 phTERT 启动子片段及无启动子慢病毒载体 pLenti-CD 片段, 并用连接酶将所回收的两条片段进行连接, 得到的质粒载体即是肿瘤特异性表达 CD 的慢病毒载体, 并命名为: pLenti-phTERT-CD, 其核苷酸组成见序列表 SEQ ID NO. 4; (6) 用 hTERT 启动子取代步骤 (3) 所得慢病毒载体 pLenti-EGFP 上的 CMV 启动子片段后, 得到的质粒命名为: pLenti-phTERT-EGFP。

4. 慢病毒颗粒的体外包装与纯化: (1) 将上述操作所得到的慢病毒质粒载体 plenti-hTERT-CD 和 plenti-hTERT-EGFP, 转化 DH5  $\alpha$  感受态大肠杆菌中进行扩增, 并制备大量的超纯质粒; 将此两种超纯质粒分别与 Invitrogen 公司的慢病毒包装质粒

plp1、plp2、plpVSV-G 按一定比例与阳离子脂质体混合后，转入 293FT 细胞中进行包装并分离纯化病毒颗粒，（具体操作按 pLenti6/V5 Directional TOPO® Cloning Kit 指导说明书进行）；（2）将由质粒 plenti-hTERT-EGFP 及 plenti-CMV-EGFP 包装而来的慢病毒颗粒分别与端粒酶阳性的：hLSEC 细胞、结肠癌细胞（SW480）、人胚肾上皮肿瘤细胞（293FT）、肝癌细胞（HepG II）、胃癌细胞（SGC7901）、黑色素瘤细胞（B16）等，以及端粒酶表达阴性的人骨肉瘤细胞（U2OS）、W38 细胞、正常组织细胞进行共同培养，48 小时后，用激光共聚焦显微镜观察 EGFP 的表达。其结果见图 9。

5. 腺病毒颗粒的包装鉴定：（1）将负载心肌细胞特异性表达 hTERT 和 neo<sup>r</sup> 的穿梭质粒 pdc315-MHCp-hTERT-IRES-neo<sup>r</sup> 与腺病毒包装质粒 pBHGloxDeltaE1, 3Cre 共转染人胚肾 293 细胞（HEK293）；（2）当 60%~80% 的包装细胞出现变圆，并有部分细胞开始出现脱壁的细胞病理现象（CPE）时，利用超声波将细胞破碎并离心分离，收集含有病毒颗粒的上清液，包装得到的病毒颗粒命名为：Ad-MHCp-hTERT-IRES-neo<sup>r</sup>，纯化后进行病毒颗粒测定、及双引物 PCR 鉴定。具体操作按元阳公司提供方法进行。此方法得到的病毒滴度可达  $5 \times 10^9$  VP/ml 以上（注：如果 OD260 小于 0.1 则用氯化铯梯度超高速离心浓缩病毒回收液后再测）。PCR 鉴定 MHC 片段的引物为上游引物为 5'-CTAGGTCCTAACAGAC-3'，下游引物为 5'-TGTCTCTCTAGATTC-3'（产物大小为 247bp）；鉴定 hTERT 片段的引物为 5'-TCTGGGATGCGAACGG-3'，下游引物为 5'-ACGGATGGGTGGGAGTG-3'（产物大小为 309bp）。

6. 心肌前体细胞的制备：从体重为 150~200 克健康 2 月龄 SD 大鼠，乙醚吸入麻醉后，无菌条件下取下股骨和胫骨，用 PBS 冲洗干净后，除去骨端，暴露骨髓；用含 10% 胎年血清的 DMEM/F12（比例为 1:1）5 毫升冲洗骨髓；用 5 毫升移液枪反复吹打冲洗液，直到看不到凝块后，接种于 50 毫升细胞培养瓶中；继续培养 24 小时后，换液去除不贴壁的细胞；继续 37℃ 二氧化碳培养箱中培养至 80% 细胞呈融合状态；吸净培养液，用 0.25% 胰蛋白酶室温消化细胞 3~4 分钟；加入 15 毫升含 10% 胎年血清的 DMEM/F12 终止消化，用 5 毫升移液枪反复吹打细胞致悬浮状态后，接种于 3 个 50 毫升细胞培养瓶中；37℃ 二氧化碳培养箱中培养 20 分钟后，轻轻地将未贴壁细胞悬液转入另外的培养瓶中；重复此操作 2 遍后，于 37℃ 二氧化碳培养箱中培养至细胞呈 40%~60% 融合状态；吸掉培养基，加入含终浓度为 10μM 的 5-氮杂胞苷（5-Az）， $10^6 \sim 10^9$  pfu/ml 腺病毒 Ad-MHCp-hTERT 颗粒， $10^5 \sim 10^9$  VP/ml 慢病毒 plenti-hTERTp-CD 颗粒的培养基，37℃ 二氧化碳培养箱中培养；72 小时后，更换无 5-Az 的含终浓度为 50μg/ml 的 G418 和 2μg/ml 的 blasticidin 的培养基进行双抗性筛选培养；以后，每换一次液，

G418 和杀稻瘟菌素的浓度增大 50ug/ml, blasticidin 浓度增大 2ug/ml。最后, G418 最后将终浓度维持在 400ug/ml, blasticidin 终浓度维持在 10ug/ml; 当细胞传到 10 代时, 即可收集到用于梗死心肌修复治疗所需要的细胞, 见附图 7。并于手术移植前用 PBS 溶液清洗掉抗生素。

7. 移植辅助细胞的基因工程改造及制备: 将生长状况良好的 HLSEC 接种于培养培养板上, 当细胞长至 40~60%融合状态时, 更换培养液, 加入含终浓度为  $10^6 \sim 10^9$  VP/ml 的慢病毒 Lenti-CMVp-CD 颗粒的培养基, 37°C 二氧化碳培养箱中培养 72 小时后, 将培养基更换为含有终浓度为 10ug/ml 的 blasticidin 的培养基进行抗性筛选培养。筛选后得到的细胞进行克隆培养, 经过传 5~10 代的抗性筛选培养后, 进行 CD 药物敏感实验。挑选对 CD 敏感的细胞克隆进行扩增培养, 并于手术移植前用 PBS 溶液清洗。

8. 细胞移植重建血管及修复梗死心肌的操作: (1) 外科手术打开大鼠心肌梗塞模型胸腔, 暴露心脏, 在心肌梗的区域植入 104~106 个对 CD 敏感的 HLSEC 细胞(辅助细胞), 然后缝合胸腔(具体操作与大鼠心肌梗塞模型建立方法相同); (2) 每天肌肉注射 1 毫克环孢素 A (CsA) 以抑制大鼠对移植辅助细胞的免疫排斥反应; (3) 用 B 超或 CT 等, 检测移植辅助细胞的生长, 当移植辅助细胞植入点形成 3~5 毫米大小的肿瘤灶时, 用步骤(3)的方法植入  $10^5 \sim 10^8$  个本发明方法制备的源于 BMSC 的心肌前体细胞。

9. 药物清除受体内辅助细胞及瘤变的心肌前体细胞: 细胞移植 2~5 周后, 开始每日静脉注射 5-Fc 三次, 每次给药剂量为 50~200mg/kg. 体重, 连续用药 3~5 天即可达到清除 HLSEC, 以及瘤变的心肌前体细胞的目的。

## 应用实施案例 2: 利用本发明组合物修复人类梗死心肌及血管重建

1. 人类心肌细胞特异性表达 hTERT 和 neo<sup>r</sup> 的腺病毒双顺反子的腺病毒穿梭质粒载体制备: 将序列表 SEQ ID NO.1 和 SEQ ID NO.2 中的启动子序列更换为人类 MHC 或者 MLC2v 启动子序列, 即可得到人类心肌细胞特异性表达 hTERT 和 neo<sup>r</sup> 的腺病毒双顺反子的腺病毒穿梭质粒载体。

2. 人类心肌前体细胞的制备: 抽取需进行移植术心梗患者 5~10 毫升骨髓后, 按照与“应用实施案例 1”相同的方法进行人类心肌前体细胞的制备。

3. 以后步骤与方法与“应用实施案例 1”相同。

## 序列表

<110> 重庆大学

<120> 一种用于梗死心肌修复与血管重建的细胞移植组合物

<160> 4

<170> PatentIn Version 2.1

<210> 1

<211> 492

<212> DNA

<213> 大鼠 (rat)

<220>

<221> promoter

<222> (10)... (499)

<220>

<221> promoter

<222> (1)... (492)

<400> 1

```

tgggaggaag aggccatgtc aattaanaag cagttcaaac tgcctctgcc attttctgct 60
cagcatcctc tctttgagga atgcctttac ttatTTTTat tatggtattt aacttgggat 120
gttctgttct ccatacctgt acttctcaga aaaggaagac aaagtgtcaa aagtggcatt 180
tcaaaggctc cttcaccaga ctgaaagaat caagagacac ttggattaaa cagattctaa 240
gcccatggca tacagtagca actcaacaaa cacgagtgga ttatgttttc ccagtgtgta 300
gccctcgtgt gaagctccac tgggcatggg acaggccaga tctccttgac cttgtctgag 360
aggctgcat ccacttcagg gtgacaggtt gatactagga tgggcaggag gctgccggct 420
gccggctgcc ggcccaggga gcagctgggc tgactggcag tttgttttgc agccaactgt 480
tttgcagcca ac 492

```

<210> 2

<211> 9066

<212> DNA

<213> 腺病毒穿梭质粒载体

<220>

<221> promoter

<222> (461)... (951)

<400> 2

```

ttcatcaata atatacctta ttttgattg aagccaatat gataatgagg ggggtggagtt 60
tgtgacgtgg cgcggggcgt gggaacgggg cgggtgacgt agtagtgtgg cggaagtgtg 120
atgttgcaag tgtggcggaa cacatgtaag cgacggatgt ggcaaaagtg acgttttttg 180
tgtgcgccgg tgtacacagg aagtgacaat tttcgcgcgg ttttaggcgg atgtttagt 240
aaatttgggc gtaaccgagt aagatttggc cattttcgcg ggaaaactga ataagaggaa 300
gtgaaatctg aataattttg tgttactcat agcgcgtaat atttgtctag ggccgcgggg 360
actttgaccg tttacgtgga gactcgcca ggtgtttttc tcaggtgttt tccgcgttcc 420
gggtcaaagt tggcgtttta ttattatagt cagntctaga tgggaggaag aggccatgtc 480
aattaanaag cagttcaaac tgcctctgcc attttctgct cagcatcctc tctttgagga 540
atgcctttac ttatTTTTAT tatggTATTT aacttgggat gttctgttct ccatacctgt 600
acttctcaga aaaggaagac aaagtgtcaa aagtggcatt tcaaaggctc cttcaccaga 660
ctgaaagaat caagagacac ttggattaaa cagattctaa gccatggca tacagtagca 720
actcaacaaa cacgagtgga ttatgttttc ccagtgtga gccctcgtgt gaagctccac 780
tgggcatggg acaggccaga tctccttgac cttgtctgag aggctgccat ccacttcagg 840
gtgacaggtt gatactagga tgggcaggag gctgccggt gccggctgcc ggcccaggga 900
gcagctgggc tgactggcag tttgttttgc agccaactgt tttgcagcca acgaattccc 960
cccgcgatgc cgcgcgctcc ccgctgccga gccgtgcgct ccctgctgcg cagccactac 1020
cgcgaggtgc tgccgctggc cacgttcgtg cggcgcctgg ggccccaggg ctggcggctg 1080
gtgcagcgcg gggacccggc ggctttccgc gcgctgggtg cccagtcct ggtgtgcgtg 1140
ccctgggacg cacggccgcc ccccgccgcc ccctccttcc gccaggtgtc ctgcctgaag 1200

```

gagctggtgg cccgagtgct gcagaggctg tgcgagcgcg gcgcaagaa cgtgctggcc 1260  
ttcggcttcg cgctgctgga cggggcccgc gggggccccc ccgaggcctt caccaccagc 1320  
gtgcgcagct acctgccc aa cacggtgacc gacgcactgc gggggagcgg ggcgtggggg 1380  
ctgctgctgc gccgctggg cgacgacgtg ctggttcacc tgctggcacg ctgvcgctc 1440  
tttgtgctgg tggctcccag ctgvcctac caggtgtgcg ggccgcccgt gtaccagctc 1500  
ggcgtgcca ctgaggccc gcccccga cacgctagt gaccccgaag gcgtctggga 1560  
tgcgaacggg cctggaacca tagcgtcagg gaggccgggg tcccctggg cctgccagcc 1620  
ccgggtgcga ggaggcgcgg gggcagtgc agccgaagtc tgccgttgcc caagaggccc 1680  
aggcgtggcg ctgcccctga gccggagcgg acgcccgtt ggccagggtc ctgggcccac 1740  
ccgggcagga cgcgtggacc gactgaccgt gtttctgtg ttgtgtcacc tgccagacc 1800  
gccgaagaag ccacctttt ggagggtgcg ctctctggca cgcgccactc ccacctatcc 1860  
gtgggcccgc agcaccacgc gggccccca tccacatgc gccaccacg tccctgggac 1920  
acgccttgtc ccccggtgta cggcgagacc aagcacttc tctactctc aggcgacaag 1980  
gagcagctgc ggccctcct cctactcagc tctctgagc ccagcctgac tggcgtcgg 2040  
aggctcgtgg agaccatctt tctgggttc aggcctgga tgccaggac tccccgagg 2100  
ttgccccgc tgccccagc ctactggca atgcccgc tgttctgga gctgcttggg 2160  
aaccacgc agtgccccta cggggtgctc ctcaagacgc actgcccgt gcgagctgcg 2220  
gtcaccagc cagccggtgt ctgtgcccgg gagaagccc agggctctgt ggcggcccc 2280  
gaggaggagg acacagacc ccgtgcctg gtgcagctgc tccgccagca cagcagccc 2340  
tggcaggtgt acggcttcgt gcgggctgc ctgcccggc ttgtgcccc aggcctctgg 2400  
ggctccaggc acaacgaag ccgcttctc aggaacacca agaagtcat ctccctggg 2460  
aagcatgcca agctctcgt gcaggagct acgtggaaga tgagcgtgc ggactgcgt 2520  
tggctgcga ggagcccagg gtttgctgt gttccggcc cagagcacc tctgctgag 2580  
gagatcctgg ccaagttcct gactggctg atgagtgt acgtcgtcga gctgctcagg 2640  
tctttcttt atgtcacgga gaccagttt caaagaaca ggctctttt ctaccggaag 2700  
agtgtctgga gcaagttgca aagcattgga atcagacagc acttgaagag ggtgcagctg 2760  
cgggagctgt cggagcaga ggtcaggcag catcggaag ccaggcccgc cctgctgacg 2820  
tccagactcc gttcatccc caagcctgac gggctgcggc cgattgtgaa catggactac 2880

gtcgtgggag ccagaacgtt ccgcagagaa aagagggccg agcgtctcac ctcgagggtg 2940  
 aaggcactgt tcagcgtgct caactacgag cgggcgcggc gccccggcct cctgggcgcc 3000  
 tctgtgctgg gcctggacga tatccacagg gcctggcgca ccttcgtgct gcgtgtgcgg 3060  
 gccaggacc cgccgcctga gctgtacttt gtcaaggtgg atgtgacggg cgcgtacgac 3120  
 accatcccc aggacaggtt cacggaggtc atcgccagca tcatcaaacc ccagaacacg 3180  
 tactgcgtgc gtcggtatgc cgtggtccag aaggccgcc atgggcacgt ccgcaaggcc 3240  
 ttcaagagcc acgtctctac cttgacagac ctccagccgt acatgcgaca gttcgtggct 3300  
 cacctgcagg agaccagccc gctgagggat gccgtcgtca tcgagcagag ctctccctg 3360  
 aatgaggcca gcagtggcct cttcgacgtc ttctacgct tcatgtgcca ccacgccgtg 3420  
 cgcatcaggg gcaagtccata cgtccagtgc caggggatcc cgcagggtc catcctctcc 3480  
 acgtgctct gcagcctgtg ctacggcgac atggagaaca agctgtttgc ggggattcgg 3540  
 cgggacgggc tgctcctgcg tttggtggat gatttcttgt tggtagacc tcacctacc 3600  
 cacgcgaaaa ccttctcag gaccctggtc cgaggtgtcc ctgagtatgg ctgctggtg 3660  
 aacttgcgga agacagtggg gaacttcct gtagaagacg aggccctggg tggcacggct 3720  
 tttgttcaga tgccggcca cgccctattc ccctggtgcg gcctgctgct ggatacccgg 3780  
 accctggagg tgacagcga ctactccagc tatgcccgga cctccatcag agccagtctc 3840  
 accttcaacc gcggcttcaa ggctgggagg aacatgcgtc gcaaactctt tgggtcttg 3900  
 cggctgaagt gtcacagcct gtttctggat ttgcaggtga acagcctcca gacggtgtgc 3960  
 accaacatct acaagatcct cctgctgcag gcgtacaggt ttcacgcatg tgtgctgcag 4020  
 ctcccatttc atcagcaagt ttggaagaac cccacatttt tctgcgct catctctgac 4080  
 acggcctccc tctgctactc catcctgaaa gccaagaacg cagggatgtc gctgggggcc 4140  
 aagggcgccc ccggccctct gccctccgag gccgtgcagt ggctgtgcca ccaagcattc 4200  
 ctgctcaagc tgactcgaca ccgtgtcacc tacgtgccac tcctggggtc actcaggaca 4260  
 gccagacgc agctgagtcg gaagctcccg gggacgacgc tgactgccct ggaggccgca 4320  
 gccaaccgga cactgccctc agacttcaag accatcctgg actgatgtaa actaaagcgg 4380  
 ccgcatagat aactgatcca gtgtgctgga attaattcgc tgtctgcgag ggccagctgt 4440  
 tggggtgagt actccctctc aaaagcgggc atgacttctg cgctaagatt gtcagtttcc 4500  
 aaaaacgagg aggatttgat attcacctgg cccgcggtga tgcccttgag ggtggccgcg 4560

tccatctggt cagaaaagac aatctttttg ttgtcaagct tgaggtgtgg caggcttgag 4620  
atctggccat acacttgagt gacaatgaca tccactttgc ctttctctcc acaggtgtcc 4680  
actcccaggt ccaactgcag gtcgagcatg catctagggc ggccaattcc gccctctcc 4740  
ctccccccc cctaacgta ctggccgaag ccgcttgaa taaggccggt gtgcgtttgt 4800  
ctatatgta tttccacca tattgccgtc ttttgcaat gtgagggcc ggaaacctgg 4860  
ccctgtcttc ttgacgagca ttcctagggg tctttcccct ctgccaaag gaatgcaagg 4920  
tctgttgaat gtcgtgaagg aagcagttcc tctggaagct tcttgaagac aaacaacgtc 4980  
tgtagcgacc ctttgcaggc agcggaaacc cccacctggc gacaggtgcc tctgcggcca 5040  
aaagccacgt gtataagata cacctgcaa ggcggcacia ccccagtcc acgttgtgag 5100  
ttgatagtt gtgaaagag tcaaatggct ctctcaagc gtattcaaca aggggctgaa 5160  
ggatgcccag aaggtacccc attgtatggg atctgatctg ggcctcggg gcacatgctt 5220  
tacatgtgtt tagtcgaggt taaaaaacg tctaggcccc ccgaaccacg gggacgtggt 5280  
tttctttga aaaacacgat gataagctt ccacaaccg ggataattcc tgcagccaat 5340  
atgggatcgg ccattgaaca agatggattg cacgcaggtt ctccggccgc ttgggtggag 5400  
aggctattcg gctatgactg ggcacaacag acaatcggct gctctgatgc cgccgtgttc 5460  
cggctgtcag cgcaggggcg cccggttctt ttgtcaaga ccgacctgc cggtgccctg 5520  
aatgaactgc aggacgagc agcgcggcta tcgtggctgg ccacgacggg cgttcttgc 5580  
gcagctgtgc tcgacgttgt cactgaagcg ggaagggact ggctgctatt gggcgaagtg 5640  
ccggggcagg atctctgtc atctacctt gctctgccc agaaagtatc catcatggct 5700  
gatgcaatgc ggcggctgca tacgcttgat ccggctacct gccattcga ccaccaagcg 5760  
aaacatcgca tcgagcgagc acgtactcgg atggaagccg gtcttgtcga tcaggatgat 5820  
ctggacgaag agcatcaggg gctcgcgcca gccgaactgt tcgccaggt caaggcgcgc 5880  
atgcccgacg gcgatgatct cgtcgtgacc catggcgatg cctgcttgc gaatatcatg 5940  
gtggaaaatg gccgcttttc tggattcatc gactgtggcc ggctgggtgt ggcggaccgc 6000  
tatcaggaca tagcgttggc taccctgat attgctgaag agcttggcgg cgaatgggct 6060  
gaccgcttcc tcgtgcttta cggtatcgc gctcccgatt cgcagcgcac gccttctat 6120  
cgccttcttg acgagttctt ctgaggggat caattctcta gcaaggatcc agcttgtcga 6180  
cttcgagcaa cttgtttatt gcagcttata atggttacia ataaagcaat agcatcacia 6240

atttcacaaa taaagcattt ttttactgc attctagttg tggtttgtcc aaactcatca 6300  
atgtatctta tcatgtctgg atcgtctagc atcgaagatc caataacttc gtatagcata 6360  
cattatacga agttataagt agcttggcgt aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa 6420  
attgttatcc gtcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct 6480  
ggggtgccta atgagtgagc taactcacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc 6540  
agtcgggaaa cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg 6600  
gtttgcgtat tgggcgctct tccgcttcct cgctcactga ctcgctgcgc tcggtcgttc 6660  
ggctgcggcg agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag 6720  
gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa 6780  
aggccgcggt gctggcgttt ttccatagge tccgcccc tgacgagcat cacaaaaatc 6840  
gacgctcaag tcagaggtgg cgaaaccga caggactata aagataccag gcgtttcccc 6900  
ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gttaccgga tacctgtccg 6960  
cctttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt ctcaatgctc acgctgtagg tatctcagtt 7020  
cgggtgtaggt cgttcgtcc aagctgggct gtgtgcacga acccccgtt cagcccgacc 7080  
gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaacc ggtaagacac gacttatcgc 7140  
cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag 7200  
agttcttgaa gtggtggcct aactacggct aactagaag gacagtattt ggtatctgcg 7260  
ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttgtag ctcttgatcc ggcaaacaaa 7320  
ccaccgctgg tagcgggtgt tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag 7380  
gatctcaaga agatccttg atcttttcta cggggtctga cgctcagtgg aacgaaaact 7440  
cacgttaagg gatthtggc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa 7500  
ttaaaaatg aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt 7560  
accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag 7620  
ttgcctgact ccccgctcgt tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca 7680  
gtgctgcaat gataccgca gaccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc 7740  
agccagccgg aaggcccgag cgcagaagtg gtcctgcaac tttatccgcc tccatccagt 7800  
ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg 7860  
ttgttgccat tgctacagge atcgtgggtg cacgctcgtc gtttggtagt gcttcattca 7920

gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttgtgc aaaaaagcgg 7980  
ttagctcctt cggtcctccg atcgttgta gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca 8040  
tggttatggc agcactgcat aattctetta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg 8100  
tgactgggta gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct 8160  
cttgcccggc gtcaacacgg gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgctca 8220  
tcattggaaa acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca 8280  
gttcgatgta acccactcgt gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg 8340  
tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa aaaggaata agggcgacac 8400  
ggaaatggtg aataactcata ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt 8460  
attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaacia ataggggttc 8520  
cgcgacatt tccccgaaa gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt atcatgacat 8580  
taacctataa aatagcgt atcactctag gcaaaatagc accctccgc tccagaacia 8640  
catacagcgc ttcacagcgg cagcctaaca gtcagcetta ccagtaaaaa agaaaaccta 8700  
ttaaaaaaac accactcgac acggcaccag ctcaatcagt cacagtgtaa aaaaggcca 8760  
agtgcagagc gagtatatat aggactaaaa aatgacgtaa cggttaaagt ccacaaaaaa 8820  
caccagaaa accgcacgcg aacctacgcc cagaaacgaa agccaaaaaa cccacaactt 8880  
cctcaaatcg tcacttcgt tttcccacgt tacgtaactt cccattttaa gaaaactaca 8940  
attccaaca catacaagtt actccgcct aaaacctag taccgcgcc cgttcccacg 9000  
ccccggcca cgtcaciaac tccaccct cattatcata ttggcttcaa tccaaaataa 9060  
ggtatagacc 9066

<210> 3

<211> 295

<212> DNA

<213> 人工合成

<220> -

<221> promoter

<222> (1)... (295)

<400> 3

```

gacagacgcc caggaccgcg cttcccacgt ggcggagggc atggggacce gggcacccgt 60
cctgcccctt caccttcag ctccgcctcc tccgcgcgga ccccgccccg tcccgacccc 120
tcccgggtcc ccggcccagc cccctccggc cctcccagcc cctccccttc ctttccgcgg 180
ccccgccctc tctcgcggc gcgagtttca ggcagcgtg cgtcctgctg cgcacgtggg 240
aagccctggc cccggccact cgaggacgca cgtgggcgca cgtgggcgca cgtgg      295

```

<210> 4

<211> 8048

<212> DNA

<213> 慢病毒载体

<220>

<221> promoter

<222> (1799)... (2095)

<400> 4

```

aatgtagtct tatgcaatac tctttagtgc ttgcaacatg gtaacgatga gtagcaaca 60
tgccttacia ggagagaaaa agcaccgtgc atgccgattg gtggaagtaa ggtggtacga 120
tcgtgcctta ttaggaaggc aacagacggg tctgacatgg attggacgaa cactgaatt 180
gccgattgc agagatattg tatttaagt cctagctcga tacataaacg ggtctctctg 240
gtagaccag atctgagcct gggagctctc tggctaacta gggaaccac tgcttaagcc 300
tcaataaagc ttgccttgag tgcttcaagt agtgtgtgcc cgtctgttgt gtgactctgg 360
taactagaga tcctcagac ctttttagtc agtgtggaaa atctctagca gtggcgcccc 420
aacagggact tgaaagcgaa agggaaacca gaggagctct ctcgacgcag gactcggctt 480
gctgaagcgc gcacggcaag aggcgagggg cggcgactgg tgagtacgcc aaaaattttg 540
actagcggag gctagaagga gagagatggg tgcgagagcg tcagtattaa gcgggggaga 600
attagatcgc gatgggaaaa aattcggtta aggccagggg gaaagaaaa atataaatta 660
aaacatatag tatgggcaag caggagacta gaacgattcg cagttaatcc tggcctgtta 720

```

gaaacatcag aaggctgtag acaaactg ggacagctac aaccatccct tcagacagga 780  
 tcagaagaac ttagatcatt atataataca gtagcaacce tctattgtgt gcatcaaagg 840  
 atagagataa aagacaccaa ggaagcttta gacaagatag aggaagagca aaacaaaagt 900  
 aagaccaccg cacagcaagc ggccgctgat cttcagacct ggaggaggag atatgaggga 960  
 caattggaga agtgaattat ataaatataa agtagtaaaa attgaacat taggagtagc 1020  
 accaccaag gcaaagagaa gagtgggtgca gagagaaaaa agagcagtgg gaataggagc 1080  
 tttgttctt gggttcttgg gagcagcagg aagcactatg ggccgagcgt caatgacgct 1140  
 gacggtacag gccagacaat tattgtctgg tatagtgcag cagcagaaca atttgctgag 1200  
 ggctattgag gcgcaacagc atctgttgca actcacagtc tggggcatca agcagctcca 1260  
 ggcaagaatc ctggctgtgg aaagatacct aaaggatcaa cagctcctgg ggatttgggg 1320  
 ttgctctgga aaactcattt gcaccactgc tgtgccttgg aatgctagtt ggagtaataa 1380  
 atctctggaa cagatttggga atcacacgac ctggatggag tgggacagag aaattaacia 1440  
 ttacacaagc ttaatacact ccttaattga agaatcgcaa aaccagcaag aaaagaatga 1500  
 acaagaatta ttggaattag ataaatgggc aagtttgtgg aattggttta acataacaaa 1560  
 ttggctgtgg tatataaaat tattcataat gatagtagga ggcttggtag gtttaagaat 1620  
 agtttttgct gtactttcta tagtgaatag agttaggcag ggatattcac cattatcgtt 1680  
 tcagaccac ctccaaccc cgaggggacc cgacaggccc gaaggaatag aagaagaagg 1740  
 tggagagaga gacagagaca gatccattcg attagtgaac ggatctcgac ggtatcgatc 1800  
 acagacgccc aggaccgcg tcccacgtg gcggagggca tggggaccg ggcaccgctc 1860  
 ctgcccctt accttcagc tccgctcct ccgcgcgac cccgccccgt cccgaccct 1920  
 cccgggtccc cggcccagcc ccctccggcc ctcccagccc ctccccttc tttccgcggc 1980  
 cccgcccct cctcgcgcg cgagtttcag gcagcgtgc gtctgctgc gcacgtggga 2040  
 agccctggcc ccggccactc gaggacgcac gtgggcgcac gtgggcgcac gtggggatcc 2100  
 gacagcagca atgacgatg tggaggctaa cagtgtcgaa taacgcttta caacaatta 2160  
 ttaacgccc gttaccaggc gaagaggggc tgtggcagat tcatctgcag gacggaaaa 2220  
 tcagcgccat tgatgcgcaa tccggcgtga tgcccataac tgaaaacagc ctggatgccg 2280  
 aacaagttt agttataccg ccgtttgtgg agccacatat tcacctggac accacgcaaa 2340  
 ccgccggaca accgaactgg aatcagtcg gcacgctgtt tgaaggcatt gaacgctggg 2400

ccgagcgcaa agcgttatta acccatgacg atgtgaaaca acgcgcatgg caaacgctga 2460  
aatggcagat tgccaacggc attcagcatg tgcgtacceca tgtcgaatgt tgggatgcaa 2520  
cgctaactgc gctgaaagca atgctggaag tgaagcagga agtcgcgccg tggattgatc 2580  
tgcaaatcgt cgccttcctt caggaaggga ttttgtcgt tcccaacggt gaagcgttgc 2640  
tggaagaggc gttacgctta ggggcagatg tagtgggggc gattccgcat tttgaattta 2700  
cccgtgaata cggcgtggag tcgctgcata aaaccttcgc cctggcgcaa aaatacgacc 2760  
gtctcatcga cgttcactgt gatgagatcg atgacgagca gtcgcgcttt gtcgaaaccg 2820  
ttgctgcctt ggcgcacccat gaaggcatgg gcgcgcgagt caccgccagc cacaccacgg 2880  
caatgcactc ctataacggg gcgtatacct cacgcctggt ccgcttgctg aaaatgtccg 2940  
gtattaactt tgtcgccaac ccgctggtea atattcatct gcaaggacgt ttcgatacgt 3000  
atccaaaacg tcgcggcatac acgcgcgtaa aagagatgct ggagtccggc attaacgtct 3060  
gctttggtea cgatgatgtc ttcgatccgt ggtatccgct gggaacggcg aatatgctgc 3120  
aagtgtgca tatggggctg catgtttgcc agttgatggg ctacgggcag attaacgatg 3180  
gcctgaattt aatcaccac cacagcgcaa ggacgtttaa tttgcaggat tacggcattg 3240  
ccgccgaaa cagcgccaac ctgattatcc tgccggctga aaatggggtt gatgcgctgc 3300  
gccgtcaggt tccggtacgt tattcggtae gtggcggcaa ggtgattgcc agcacacaac 3360  
cggcacaac caccgtatat ctggagcagc cagaagccat cgattacaaa cgttgaacga 3420  
ctgggttaca gcgagcttag tttatgccgg atgcggcgtg aacgccttat ccggcctacg 3480  
tagagcactg aactcgtagg cctgataagc gtagcgcata aggcaattcc agccgctgat 3540  
ctgtgtcagc ggctaccgtg attcattccc gccacaacc gcgcattcct ccaacgcacc 3600  
ggttagtaat gagtttgaa ttaattctgt ggaatgtgtg tcagttaggg tgtggaaagt 3660  
ccccaggctc ccaggcagg cagaagtatg caaacgatgc atctcaatta gtcagcaacc 3720  
aggtgtggaa agtccccagg ctccccagca ggcagaagta tgcaaagcat gcattcaat 3780  
tagtcagcaa ccatagtccc gccctaact ccgccatcc cgcccctaac tccgccagt 3840  
tccgccatt ctccgcccc tggtgacta attttttta tttatgcaga ggccgaggcc 3900  
gcctctgcct ctgagctatt ccagaagtag tgaggaggct tttttggagg cctaggcttt 3960  
tgcaaaaagc tcccgggagc ttgtatatcc attttcggat ctgatcagca cgtgttgaca 4020  
attaatcacc gccatagtat atcgccatag tataatacga caaggtgagg aactaaacca 4080

tggccaagcc tttgtctcaa gaagaatcca ccctcattga aagagcaacg gctacaatca	4140
acagcatccc catctctgaa gactacagcg tcgccagcgc agctctctct agcgacggcc	4200
gcatcttcac tgggtgcaat gtatatcatt ttactggggg accttgtgca gaactcgtgg	4260
tgctgggcac tgctgctgct gcggcagctg gcaacctgac ttgtatcgtc gcgatcggaa	4320
atgagaacag gggcatcttg agcccctgcg gacggtgccg acaggtgctt ctcgatctgc	4380
atcctgggat caaagccata gtgaaggaca gtgatggaca gccgacggca gttgggattc	4440
gtgaattgct gccctctggt tatgtgtggg agggctaagc acaattcgag ctcggtacct	4500
ttaagaccaa tgacttaciaa ggcagctgta gatcttagcc actttttaa agaaaagggg	4560
ggactggaag ggctaattca ctcccaacga agacaagatc tgctttttgc ttgtactggg	4620
tctctctggt tagaccagat ctgagcctgg gagctctctg gctaactagg gaaccactg	4680
cttaagcctc aataaagctt gccttgagtg cttcaagtag tgtgtgcccg tctgttgtgt	4740
gactctggta actagagatc cctcagacce ttttagtcag tgtggaaaat ctctagcagt	4800
agtagttcat gtcactttat tattcagtat ttataacttg caaagaaatg aatatcagag	4860
agtgagagga acttgtttat tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca	4920
aatttcacaa ataaagcatt tttttcactg cattctagtt gtggtttgc caaactcatc	4980
aatgtatctt atcatgtctg gctctagcta tcccgccct aactccgcc atcccgcctc	5040
taactccgcc cagttccgcc cattctccgc cccatggctg actaattttt tttatttatg	5100
cagaggccga ggccgcctcg gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga ggcttttttg	5160
gaggcctagg gacgtaccca attcgccta tagtgagtcg tattacgcgc gctcactggc	5220
cgtcgtttta caacgtcgtg actgggaaaa cctggcggtt acccaactta atcgccttgc	5280
agcacatccc ctttcgcca gctggcgtaa tagcgaagag gcccgaccg atcgccttc	5340
ccaacagttg cgcagcctga atggcgaatg ggacgcgccc tgtagcggcg cattaagcgc	5400
ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac cgctacactt gccagcgcct tagcgcctgc	5460
tcctteget ttcttcctt cttttctcgc cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct	5520
aaateggggg ctccctttag ggttcgatt tagtgcttta cggcacctcg acccaaaaa	5580
acttgattag ggtgatggtt cacgtagtgg gccatcgccc tgatagacgg tttttcgccc	5640
tttgacgttg gagtccacgt tctttaatag tggactcttg ttccaaactg gaacaacact	5700
caaccctatc tcggtctatt cttttgattt ataaggatt ttgccgattt cggcctattg	5760

gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt taacgcgaat ttaacaaaa tattaacgct	5820
tacaatttag gtggcacttt tcggggaaat gtgcgcggaa cccctatttg tttatttttc	5880
taaatacatt caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa	5940
tattgaaaaa ggaagagtat gagtattcaa catttccgtg tcgcccttat tccctttttt	6000
gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac ccagaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct	6060
gaagatcagt tgggtgcacg agtgggttac atcgaactgg atctcaacag cggtaagatc	6120
cttgagagtt ttcgccccga agaacgtttt ccaatgatga gcacttttaa agttctgcta	6180
tgtggcgcgg tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc aactcggctg ccgcatacac	6240
tattctcaga atgacttggg tgagtactca ccagtcacag aaaagcatct tacggatggc	6300
atgacagtaa gagaattatg cagtgtgcc ataaccatga gtgataacac tgcggccaac	6360
ttacttctga caacgatcgg aggaccgaag gagctaaccg cttttttgca caacatgggg	6420
gatcatgtaa ctgccttga tcggtgggaa ccggagctga atgaagccat accaaacgac	6480
gagcgtgaca ccacgatgcc tntagcaatg gcaacaacgt tgcgcaaact attaactggc	6540
gaactactta ctctagcttc ccggcaacaa ttaatagact ggatggaggc ggataaagtt	6600
gcaggaccac ttctgcgctc ggcccttcg gctggctggt ttattgctga taaatctgga	6660
gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg ggccagatgg taagccctcc	6720
cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta tggatgaacg aaatagacag	6780
atcgtgaga taggtgctc actgattaag cattggtaac tgtcagacca agtttactca	6840
tatatacttt agattgattt aaaacttcat ttttaattta aaaggatcta ggtgaagatc	6900
cttttgata atctcatgac caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca	6960
gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc	7020
tgcttgcaaa caaaaaaac accgctacca gcggtggttt gtttgccgga tcaagagcta	7080
ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgttctt	7140
ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatacctc	7200
gctctgctaa tctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg	7260
ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggc cgggctgaac ggggggttcg	7320
tgcacacagc ccagcttggg gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag	7380
ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc	7440

---

agggtcggaa caggagagcg cacgaggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat	7500
agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgtcaggg	7560
gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac ggggcctttt tacggttcct ggccttttgc	7620
tggccttttg ctacatggtt ctttctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt	7680
accgcctttg agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca	7740
gtgagcgagg aagcggaaga gcgccaata cgcaaaccgc ctctccccgc gcgttggccg	7800
attcattaat gcagctggca cgacaggttt cccgactgga aagcgggcag tgagcgcaac	7860
gcaattaatg tgagttagct cactcattag gcaccccagg ctttacactt tatgcttccg	7920
gctcgtatgt tgtgtggaat tgtgagcgga taacaatttc acacaggaaa cagctatgac	7980
catgattacg ccaagcgcgc aattaaccct cactaaaggg acaaaaagct ggagctgcaa	8040
gcttgcca	8048

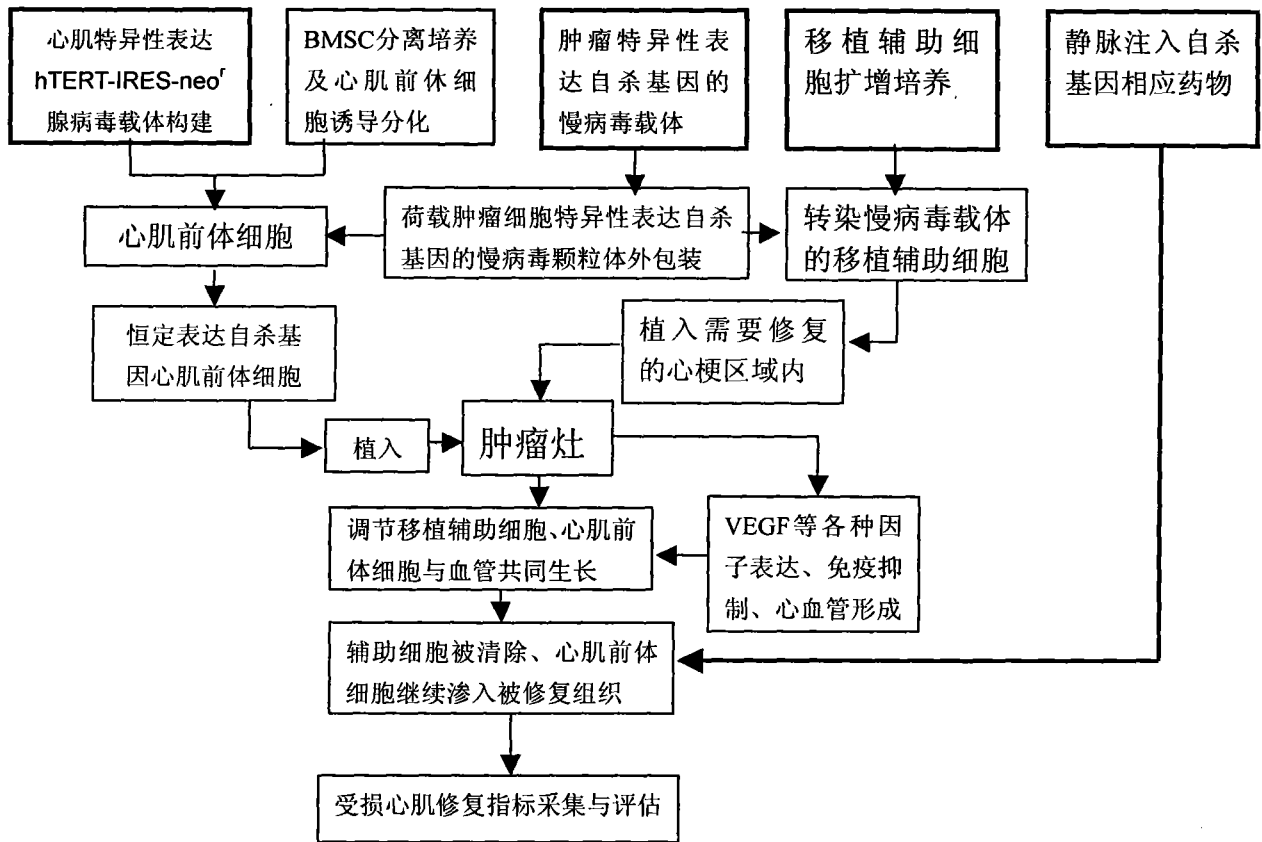


图 1

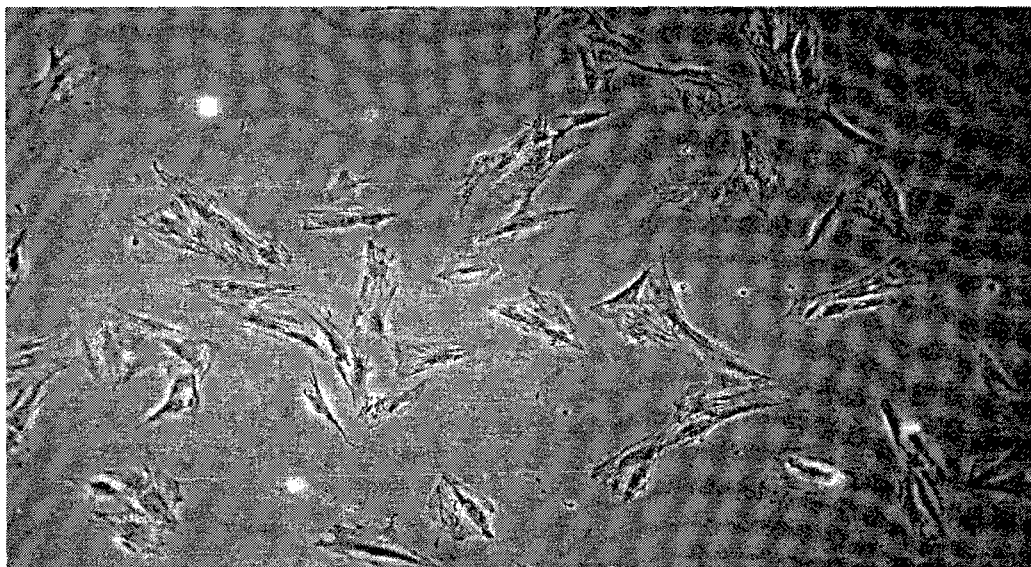


图 2

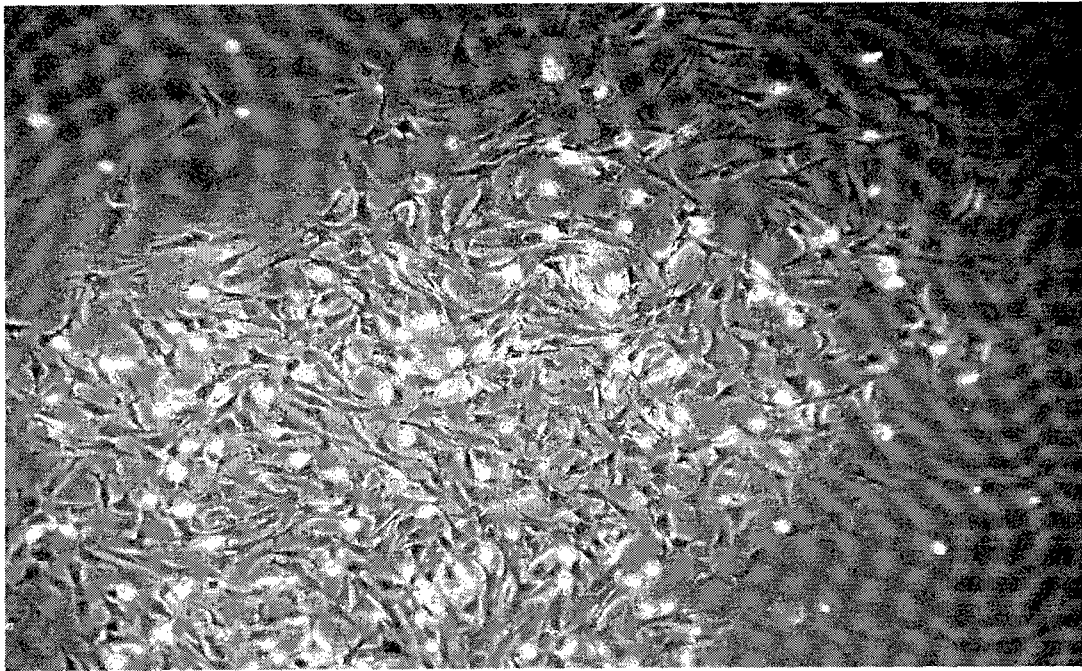


图 3

转染72h  
TRAP图

转染24h  
TRAP图

转染前  
TRAP图

293FT细胞  
TRAP图

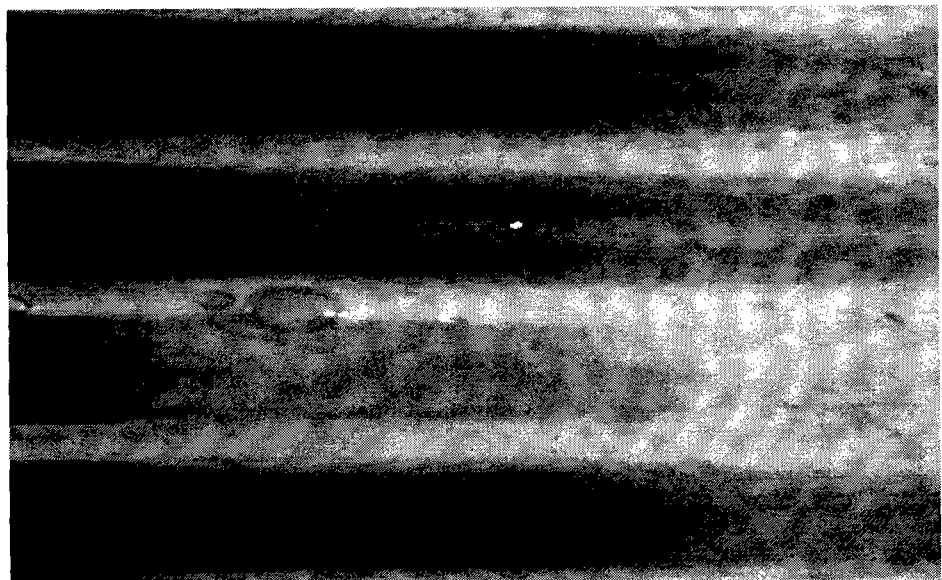


图 4

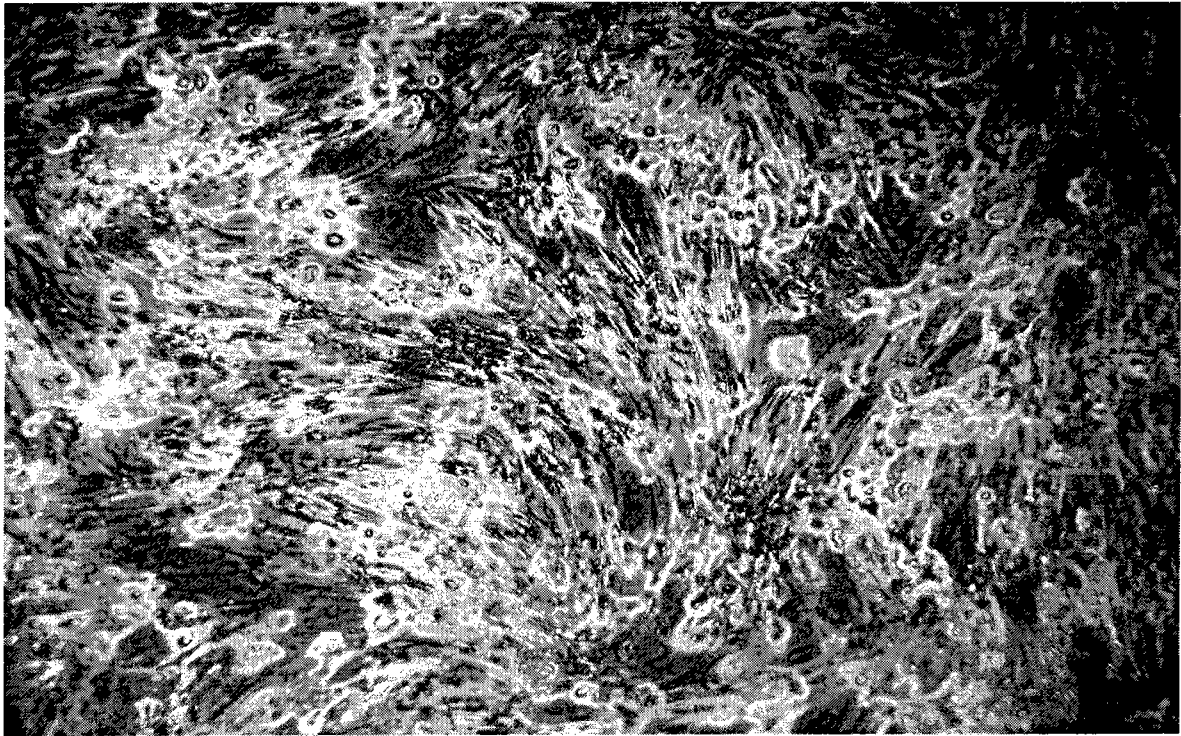


图 5

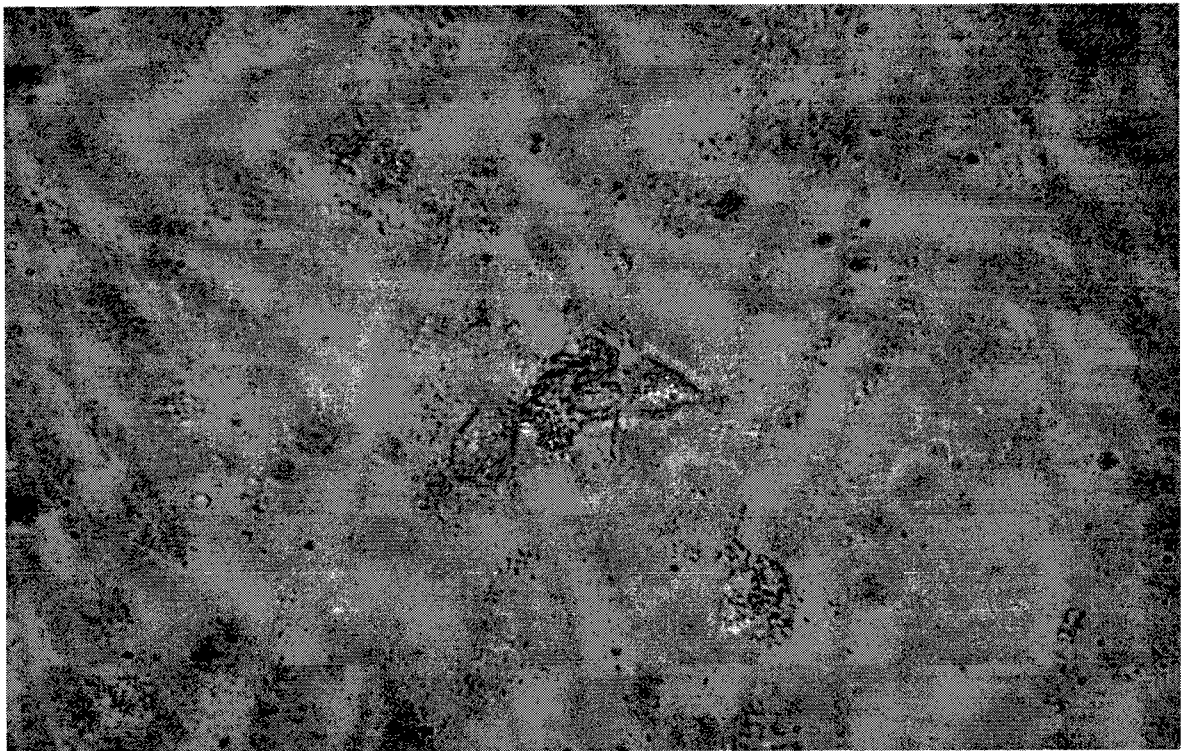


图 6

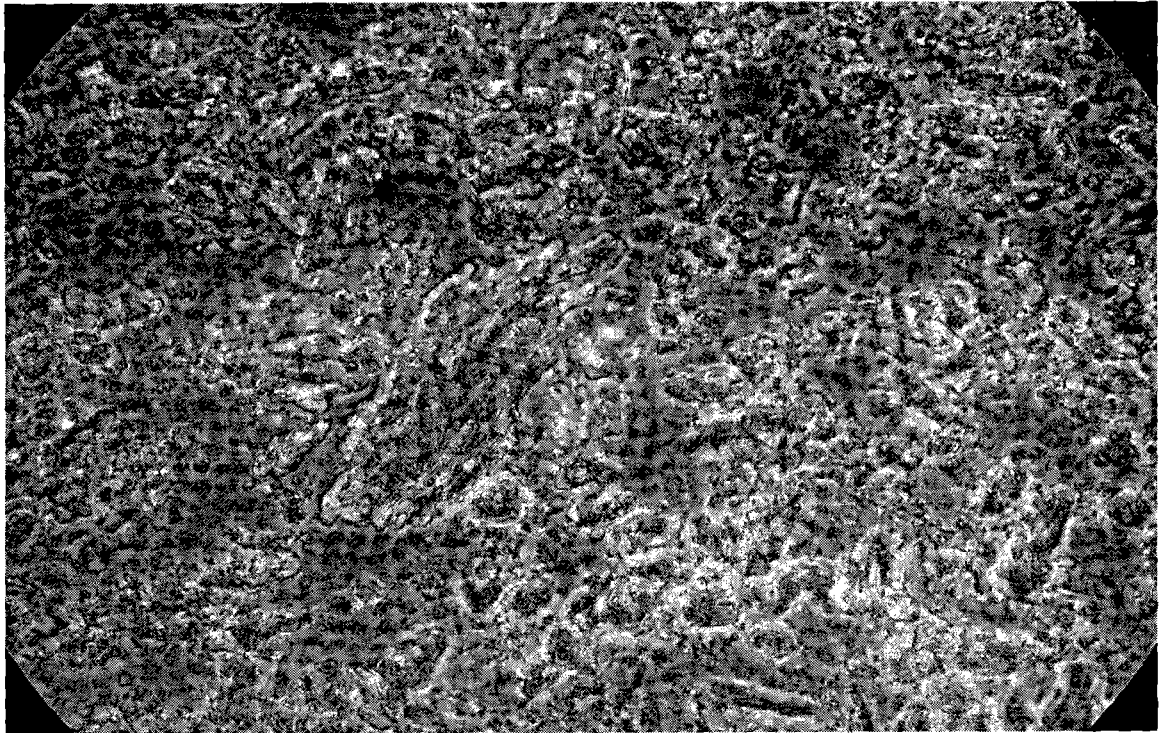


图 7

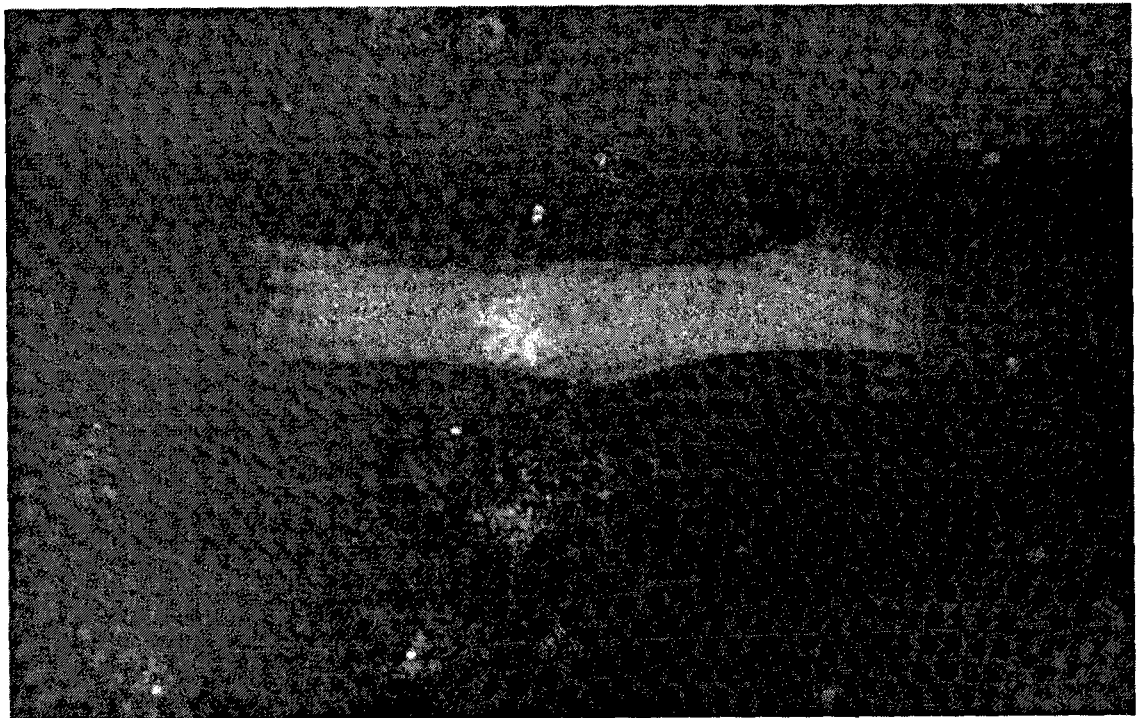


图 8

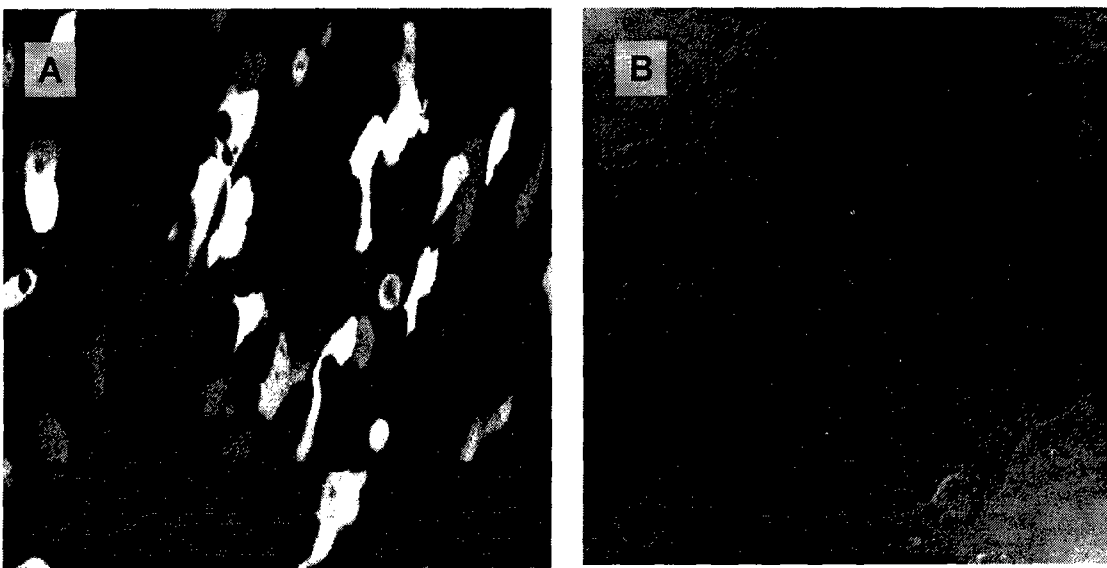


图 9