

人单纯疱疹病毒 1 型 VP22 介导的 microdystrophin 重组腺病毒的构建及其蛋白转导特性

熊 符^{1,2}, 张 成², 郑 卉², 肖少波³, 潘永飞³, 许勇峰², 刘正山², 李 勇²

¹南方医科大学医学遗传学教研室, 广州 510515

²中山大学 附属第一医院神经内科, 广州 510080

³华中农业大学农业微生物国家重点实验室, 武汉 430070

通信作者: 张 成 电话: 020-87755766-8290, 传真: 020-87330736, 电子邮件: zhangch6@mail.sysu.edu.cn

摘要: **目的** 构建含有人单纯疱疹病毒 1 型 (HSV-1) VP22 与人 microdystrophin 基因融合的重组腺病毒, 体外感染成肌细胞 C2C12, 探讨 VP22 对 microdystrophin 基因在成肌细胞中的蛋白转导特性。**方法** 设计引物, 从质粒 pSIN-rep5-VP22 中扩增 VP22 全长基因, 然后将 VP22 基因定向插入腺病毒穿梭质粒 pShuttle-CMV, 获得重组质粒 pCMV-VP22; 再用 Not I 酶切含 microdystrophin 基因的 pBSK-micro 质粒, 获得 microdystrophin 基因, 片段回收后定向插入重组质粒 pCMV-VP22, 获得重组质粒 pCMV-VP22-MICDYS。PmeI 线性化重组质粒 pCMV-VP22-MICDYS, 去磷酸化后回收与腺病毒骨架质粒 pAdeasy-1 共电转化 BJ5183 感受态细胞。同源重组后用选择性培养基筛选阳性克隆, 提取质粒, 脂质体介导转染 293 细胞, 通过观察 293 细胞病变及 PCR 扩增目的基因等方法鉴定重组腺病毒。将含 VP22-microdystrophin 及 microdystrophin 的病毒上清分别转染成肌细胞 C2C12, 通过 RT-PCR、Western-blot 和免疫组织化学方法检测 microdystrophin 的 mRNA 及蛋白表达。**结果** 成功构建了含有 VP22-microdystrophin 基因的重组腺病毒, 体外感染成肌细胞 C2C12, Western-blot 及免疫组织化学检测显示 VP22 显著提高了 microdystrophin 蛋白在 C2C12 细胞中的表达。**结论** 含有 VP22-microdystrophin 基因的重组腺病毒载体的构建及 VP22 介导 microdystrophin 在成肌细胞 C2C12 间的转导, 为利用此病毒进行假肥大型肌营养不良症疾病的治疗研究奠定了基础。

关键词: VP22; microdystrophin; 腺病毒; 假肥大型肌营养不良症

中图分类号: R730.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-503X(2008)04-0498-08

DOI:10.3881/j.issn.1000-503X.2008.04.027

Construction of Herpes Simplex Virus-1 Virion Protein 22-mediated Microdystrophin Gene Recombinant Adenovirus and Study on the Property of Protein Transduction

XIONG Fu^{1,2}, ZHANG Cheng², ZHENG Hui², XIAO Shao-bo³, PAN Yong-fei³,
XU Yong-feng², LIU Zheng-shan², LI Yong²

¹ Department of Medical Genetics, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

² Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

³ Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Corresponding author: ZHANG Cheng Tel: 020-87755766-8290, Fax: 020-87330736, E-mail: zhangch6@mail.sysu.edu.cn

ABSTRACT: Objective To construct the recombinant adenovirus containing herpes simplex virus-1 virion

protein (VP) 22 and human microdystrophin gene, then the adenovirus was transfected into C2C12 myoblast and studied on the property of protein transduction with VP22-mediated microdystrophin in C2C12 myoblast.

Methods The full-length VP22 cDNA was obtained from recombinant plasmid pSINrep5-VP22 with PCR, and the product was directionally inserted into pShuttle-CMV to acquire the plasmid pCMV-VP22. Microdystrophin cDNA was obtained from recombinant plasmid pBSK-micro digested with restrictive endonuclease NotI, and the product was directionally inserted into pCMV-VP22 to acquire the plasmid pCMV-VP22-MICDYS. The plasmid of pCMV-VP22-MICDYS was lined with Pme I, and the fragment containing VP22-microdystrophin was reclaimed and transfected into E1 coli BJ5183 with plasmid pAdeasy-1. After having been screened by selected media, the extracted plasmid of positive bacteria was transfected into HEK293 cells with liposome and was identified by observing the cytopathic effect of cells and by PCR method to acquire the recombinant adenovirus Ad-VP22-MICDYS. Finally, the C2C12 myoblast were transfected with the recombinant adenovirus Ad-VP22-MICDYS and Ad-MICDYS, and the expression of microdystrophin was detected by RT-PCR, Western blot and immunocytochemistry.

Results The recombinant adenovirus including VP22 and microdystrophin gene was successfully constructed. VP22 transferred VP22-microdystrophin fused protein from infected C2C12 myoblast into uninfected cells and enhance the expression of microdystrophin in myoblast.

Conclusions Recombinant adenovirus containing VP22 and microdystrophin gene was constructed successfully. VP22 can enhance the expression with microdystrophin in myoblast. It lays the foundation for further studying on VP22-mediated recombinant including microdystrophin gene to cure Duchenne muscular dystrophy.

Key words: virion protein 22; microdystrophin; adenovirus; Duchenne muscular dystrophy

Acta Acad Med Sin, 2008,30(4):498-505

Duchenne 型肌营养不良症 (Duchenne muscular dystrophy, DMD) 是一种 X 连锁隐性遗传病^[1], 此病目前尚无有效的治疗方法, 基因治疗被认为是治疗该病最有希望的途径。但基因治疗存在表达效率低下、治疗部位局限等问题, 限制了累及全身所有骨骼肌包括膈肌和心肌在内的 DMD 的治疗, 因此提高治疗基因在体内的表达效率以及选择合适的载体是治疗 DMD 的关键。蛋白转导是近年生命科学领域发现的一种十分独特的现象, 具有蛋白转导功能的蛋白能将与之融合的目的蛋白以一种目前尚不清楚的非典型途径自主穿过细胞膜, 在细胞间自由传递, 并保持目的蛋白的生物活性与功能^[2]。蛋白转导相关蛋白的这种独特、高效的跨膜转运功能和在细胞间自主传递的特点, 为人类基因治疗和新型疫苗研究带来了新的曙光^[3]。目前已发现来源于果蝇的控制触角的基因、人类免疫缺陷病毒的转录反式作用因子、人单纯疱疹病毒 1 型 (herpes simplex virus-1, HSV-1)、牛疱疹病毒 I 型、马力克氏病毒 I 型和伪狂犬病病毒的 virion protein 22 (VP22) 均具有蛋白转导的特性。本研究利用 HSV-1 VP22 基因的蛋白转导特性, 构建含有 HSV-1 VP22 和 microdystrophin 基因的重组腺病毒, 然后在成肌细胞 C2C12 细胞检测

重组腺病毒的表达, 探讨 VP22 介导的重组腺病毒的蛋白转导特性, 为进一步利用 VP22 介导的 microdystrophin 重组腺病毒对 DMD 模型鼠 mdx 鼠做体内的治疗研究奠定基础。

材料和方法

材料 腺病毒载体和菌株: pShuttle-CMV、pAdeasy-1 载体、BJ5183、XL-10 Gold 细胞和 293 高传代细胞由华中农业大学农业微生物国家重点实验室保存提供; 293 低传代细胞由中山大学肿瘤医院黄文林教授惠赠; DH5 α 菌株由本室保存; 含增强绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 的腺病毒 (adenovirus-EGFP, Ad-EGFP) 由中山大学肿瘤医院黄文林教授惠赠; 含人 microdystrophin 基因的重组腺病毒 (adenovirus-microdystrophin, Ad-MICDYS) 由本室构建^[4]。含人 microdystrophin 基因的 pBSK-micro 质粒 (含全长 dystrophin 基因的 N 端区, 3 个杆状重复区 R1、R2、R24, 3 个铰链区 H1、H2、H4 的一段长 3.7 kb 的微小基因) 由美国 Washington 大学医学院神经内科 J. S. Chamberlain 教授克隆构建、惠赠; 含 HSV-1 VP22 全长序列的重组质粒

pSINrep5-VP22 由美国 Johns Hopkins 医学院 T. C. Wu 教授惠赠。限制性内切酶 Not I、Hind III 及 Taq 酶、T4 DNA 连接酶、去磷酸化酶购自宝生生物公司；PmeI、PacI 购自 New England 生物技术有限公司；脂质体转染试剂盒 (Lipofectamine 2000) 购自 Invitrogen 公司；Trizol 试剂盒购自美国 Fermentas 公司；胎牛血清、DMEM 及 R/MINI-1640 培养基购自 GIBCO 公司；小鼠抗 Dystrophin 单克隆抗体 (氨基端) 及山羊抗小鼠 -CY3 IgG 二抗均购自 CHEMICON 公司。

VP22 基因的 PCR 扩增及克隆、鉴定 以质粒 pSINrep5-VP22 为模板, 进行 VP22 的扩增。上游引物: 5' TTTGGATCCACCATGACCTCTCGCCGCTCC 3'; 下游引物: 5' TTTGCGGCCGC (GCTTCCTCTCCTCC)₂GATCCACCCCTCGACGGCCGTC 3'。反应条件为 95℃ 变性 1 min, 52℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1.5 min, 35 个循环后 72℃ 延伸 10 min, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 紫外灯下观察结果, 鉴定 PCR 产物。然后将电泳分析的 PCR 产物克隆到 pMD18 - T 载体中, 酶切及测序鉴定得到 TVP22。

重组穿梭转移质粒的构建 用 BamH I 和 Not I 双酶切鉴定正确的质粒 TVP22, 回收 0.94 kb 左右的目的片段, 克隆到 pShuttle-CMV 相应位点, 获得鉴定正确的质粒, 命名为 pCMV-VP22。同时 Not I 单酶切 pBSK-micro 质粒, 回收 3.75 kb 的 microdystrophin 基因片段, 然后克隆到 pCMV-VP22 相应 Not I 位点, 获得鉴定正确的质粒, 命名为 pCMV-VP22-MICDYS。

BJ5183 细菌内同源重组产生重组腺病毒质粒 用 Pme I 线性化重组穿梭质粒 pCMV-VP22 -MICDYS, 去磷酸化后回收, 取 1.0 μg 与腺病毒骨架质粒 pAdeasy-1 (0.1 μg) 共电转化 BJ5183 感受态细胞, 电转条件为 2.5 kV、200Ω、25 μF。转化子涂布于 Kan 抗性平板, 碱裂解法提取并纯化质粒, Pac I 酶切鉴定; 同时进行 PCR 扩增及测序鉴定。PCR 扩增上游引物: 5' GCTGGGTCCGACAATC3'; 下游引物: 5' ATGGCTTCAATGCTCACT3', 反应条件: 95℃ 变性 1 min, 50℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1.5 min, 35 次循环, 扩增长度为 319 bp, 将鉴定正确的重组质粒命名为 pAde-VP22-MICDYS。用同样的方法, 将质粒 pCMV-VP22 与 pAdeasy-1 电转空重组腺病毒质粒子 pAde-VP22, 作为阴性对照。

重组病毒在 293 细胞的包装、鉴定和纯化 具体操作参考文献 [4]。重组质粒 pAde-VP22-MICDYS 制备的重组腺病毒命名为 Ad-VP22-MICDYS; 重组质

粒 pAde-VP22 制备的重组腺病毒命名为 Ad-VP22, 作为本研究的阴性对照。

重组腺病毒在成肌细胞 C2C12 中的表达

腺病毒感染 C2C12 细胞最佳剂量的确定: 取生长良好的 C2C12 细胞进行实验, 将浓缩的腺病毒 Ad-EGFP 用 PBS 稀释成 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 vp/ml 的病毒液, 感染 80% ~ 90% 融合的、接种于 6 孔板中的 C2C12 细胞 (每孔 1 ml), 37℃ 感染 1 h 后, 弃掉感染液, PBS 冲洗 1 遍, 添加含 5% 小牛血清的 DMEM 继续培养 48 h, 在荧光显微镜下观察拍照, 计算各个浓度 EGFP 的表达效率 (EGFP 阳性细胞数量/总细胞数量), 同时镜下观察细胞形态和死亡情况, 确定最佳范围的病毒感染量。

感染后 C2C12 细胞中 microdystrophin 和 VP22 的转录: 取病毒上清, 将 Ad-VP22-MICDYS 用 PBS 稀释成最佳感染病毒粒子数 (1×10^8 vp/ml), 感染 80% ~ 90% 融合的 C2C12 细胞, 感染后 48 h 离心收集细胞。细胞沉淀用 Trizol 试剂盒提取总 RNA。获得的 RNA 进行逆转录; 取 2 μl cDNA 产物为模板, 用上述 VP22 基因的 PCR 扩增鉴定、microdystrophin 重组腺病毒质粒鉴定的引物及反应条件进行目的基因 VP22 及 microdystrophin 的 PCR 扩增。同法获得对照腺病毒 Ad-VP22 的 cDNA 产物作为对照, 进行 VP22 及 microdystrophin 的 PCR 扩增, 同时扩增内参 β-肌动蛋白, 上游引物: 5' TCGTACCACAGGCATTGTGATGG3'; 下游引物: 5' GCTATGCCTGGGTACATGGTGG3', 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

Western-blot 检测腺病毒感染后 C2C12 细胞中 microdystrophin 的表达: 取病毒上清, 将 Ad-VP22、Ad-VP22-MICDYS 用 PBS 稀释成最佳感染病毒粒子数 (1×10^8 vp/ml), 感染 80% ~ 90% 融合的 C2C12 细胞。48 h 后离心收集细胞, 沉淀用 PBS 洗 2 次, 加入 500 μl 细胞裂解液提取蛋白 (50 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷, 10% 丙三醇, 2% 十二烷基硫酸钠, 100 mmol/L 二硫苏糖醇, pH 6.8), 以超声波进一步破碎细胞, BCA 法测定蛋白浓度, 然后经 SDS-PAGE 和 Western-blot 检测 microdystrophin 蛋白的表达, 一抗为鼠抗人抗肌萎缩蛋白单克隆抗体 (N 端) (1:50), 二抗为辣根过氧化物酶标记的兔抗小鼠 IgG (1:5000)。用 KONTRON IBAS 2.0 全自动图像分析系统测量不同处理组的蛋白条带的面积和平均光密度, 获得积分光密度 (蛋白条带的面积 × 平均光密度), 得到不同处理组蛋白表达的相对量。

免疫组织化学方法检测腺病毒感染后 C2C12 细胞中 microdystrophin 的表达及 VP22 介导的蛋白转导特性：将 Ad-VP22、Ad-MICDYS、Ad-VP22-MICDYS 用 PBS 稀释成最佳感染病毒粒子数 (1×10^8 vp/ml)，感染接种于 6 孔板中的 C2C12 细胞，在感染后 12、24、48、72 h 分别进行 microdystrophin 免疫组织化学检测（免疫组织化学检测方法参考文献 [4]），结果置于荧光倒置显微镜观察，拍照，并随机选取 5 个视野，计数阳性细胞数量，用阳性细胞数量/总细胞数量计算出 microdystrophin 的表达效率。

结 果

VP22 基因的 PCR 扩增、鉴定与克隆 用 pSIN-rep5-VP22 作为模板，PCR 扩增，产物在 1% 琼脂糖凝胶中可见一条 0.94 kb 大小的特异性条带，其大小同预期的相当。回收该片段，克隆到 pMD18-T 载体，构建的重组质粒 TVP22 经 BamH I 和 Not I 双酶切出 2.7 和 0.94 kb 条带，证实 VP22 克隆成功（图 1）。

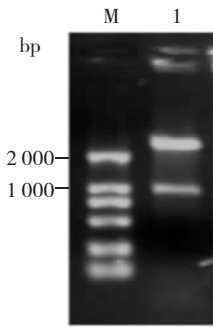


图 1 TVP22 的酶切鉴定

Fig 1 Identification of the plasmid TVP22 by restriction enzyme
M. DNA marker (DL-2000); 1. BamHI 和 NotI 双酶切 TVP22
M. DNA marker (DL-2000); 1. TVP22/BamHI + NotI

pCMV-VP22、pCMV-VP22-MICDYS 重组穿梭质粒的构建 重组穿梭质粒 pCMV-VP22 经 Sal I 酶切，得到 8.14 kb 和 325 bp 酶切片段（图 2）。重组穿梭质粒 pCMV-VP22-MICDYS 经 Hind III 酶切进行方向鉴定，正向插入片断大小为 10.9 和 1.3 kb，反向插入片断大小为 2.5 和 9.7 kb（图 3）。

pAde-VP22、pAde-VP22-MICDYS 重组腺病毒质粒的构建 pAde-VP22、pAde-VP22-MICDYS 重组腺病毒质粒分别用 Pac I 酶切，得到 30 和 4.5 kb 两个片段（图 4，5）。

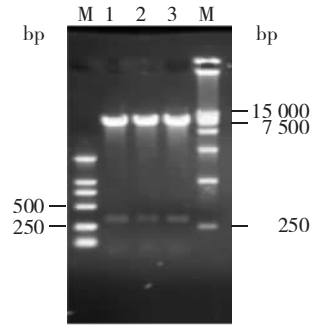


图 2 重组质粒 pCMV-VP22 的酶切鉴定

Fig 2 Identification of recombinant plasmid pCMV-VP22 by restriction enzyme
M. DNA marker (DL-2000 and DL-15000); 1-3. pCMV-VP22/Sal I

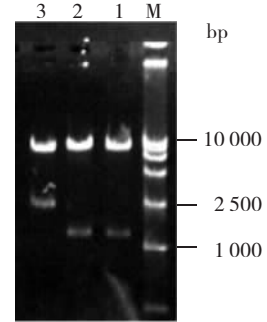


图 3 重组质粒 pCMV-VP22-MICDYS 的酶切鉴定

Fig 3 Identification of recombinant plasmid pCMV-VP22-MICDYS by restriction enzyme
M. DNA marker (DL-15000); 1, 2. Hind III 酶切 pCMV-VP22-MICDYS, 正向; 3. Hind III 酶切 pCMV-VP22-MICDYS, 反向
M. DNA marker (DL-15000); 1, 2. pCMV-VP22-MICDYS/Hind III, positive direction; 3. pCMV-VP22-MICDYS/Hind III, opposite direction

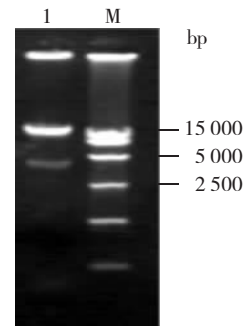


图 4 重组质粒 pAde-VP22 的酶切鉴定

Fig 4 Identification of recombinant plasmid pAde-VP22 by restriction enzyme
M. DNA marker (DL-15000); 1. pAde-VP22/pac I

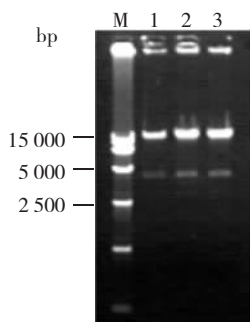


图5 重组质粒 pAde-VP22-MICDYS 的酶切鉴定

Fig 5 Identification of recombinant plasmid pAde-VP22-MICDYS by restriction enzyme

M. DNA marker (DL-15000); 1-3. pAde-VP22-MICDYS/pac I

重组病毒的鉴定

用重组病毒 Ad-VP22、Ad-VP22-MICDYS 基因组 DNA 以及对照质粒 pBSK-micro、pCMV-VP22 为模板, 进行 PCR 扩增鉴定, 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 得到 microdystrophin 大小 319 bp 的片段 (图 6), VP22 大小 942 bp 的片段 (图 7)。

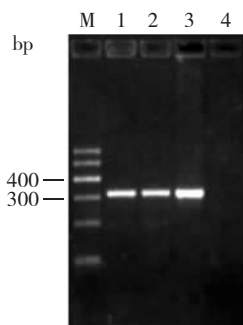


图6 重组腺病毒 Ad-VP22-MICDYS 的 PCR 鉴定

Fig 6 Identification of recombinant adenovirus Ad-VP22-MICDYS by PCR

M. DNA marker (DL-600); 1, 2. 重组腺病毒 Ad-VP22-MICDYS; 3. 阳性对照质粒 pBSK-micro; 4. 阴性对照

M. DNA marker (DL-600); 1, 2. recombinant adenovirus Ad-VP22-MICDYS; 3. positive control (pBSK-micro); 4. negative control

腺病毒感染 C2C12 细胞最佳剂量

不同浓度的腺病毒 Ad-EGFP 感染 C2C12 细胞 48 h 后, 在荧光显微镜下可见绿色荧光 (图 8), 随着病毒浓度的升高, EGFP 的表达效率逐渐增高, 在病毒浓度为 (1×10^5) 、 (1×10^6) 、 (1×10^7) 、 (1×10^8) vp/ml 时, EGFP 表达量分别为 18%、32%、44%、58%; 病毒浓度为 (1×10^9) vp/ml 时, EGFP 表达量反而下降,

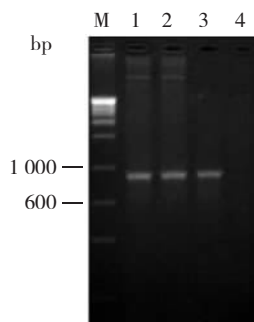


图7 重组腺病毒 Ad-VP22、Ad-VP22-MICDYS 的 PCR 鉴定

Fig 7 Identification of recombinant adenovirus Ad-VP22、Ad-VP22-MICDYS by PCR

M. DNA marker (DL-15000); 1. 重组腺病毒 Ad-VP22; 2. 重组腺病毒 Ad-VP22-MICDYS; 3. 阳性对照质粒 pCMV-VP22; 4. 阴性对照

M. DNA marker (DL-15000); 1. recombinant adenovirus Ad-VP22; 2. recombinant adenovirus Ad-VP22-MICDYS; 3. positive control (pCMV-VP22); 4. negative control

约为 56%。根据 EGFP 的表达效率以及镜下观察细胞形态和死亡情况, 确定腺病毒感染 C2C12 细胞的最佳感染病毒量为 (1×10^8) vp/ml。

重组腺病毒感染 C2C12 细胞后 microdystrophin 及 VP22 的 mRNA 表达

Ad-MICDYS、Ad-VP22、Ad-VP22-MICDYS 感染后的 C2C12 细胞有 microdystrophin 及 VP22 片段的扩增, 而对照组无特异性条带产生, 表明插入的目的基因 microdystrophin 及 VP22 在 mRNA 水平能有效转录 (图 9)。

腺病毒感染 C2C12 细胞后 microdystrophin 的蛋白表达

Western-blot 检测显示 Ad-MICDYS 感染的 C2C12 细胞表达单独的 microdystrophin 蛋白, 相对分子质量为 137 000; Ad-VP22-MICDYS 感染的 C2C12 细胞表达 VP22-microdystrophin 融合蛋白, 相对分子质量为 175 000; Ad-VP22-MICDYS 感染的细胞较 Ad-MICDYS 感染的 C2C12 细胞中 microdystrophin 的表达量高 2.4 倍 (图 10)。免疫组织化学检测显示重组腺病毒感染后的 C2C12 细胞核 (蓝色) 和细胞膜中均可见红色颗粒, 深浅不一; 而阴性对照组 (Ad-VP22 感染组) 未见红色颗粒 (图 11)。Ad-MICDYS、Ad-VP22-MICDYS 感染 12、24 h 后, C2C12 细胞中 microdystrophin 蛋白表达差异无显著性; 感染 48 h 后, Ad-VP22-MICDYS 感染的 C2C12 细胞中 microdystrophin 表达较 Ad-MICDYS 显著增多 ($P < 0.05$) (图 12)。

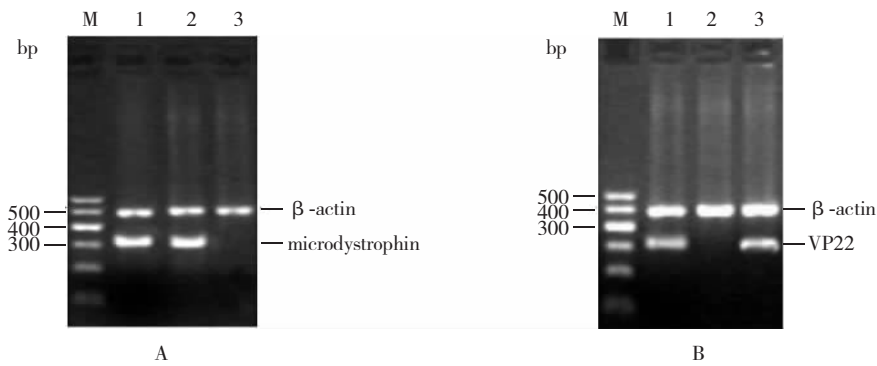


图 9 RT-PCR 检测重组腺病毒感染后 C2C12 细胞中 microdystrophin (A) 及 VP22 (B) 的 mRNA 表达

Fig 9 RT-PCR detection on microdystrophin (A) and VP22 (B) mRNA expression in C2C12 cells infected by recombinant adenovirus
M. DNA marker (DL-600); 1. 感染 Ad-VP22-MICDYS; 2. 感染 Ad-MICDYS; 3. 感染 Ad-VP22
M. DNA marker (DL-600); 1. infected by Ad-VP22-MICDYS; 2. infected by Ad-MICDYS; 3. infected by Ad-VP22

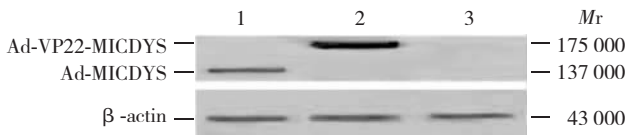


图 10 Western-blot 检测重组腺病毒感染后 C2C12 细胞中 microdystrophin 的蛋白表达

Fig 10 Western-blot detection on microdystrophin protein expression in C2C12 cells infected by recombinant adenovirus
1. 感染 Ad-MICDYS; 2. 感染 Ad-VP22-MICDYS; 3. 感染 Ad-VP22; M_r : 相对分子质量
1. infected by Ad-MICDYS; 2. infected by Ad-VP22-MICDYS; 3. infected by Ad-VP22; M_r : relative molecular mass

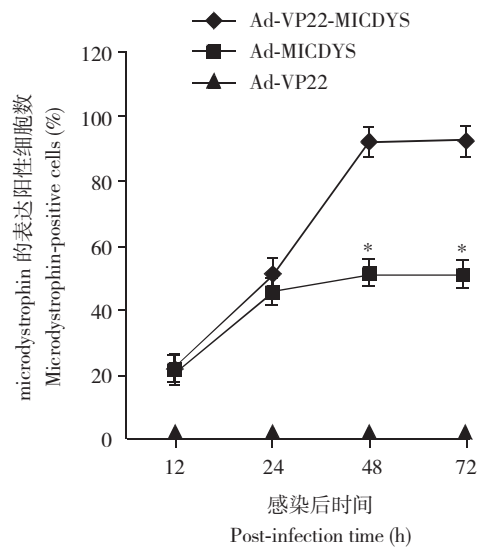


图 12 不同时间点腺病毒感染 C2C12 细胞后 microdystrophin 的表达阳性细胞数

Fig 12 Numbers of microdystrophin-positive cells in C2C12 cells infected by adenovirus at different time points
与 Ad-VP22-MICDYS 比较, * $P < 0.05$
* $P < 0.05$ compared with Ad-VP22-MICDYS

讨 论

DMD 的治疗目前尚无特效的途径, 主要问题在于如何纠正 dystrophin 基因在体内正确有效地表达。目前对 DMD 的治疗多集中于基因治疗和细胞治疗, 但细胞治疗由于存在免疫排斥、表达时间不持久、不能改善心肌、膈肌肌力和智力缺陷、局部注射分布范围局限、血管途径表达率低等问题, 其临床应用受到限制, 因此, 基因治疗仍是解决 DMD 治疗的最有效途径。目前常用的基因治疗方法有脂质体、质粒 DNA、反义寡核苷酸治疗、RNA/DNA 寡核苷酸嵌合体修复术和病毒载体等, 其中以病毒载体介导的 DMD 基因治疗前景最大。在病毒载体介导的 DMD 基因治疗中, 腺病毒是目前应用最多的病毒载体, 腺病毒是无包膜的线性双链 DNA 病毒, 可感染

种类相当广泛的有丝分裂后细胞, 甚至包括来自高度分化的组织中的细胞, 例如骨骼肌细胞、肺细胞、脑细胞和心脏细胞等^[5]。虽然腺病毒向大多数体外培养的传代细胞转运已经相当成熟, 但研究表明较多的病毒包括腺病毒对骨骼肌及其成肌培养细胞的感染效率均较低^[6], 因此腺病毒介导的对 DMD 的基因治疗无较高的基因表达, 而且腺病毒本身的蛋白和携带的外源蛋白可引发严重的细胞和体液免疫反应, 其在 DMD 的治疗中需要高剂量的病毒才能表达足够的基因以达到治疗的目的^[7]。所以提高腺病毒

对肌细胞的感染率、减小腺病毒应用的剂量、提高 dystrophin 表达的水平、延长 dystrophin 表达的时间是解决腺病毒作为载体治疗 DMD 的关键。

本研究以带 EGFP 报告基因的重组腺病毒研究腺病毒对成肌细胞 C2C12 的感染效率,结果显示腺病毒对 C2C12 的感染效率在 50% ~ 60%。而 VP22 对与之融合的外源基因在体内外具有明显的转导活性^[8-11],而且显著增强腺病毒对细胞的感染效率,尤其是对肌肉细胞也有相同的作用^[12,13],同样体内也证实了 VP22 可增强重组腺病毒的治疗肿瘤的效率^[14-16],本研究经证实 VP22 能提高腺病毒对 C2C12 细胞的感染效率。用 RT-PCR 检测含 VP22 和不含 VP22 的 microdystrophin 的重组腺病毒感染 C2C12 后显示 mRNA 表达水平差异无显著性,但用 Western-blot 检测显示含 VP22 的重组腺病毒感染 C2C12 细胞后 microdystrophin 蛋白的表达提高了约 2 倍,用免疫组织化学检测也证实了此现象,通过不同的时间点检测腺病毒感染后 microdystrophin 蛋白的表达随着时间增加,含 VP22 的重组腺病毒感染后的 C2C12 中 microdystrophin 蛋白的表达逐渐增加,最高可达 93% 以上,而不含 VP22 的腺病毒在 24 和 48 h 的蛋白表达量差异无显著性,表明 VP22 能增强腺病毒对 C2C12 的感染而提高了 microdystrophin 蛋白的表达量。

对于 HSV-1 VP22 是否能在活细胞中观察到蛋白转导一直存在争议。以往研究一般采用 EGFP 作为示踪,通过细胞定位或转染后荧光细胞的数量评价 VP22 在活细胞中的蛋白转导。但在采用单一 EGFP 作标记的情况下,通过仅有的视野评价蛋白转导效率无法排除视野选择上的主观因素的影响。Derer 等^[12]研究显示蛋白转导效率也并非 100%,VP22-EGFP 与非融合的 EGFP 荧光细胞比例分别界于 20% ~ 50% 和 5% ~ 15%,VP22-EGFP 在不同细胞中的转导效率不同。蛋白转导检测的敏感性还与转染效率、转染质粒的用量以及转染试剂等有关,当转染效率高于 60% 时,很难检测到明显的蛋白转导^[17,18]。本研究为了减少人为地细胞数造成的主观影响,在进行细胞计数的同时采用 Western-blot 比较蛋白的相对表达量,同时在不同的时间点检测 microdystrophin 的表达,结果显示随着时间的延长,VP22 介导的 microdystrophin 重组腺病毒比单独的 microdystrophin 重组腺病毒感染的 C2C12 细胞中 microdystrophin 阳性细胞数量显著增多,同时 Western-blot 检测蛋白的表

达与免疫组织化学检测通过细胞计数的结果相似,48 h 后相差 2 倍左右,进一步证实了 VP22 能利用其蛋白转导的特性对 microdystrophin 在成肌细胞中进行转导。另外,由于本研究下一步需要治疗的 DMD 是肌肉性疾病,因此需要证明 VP22 能在肌肉细胞中具有蛋白转导的功能,因此在实验中选用了 C2C12 成肌细胞,研究结果与国外报道^[12,13]一致,VP22 能够介导成肌细胞间的转导,提高了 microdystrophin 的表达,为下一步进行体内实验提供了实验依据。

(本文图 8, 11 见封三)

参 考 文 献

- [1] Emery AE. Duchenne muscular dystrophy [M]. 2nd ed. Oxford University: Oxford University Press, 1993:25-45.
- [2] Sehwarze SR, Hruska KA, D0wdY SF. Protein transduction: unrestricted delivery into all cells [J]. *Trend cel Biol*, 2000, 10(7):290-295.
- [3] Luft FC. Can VP22 resurrect gene therapy [J]? *J Mol Med*, 1999, 77:575-576.
- [4] 熊 符, 张 成, 肖少波, 等. Microdystrophin 基因重组腺病毒的构建及转染 mdx 骨髓间充质干细胞的表达 [J]. *生物工程学报*, 2007, 23(1):27-32.
- [5] Franceschi RT, Ge C. Gene delivery by adenoviruses [J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 455:137-147.
- [6] Nalbantoglu J, Pari G, Karpati G, *et al*. Expression of the primary coxsackie and adenovirus receptor is downregulated during skeletal muscle maturation and limits the efficacy of adenovirus-mediated gene delivery to muscle cells [J]. *Hum Gene Ther*, 1999, 10(6):1009-1019.
- [7] Deconinck N, Ragot T, Maréchal G, *et al*. Functional protection of dystrophic mouse (mdx) muscles after adenovirus-mediated transfer of a dystrophin minigene [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(8):3570-3574.
- [8] Cheng WF, Hung CF, Hsu KF, *et al*. Cancer immunotherapy using Sindbis virus replicon particles encoding a VP22-antigen fusion [J]. *Hum Gene Ther*, 2002, 13(4):553-568.
- [9] Hung CF, He L, Juang J, *et al*. Improving DNA vaccine potency by linking Marek's disease virus type 1 VP22 to an antigen [J]. *J Virol*, 2002, 76(6):2676-2682.
- [10] Roeder GE, Parish JL, Stern PL, *et al*. Herpes simplex virus VP22-human papillomavirus E2 fusion proteins produced in mammalian or bacterial cells enter mammalian cells and induce apoptotic cell death [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2004, 40(2):157-165.

- [11] Lemken ML, Wolf C, Wybranietz WA, *et al.* Evidence for intercellular trafficking of VP22 in living cells [J]. *Mol Ther*, 2007, 15(2):310-319.
- [12] Derer W, Easwaran HP, Knopf CW, *et al.* Direct protein transfer to terminally differentiated muscle cells [J]. *J Mol Med*, 1999, 77(8):609-613.
- [13] Derer W, Easwaran HP, Leonhardt H, *et al.* A novel approach to induce cell cycle reentry in terminally differentiated muscle cells [J]. *FASEB J*, 2002, 16(1):132-133.
- [14] Wills KN, Atencio IA, Avanzini JB, *et al.* Intratumoral spread and increased efficacy of a p53-VP22 fusion protein expressed by a recombinant adenovirus [J]. *J Virol*, 2001, 75(18):8733-8741.
- [15] Zender L, Kock R, Eckhard M, *et al.* Gene therapy by intrahepatic and intratumoral trafficking of p53-VP22 induces regression of liver tumors [J]. *Gastroenterology*, 2002, 123(2):608-618.
- [16] Zender L, Kuhnel F, Kock R, *et al.* VP22-mediated intercellular transport of p53 in hepatoma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Cancer Gene Ther*, 2002, 9(6):489-496.
- [17] Wybranietz WA, Prinz F, Spiegel M, *et al.* Quantification of VP22-GFP spread by direct fluorescence in 15 commonly used cell lines [J]. *J Gene Med*, 1999, 1(4):265-274.
- [18] Bamdad T, Bell JC. Intercellular trafficking of VP22, a herpes simplex virus type 1 tegument protein [J]. *Iran Biomed J*, 2007, 11(1):53-57.

(2007-09-11 收稿)