文章编号:1000-5404(2008)12-1111-03

论著

2种腺相关病毒介导的增强型绿色荧光蛋白对人成纤维细胞转染效率的研究

郑钧丰[1],孔 永[2],葛良鹏[1,3],魏 泓[1] ([1]第三军医大学基础医学部实验动物学教研室,重庆 400038;[2]西南大学生命科学院,重庆 400017;[3]重庆宗申医达公司,重庆 400054)

摘 要:目的 比较2种不同腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)介导的增强型绿色荧光蛋白对人皮肤成纤维细胞(human fibroblast, HFB)的转染效率。**方法** 原代分离培养人皮肤成纤维细胞并鉴定,按照感染复数(multiple of infection,MOI)为10^4、10^5、10^6转染传2代的人成纤维细胞,流式细胞检测AAV2-EGFP和AAV2/1-EGFP对HFB的转染效率,倒置荧光显微镜观察转染后的荧光强度。MTT法检测AAV2-EGFP和AAV2/1-EGFP对HFB的毒性。**结果** 腺相关病毒AAV2-EGFP对HFB的转染效率随着MOI增加而增高,MOI为10^4时转染效率为(7.68±1.18)%,当MOI达到10^5后,转染效率稳定在(22.16±5.59)%,随着MOI增加,最高至MOI 10^6转染效率无显著提高。而病毒AAV2/1对于HFB的转染效率在MOI为10^6转染效率仅为(3.47±0.93)%。2种病毒在转染过程中,细胞生长正常,MTT显示各转染组与未转染组的吸光度值无统计学差异。**结论** AAV2载体对体外培养的HFB转染效率高于AAV2/1,但2种病毒载体对人皮肤成纤维细胞转染效率均不高,AAV2/1-EGFP对HFB几乎无感染能力。

关键词: 腺相关病毒;人皮肤成纤维细胞;增强型绿色荧光蛋白;流式细胞
中图法分类号: R329;R373;R394-33 **文献标识码:** A

AAV2-mediated versus AAV2/1-mediated enhanced green fluorescent protein transfection into human skin fibroblast *in vitro*

ZHENG Jun-feng[1], KONG Yong[2], GE Liang-peng[1,3], WEI Hong[1] ([1]Department of Laboratory Animal Science, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400017; [3]Zong Shen Yida Company, Chongqing 400054, China)

Abstract: Objective To compare the transfection rate of AAV2-EGFP and AAV2/1-EGFP to human skin fibroblast (HFB). **Methods** Two recombinant adeno-associated viruses (AAV) encoding enhanced green fluorescent protein (EGFP) were constructed and transfected to HFB at multiple of infection MOI ranging from 10^4 to 10^6. Twenty-four hours after the infection, the expression rates of EGFP on cultured HFB were assessed by flow cytometry and the transfected cells were observed under fluorescence microscope. The killing effect of the virus on the infected cells was assayed by MTT. **Results** The transfection efficiency of AAV2-EGFP was increased as MOI increased. When MOI was 10^4, the transfection efficiency of AAV2-EGFP was 7.68% ± 1.18%; When MOI was 10^5, that was 52.12% ± 1.59%; When MOI was 10^6, that showed no significant increase. However, the transfection efficiency of AAV2/1-EGFP showed no obvious changes at any MOI. **Conclusion** AAV2 is more efficient than AAV2/1 in transfecting HFB, but neither AAV has a high transfection efficiency.

Key words: adeno-associated virus; human fibroblast; enhanced green fluorescent protein; flow cytometry

目前基因治疗所应用的病毒载体主要包括逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、慢病毒和疱疹病毒[1]。在人类基因治疗常用的病毒载体中,腺相关病毒(adeno-associated viruses, AAV)载体是目前唯一没有引起人类宿主任何病理反应的载体[2]。近年来,许多研究采用灵长类来源的不同血清型AAV1-9作为载体,结果显示不同血清型的AAV具有不同的组织嗜向性[3-5]。但是,目前在AAV载体用于皮肤组织基因修饰的报道中,AAV对人皮肤成纤维细胞(human fibroblast, HFB)的转染效率研究尚少见确切报道。另外,在GFP的基础上进行F64L和S65T突变后的增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescence protein, EGFP)进一步

基金项目: 国家"十五"科技攻关计划重点项目(2004BA717B23)
Supported by the Key Program of "Tenth Five-Year Plan" for Sci & Tech Research of China (2004BA717B23)
作者简介: 郑钧丰,女,四川省资中县人,硕士研究生,主要从事异种移植方面的研究。电话:(023)68772254,E-mail: zheng-junfeng@126.com
通信作者: 魏 泓,E-mail: weihong63528@163.com
收稿日期: 2007-10-16;**修回日期:** 2008-03-04

增强了 GFP 的荧光性能,使结果更容易观察检测[6]。因此本实验以 EGFP 为报告基因,通过 AAV2 和 AAV2/1 两种载体的比较,以流式细胞检测(flow cytometry, FCM)为定量指标,探讨了腺相关病毒对 HFB 的转染效率,希望筛选出对 HFB 嗜性较高的载体,为进一步研究皮肤组织的基因修饰提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

AAV2-EGFP 和 AAV2/1-EGFP 由本元正阳基因技术股份有限公司提供,滴度均为 5 $\times 10^{11}$ PFU/ml。MTT 购自 Sigma 公司,每 5 毫克溶于 10 ml 的 PBS,用时新鲜配制。DMEM 培养基及新生牛血清均为百瑞公司产品。

1.2 细胞培养与鉴定

人皮肤材料取自包皮环切术患者(由第三军医大学西南医院全军烧伤研究所惠赠),常规消毒后去除结缔组织及多余脂肪,将皮肤组织块切碎至 1 mm^2 大小,0.25% 胰酶 37 ℃恒温气浴摇床内振摇消化 1 ~ 2 h,100 目筛网过滤,取滤液 800 r/min 4 ℃ 离心 10 min, 弃上清,加入 PBS,吹打混匀,再次离心,弃上清后加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基,接种于 25 mm 培养瓶,4 ~ 5 d 后待人成纤维细胞长出并汇合成片,传代并根据实验需要使用。

1.3 AAV2-EGFP 和 AAV2/1-EGFP 对体外培养的皮肤成纤维细胞转染以及转染效率的检测

取生长至 90% 融合的 HFB 细胞,0.25% 的胰蛋白酶消化细胞,将细胞分别种至 25 mm 培养瓶,细胞接种浓度为每瓶 2 $\times 10^5$ 个。加含 10% FBS-DMEM 培养基进行常规细胞培养贴壁后,弃去培养液,无血清的 DMEM 培养基轻洗细胞 2 次,按感染复数(multiple of infection, MOI) 10^4、10^5、10^6 加入无血清的 DMEM 培养基稀释的病毒液约 1 ml,使其完全覆盖细胞培养面积,37 ℃孵育 2 h 后,PBS 洗去转染液,加含 10% FBS 的 DMEM 培养基至 5 ml 继续培养 24 h 后,应用流式细胞仪检测转染效率。按上述同样操作,不转染 AAV1-EGFP 和 AAV2-EGFP 的同一批细胞作对照。

1.4 MTT 法检测 AAV2-EGFP 和 AVV2/1-EGFP 对 HFB 细胞的毒性

2.5 g/L 的胰蛋白酶消化生长至 90% 融合的 HFB 细胞,按每孔 1 $\times 10^3$ 个细胞接种于 96 孔板,常规细胞培养 2 d 后,按 MOI 10^4、10^5、10^6 分别加入 AAV2-EGFP 和 AVV2/1-EGFP (转染方法同 1.3),未转染组作对照,再培养 2 d 后,每孔加入噻唑蓝溶液 20 μl (5 g/L),继续培养 4 h 后终止培养,弃上清,然后每孔加入 150 μl DMSO,震荡 15 min,于 SM22 酶免分析仪 490 nm 测定吸光度值[D(490)]。

1.5 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 细胞培养

细胞原代培养 5 d 左右细胞汇合至 80%,在倒置显微镜下可见细胞呈长梭形,细胞大致呈平行排列,核较大,细胞质较多,为典型的成纤维细胞状态(图 1)。

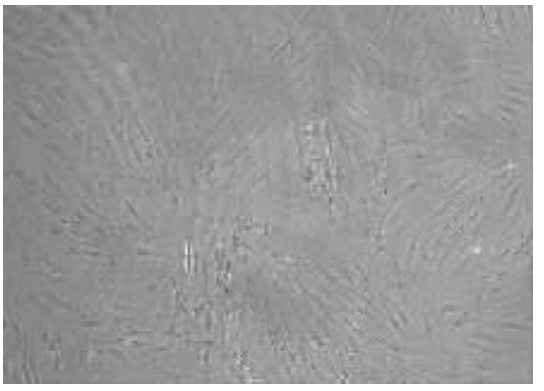
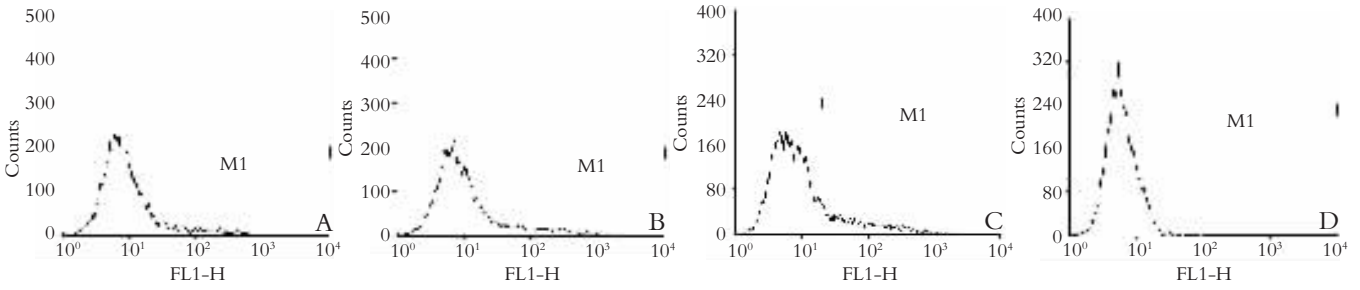


图 1 倒置显微镜下原代培养的 HFB (×10)

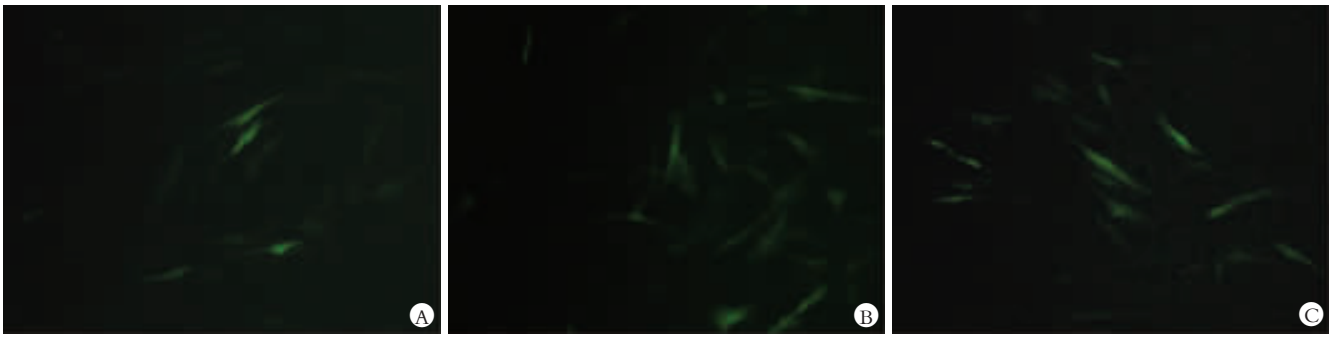
2.2 AAV2-EGFP 和 AAV2/1-EGFP 对体外培养 HFB 转染效率的检测

流式细胞检测结果显示,AAV2-EGFP 在 MOI 为 10^4、10^5、10^6 时,转染效率分别为(7.68 ± 1.18)%、(22.16 ± 5.59)%、(21.11 ± 5.40)%。AAV2/1-EGFP 在 MOI 在 MOI 为 10^4,10^5,10^6 时,转染效率分别为(0.03 ± 0.58)%、(1.22 ± 1.17)%、(3.47 ± 0.93)%(图 2)。统计结果表明,AAV2-EGFP 对 HFB 转染效率显著高于 AAV2/1-EGFP($P < 0.05$)。随着 MOI 升高,AAV2-EGFP 对 HFB 的转染效率升高,AAV2/1-EGFP 对 HFB 几乎无转染能力。在倒置荧光显微镜下观察,随着 MOI 增强,荧光逐渐增强,MOI 为 10^4 时可见少量绿色荧光表达(图 3A),MOI 为 10^5 时镜下表达绿色荧光的细胞增多(图 3B),MOI 为 10^6 时镜下观察荧光表达细胞未见继续增多,荧光强度也无明显增高(图 3C)。AAV2/1-EGFP 转染后的 HFB 在荧光显微镜下观察未见明显绿色荧光,流式细胞检测结果表明该载体对 HFB 没有转染效率。



A: AAV2-EGFP MOI = 10^4; B: AAV2-EGFP MOI = 10^5; C: AAV2-EGFP MOI = 10^6; D: AAV2/1-EGFP MOI = 10^6

图 2 AAV2-EGFP 和 AAV2/1-EGFP 对体外培养 HFB 的转染流式结果



A: MOI = 10^4; B: MOI = 10^5; C: MOI = 10^6

图 3　AAV2-EGFP 倒置荧光显微镜观察结果(×100)

2.3　细胞毒性检测

显微镜下观察各个感染 MOI 的细胞形态和阴性对照孔之间没有明显差别,MTT 检测结果显示, 2 个载体即使在最高 MOI 条件下 D(490)和阴性对照相比没有显著型差异,说明 2 个载体对各个受试细胞没有明显杀伤作用。

3　讨论

目前,基因修饰中所用的载体可分为两大类:非病毒载体和病毒载体。非病毒载体包括脂质体、分子偶联载体等,基因转移效率低。病毒载体应用广泛,其中,腺相关病毒、逆(反)转录病毒、腺病毒、单纯疱疹病毒是基因治疗中最常用的 4 种病毒载体,各病毒载体均有优点和不足。逆(反)转录病毒能随机整合入宿主 DNA,可以引起"插入诱变", 也有可能产生具有复制能力的病毒[7]。腺病毒不能整合到宿主染色体 DNA 上,表达时间短暂,不能持续表达所需产物,且可引起免疫反应[8]。单纯疱疹病毒对人类具有明显的致病性,因此使用时需考虑病毒载体的生物安全性问题。AAV 是一种单链微小 DNA 病毒,具有下列优点:①目前尚未发现该病毒在人体中致病,所以比较安全;②感染宿主细胞广泛,包括非分裂细胞和分裂细胞,特别对神经元和神经胶质感染性较强;③能特异整合于人的第 19 号染色体长臂末端,减小了插入突变激活原癌基因的可能性; ④rAAV 虽然失去了整合特异性,但反向末端重复序列中没有转录调控组件,因而减少了插入突变的可能性; ⑤外源基因表达稳定,可长达 2 年。通过本实验,证明 AAV2 载体可以有效转染人皮肤成纤维细胞,因此可以通过 AAV2 载体转染,获得人皮肤基因修饰细胞,用于相关的基因治疗。

本研究表明,随着 MOI 增高,AAV2-EGFP 对成纤维细胞的转染逐渐增高,当 MOI 为 10^5时,转染效率达到(22.16 ± 5.59)%,MOI 继续增高,转染效率无显著变化。AAV2 感染宿主主要通过受体硫酸肝素糖蛋白(surface heparin protein of glycans, SHPG)介导[7],由于 HBF 细胞膜上该受体有限,结合达到饱和,导致转染效率由低到高最后趋于稳定,本研究结果与杨晓慧等[8]一致。AAV2/1 是由 AAV2 的 ITRs 包被进入 AAV1 的衣壳蛋白形成的嵌合型载体,AAV2/1 在流式细胞检测中 MOI 为 10^6时,转染效率仅为(3.47 ± 0.93)%,在荧光显微镜下观察无明显绿色荧光,提示 AAV2 衣壳蛋白上可能具有决定载体对 HFB 嗜性的关键蛋白,从而导致载体结构改造后 AAV2/1 对 HFB 失去感染能力。本实验结果进一步提示,AAV2 载体对 HFB 嗜性比 AAV2/1 高,在皮肤基因修饰的研究上,AAV2 是一种有前景的载体。采用恰当血清型的 rAAV 载体并通过适当的转入途径是实现靶器官基因治疗的关键所在。但本研究只是对 rAAV 载体转导 HFB 初步研究,因此,要筛选出对皮肤组织基因修饰稳定并且更高效表达的载体,有待进一步研究。

(致谢:本实验得到了重庆宗申医达公司的大力支持和帮助,在此表示诚挚的感谢!)

参考文献:

[1] Isner J M. Myocardial gene therapy[J]. Nature, 2002, 415(6868): 234 - 239.

[2] Flotte T R. Gene therapy progress and prospects: recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors[J]. Gene Ther, 2004, 11(10): 805 - 810.

[3] Mohan R R, Schultz G S, Hong J W, *et al*. Gene transfer into rabbit keratocytes using AAV and lipid-mediated plasmid DNA vectors with a lamellar flap for stromal access[J]. Exp Eye Res, 2003, 76 (3): 373 - 383.

[4] Burger C, Gorbatyuk O S, Velardo M J, *et al*. Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1, 2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system[J]. Mol Ther, 2004, 10(2): 302 - 317.

[5] Evans C H, Gouze E, Gouze J N, *et al*. Gene therapeutic approaches-transfer *in vivo*[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2006, 58 (2) : 243 - 258.

[6] 欧阳长杰, 赵　玉, 徐铁军. 腺病毒介导 EGFP 基因转染神经干细胞的实验研究[J]. 徐州医学院学报, 2007, 27(7): 424 - 428.

[7] Bartlett J S, Wilcher R, Samulski R J. Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors[J]. J Virol, 2000, 74(6): 2777 - 2785.

[8] 杨晓慧, 孙葆忱. 腺相关病毒介导绿色荧光蛋白基因对体外培养 IPE 细胞的转染及毒性[J]. 眼科新进展, 2003, 23(5): 332 - 334.

(编辑　王小寒)