

# 表达人内啡肽的腺病毒/腺相关杂合病毒的构建及体外表达分析

徐学武<sup>1</sup> 俞卫锋<sup>1\*</sup> 崔贞福<sup>2</sup> 王星华<sup>2</sup> 李 泉<sup>1</sup>

(第二军医大学东方肝胆外科医院 <sup>1</sup> 麻醉科 <sup>2</sup> 病毒基因治疗实验室 上海 200438)

**摘 要** 应用分子生物学方法将人  $\beta$ -内啡肽融合基因序列克隆入腺病毒穿梭质粒 pDC312-AAVEE, 后者与骨架质粒共转染 HEK293 细胞, 包装得到含转基因腺病毒/腺相关杂合病毒 Ad/AAV-EE。用 PCR 方法对杂合病毒进行鉴定, TCID<sub>50</sub> 法测定病毒滴度。杂合病毒感染体外培养细胞观察转基因表达, ELISA 法测定培养液中表达产物浓度。PCR 法证实转基因正确插入了杂合病毒基因组内, 且没有野生型病毒污染, 病毒滴度为  $1.29 \times 10^{10}$  PFU/mL。结果表明转基因从第 1 天到第 14 天的表达水平呈上升趋势, 第 14 天达到 3141 pg/mL。

**关键词**  $\beta$ -内啡肽 腺病毒 腺相关病毒 杂合病毒 构建 表达

中图分类号: Q93, Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2005)06-0856-04

基因治疗是基因工程的主要应用之一, 通过基因转导系统将治疗性基因导入体内组织细胞, 转基因在机体内表达, 产生具有生物活性的治疗物质, 对疾病产生一定的治疗效果。而提高基因治疗的效率则是其应用中必须要解决的问题之一, 基因治疗系统中基因转导载体是治疗成功与否及治疗效率如何的关键因素, 一种能够实现高效转导和表达的载体将对该载体的应用产生巨大的影响。大量研究证实, 基因治疗不仅可以用于肿瘤等疾病的治疗<sup>[1]</sup>, 同样也可以治疗遗传病<sup>[2]</sup>、慢性疼痛<sup>[3]</sup>等的治疗, 其中后两者的治疗需要治疗载体能够长期的产生治疗性蛋白质物质, 以弥补或提供机体内某些正常存在的物质, 从而起到治疗作用。目前应用于基因治疗研究的病毒载体中主要有腺病毒载体、腺相关病毒载体以及逆转录病毒载体等, 其中腺病毒载体介导的转基因的表达是高效的, 但表达时相短<sup>[4]</sup>, 不能满足慢性疼痛或遗传病等的要求。到目前为止, 基因治疗研究中所使用的载体大部分是逆转录病毒载体, 但该载体在慢性疼痛基因治疗中的安全性仍有待确定。而腺相关病毒载体因其特性成为基因治疗中常用的载体之一, 该载体不仅不会产生副作用, 此外还能够以其特有的方式长期地表达转基因, 非常适合需要长期表达的病例, 但其该类载体的生产仍有问题需解决。如何有效地利用腺相关病毒能实现基因组对细胞染色体的整合<sup>[5]</sup>, 从而长期稳定地表达治疗基因, 是一个值得研究的课题。杂合病毒可以继

承父病毒的优点, 本文进行了人内啡肽的腺病毒/腺相关杂合病毒的构建和体外表达。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

含人  $\beta$ -内啡肽融合基因的质粒 pTCNE、含增强型绿色荧光蛋白(EGFP)质粒 pXC70-EGFP、克隆载体 pUCL 和 pClone9 由本实验室构建; E1 区缺失的 5 型腺病毒穿梭质粒 pCA14、pDC312 和 5 型腺病毒骨架质粒 pBHGloxPdeltaE1.3Cre 购于加拿大 Microbix Biosystem 公司; 含重组腺相关病毒基因组的质粒 pAd.Psi-AAV5 由 A. A. F. de Vries 博士(Leiden University Medical Center)馈赠; A431、腺病毒 E1 区转化的人胚胎肾细胞(HEK293 细胞)购自 ATCC 公司。 $\beta$ -内啡肽 ELISA 试剂盒购自大连泛邦生物技术有限公司。

### 1.2 引物序列

引物 PR001 和 PR002 是本实验室通用的野生病毒鉴定引物, 其中 PR001 为 5'-CTGGCCAATACCAACCTTA-3' (位于 Human adenovirus C serotype 5 的 2772 ~ 2790bp), PR002 为 5'-ATATGAGCTCACAATGCTTC-3' (位于 Human adenovirus C serotype 5 的 3631 ~ 3650bp)。引物 PR003 (5'-ACCATGTCCATGTTCCTTA-3') 及 PR004 (5'-CCTGGAAGTCTAGATCCAGA-3') 为从内啡肽翻译序列得到的鉴定引物, PR003 位于翻译起始部位, PR004 位于结束部位附近。

\* 通讯作者。Tel/Fax 86-21-25070783, E-mail: ywf888@sohu.com

作者简介 徐学武 (1972-) 男, 天津静海人, 主治医师, 在读博士研究生, 主要研究疼痛的基因治疗。E-mail: xu\_xw2002@yahoo.com.cn

其他作者 吴飞翔<sup>1</sup>, 董 刚<sup>1</sup>, 姜梨华<sup>2</sup>

收稿日期 2005-04-25, 修回日期 2005-07-21

### 1.3 穿梭质粒载体构建

将内啡肽(NEP)序列自 pTCNE 中用 *Bgl* II 和 *Hind* III 双酶切下,插入经 *Bam* HI 和 *Hind* III 消化的载体 pCA14 内,得到 pCA14-NEP。后者用 *Bgl* II 酶切,为内啡肽完整表达盒,与 *Bam* HI 消化的载体 pClone9 连接,产物为 pClone9-NEP。*Bgl* II 酶切 pXC70-EGFP,得到增强的绿色荧光蛋白(EGFP)的完整表达盒,与 *Bam* HI 消化的载体 pClone9 连接,产物为 pClone9-EGFP。pClone9-EGFP 经 *Spe* I 与 *Xba* I 双酶切,EGFP 片段连接到 pClone9-NEP 的 *Xba* I 位点之间,得到与 NEP 转录方向相同的质粒 pClone9-EE。*Spe* I 与 *Xba* I 将 NEP + EGFP 片段切下,插入到 pUCL 的 *Xba* I 位点间,产物为 pUCL-EE。*Bam* HI 与 *Bgl* II 将 NEP + EGFP 片段切下,插入到 pAd. Psi-AAV5 的 *Bgl* II 位点间,产物为 pAAV-DTREE。*Bam* HI 与 *Eco* RV 将表达序列(NEP + EGFP)及重组腺相关病毒序列片段切下,插入到 pDC312 的 *Bam* HI 和 *Stu* I 位点间,得到腺病毒穿梭质粒载体 pDC312-AAVEE,并对其进行酶切和 PCR 鉴定。

### 1.4 病毒包装鉴定及滴度测定

脂质体法将 pDC312-AAVEE 与 pBHGLOxPdeltalE1.3Cre 共转染 HEK293 细胞,铺琼脂板,细胞内同源重组获得目的腺病毒。转染 10d 后出现病毒空斑,取细胞上清提取病毒 DNA,PCR 鉴定获得含人  $\beta$ -内啡肽融合基因的腺病毒/腺相关杂合病毒 Ad/AAV-EE。HEK293 细胞内扩增病毒,离子交换吸附法纯化病毒,PCR 鉴定野生型病毒的污染。96 孔板加入 HEK293 细胞,37°C CO<sub>2</sub> 孵箱中培养,加入纯化好的病毒,培养 10d 后倒置显微镜下观察计数出现 CPE( Cytopathic Effect 细胞病变反应)的孔数,按 Karbers 公式计算病毒滴度。

### 1.5 转基因的体外表达

用六孔板常规培养 A431 细胞,  $2 \times 10^5$  细胞/孔。按  $MOI = 10^{6.71}$  进行病毒感染试验,对照组无病毒感染。感染后第 1、3、7、10、14 天吸取细胞培养液,ELISA 方法测定其内啡肽蛋白的浓度。

## 2 结果

### 2.1 质粒载体 pDC312-AAVEE 的鉴定

用 *Aat* II 酶切 pDC312-AAVEE,可以得到 1859bp、1881bp 和 2946bp 等 3 个电泳可见片段;*Not* I 酶切后有 1608bp、2146bp 和 3254bp 3 个电泳可见片段,两结果与理论值相符。用引物 PR003 和

PR004 鉴定内啡肽基因,阳性对照为 pTCNE,可见 385bp 的阳性片段(图 1),显示模板中含有内啡肽基因序列,说明穿梭质粒正确。

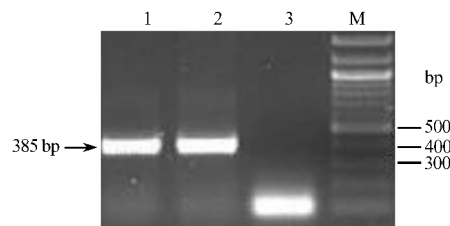


图 1 PCR 鉴定 pDC312-AAVEE

Fig.1 Identificatin of pDC312-AAVEE by PCR

1. pDC312-AAVEE; 2. Positive control( pTCNE ); 3. Negative control ; M. 1kb DNA Ladder.

### 2.2 病毒转基因及野生型病毒鉴定

提取杂合病毒 DNA 作为 PCR 模板,引物 PR003 和 PR004 鉴定内啡肽基因,阳性对照为 pTCNE。结果可见到 385bp 的阳性片段(图 2),样本和阳性对照是阳性结果而阴性对照的阴性结果表明病毒基因组内有内啡肽基因。引物 PR001 和 PR002 鉴定是否含有野生型腺病毒,阳性对照为含腺病毒 E1b 区的质粒 pXC1。结果可见到 800bp 的阳性片段(图 3),样本和阴性对照是阴性结果而阳性对照的阳性结果表明没有野生型(或可复制型)腺病毒污染。

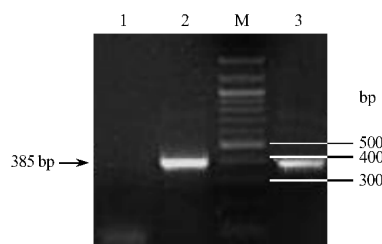


图 2 PCR 鉴定 Ad/AAV-EE

Fig.2 Identificatin of Ad/AAV-EE by PCR

1. Negative control; 2. Ad/AAV-TREE; 3. Positive control( pTCNE ); M. 1kb DNA Ladder.

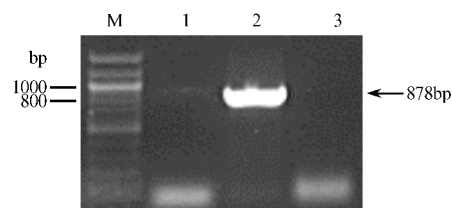


图 3 PCR 鉴定野生型病毒

Fig.3 Identificatin of wt-Virus by PCR

M. 1kb DNA Ladder; 1. Ad/AAV-TREE; 2. Positive control( pXC70 ); 3. Negative control.

### 2.3 病毒滴度

定病毒滴度为  $1.29 \times 10^{10}$  PFU/mL。

## 2.4 转基因的表达

ELISA 方法测定内啡肽蛋白浓度,结果表明(图4)(1)插入到病毒基因组内表达  $\beta$ -内啡肽的 DNA 序列是正确的,能够正确翻译出蛋白质,后者可被细胞分泌到细胞外(2)在第1天至第14天的观察期内,转基因的表达呈上升趋势,没有显现下降迹象,第14天时内啡肽的浓度达到了 3141pg/mL。

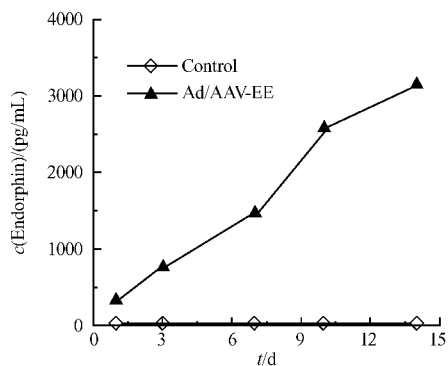


图4 转基因的表达情况

Fig. 4 Expression of transgene

## 3 讨论

基因治疗是基因工程的主要应用之一,通过基因转导系统将治疗性基因导入体内组织细胞,转基因在机体内表达,产生具有生物活性的治疗物质,对疾病产生一定的治疗效果。而提高基因治疗的效率则是其应用中必须要解决的问题之一,基因治疗系统中基因转导载体是治疗成功与否及治疗效率如何的关键因素,一种能够实现高效转导和表达的载体将对该载体的应用产生巨大的影响。大量研究证实,基因治疗不仅可以用于肿瘤等疾病的治疗<sup>[1]</sup>,同样也可以用于遗传病<sup>[2]</sup>、慢性疼痛<sup>[3]</sup>等的治疗,其中后两者的治疗需要治疗载体能够长期的产生治疗性蛋白质,以弥补或提供机体内某些正常存在的物质,从而起到治疗作用。目前应用于基因治疗研究的病毒载体中主要有腺病毒载体、腺相关病毒载体以及逆转录病毒载体等,其中腺病毒载体介导的转基因的表达是高效的,但表达时相短<sup>[4]</sup>,不能满足慢性疼痛或遗传病等的要求。到目前为止,基因治疗研究中所使用的载体大部分是逆转录病毒载体,但该载体在慢性疼痛基因治疗中的安全性仍有待确定。而腺相关病毒载体因其特性成为基因治疗中常用的载体之一,该载体不仅不会产生副作用,此外还能够以其特有的方式长期地表达转基因,非常适合

需要长期表达的病例,但其该类载体的生产仍有问题需解决。如何有效地利用腺相关病毒能实现基因组对细胞染色体的整合<sup>[5]</sup>,从而长期稳定地表达治疗基因,是一个值得研究的课题。一些学者已经尝试利用腺相关病毒能实现基因组对细胞染色体的整合从而长期稳定地表达治疗基因<sup>[8,9]</sup>,但研究腺病毒和腺相关杂合病毒载体作为基因治疗载体的报告不多。

内啡肽是中枢神经系统的一种重要的神经肽,主要由下丘脑和腺垂体神经内分泌细胞分泌,主要作用于  $\mu$ -阿片受体,不仅是参与应激反应的重要细胞因子,也是机体重要的内源性镇痛物质。Finegold 等<sup>[3]</sup>利用第一代腺病毒载体将  $\beta$ -内啡肽的融合基因导入大鼠腰段软脊膜细胞内,其表达产物出现在实验动物的脑脊液内,并提高了慢性疼痛模型的动物的痛阈值,提示对慢性疼痛有一定的治疗作用。也说明基因治疗是完全可以应用于慢性疼痛的治疗的。此后尤圣武等<sup>[10]</sup>也构建了类似的腺病毒载体,发现对大鼠的慢性坐骨神经痛模型具有稳定的镇痛效果。他们都发现腺病毒载体的治疗效果只能持续 3~4 周,这对于慢性疼痛或遗传病等需长期表达的疾病是不够的。由于重复应用腺病毒会诱导机体产生针对腺病毒的中和抗体,导致治疗作用减弱或丧失<sup>[11]</sup>,故多次应用同一种载体是不可取的。只有延长转基因的表达时间才能解决上述问题。

腺病毒/腺相关杂合病毒在感染细胞后,通过腺病毒高效复制扩增的机制大量生成携带腺相关病毒 ITR 的 DNA 序列,后者在腺相关病毒 ITR 的介导下,能够将 ITR 之间的转基因序列整合到宿主细胞染色体内。整合的转基因表达序列在细胞内随着基因组的正常表达而表达,并且未经整合的杂合病毒基因组在细胞内仍能够进行表达,产生治疗物质。其中经整合的表达序列可随着细胞的分裂增殖而传递至下一代细胞,能够继续表达所需要的治疗物质,而未整合的杂合病毒基因组在数周后则由于感染病毒细胞的消除而被机体清除,故杂合病毒转基因的表达时相要优于单纯的腺病毒载体。

本研究中为延长转基因表达时间,提高基因治疗的效率,我们利用细胞内的位点特异性重组技术<sup>[12]</sup>成功地构建并包装出了腺病毒/腺相关杂合病毒,经鉴定是正确的。PCR 方法鉴定,杂合病毒基因组包含了  $\beta$ -内啡肽融合基因,且没有野生型腺病毒的污染。杂合病毒介导的  $\beta$ -内啡肽转基因在第 1、3、7、10、14 天的表达水平呈现明显的上升趋势,在

观察期内没有显现下降的趋势,第3~10天之间产物浓度上升较快,第14天则达到3141pg/mL。说明我们构建并包装的病毒所携带的转基因的表达是良好的,但这种表达水平能否在慢性疼痛的治疗中产生优于腺病毒载体的治疗效果,还需在进一步的体外实验中加以验证,希望该杂合病毒在慢性疼痛的治疗中有一定的突破。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 张 霞,赵 健,李晓冬,等. TIP30 基因腺病毒载体的构建及体内外抑癌作用. 中华肿瘤杂志, 2004, **26**( 2 ) : 85 - 88.
- [ 2 ] Ogata K, Mimuro J, Kikuchi J, *et al.* Expression of human coagulation factor VIII in adipocytes transduced with the simian immunodeficiency virus agniTYOI-based vector for hemophilia A gene therapy. *Gene Ther*, 2004, **11**( 3 ) : 253 - 259.
- [ 3 ] Finegold A A, Mannes A J, Iadarola M J. A paracrine paradigm for in vivo gene therapy in the central nervous system: treatment of chronic pain. *Hum Gene Ther*, 1999, **10** : 1251 - 1257.
- [ 4 ] Jooss K, Chirmule N. Immunity to adenovirus and adeno-associated viral vectors: implications for gene therapy. *Gene Ther*, 2003, **10** ( 11 ) : 955 - 963.
- [ 5 ] Hamilton H, Gomos J, Berns K I, *et al.* Adeno-associated virus site-specific integration and AAVS1 disruption. *J Virol*, 2004, **78**

( 15 ) : 7874 - 7882.

- [ 6 ] Tseng L F, Henneberry B, Collins K A. The antinociception induced by beta-endorphin administered intrathecally is mediated by the activation of mu- and kappa-opioid receptors in the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1995, **351** : 464 - 468.
- [ 7 ] Beutler A S, Banck M S, Bach F W, *et al.* Retrovirus-mediated expression of an artificial  $\beta$ -endorphin precursor in primary fibroblasts. *J Neurochem*, 1995, **64** : 475 - 481.
- [ 8 ] Goncalves M A, van der Velde I, Knaan-Shanzer S, *et al.* Stable transduction of large DNA by high-capacity adeno-associated virus/adenovirus hybrid vectors. *Virology*, 2004, **321**( 2 ) : 287 - 296.
- [ 9 ] Zhang X, Chen Z, Chen Y, *et al.* Delivering antisense telomerase RNA by a hybrid adenovirus/ adeno-associated virus significantly suppresses the malignant phenotype and enhances cell apoptosis of human breast cancer cells. *Oncogene*, 2003, **22**( 16 ) : 2405 - 2416.
- [ 10 ] 尤圣武,俞卫锋,于布为,等. 重组小鼠神经生长因子前导肽和人  $\beta$ -内啡肽融合基因非增殖型腺病毒的构建和鉴定. 中华麻醉学杂志, 2004, **24**( 12 ) : 896 - 900.
- [ 11 ] Sumida S M, Truitt D M, Kishko M G, *et al.* Neutralizing antibodies and CD8 + T lymphocytes both contribute to immunity to adenovirus serotype 5 vaccine vectors. *J Virol*, 2004, **78**( 6 ) : 2666 - 2673.
- [ 12 ] Ghosh K, van Duyn G D. Cre-loxP biochemistry. *Methods*, 2002, **28**( 3 ) : 374 - 383.

## Construction and analysis of *in vitro* expression of Adenovirus/Adeno-associated hybrid virus containing the fusion gene of human $\beta$ -endorphin

XU Xue-wu<sup>1</sup> YU Wei-feng<sup>1\*</sup> CUI Zhen-fu<sup>2</sup> WANG Xing-hua<sup>2</sup> LI Quan<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Department of Anesthesiology, <sup>2</sup> Viral Gene Therapy Laboratory, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Medical Military University, Shanghai 200438, China)

**Abstract** : The fusion gene of human  $\beta$ -endorphin was cloned into the shuttle plasmid pDC312-AAVEE with the method of molecular biology. The latter and genomic plasmids were cotransfected into HEK293 to package the Adenovirus/Adeno-associated hybrid virus containing fusion gene of human beta-endorphin. The hybrid virus was identified with the method of PCR. The titer of proliferated virus, after purified, was determined by TCID50. The expression of transgene was studied after the hybrid virus infected the cultured cells, through testing the concentration of expressed product in the culture liquid by ELISA. It was identified that the sequence of fusion gene of human  $\beta$ -endorphin was correctly inserted into the genome of hybrid virus, and not contaminated by wild type virus. The titer of Ad/AAV-EE is  $1.29 \times 10^{10}$  PFU/mL after purification. The ascending trend of transgene expression was observed from the 1<sup>st</sup> to the 14<sup>th</sup> day, and the protein concentration reached 3141pg/mL at the 14<sup>th</sup> day.

**Key words** :  $\beta$ -Endorphin, Adenovirus, Adeno-associated virus, Hybrid virus, Construction, Expression

\* Corresponding author. Tel/Fax : 86-21-25070783 ; E-mail : ywf888@sohu.com

Other authors : WU Fei-xiang<sup>1</sup>, DONG Gang<sup>1</sup>, JIANG Li-hua<sup>2</sup>

Received date : 04-25-2005