

8 型重组腺相关病毒介导绿色荧光蛋白基因在角膜基质细胞中的表达及影响

汤明芳, 于健, 白浪, 刘琼

基金项目: 中国国家自然科学基金青年资助项目 (No. 30901650); 中国广东省自然科学基金资助项目 (No. 10451051501005773)
作者单位: (510515) 中国广东省广州市, 南方医科大学南方医院眼科
作者简介: 汤明芳, 女, 博士, 副教授, 副主任医师, 研究方向: 眼表疾病、屈光手术。
通讯作者: 汤明芳. tmf1901@163. com
收稿日期: 2011-01-24 修回日期: 2011-03-07

• KEYWORDS: recombinant adeno-associated virus; gene; transfection; keratocyte; proliferation

Tang MF, Yu J, Bai L, et al. Expression and effect of recombinant adeno-associated virus vector-8 transduced green fluorescent protein gene into rat keratocytes. *Guoji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011; 11 (5): 769-771

Expression and effect of recombinant adeno-associated virus vector-8 transduced green fluorescent protein gene into rat keratocytes

Ming-Fang Tang, Jian Yu, Lang Bai, Qiong Liu

Foundation items: National Natural Science Funds for Young Scholars (No. 30901650); Natural Science Foundation of Guangdong Province, China (No. 10451051501005773)
Department of Ophthalmology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China
Correspondence to: Ming-Fang Tang, Department of Ophthalmology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong Province, China. tmf1901@163. com
Received: 2011-01-24 Accepted: 2011-03-07

Abstract

• **AIM:** To evaluate the expression and the effect of recombinant adeno-associated virus (rAAV) vector-8 transduced enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene into rat keratocytes.
• **METHODS:** rAAV8-EGFP was transfected respectively into rat keratocytes at different multiplicities of infection. The inverted fluorescent microscope was performed to assess GFP expression and the percentage of positive GFP in the cells was analyzed by flow cytometric analysis. The effects of rAAV8 and rAAV8-EGFP on cell proliferation were assessed by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method.
• **RESULTS:** The inverted fluorescent microscope was performed to assess GFP expression. The EGFP expression peak occurred at 7d after transfection and the expression level was 31.5% (MOI = 5×10^3), 42.5% (MOI = 5×10^4), 54.8% (MOI = 5×10^5), respectively. Results of MTT assay indicated there was no inhibitory effect on keratocytes by rAAV8-EGFP and rAAV8 transduction respectively.
• **CONCLUSION:** The rAAV8 vector can deliver effectively EGFP genes into rat keratocytes, and there is no inhibitory effect on keratocyte by rAAV8-EGFP transduction.

摘要

目的: 评价 8 型重组腺相关病毒 (rAAV8) 介导增强型绿色荧光蛋白基因 (EGFP) 转染角膜基质细胞后的表达及对细胞增殖的影响。
方法: 以不同 MOI 的 rAAV8-EGFP 转染大鼠角膜基质细胞, 转染后以倒置荧光显微镜观察角膜基质细胞中 GFP 的表达, 流式细胞仪分析角膜基质细胞中 rAAV8-EGFP 表达的阳性率。MTT 法分别检测 rAAV8 和 rAAV8-EGFP 转染对角膜基质细胞增殖的影响。
结果: 倒置荧光显微镜观察 rAAV8-EGFP 转染角膜基质细胞后 GFP 的阳性表达 7d 达到高峰, 此时流式细胞仪检测 rAAV8-EGFP 对角膜基质细胞的转染效率分别为 31.5% (MOI = 5×10^3), 42.5% (MOI = 5×10^4), 54.8% (MOI = 5×10^5); MTT 检测结果显示 rAAV8 及 rAAV8-EGFP 转染对角膜基质细胞增殖均无明显影响。
结论: rAAV8-EGFP 能有效地转染角膜基质细胞, 并且对细胞增殖无明显影响。
关键词: 重组腺相关病毒; 基因; 转染; 角膜基质细胞; 增殖
DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2011.05.006

汤明芳, 于健, 白浪, 等. 8 型重组腺相关病毒介导绿色荧光蛋白基因在角膜基质细胞中的表达及影响. 国际眼科杂志 2011; 11 (5): 769-771

0 引言

角膜位于体表, 在感染、外伤、排斥反应和手术等原因诱导下, 常导致角膜透明性的减退或丧失, 引起视力下降甚至失明, 是目前最常见的致盲原因之一, 临床治疗非常棘手。为此, 人们在角膜疾病基因治疗方面进行了较多的探索性研究。在病毒载体中重组腺相关病毒 (rAAV) 以其独特的优势较广泛地用于眼部疾病转基因治疗的研究, 取得了一些进展。我们前期研究^[1]采用 rAAV1 作为转基因载体将增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 基因转入角膜基质细胞中, 转染复数 (multiplicities of infection, MOI) = 10^6 的 rAAV1-EGFP 转染角膜基质细胞后, 流式细胞仪检测转染效率为 47.5%。鉴于前期研究结果, rAAV1-EGFP 转染角膜基质细胞所需转染液的 MOI 高, 病毒质粒提纯难度大, 成本高, 而且转染率

较低。我们以 8 型重组腺相关病毒(rAAV8)为载体介导 EGFP 基因转染原代培养的大鼠角膜基质细胞,检测 rAAV8 病毒载体在角膜基质细胞中的转染效率及对细胞增殖的影响;评价 rAAV8 作为转基因载体的有效性和安全性,为角膜病的转基因治疗提供更好的载体。

1 材料和方法

1.1 材料 滴度均为 2×10^{15} vg (vector genomes)/L 的 rAAV8 病毒颗粒及 rAAV8-EGFP 病毒质粒由北京五加和分子医学研究所提供;DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶(Gibco 公司);MTT(美国 Sigma 公司);RNA 酶、碘化丙啶(PI)试剂盒(广州威佳科技有限公司)。倒置荧光显微镜(Leica, 德国);流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司, FACS Calibur 型);Bio-Tek Instruments 酶标仪(美国)。SPF 级 SD 大鼠(南方医科大学动物实验中心提供)。

1.2 方法 取 SPF 级 SD 大鼠 3 只, 30mg/L 戊巴比妥 1.5mL/kg ip 麻醉后,眼周消毒,手术显微镜下刮去角膜上皮层,自角膜缘内侧 1mm 剪下角膜组织片。刮去后弹力层及内皮层,把漂洗干净的基质剪切成约 1mm × 1mm × 0.4mm 的小块,加入适量 0.2g/L 胰蛋白酶溶液,放入 37℃ 50mL/L CO₂ 孵箱中过夜。用 PBS 液清洗,清洗后低速离心 5min × 2 次,弃上清液后,加入 DMEM(含 100mL/L 胎牛血清)培养基,轻柔吹打成混悬液接种于培养瓶,在 37℃ 50mL/L CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。2d 换 DMEM(含 100mL/L 胎牛血清)培养基,以后每 3~5d 换培养基,培养持续 14d。将基质细胞接种于 24 孔板,共 8 孔,其中 6 孔用于转染,2 孔留作细胞计数用。培养 12h,细胞进入对数增长后期后计数;待转染细胞为 2×10^5 /孔。用无血清的 DMEM 液将待转染的大鼠角膜基质细胞洗 2 遍,用 PBS 液将 rAAV8-EGFP 转染液配成 1×10^{14} vg/L;分别按 MOI = 5×10^3 , 5×10^4 , 5×10^5 vg/cell 进行转染。各设 3 个复孔,培养基适量稀释,使其能够完全覆盖细胞培养面积,37℃ 孵育 4h 后,保留转染液,补充含 100mL/L 胎牛血清的 DMEM 培养基,同一批细胞,按照上述方法操作,以未进行病毒转染的细胞(MOI = 0)作为对照。转染后 3, 5, 7, 14 和 28d 于倒置荧光显微镜 490nm 激发光下观察角膜基质细胞中 GFP 的表达情况,并照相记录。转染后第 7d 收集被不同 MOI 转染的细胞,取 2×10^5 培养细胞,离心,洗涤 2 次,震荡细胞,加入 40mL/L 多聚甲醛固定,直接用流式细胞仪检测角膜基质细胞中 rAAV8-EGFP 表达的阳性率。将原代培养好的角膜基质细胞消化、计数,加入 96 孔板,每孔加入 100μL(即 5 000 细胞/孔)。分组:A 组以 MOI = 5×10^4 的 rAAV8-EGFP 转染角膜基质细胞;B 组以 MOI = 5×10^5 的 rAAV8-EGFP 转染角膜基质细胞;C 组以 MOI = 5×10^5 的 rAAV8 病毒(空载体)转染角膜基质细胞;D 组空白对照组。各设 6 个复孔,培养 24h 后吸弃培养液,除空白对照孔外,各孔分别加入 MOI = 5×10^4 和 MOI = 5×10^5 的 rAAV8-EGFP 及 MOI = 5×10^5 的 rAAV8 转染角膜基质细胞。37℃ 50mL/L CO₂ 培养 72 和 96h 后,分别加入 5g/L MTT 10μL,继续培养 4h,加入 100μL 二甲基亚砜终止反应,微量振荡器振荡 10min,用酶标仪测定在 570nm 的吸光度 A 值;以检测细胞活性,评价对细胞增殖的影响。

统计学分析:实验数据用 SPSS 13.0 统计软件进行处理,采用定量数据重复测量的方差分析,各治疗组间比较用单因素方差分析,72, 96h 各组之间比较用配对 *t* 检验。取 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

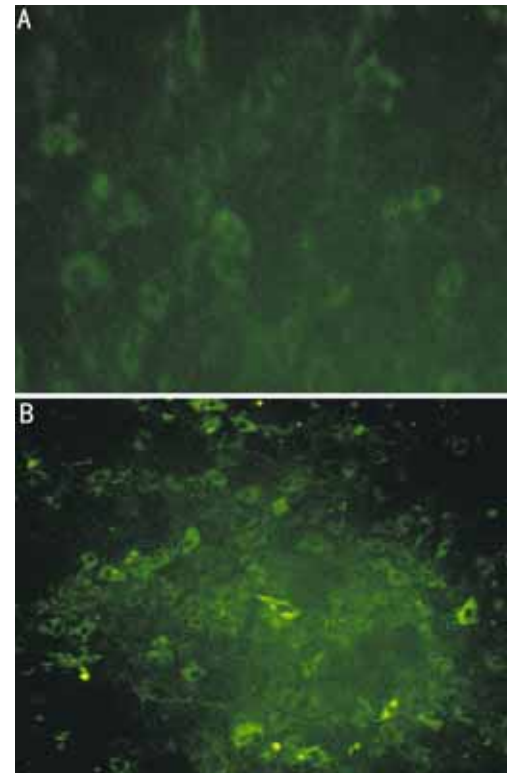


图 1 rAAV8-EGFP 转染角膜基质细胞后的 GFP 表达 A :3d ($\times 200$);B:7d($\times 100$)。

表 1 转染后角膜基质细胞的影响 ($\bar{x} \pm s, A \times 10^{-3}, n = 6$)

分组	72h	96h	SUM
A	303.0 ± 4.6	305.3 ± 4.0	304.2 ± 4.3
B	300.0 ± 2.1	300.3 ± 4.5	300.2 ± 3.3
C	299.5 ± 5.6	299.2 ± 6.1	299.3 ± 5.6
D	302.5 ± 4.4	303.7 ± 4.5	303.1 ± 4.3
Total	301.3 ± 4.4	302.1 ± 5.2	301.7 ± 4.8

2 结果

2.1 rAAV8-EGFP 的阳性表达 按 rAAV8-EGFP 的 MOI 为 5×10^3 , 5×10^4 , 5×10^5 vg/cell 转染已培养好的大鼠角膜基质细胞。转染后 3d,在倒置荧光显微镜下观察到稀少的角膜基质细胞中的细胞质有 GFP 阳性表达,而细胞核无 GFP 阳性表达(图 1A)。起始表达强度不一,随 MOI 值的增高而增强,随着时间延长而逐渐增强, 5×10^5 vg/cell 的 rAAV8-EGFP 转染后 7d 达到高峰,此时倒置荧光显微镜下可见较多角膜基质细胞细胞质有明显 GFP 阳性表达,而细胞核无 GFP 阳性表达(图 1B),14d 时呈 GFP 阳性表达的细胞明显减少,28d 时仍有少量细胞呈 GFP 阳性表达。

2.2 rAAV8-EGFP 的转染效率 rAAV8-EGFP 转染角膜基质细胞后 GFP 阳性表达 7d 达到高峰,此时流式细胞仪检测 rAAV8-EGFP 对体外培养的大鼠角膜基质细胞的转染效率分别为 31.5% (MOI = 5×10^3), 42.5% (MOI = 5×10^4), 54.8% (MOI = 5×10^5)。

2.3 rAAV8-EGFP 对角膜基质细胞增殖的影响 rAAV8 及不同 MOI 的 rAAV8-EGFP 转染角膜基质细胞后,细胞生长及形态正常(表 1),转染后各时间段各转染组与未转染组之间无时间与转染的交互效应 ($F = 0.381, P = 0.768$),转染后各时间段组间及组内两两比较均无显著性差异 ($P >$

0.05)。同时间段各转染组间及组内两两比较亦无显著性差异($P > 0.05$),提示在不同时间和不同转染复数 rAAV8-EGFP 及空载体(rAAV8 病毒)转染对角膜基质细胞增殖均无明显影响。

3 讨论

眼科基因治疗是体细胞基因治疗。目前基因治疗迫切需要解决的问题:(1)开发更多更好的治疗基因;(2)构建安全有效的传递治疗基因的载体。病毒载体中 AAV 的主要特点有^[2]:(1)AAV 能转染分裂细胞和非分裂细胞;(2)AAV 具有广泛的趋向性;(3)AAV 能整合至宿主染色体具有建立长期表达的能力;(4)AAV 是一种非致病性病毒;(5)AAV 不会产生细胞介导的免疫反应。这些优势使 AAV 成为眼部疾病基因治疗载体的最佳选择。国际病毒分类委员会根据衣壳的差异已鉴别出多个 AAV 种类成员,包括 AAV1 ~ AAV8、禽 AAV、牛 AAV 和犬 AAV 等。不同 AAV 血清型具有不同的衣壳构象,因而其识别与结合的细胞表面受体或共受体也相应存在差异^[3]。形态结构的差异和细胞趋向性的不同导致不同血清型转染的细胞类型和感染效率也各不相同。8 型腺相关病毒是由 Gao 等^[4]在 2002 年从罗猴心脏分离出来的,经基因重组建立起来的新型基因治疗载体,对心肌、骨骼肌、肝脏具有高亲嗜性。感染能力受剂量限制,大剂量的 AAV8 能感染小鼠的全身肌肉和整个肝脏,显示了其在基因治疗中的巨大潜力。Gao 等^[5,6]的研究还发现,由肝脏特异启动子介导治疗基因表达的 AAV1, 2, 5, 7, 8, 载体表达量差异为 AAV8 > AAV5 > AAV7 > AAV2 > AAV1,且 AAV8 的肝脏细胞转导效率最高。特别值得一提的是,rAAV8 载体介导的小鼠血管内皮生长因子受体 2 (VEGFR2)抗体 DC101 基因在小鼠体内实现了高水平长期表达,显示了其重要的抗癌作用前景^[7]。Acland 等^[8]研究证明,无论在大鼠视网膜基底或玻璃体内注射 AAV1, AAV2 和 AAV5 载体均可有效感染光受体细胞和视网膜色素上皮细胞,并表达所携带的 GFP 基因。但 AAV2 和 AAV5 表达部位位于感染光受体细胞和视网膜色素上皮细胞,而 AAV1 则特异集中于视网膜色素上皮细胞层,AAV2 还可感染内层视网膜色素细胞,而 AAV1 和 AAV5 在该部位表达则较 AAV2 差。AAV1 载体表达从病毒注射后 4d 即可检出,而 AAV2 和 AAV5 则分别要到 4 和 2wk 后检出,一旦表达检出后,表达可平稳持续 4mo 以上。Yang 等^[9]还发现,AAV5 在视网膜的表达早于 AAV2,并且感染效率和表达水平要高于 AAV2 约 30 倍左右。Auricchio 等^[10]发现 AAV3 和 AAV6 在视网膜的表达与 AAV5 类似。另外我们前期研究^[11]采用 rAAV1 作为转基因载体将 EGFP 转入角膜基质细胞中,rAAV1-EGFP 转染角膜基质细胞后 GFP 阳性表达第 7 ~ 9d 达到高峰,流式细胞仪检测 rAAV1-EGFP 对体外培养角膜基质细胞的转染效率分别为 16.3% (MOI = 10^3), 30.3% (MOI = 10^4), 43.6% (MOI = 10^5) 和 47.5% (MOI = 10^6)。

鉴于前期研究结果,rAAV1-EGFP 转染角膜基质细胞所需转染液的 MOI 高,病毒质粒提纯难度大,成本高,而且转染率较低。我们尝试用 rAAV8 作为转基因载体将 EGFP 基因转入角膜基质细胞中,转染后 GFP 阳性表达 7d 达到高峰,此时流式细胞仪检测 rAAV8-EGFP 对角膜基质细胞的转染效率分别为 31.5% (MOI = 5×10^3), 42.5% (MOI = 5×10^4) 和 54.8% (MOI = 5×10^5)。结果显示,转染液 rAAV8-EGFP 的 MOI (5×10^5) 较前期研究中转染液 rAAV1-EGFP 的 MOI (10^6) 低,而且转染率更高(54.8%)。rAAV8 转染率更高的原因有待进一步研究。

同时,我们应用 MTT 比色法检测 rAAV8-EGFP 及 rAAV8 (空载体)转染后角膜基质细胞生长活性,以评价 rAAV8-EGFP 对角膜基质细胞的毒性。统计分析结果提示,在不同时间和不同转染复数 rAAV8-EGFP 及 rAAV8 (空载体)转染对角膜基质细胞增殖均无明显影响。综上所述,以 rAAV8 作为转基因载体能将 EGFP 基因安全并较 rAAV1 更高效地转入角膜基质细胞,为角膜疾病的转基因治疗选择更适当的载体将有治疗作用的目的基因转入角膜基质细胞的研究奠定了实验基础,为进一步研究角膜疾病的转基因治疗提供了新的技术平台。

参考文献

- 1 汤明芳,陆晓和,周瑾,等. 腺相关病毒-1 介导增强型绿色荧光蛋白基因体内外转染大鼠角膜基质细胞. 国际眼科杂志 2007;7(6):1551-1554
- 2 谢辉,郭黠,梁念慈,等. 基因治疗中的腺相关病毒载体. 国外医学病毒学分册 2005;12(6):185-188
- 3 Ding W, Zhang L, Yan Z, et al. Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. *Gene Ther* 2005;12(11):873-880
- 4 Gao GP, Alvira MR, Wang L, et al. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(18):11854-11859
- 5 Gao GP, Lu Y, Calcedo R, et al. Biology of AAV serotype vectors in liver-directed gene transfer to nonhuman primates. *Mol Ther* 2006;13(1):77-87
- 6 Gao GP, Lu Y, Sun X, et al. High-level gene transgene expression in nonhuman primate liver with novel adeno-associated virus serotypes containing self-complementary genomes. *J Virol* 2006;80(12):6192-6194
- 7 Fang J, Qian JJ, Yi S, et al. Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide. *Nat Biotechnol* 2005;23(5):584-590
- 8 Acland GM, Aguirre GD, Bennett J, et al. Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness. *Mol Ther* 2005;12(6):1072-1082
- 9 Yang GS, Schmidt M, Yan Z, et al. Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus: effects of viral capsid and genome size. *J Virol* 2002;76(15):7651-7660
- 10 Auricchio A, Rolling F. Adeno-associated viral vectors for retinal gene transfer and treatment of retinal diseases. *Curr Gene Ther* 2005;5(3):339-348