维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)03-0330-04

新型腺病毒载体的制备及其特性研究

邱 峰[1],陈世知[2],陈 虹[1]

(1. 重庆医科大学附属第一医院临床药理研究室,重庆 400016;2. 重庆医科大学附属第二医院核医学科,重庆 400010)

【摘 要】目的:本研究在普通腺病毒载体(Adv)纤毛头节区插入了具有整合素特异性的 RGD 肽,制备了一种新型 RGD-Adv,以克服 Adv 基因转导的柯萨奇腺病毒受体依赖性。方法:用体外连接法构建 RGD-Adv,并考察其基因转效率、稳定性及体外、体内毒性。结果:RGD-Adv 可有效地实现向受试细胞转导基因,其转导能力随病毒量的增加而加强。结论:具有 a_v 亲和性的 RGD-Adv 是一种安全高效的新型腺病毒载体,将在基因治疗及实验研究中发挥重要作用。

【关键词】腺病毒载体;RGD 肽;整合素

【中图分类号】Q 78 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-10-16

Generation and characterization of fibre modified adenovirus vectors

QIU Feng, et al

(*Department of Clinical Pharmacology Lab, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstact】*Objective*: In the present study, We developed and assess an integrin-targeted fiber-mutant Ad vector containing the Arg-Gly-Asp (RGD) peptide motif on the fiber knob for the transfection of melanoma cell lines. *Methods*: We constructed RGD-Adv by in vitro ligation method, and investigated the efficiency of gene transdution in melanoma cells, studied its stability, in vitro,and in vivo toxicology. *Results*: For in vivo and in vitro,gene transfer the RGD-Adv more efficient than the vector containing wild type fiber via an CAR independent cell entry pathway. *Conclusion*: These results revealed that gene delivery by RGD-Adv was more efficient than that by conventional Adv and suggest that a_v-integrin-targeted Adv will be of great utility for gene therapy and gene transfer experiments.

【Key word】Adenovirus vector; RGD peptid; Integrin;

安全高效的基因转导对基因治疗研究和临床应用具有重要意义。腺病毒载体(Adenovirus vector, Adv)是目前广泛使用的一种较为理想的病毒性基因载体,Adv 具有可携带较大外源基因、可高效转染多种类型的分裂期和非分裂期细胞等优点[1-3]。

Adv 主要是通过其纤毛与细胞表面的柯萨奇腺病毒受体(CAR)结合,实现对细胞的感染。但是,黑色素瘤细胞、树突状细胞 (DCS)、平滑肌细胞等 CAR 弱表达或不表达 CAR 的细胞对 Adv 感染表现出抵抗性,这阻碍了 Adv 在实验研究和一些难治性疾病治疗中的应用[4,5]。

RGD 肽(Arg-Gly-Asp peptid)是存在于细胞外基质成分纤维连接蛋白(Fn)的细胞粘附域内的细胞粘附最小活性单位, 对细胞表面的 α_v 整合素具有高亲和性,可诱导细胞内吞作用,在 DCs 上也有 α_v 整合素表达。在本实验中,通过将 RGD 肽导入 Ad 纤毛头节区,制备具有整合素靶向性的纤毛突变型 Adv(RGD-Adv),使其通过直接与细胞表面 α_v 整合素结合,实现对 Adv 抵抗性细胞的感染。

1 材料与方法

1.1 细胞与动物

B16BL6、A2058、A549、HEK293 细胞由大阪大学药学部提供,培养于 100 ml/L FCS (Featal calf serum)-DMEM 培养基。

含普通 Adv(WT-Adv)或 RGD-Adv 编码基因的载体质粒 pAdHM15、pAdHM15-RGD,以及含荧光素酶(Luc)基因的穿梭质粒 pHMCMV6-Luc 由日本国立医药品食品卫生研究所提供;重组有 Luc 基因的 WT-Adv(WT-Adv-Luc)由大阪大学药学部提供。C57BL/6 小鼠,雌性,4 周龄,购自 CLEA Japan, Inc.(Japan)。

1.2 试药与仪器

作者介绍:邱 峰(1969-),男,讲师,博士,主要研究方向:肿瘤基因免疫治疗。

维普资讯 http://www.cqvip.com

DMEM 培养基购自 Sigma-Aldrich, Inc.（USA），Luc 检测试剂盒（Luciferase Assay System）购自 Promega Co.（Japan），肝功能检测试剂盒 GP-Transaminase Kit 购自 Sigma Diagnostics Co.（USA）；氯仿、异丙醇、无水乙醇均为分析纯试剂（Wako Pure Chemical Industries,Ltd.,Japan），Lipofectin 试剂（Cation- liposome reagent）购自 Invitrogen Co.（USA），透析膜（Spectra/Por Membrane，MWCO:50000）购自 Spectrum laboratories Inc.（USA）。

BECKMAN LE-80K 型低温超速离心机（Beckman Coult, USA），Microlumat Plus LB96 荧光光度计（Perkin Elmer Co., USA）。

1.3 腺病毒载体制备

使用含 RGD-Adv 编码基因的载体质粒与含目的基因的穿梭质粒，通过 Mizuguchi 体外连接法[6,7]制备 RGD-Adv。其主要过程如下：

载体质粒 pAdHM15、pAdHM15-RGD 表达框的 E1 缺失区有 I-Ceu I、Swa I、PI-Sce I 限制性酶切位点，E3 缺失区有 Csp45 I 和 Cla I 限制性酶切位点；pHMCMV6 表达框含有 PI-Sce I 和 I-Ceu I 限制性酶切位点。

以 Luc 基因为目的基因，用 I-Ceu I 和 PI-Sce I 切割穿梭质粒，获得目的基因片断，分别将其插入 pAdHM15 或 pAdHM15-RGD 的 I-Ceu I 和 PI-Sce I 位点之间，得到含目的基因的重组质粒，用 PacI 将重组质粒线性化，通过转染 HEK 293 细胞制备获得重组有目的基因的 WT-Ad-Luc、RGD-Ad-Luc。两种 Adv 均以 HEK 293 细胞进行扩增，以 CsCl 密度梯度离心法、透析法分离纯化，-80℃保存备用。

1.4 RGD-Adv 介导的基因转导

将 B16BL6、A2058、A549 细胞（2×10^4 cells/ml）分别按 100 μl/孔播种于 96 孔板，培养 12 h 后，分别加入 50 μl 6、12、25、50、100、200、400 PFU/cell 的 WT-Adv-Luc 或 RGD-Adv-Luc 溶液转染 4 h，用 Luc 检测试剂盒测定受试细胞中的 Luc 活性，以相对光强度单位（Relative light unit，RLU）表示。

1.5 RGD-Adv 细胞毒性试验

采用 MTT 法评价 RGD-Adv 的细胞毒性。B16BL6、A2058 细胞（2×10^4 cells/ml）分别按 100 μl/孔播种于 96 孔板，培养 12 h 后，分别按 50 μl/孔加入 WT-Adv-Luc、RGD-Adv-Luc 溶液，使浓度分别为 200、400、800、1600、3200 PFU/cell，培养 48 h，加入 MTT 溶液（10 μl/孔）进行 MTT 试验，按下式计算细胞抑制率：

$$\text{抑制率}=\frac{\text{对照组吸光度}-\text{实验组吸光度}}{\text{对照组吸光度}}\times100\%$$

1.6 RGD-Adv 稳定性实验

将 WT-Adv-Luc、RGD-Adv-Luc 用含 10% 甘油的缓冲液混悬后，按 2500 mol/ml 分装，分别于 25℃、4℃、-20℃放置 1、2、5、10、20、40 天；将 A549（2×10^4 cells/ml）按 100 μl/孔播种于 96 孔板培养 12 h 后，加入 10 μl 上述各 Adv 溶液，于 37℃、5% CO_2 培养 48 h，检测并计算 Adv 残留活性以评价其稳定性：

$$\text{残留活性}=\frac{\text{试验组 Adv 活性(RLU)}}{\text{-80℃保存的 Adv 活性(RLU)}}\times100\%$$

1.7 RGD-Adv 的体内分布及毒性

1.7.1 B16BL6 肿瘤荷瘤小鼠模型制作　于 C57BL/6 小鼠腹部皮下注射 B16BL6 细胞混悬液（2×10^6 cells/ml）100 μl，肿瘤生长至直径约 5 mm 时，即可供实验使用。

1.7.2 RGD-Adv 的体内分布　于荷瘤小鼠尾静脉注射 200 μl Adv（4×10^8 PFU/mL），2 天后取肿瘤、肝脏、肾脏、脾脏、心脏、肺、脑等组织，匀浆，离心（10 kr/min、10 min），取上清液测定 Luc 活性（以 RLU/mg 组织表示）。

1.7.3 RGD-Adv 的体内毒性试验　于荷瘤小鼠（5 只/组）尾静脉注射 200 μl Adv（4×10^8、2×10^8 PFU/ml），对照组注射 200 μl PBS，于注射后第 2 天和第 5 天，取静脉血，用 GP-Transaminase Kit 检测 GPT、GOT；于注射后第 5 天取肝、肾脏，病理组织切片，对肝脏 HE 染色，肾脏 HE 染色和 PAS 染色。

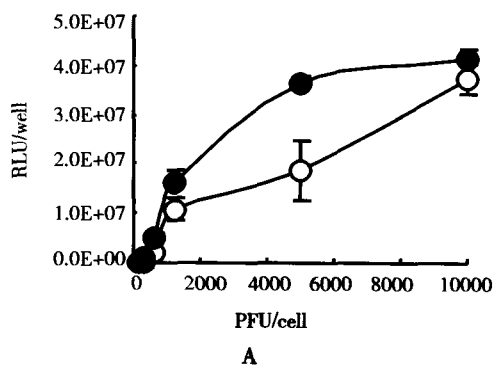
2 结　果

2.1 RGD-Adv 制备

用体外连接法制备了在 Adv 纤毛头节区导入 RGD 序列，具有整合素靶向性的 RGD-Adv，使其能够感染 CAR 低表达或 CAR(-)的细胞。

2.2 RGD-Adv 基因转导效率

以 CAR (+) 的 A549 细胞为对照，分别用 RGD-Adv-Luc 和 WT-Adv-Luc 转染 CAR 弱表达的 B16BL6、A2058 细胞，结果显示，RGD-Adv 组的基因表达量均显著增加（图 1）。在 A549 细胞，RGD-Adv 组的 Luc 表达量约为 WT-Adv 组的 2 倍（图 1a），在 B16BL6、A2058 细胞，RGD-Adv 组的 Luc 表达量约为 WT-Adv 组的 15 倍（图 1b，图 1c）。



A

维普资讯 http://www.cqvip.com

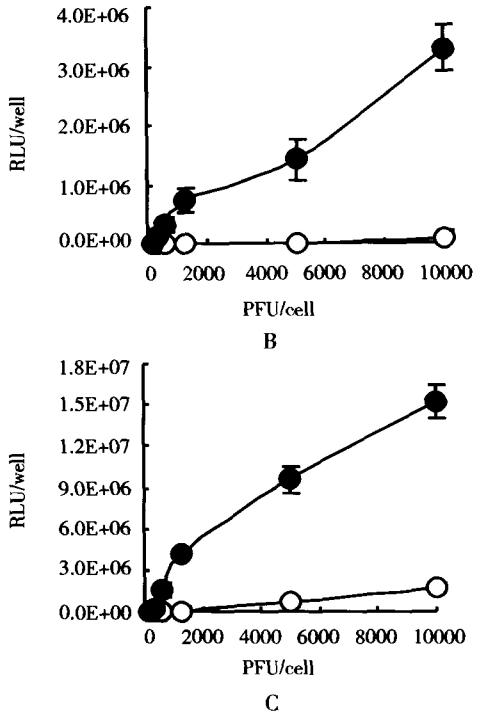


图 1　黑色素瘤细胞经 WT-Adv-Luc 和 RGD-Adv-Luc 转导后的 Luc 表达情况

2.3　RGD-Adv 的细胞毒性

实验表明，以 800 PFU/cell 的高滴度感染细胞时，WT-Adv、RGD-Adv 均未表现出明显细胞毒性（图 2），但 RGD-Adv 基因转导效率却显著优于 WT-Adv。所以，RGD-Adv 是一种安全高效的优良基因载体。

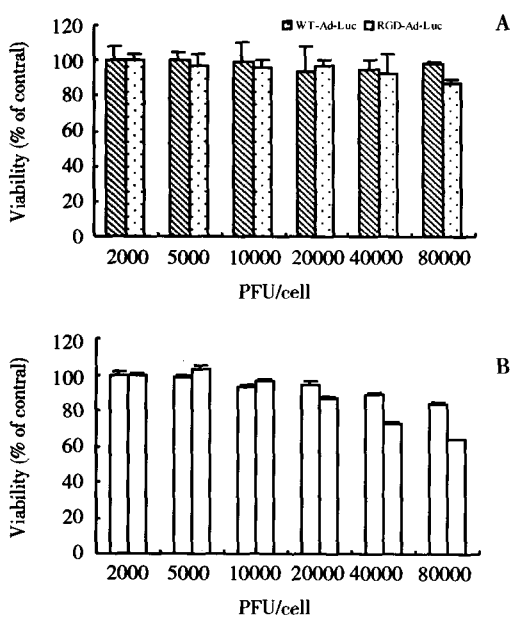


图 2　WT-Adv-Luc 与 RGD-Adv-Luc 的细胞毒性实验结果性

a. A2058 cells, b. B16BL6 cells.

2.4　RGD-Adv 稳定性

结果表明，各 Adv 于 -20℃保存约 10 天、4℃保存 2 天，其活性下降约 50%，于 25℃保存 1 天，活性下降约 40%（图 3）。所以，于 -20℃、4℃、25℃保存 1 ~ 40 天后，RGD-Adv 的稳定性与 WT-Adv 基本相同。

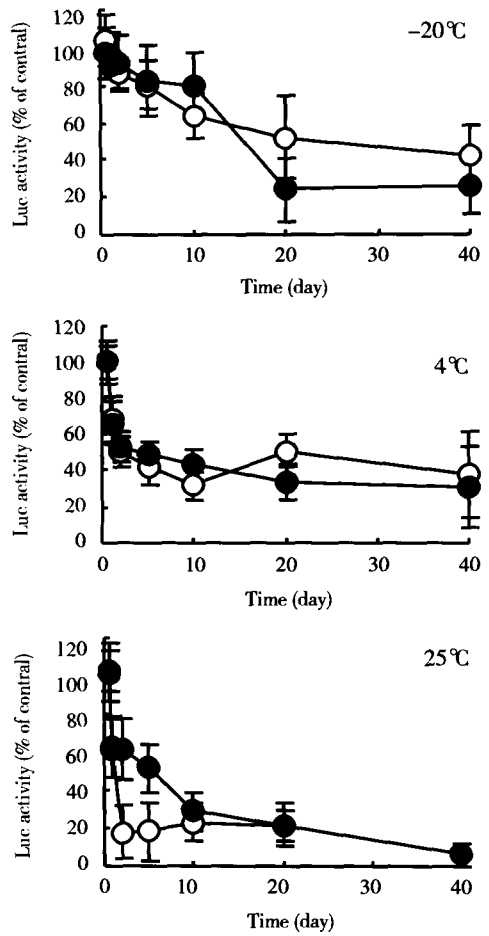


图 3　Adv 稳定性

2.5　RGD-Adv 的体内分布及毒性

经小鼠尾静脉注射 RGD-Adv 后，RGD-Adv 介导的基因表达主要在肝脏，这与文献报道 WT-Adv 介导的基因表达 95%以上在肝脏相似 [8,9]。但是，RGD-Adv 组在肝脏、肾脏、肺、脑、肿瘤等组织的基因表达均高于 WT-Adv 组（图 4），对肝、肾脏的病理组织学检查及肝功能检查未见异常（表 1）。所以，RGD-Adv 是一种安全、高效的优良基因载体。

3　讨　论

本实验制备在纤毛中含有 RGD 肽的 α_v 整合

维普资讯 http://www.cqvip.com

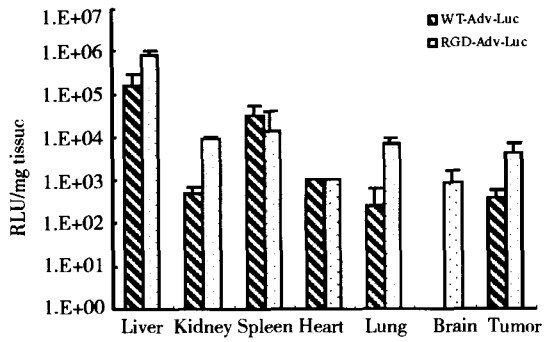


图 4　静脉注射不同 Adv 后的 Luc 活性

表 1　WT-Adv 与 RGD-Adv 的肝脏毒性比较

	Groups		
	WT-Adv	RGD-Adv	Control
GPT	42.4 ± 21.8	31.8 ± 21.2	52.0 ± 10.2
GOT	362.6 ± 142.8	412.9 ± 307.2	256.8 ± 232.7

素靶向性腺病毒载体 RGD-Adv，可通过细胞表面整合素介导实现对具有 Adv 抵抗细胞的基因转导。

整合素是一类细胞表面分子家族，是由 α 和 β 两个糖蛋白亚单位形成的二聚体跨膜糖蛋白受体，对细胞－基质、细胞－细胞间相互作用具有关键意义。RGD 肽为一个三肽结构，对 $\alpha_v\beta_3$ 和 $\alpha_v\beta_5$ 整合素具有高亲和性，通过与其结合，诱导细胞内吞作用[10-12]，而在黑色素瘤细胞、树突状细胞等 CAR 阴性细胞中都有 $\alpha_v\beta_3$ 和/或 $\alpha_v\beta_5$ 整合素表达[13]，因此，制备整合素亲和性的 Adv 对克服普通 Adv 的不足，发挥其优点，进一步增加适用性具有重要意义。

本实验采用 Mizhuguchi 体外连接法[6,7]将携带 RGD-Adv 基因组的载体质粒与携带目的基因的穿梭质粒进行体外重组，制备了重组目的基因的 RGD-Adv。由于体外连接法不需对切割载体质粒和穿梭质粒所得的目的基因片断进行电泳回收，也不需对病毒基因组进行细胞内同源重组，不会产生野生型腺病毒。所以，克服了细胞内重组法构建 Adv 存在的操作烦杂、效率低等缺点。

研究表明，RGD-Adv 在稳定性、体内、外毒性等方面与 WT-Adv 基本相同，但其基因转导效率却显著优于 WT-Adv，且呈病毒剂量依赖性。所以，RGD-Adv 是一种安全高效的基因载体，大大扩展了 Adv 的应用范围。

参 考 文 献

[1] Baum BJ, Goldsmith CM, Kok MR, et al. Advances in vector-mediated gene transfer [J]. Immunol Lett, 2003;90(2-3):145-149.

[2] Cao H, Koehler DR, Hu J. Adenoviral vectors for gene replacement therapy [J]. Viral Immunol, 2004;17(3):327-333.

[3] St George JA. Gene therapy progress and prospects: adenoviral vectors [J]. Gene Ther, 2003;10(14):1135-1141.

[4] Green NK,Seymour LW. Adenoviral vectors: systemic delivery and tumor targeting [J]. Cancer Gene Ther, 2002;9(12):1036-1042.

[5] Barnett BG, Crews CJ, Douglas JT. Targeted adenoviral vectors [J]. Biochim Biophys Acta, 2002;1575(1-3):1-14.

[6] Mizuguchi H, Kay MA, Hayakawa T. In vitro ligation-based cloning of foreign DNAs into the E3 and E1 deletion regions for generation of recombinant adenovirus vectors [J]. Biotechniques, 2001;30(5):1112-1114, 1116.

[7] Mizuguchi H, Kay MA, Hayakawa T. Approaches for generating recombinant adenovirus vectors [J].Adv Drug Deliv Rev, 2001; 52(3):165-176.

[8] Worgall S, Wolff G, Falck-Pedersen E, et al. Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following in vivo administration [J]. Hum Gene Ther, 1997;8(1):37-44.

[9] Alemany R, Suzuki K, Curiel DT. Blood clearance rates of adenovirus type 5 in mice [J]. J Gen Virol, 2000;81(Pt 11):2605-2609.

[10] Calderwood DA. Integrin activation [J]. J Cell Sci, 2004;117 (Pt 5):657-666.

[11] Schuppan D, Ocker M. Integrin-mediated control of cell growth [J]. Hepatology, 2003;38(2):289-291.

[12] Kumar CC. Integrin avb3 as a therapeutic target for blocking tumor-induced angiogenesis [J]. Curr Drug Targets, 2003;4(2): 123-131.

[13] Uduehi A, Mailhos C, Truman H, et al. Enhancement of integrin-mediated transfection of haematopoietic cells with a synthetic vector system [J]. Biotechnol Appl Biochem, 2003;38: 201-209.