论著

文章编号:1000-5404(2010)08-0802-03

重组腺病毒 Ad-shRNA-NgR 在大鼠缺血脑组织的转染效率研究

吴小慧,秦新月,王 敬,张沁丽,李 鑫 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经内科)

[摘要] **目的** 探索用于 RNA 干扰的重组腺病毒 Ad-shRNA-NgR 转染大鼠缺血脑组织的适宜滴度。**方法** 将低、中、高 3 种不同滴度(7.90×10^{9}、1.58×10^{10}、3.16×10^{10} pfu/ml)的重组腺病毒通过立体定位手术注射到大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)/再灌注模型大鼠($n=10$)脑缺血区,于术后 48 h 和 1 周在荧光显微镜下观察各组大鼠脑组织中绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)的表达强度并估算转染效率,通过 HE 染色检测炎性反应。**结果** 中滴度和高滴度注射组大鼠脑组织腺病毒转染效率相似,为 60% ~70%,明显高于低滴度注射组($P<0.01$)。在各组脑组织切片中,仅高滴度注射组有明显炎症反应,血管周围可见淋巴和巨噬细胞浸润。**结论** 中等滴度(1.58×10^{10} pfu/ml)的腺病毒能高效、稳定、低毒地转染大鼠缺血脑组织,推荐用于脑缺血基因干预治疗的实验研究。

[关键词] 重组腺病毒,Ad-shRNA-NgR;适宜滴度;转染;生物学标记;药理学;大鼠
[中图法分类号] R394-33;R394.2;R743.31 **[文献标志码]** A

Transfection efficiency of recombinant adenovirus Ad-shRNA-NgR in ischemic brain tissues of rats

Wu Xiaohui, Qin Xinyue, Wang Jing, Zhang Qinli, Li Xin (Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[Abstract] **Objective** To explore a proper titer of RNA interference recombinant adenovirus Ad-shRNA-NgR transfecting ischemic region in rat brains for further study on gene therapy in cerebral ischemia. **Methods** Three different titers (7.90×10^{9}, 1.58×10^{10}, and 3.16×10^{10} pfu/ml) of recombinant adenovirus were respectively injected into the ischemic region of middle cerebral artery occlusion (MCAO)/reperfusion rats ($n=10$) by stereotactic surgery. Green fluorescent protein (GFP) expression in each group was observed to measure transfection efficiency of recombinant adenovirus in postoperative 48 h and 1 week. Inflammation was observed by HE staining. **Results** Transfection efficiencies of recombinant adenovirus in high and medium titer injection group were similar, about 60% to 70%, both significantly higher than low titer group ($P<0.01$). Besides, inflammation as perivascular infiltration of lymphoid and macrophage was only observed in high titer group. **Conclusion** Medium titer (1.58×10^{10} pfu/ml) of recombinant adenovirus can stably, with high efficiency and low toxicity, transfect ischemic brain tissue in rats.

[Key words] recombinant adenovirus; Ad-shRNA-NgR; proper titer; transfection; biomarkers; pharmacological; rats

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30470607). Corresponding author: Qin Xinyue, Tel:86-23-89012478;E-mail:qinxinyue@yahoo.com

以重组腺病毒为载体,将特定基因转移至靶器官/组织或靶细胞内的方法在当前各种基因治疗手段中是最有潜力的[1],其安全性问题一直受到相关领域研究者的密切关注,直接影响其应用前景[2]。重组腺病毒体内转染的毒性主要表现为引起局部炎症反应[3,4],而其注射至局部的量直接影响炎症反应的强弱。本研究旨在探索一个适宜的腺病毒注射滴度,既能有效转染大鼠缺血脑组织,又可尽量避免炎症反应带来的不良后果。

[基金项目] 国家自然科学基金(30470607)
[通信作者] 秦新月,电话:(023)89012478,E-mail:qinxinyue@yahoo.com

1 材料与方法

1.1 试剂及器材

重组腺病毒 Ad-shRNA-NgR 由本课题组张沁丽[5]硕士构建完成。腺病毒纯化试剂盒(Vivapure AdenoPACK 20)为德国赛多利斯公司产品。293 细胞株、大鼠脑立体定位仪(日本成茂公司)等实验所需器材、图像采集和数据分析系统及实验场地等均由重庆医科大学附属第一医院重庆市神经病学重点实验室提供。

1.2 实验动物及分组

成年健康雄性 SD 大鼠 40 只,体质量 250 ~280 g,由重庆医科大学实验动物中心提供。按完全随机方法分为模型对照组、低滴度组、中滴度组和高滴度组,每组 10 只,分别于 48 h 和 1 周取材。实验过程中动物喂养及取材等操作均遵守实验动物

管理和保护的有关规定。

1.3 方法

1.3.1 重组腺病毒的扩增、纯化及滴度测定 在融合达70%～80%的293细胞中加入适量重组腺病毒原液进行扩增，待60%～70%细胞出现明显细胞变圆、肿胀脱落现象（cytopathic effect, CPE）后进行腺病毒收集。最后按赛多利斯腺病毒纯化试剂盒说明书纯化腺病毒，分装保存于－80 ℃，并采用50%组织培养感染剂量（50% tissue culture infective dose, TCID50）法测定其滴度。

1.3.2 大鼠大脑中动脉阻塞（middle cerebral artery occlusion, MCAO）/再灌注（缺血/再灌注）模型制备 参照Longa法，结合其他研究者的经验，采用线栓法制作大鼠右侧缺血/再灌注模型。大鼠清醒后，参照Zea Longa 5分制进行神经功能评分，到达观察时间点后于清醒状态下（2 h）再次评分。排除标准：①评分低于1分。②发现蛛网膜下腔出血。③HE染色示无脑缺血改变。④未到预定时间点死亡。如因上述因素导致动物不足原定数量，则通过随机抽样原则补齐。

1.3.3 立体定向注射 大鼠右侧缺血/再灌注模型成功后立即进行立体定向手术，给予重组腺病毒注射。注射坐标（以前囟为0点）-皮质（前）：向前1.0 mm，右侧旁开2.0 mm，深度1.2 mm；皮质（后）向后3.0 mm，右侧旁开1.5 mm，深度1.2 mm；海马：向后3.5 mm，右侧旁开2.5 mm，深度3.0 mm[6]。高滴度、中滴度、低滴度组大鼠所注射的重组腺病毒滴度分别为3.16×10^{10}、1.58×10^{10}、7.90×10^{9} pfu/ml，对照组则以PBS代替。

1.3.4 实验取材 动物术后48 h及1周，以4%多聚甲醛经心脏灌流固定后断头取脑，每组中4只用于石蜡切片，行HE染色以观察局部炎症反应及组织病理学改变；另6只用作冰冻切片（切片厚度30 μm），在荧光显微镜下直接观察绿色荧光蛋白（GFP）表达，并通过Image Pro Plus 6.0软件测量分析荧光强度。

1.3.5 转染效率计算 在荧光显微镜下，每张切片随机取10个400倍视野，计算GFP阳性细胞数占总细胞数（通过DAPI染核计数）的百分比，即为估算的转染效率。

1.4 统计学处理

数据均以$\bar{x}\pm s$表示，使用SPSS 12.0统计软件进行统计分析，齐性资料组内比较采用t检验，多组间比较采用单因素方差分析，非齐性资料则用秩和检验。

2 结果

2.1 重组腺病毒滴度的测定

扩增得到的重组腺病毒Ad-shRNA-NgR滴度为7.90×10^{9} pfu/ml，经试剂盒纯化后重组腺病毒滴度则为3.16×10^{10} pfu/ml。

2.2 神经功能评分

大鼠脑缺血2 h后均出现神经功能缺损症状，缺血/再灌注48 h症状略有加重趋势，而1周后各组大鼠缺血症状均较前有所减轻，但仅中滴度和高滴度注射组的差别有统计学意义（$P<0.05$）。见表1。

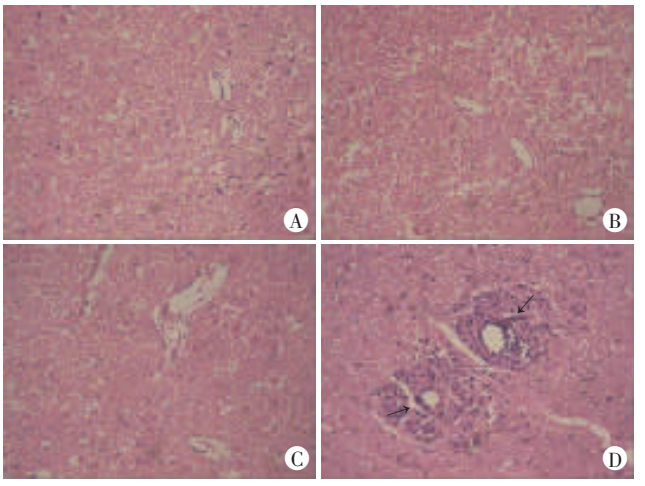
2.3 HE染色

光镜下可见健侧脑皮质和海马结构完整，细胞排列有序，胞膜完整，细胞质染色均匀，胞核清晰可见，核仁明显，间质无异常；各组术后48 h均可观察到右侧大脑中动脉供血区明显缺血灶，缺血核心区神经元变性、坏死，镜下见细胞质稀疏松散，核固缩，核仁消失，间质水肿。转染后第7天，高滴度组大鼠脑组织注射区域内出现明显炎症反应，光镜下见淋巴及巨噬细胞浸润，呈“袖套样”改变；其余各组大鼠脑组织切片注射区域内，均未发现明显炎症反应迹象。见图1。

表1 局灶性脑缺血/再灌注后大鼠神经功能评分（$n=10, \bar{x}\pm s$）

组别	2 h	48 h	1周
对照组	1.60±0.70	2.00±0.71	1.40±0.55
低滴度注射组	1.40±0.52	1.60±0.55	1.20±0.84
中滴度注射组	1.60±0.52	1.60±0.55	0.80±0.45[a]
高滴度注射组	1.50±0.53	1.60±0.89	0.60±0.89[a]

a：$P<0.05$，与同滴度注射组2 h评分比较

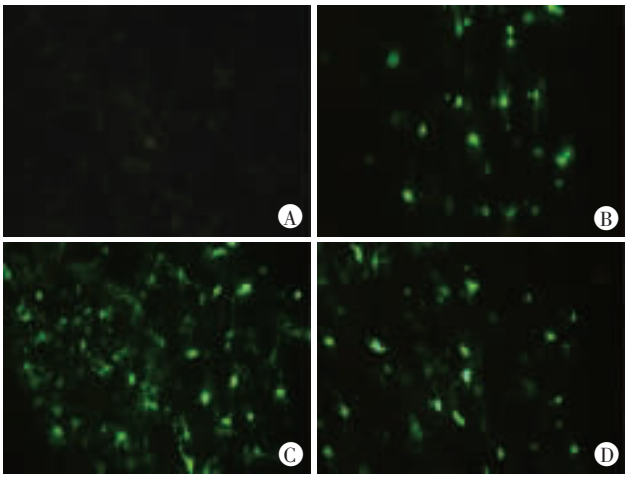


A：对照组；B：低滴度注射组；C：中滴度注射组；D：高滴度注射组
↑：血管周围淋巴细胞及巨噬细胞浸润

图1 各滴度组腺病毒转染后1周缺血区皮质病理学观察（HE ×200）

2.4 绿色荧光蛋白在脑组织中的表达

不同滴度的重组腺病毒感染缺血区脑组织48 h后，皆可在针道周围观察到少量GFP表达，而在模型对照组脑切片中则未见GFP表达。1周后，低、中、高滴度注射组的GFP荧光强度[分别为（7.64±1.29）、（14.71±2.31）、（15.15±1.83）]都较48 h增高[分别为（2.84±1.04）、（4.02±1.06）、（4.25±1.32），$P<0.05$]，其中高滴度注射组和中滴度注射组GFP表达均显著高于低滴度组（$P<0.01$），而该两组之间并无统计学差异（$P>0.05$）。见图2。



绿色荧光为腺病毒转染的细胞 A：对照组；B：低滴度注射组；C：中滴度注射组；D：高滴度注射组

图2 各滴度组腺病毒转染后1周缺血脑组织GFP表达（荧光显微镜 ×200）

腺病毒注射48 h后,各腺病毒注射组脑切片仅可见较少量GFP表达,1周后测得低滴度组腺病毒转染效率为(34.79±6.54)%,明显低于另外2个滴度注射组($P<0.01$),而中滴度和高滴度注射组的转染效率之间差异无统计学意义[(64.55±10.22)% *vs* (66.52±10.94)%,$P>0.05$]。

3 讨论

基因治疗手段的实施离不开有效且稳定可靠的转移系统,其关键是选择高效的基因转移载体[7,8]。重组腺病毒载体近年来发展较快,是目前基因治疗较为热门的基因转移系统之一[9]。它具有不整合到宿主基因组、表达时间短、相对安全稳定等优点,特别适用于脑血管疾病基因治疗的相关研究。

与中枢神经损伤后轴突的破坏及再生有关的蛋白和分子是近年来神经科学领域的研究热点。Nogo-66受体(NgR)是髓鞘相关糖蛋白(MAG)、Nogo-A和少突胶质细胞/髓鞘糖蛋白(OMgp)这3个重要轴突再生抑制蛋白的共同受体[10]。研究表明,通过特异性抗体等阻断NgR表达可显著改善脊髓外伤及缺血性脑损伤后轴突再生,使大鼠运动功能得到一定程度的恢复[11,12]。然而,这些拮抗剂特异性不足,治疗效果很大程度上受传递途径的影响,并且难以维持稳定的作用浓度而需要长时间反复给药,应用上有很大局限性。我们计划用NgR特异性RNAi重组腺病毒Ad-shRNA-NgR,对脑缺血损伤后大鼠中枢神经系统NgR信号转导调控及其与轴突损伤及修复的关系相关机制进行探讨。因此,选择一个适宜的注射滴度/剂量最大限度发挥载体的基因转移功能并尽可能限制其副反应,作为在体实验的前期工作显得尤其重要。

本研究使用的重组腺病毒载体骨架带有独立、完整的GFP表达系统,可直接进行观察,便于计算及分析其转染效率。我们通过批量化逐级放大方法扩增得到了大量病毒原液[13],再使用赛多利斯腺病毒纯化试剂盒进行纯化,减少杂质对后续实验的影响,并保障了高病毒活性和感染率。

腺病毒载体在脑组织均可高效表达[14],但期限较短,一般不超过3周,外源基因表达于转染后7 d达高峰,2周后基本停止[15]。腺病毒注射后,1周正值其表达高峰期,可真实反映其转染能力,用于检测不同滴度/剂量腺病毒对缺血区脑组织的转染效率及组织病理学改变。

在本实验中,给予低滴度腺病毒注射时仅少量细胞表达GFP;随着滴度增高,GFP表达量亦显著增多;而在高滴度注射组中,GFP表达量并没有呈线性升高,反而由于腺病毒载体与基因产物具有免疫原性,致使大鼠脑组织出现了不同程度的炎性细胞浸润。这提示在一定范围内,外源基因表达效率与腺病毒载体量呈正相关,但过高滴度/剂量非但不能提高转染效率,反而会引发机体免疫反应。因此,需将在体使用的病毒载体限制在一定滴度范围内,避免机体产生过强免疫反应而影响干预效果。

参考文献:

[1] Cotter M J, Muruve D A. The induction of inflammation by adenovirus vectors used for gene therapy [J]. Front Biosci, 2005, 10: 1098-1105.

[2] Zhu J, Huang X, Yang Y. Innate immune response to adenoviral vectors is mediated by both Toll-like receptor-dependent and -independent pathways[J]. J Virol, 2007, 81(7): 3170-3180.

[3] Lowenstein P R, Mandel R J, Xiong W D, *et al*. Immune responses to adenovirus and adeno-associated vectors used for gene therapy of brain diseases: the role of immunological synapses in understanding the cell biology of neuroimmune interactions[J]. Curr Gene Ther, 2007, 7(5): 347-360.

[4] Candolfi M, Kroege K M, Pluha G E, *et al*. Adenoviral-mediated gene transfer into the canine brain *in vivo* [J]. Neurosurgery, 2007, 60(1): 167-178.

[5] 张沁丽, 秦新月, 殷成, 等. 编码大鼠Nogo受体mRNA的shRNA重组腺病毒载体的构建和鉴定[J]. 第四军医大学学报, 2008, 29(1): 55-58.

[6] Zhao L R, Duan W M, Reyes M, *et al*. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats [J]. Exp Neurol, 2002, 174(1): 11-20.

[7] El-Aneed A. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy [J]. J Control Release, 2004, 94(1): 1-14.

[8] Mhashilkar A, Chada S, Roth J A, *et al*. Gene therapy: Therapeutic approaches and implications [J]. Biotechnol Adv, 2001, 19(4): 279-297.

[9] Sharma S, Tozer J R. Development of adenovirus vectors for gene therapy [J]. Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews, 2005, 1(1): 19-26.

[10] Fournier A E, GrandPre T, Strittmatter S M. Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration[J]. Nature, 2001, 409(6818): 341-346.

[11] Lee J K, Kim J E, Sivula M, *et al*. Nogo receptor antagonism promotes stroke recovery by enhancing axonal plasticity[J]. J Neurosci, 2004, 24(27): 6209-6217.

[12] Li S, Liu BP, Budel S, *et al*. Blockade of Nogo-66, myelin-associated glycoprotein, and oligodendrocyte myelin glycoprotein by soluble Nogo-66 receptor promotes axonal sprouting and recovery after spinal injury[J]. J Neurosci, 2004, 24(46): 10511-10520.

[13] Oualikene W, Lamoureux L, Weber J M, *et al*. Protease-deleted adenovirus vectors and complementing cell lines: potential applications of single-round replication mutants for vaccination and gene therapy[J]. Hum Gene Ther, 2000, 11(9): 1341-1353.

[14] Ooboshi H, Ibayashi S, Takada J, *et al*. Adenovirus-mediated gene transfer to ischemic brain: ischemic flow threshold for transgene expression [J]. Stroke, 2001, 32(4): 1043-1047.

[15] Abe K, Setoguchi Y, Hayashi T, *et al*. *In vivo* adenovirus-mediated gene transfer and the expression in ischemic and reperfused rat brain [J]. Brain Res, 1997, 763(2): 191-201.

(**收稿**:2009-10-08;**修回**:2009-11-22)

(编辑 吴培红)