

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.06.013

腺相关病毒载体介导 ZsGreen 基因通过 3 种转染途径 在心肌组织转染效果的比较

谭文鹏, 杨侃, 李安莹, 杨琼

(中南大学湘雅三医院心内科, 长沙 410013)

【摘要】目的: 采用腺相关病毒(Adeno-associated virus, AAV)-9 为载体, 比较 3 种转染方法对 ZsGreen 基因在大鼠心肌组织表达的影响。方法: 30 只雄性 SD 大鼠随机分为尾静脉(Tail vein, TV)注射组、心肌(Intramyocardium, IM)注射组、冠脉(Intracoronary, IC)灌注组, 采用相应方法在体转染携带报告基因 ZsGreen 的腺相关病毒-9 型(Adeno-associated virus 9-ZsGreen, AAV9-ZsGreen)。2 周后荧光显微镜下观察绿色荧光在大鼠 IM 组织的表达情况。结果: TV 组 IM 有少量绿色荧光分布; IM 组绿色荧光表达主要局限在 IM 注射位点, 注射点周边有少量分布; IC 组大量绿色荧光在 IM 广泛均匀表达。IM 及 IC 组荧光强度均显著高于 TV 组($P < 0.01$), IC 组荧光强度高于 IM 组($P < 0.01$)。结论: IC 灌注法可使 AAV 介导的外源基因在 IM 组织高效、广泛、均匀表达, 优于 TV 注射法及 IM 注射法。

【关键词】转染; 心肌; 腺相关病毒; 基因治疗

【中国图书分类法分类号】Q78; R363

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-12-01

Comparison on three transfection methods for ZsGreen gene expression mediated by adeno-associated virus in the myocardium of rats

TAN Wenpeng, YANG Kan, LI Anying, YANG Qiong

(Department of Cardiology, the Third Xiangya Hospital, Central South University)

【Abstract】Objective: To compare the effect of three transfection methods on ZsGreen gene expression in rats myocardium mediated

作者介绍: 谭文鹏(1983-), 男, 博士,

研究方向: 心室重构及基因治疗。

通信作者: 杨侃, 男, 教授, Email: yangkan@medmail.com.cn。

by adeno-associated virus 9(AAV9). Methods: Totally 30 male SD rats were divided into tail vein(TV) injection group, intramyocardium(IM) injection group and intracoronary(IC) infusion

[5] Maeng M, Olesen P G, Emmertsen N C, et al. Time course of vascular remodeling, formation of neointima and formation of neoadventitia after angioplasty in a porcine model[J]. Coron Artery Dis, 2001, 12(4): 285-293.

[6] 周晓莉, 雷寒. 罗格列酮对血管球囊损伤后新生内膜增生及 c-Fos 和 p27kip1 表达的影响[J]. 重庆医科大学学报, 2011, 36(8): 924-928.

Zhou X L, Lei H. Effects of rosiglitazone on neointimal hyperplasia and the expression of c-Fos and p27 kip1 in rat carotid arteries after balloon injure [J]. Journal of Chongqing Medical University, 2011, 36(8): 924-928.

[7] Tepe G, Zeller T, Albrecht T, et al. Local delivery of Paclitaxel to inhibit restenosis during angioplasty of the leg[J]. N Engl J Med, 2008, 358(7): 689-699.

[8] 康艳敏, 吴燕, 杨长青, 等. 紫杉醇脂质体的制备及质量考察[J]. 中国药房, 2008, 19(28): 2208-2210.

Kang Y M, Wu Y, Yang C Q, et al. Preparation and quality study of Paclitaxel liposome[J]. China Pharmacy, 2008, 19(28): 2208-2210.

[9] 邓联东, 孙多先, 董岸杰. 紫杉醇注射剂的研究[J]. 药学进展, 2002, 26(3): 152-155.

Deng L D, Sun D X, Dong A J. Advances in the research of injection of anticancer agent Paclitaxel[J]. Progress in Pharmaceutical Science, 2002, 26(3): 152-155.

[10] Tomai F, Reimers B, De L L, et al. Head-to-head comparison of sirolimus- and paclitaxel-eluting stent in the same diabetic patient with multiple coronary artery lesions: a prospective, randomized, multicenter study[J]. Diabetes Care, 2008, 31(1): 15-19.

[11] Scheller B, Hehrlein C, Bocksch W, et al. Two year follow-up after treatment of coronary in-stent restenosis with a paclitaxel-coated balloon catheter[J]. Clin Res Cardiol, 2008, 97(10): 773-781.

[12] Werk M, Langner S, Reinkensmeier B, et al. Inhibition of restenosis in femoropopliteal arteries: paclitaxel-coated versus uncoated balloon: femoral paclitaxel randomized pilot trial[J]. Circulation, 2008, 118(13): 1358-1365.

[13] 钱思源. 申报细胞毒类抗肿瘤药物脂质体的立题考虑和临床研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2006, 22(6): 472-474.

Qian S Y. Clinical trial method and point on development plans on the cytotoxic oncology drugs[J]. Chin J Clin Pharmacol, 2006, 22(6): 472-474.

[14] Fitzgerald P J, Takagi A, Moore M P, et al. Intravascular sonotherapy decreases neointimal hyperplasia after stent implantation in swine[J]. Circulation, 2001, 103(14): 1828-1831.

[15] Hashiya N, Aoki M, Tachibana K, et al. Local delivery of E2F decoy oligodeoxynucleotides using ultrasound with microbubble agent (Optison) inhibits intimal hyperplasia after balloon injury in rat carotid artery model[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 317(2): 508-514.

(责任编辑: 关蕴良)

group. AAV9 carrying report gene ZsGreen were transferred into rats' myocardium by methods mentioned above and green fluorescence expression in myocardium was observed by fluorescence microscopy two weeks later. **Results:** A little green fluorescence expression could be observed in myocardium of TV injection group; in IM injection group, most green fluorescence expressions were localized at the injection sites and a small amount around the injection sites; in IC infusion group, there was large green fluorescence in myocardium of broad and uniform distribution. The fluorescence intensity was increased significantly in IM injection and IC infusion group compared with that in TV injection group ($P < 0.01$). The fluorescence intensity in IC infusion group was higher than that in IM injection group ($P < 0.01$). **Conclusion:** IC infusion can make AAV-mediated ZsGreen gene express in an efficient, extensive and well-distributed way in myocardium tissues, superior to TV injection and IM injection.

【Key words】transfection; myocardium; adeno-associated virus; gene therapy

基因工程技术在心血管领域的应用日渐广泛及深入,心肌组织的基因转染不仅是一种潜力巨大的治疗手段还可以用来研究靶基因在心脏疾病中的病理生理机制^[1]。如何使外源性基因在心肌组织高效、特异性表达是研究的热点^[2]。本实验采用腺相关病毒(Adeno-associated virus, AAV)作为载体,比较 3 种转染方法对报告基因礁珊瑚绿色荧光蛋白 ZsGreen 在心肌组织转染效果的影响,为基因治疗选择适当的转染方法提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

SPF 级雄性 SD 大鼠 30 只,体重 250~300 g,由湘雅三医院实验动物中心提供,许可证号 SCXK(湘)2009-0004。携带报告基因 ZsGreen 的腺相关病毒-9(Adeno-associated virus 9-ZsGreen, AAV9-ZsGreen)购自百恩维生物公司,制备方法是构建重组质粒 pAAV-ZsGreen 并导入 293AAV 细胞,产生含报告基因 ZsGreen 的 AAV9,滴度 1×10^8 TU/ml。病毒使用 CMV 启动子指导报告基因序列的转录及 polyA 识别的终止信号终止转录。

1.2 动物分组

30 只大鼠随机分为尾静脉(Tail vein, TV)注射组($n=10$)、心肌(Intramyocardium, IM)注射组($n=10$)、冠脉(Intracoronary, IC)灌注组($n=10$)。每只采用相应方法转染 1×10^7 TU 即 100 μ l AAV9-ZsGreen。

1.3 病毒载体转染

TV 注射组:100 μ l AAV9-ZsGreen 通过大鼠 TV 注入。IM 注射组:大鼠腹腔注射 10%水合氯醛(350 mg/kg)麻醉,仰卧位固定。无菌条件下剪开颈部皮肤,钝性分离颈部肌肉,暴露气管,在甲状腺下 2~3 软骨环间,横向剪开气管 2~3 mm,插管连接小型动物呼吸机行呼吸支持,设定呼吸频率 70 次/min,潮气量 10 ml,呼吸比 1:1。剪开左侧胸部皮肤,钝性分离肌肉,纵向剪开第 3、4 肋骨开胸,眼科镊撕开心包,暴露心脏。心脏前壁取 10 点注射 100 μ l AAV9-ZsGreen,每点 10 μ l。IC 组:同前法开胸,暴露心脏,左心室腔内注射 100 μ l AAV9-ZsGreen,同时用自制无损伤血管钳夹闭主动脉 10 s,期间可见心脏逐渐膨大,心率变慢,松开血管钳后,心脏恢复正常大小,心率恢复正常,逐层缝合胸壁、皮肤,撤除呼吸机,缝合颈

部皮肤。IM 注射组、IC 灌注组术后 3 d 腹腔注射青霉素十万 U/只预防感染。

1.4 荧光显微镜观察

术后 2 周取心脏,垂直心脏长轴在长轴中点将心脏切为两半;在冰生理盐水中洗去血液后,4%多聚甲醛固定 8 h,15%、30%蔗糖溶液先后分别脱水 2 h,以心脏组织沉到溶液底部为准;放入包埋剂中低温成型,冰冻切片机连续切片(厚度 10 μ m),荧光显微镜下观察,全部操作过程注意避光。用 NIS-Elements BR 3.00 图像分析系统,分析各组的平均荧光强度,重复 5 次。

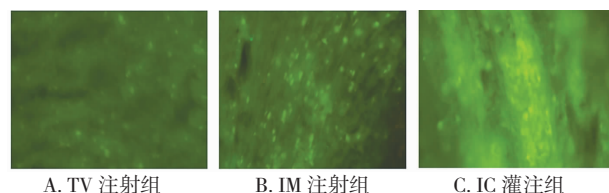
1.5 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件对数据作分析,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ZsGreen 在各组大鼠心肌的表达

荧光显微镜下可见心肌纤维排列整齐,TV 注射组心肌可见少量绿色荧光稀疏分布;IM 注射组绿色荧光集中在左室前壁注射位点,注射点周边有少量分布,左室后壁、室间隔、右室均无绿色荧光分布;IC 灌注组左右心室、室间隔均有大量绿色荧光广泛均匀分布(图 1)。



A. TV 注射组

B. IM 注射组

C. IC 灌注组

摄片部位为大鼠左室前壁,可见绿色荧光位于细胞胞浆,TV 注射组、IM 注射组可见少量荧光稀疏分布,IC 灌注组可见大量绿色荧光均匀分布

图 1 各组大鼠 IM 组织转染 AAV9-ZsGreen 后绿色荧光表达情况 (200 $\times$)

Fig.1 Fluorescence expression in each group after AAV9-ZsGreen delivery to the heart of rats (200 $\times$)

2.2 各组大鼠 IM 荧光强度比较

采用 NIS-Elements BR 3.00 图像分析系统,分析各组的平均荧光强度,3 组间比较荧光强度差异有统计学意义 ($P <$

0.01), IM 注射组及 IC 灌注组荧光强度均显著高于 TV 注射组 ($P<0.01$), IC 灌注组荧光强度高于 IM 注射组 ($P<0.01$) (表1)。

表 1 各组大鼠 IM 组织转染 AAV9-ZsGreen
后荧光强度比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison on fluorescence intensity in each group after
AAV9-ZsGreen delivery to the heart of rats ($\bar{x} \pm s$)

	例数(<i>n</i>)	荧光强度
TV注射组	10	89 ± 10
IM注射组	10	514 ± 43*
IC灌注组	10	682 ± 58**
<i>F</i> 值		244.807
<i>P</i> 值		0.000

注:*, 与 TV 注射组比较, 经 *LSD* 检验, $P<0.01$; #, 与 IM 注射组比较, 经 *LSD* 检验, $P<0.01$

3 讨 论

基因在体转染过程中, 选择适当的基因载体和转染方式是影响转染效果的关键因素。IM 细胞是非分裂细胞, 本实验采用的基因载体 AAV 具有安全性好、免疫原性低、能感染分裂细胞和非分裂细胞等优点, 目前被认为是最有应用潜力的基因载体^[3]。AAV9 是骨骼肌、IM 特异性血清型, 对心脏靶向性好。研究表明, AAV9 在体转染 2 周后外源基因表达达到高峰, 并能长期稳定表达, 满足基因治疗需要^[4]。报告基因 ZsGreen 是礁珊瑚荧光蛋白 (Reef coral fluorescent protein, RCFP) 家族成员, 是一种从珊瑚中分离的绿色荧光蛋白, 比传统的从水母中分离的绿色荧光蛋白 (Green fluorescent protein, GFP) 亮度更高, 稳定性更好, 可用来观察载体的转染效果^[5]。本实验采用携带 ZsGreen 的 AAV9 作为转染载体, 成功转染后能在心肌细胞内借助 CMV 启动子转录并翻译出绿色荧光蛋白并由 polyA 终止转录, 通过荧光显微镜观察绿色荧光表达, 由此评估转染效率。在此基础上本实验比较了 3 种转染方法对外源基因在大鼠心脏表达的影响。

TV 注射法转染外源基因的优点是创伤小、操作简单, 但由于血液的稀释作用以及病毒载体通过血液循环广泛的分布到全身组织, 导致转染的靶向性较差、转染效率较低^[6]。本实验显示, 采用 TV 注射法转染携带 ZsGreen 的 AAV-9, 大鼠 IM 只有少量绿色荧光表达, 荧光强度显著低于 IM 注射法及冠脉灌注法 ($P<0.01$), 转染效果不理想。IM 注射法是较早采用的转染方法, 对局部组织有较高的转染效率^[7], 但是外源基因的表达局限在注射位点, 不能对心脏疾病达到整体的治疗作用, 同时局部注射可引

起注射位点白细胞聚集导致炎症反应, 可能限制外源基因表达的强度和持续时间, 并且随着注射位点增多对心肌的损伤增加^[8]。本实验显示, 荧光显微镜下绿色荧光集中在注射位点, 周边有少量分布, 远离注射区如左室后壁、室间隔、右室没有绿色荧光分布, 荧光强度低于 IC 灌注法 ($P<0.05$)。IC 灌注法^[9]是在左心室腔内注射病毒载体同时用无损伤血管钳阻断主动脉 10 s, 左心室内血液由于主动脉阻断不能进入体循环, 大量血液进入冠状动脉, 在此期间可见心脏逐渐膨大, 心率减慢, 解除主动脉阻断后心率恢复正常。荧光显微镜镜下可见大量绿色荧光在左右心室、室间隔广泛均匀分布, 荧光强度高于 TV 注射法 ($P<0.01$) 及 IM 注射法 ($P<0.05$), 转染效率较高。说明 IC 灌注法可以实现外源基因在心肌组织高效、广泛、特异性转染, 满足基因治疗的需要。

AAV 与 IC 灌注法的联合应用, 提高了外源基因在 IM 组织的表达效果, 为基因治疗的进一步发展提供有力帮助。

参 考 文 献

- [1] Hedman M, Hartikainen J, Yla-Herttuala S. Progress and prospects: hurdles to cardiovascular gene therapy clinical trials[J]. Gene Ther, 2011, 18(8):743-749.
- [2] Lyon A R, Sato M, Hajjar R J, et al. Gene therapy: targeting the myocardium[J]. Heart, 2008, 94(1):89-99.
- [3] Pacak C A, Byrne B J. AAV vectors for cardiac gene transfer: experimental tools and clinical opportunities[J]. Mol Ther, 2011, 19(9):1582-1590.
- [4] Bish L T, Morine K, Sleeper M M, et al. Adeno-associated virus (AAV) serotype 9 provides global cardiac gene transfer superior to AAV1, AAV6, AAV7 and AAV8 in the mouse and rat[J]. Hum Gene Ther, 2008, 19(12):1359-1368.
- [5] Heddle C, Mazaleyrat S L. Development of a screening platform for directed evolution using the reef coral fluorescent protein ZsGreen as a solubility reporter[J]. Protein Eng Des Sel, 2007, 20(7):327-337.
- [6] Inagaki K, Fuess S, Storm T A, et al. Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8[J]. Mol Ther, 2006, 14(1):45-53.
- [7] Wolff J A, Malone R W, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo[J]. Science, 1990, 247(4949 Pt 1):1465-1468.
- [8] French B A, Mazur W, Geske R S, et al. Direct in vivo gene transfer into porcine myocardium using replication-deficient adenoviral vectors[J]. Circulation, 1994, 90(5):2414-2424.
- [9] Katz M G, Swain J D, Tomasulo C E, et al. Current strategies for myocardial gene delivery[J]. J Mol Cell Cardiol, 2011, 50(5):766-776.

(责任编辑:唐秋娟)