

文章编号: 1000-5013(2013)01-0068-04

表达 Kallistatin 的 9 型重组腺相关病毒 的制备及其体外表达效率

王峰^{1,2}, 许瑞安^{1,2}

(1. 华侨大学 分子药物研究院, 福建 泉州 362021;

2. 华侨大学 分子药物教育部工程研究中心, 福建 泉州 362021)

摘要: 采用三质粒磷酸钙共转染生产系统, 制备出可以表达内源性抗肿瘤血管生成因子(Kallistatin)的 9 型重组腺相关病毒(rAAV2/9)和 2 型重组腺相关病毒(rAAV2/2). rAAV 经银染法鉴定其纯度; 采用 Western Blotting 法比较 rAAV2/9 和 rAAV2/2 外壳蛋白的大小; qPCR 方法检测 rAAV 的滴度. 使用 rAAV2/9-Kallistatin 和 rAAV2/2-Kallistatin 分别感染人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)后, RT-PCR 和 ELISA 法分别检测 Kallistatin 的 mRNA 和蛋白表达水平. 结果表明: 纯化的病毒纯度达到 98% 以上; rAAV9 外壳蛋白比 rAAV2 的大. 感染 HUVEC 后, rAAV2/9 介导 Kallistatin 在 mRNA 和蛋白表达水平都要比 rAAV2/2 高.

关键词: 9 型重组腺相关病毒; Kallistatin; 表达效率; 人脐静脉血管内皮细胞

中图分类号: R 969.4

文献标志码: A

目前在使用靶向性载体进行基因治疗的研究中, 重组腺相关病毒(recombinant adeno-associated virus, rAAV)载体因其在体内外表达效率高、表达周期长、免疫性低、无致病和致癌性、遗传毒性低并可大规模化生产等诸多优点, 使其成为目前基因治疗领域非常有前途的生物载体^[1-2]. 现有的 rAAV 规模化生产的产量和质量完全可以达到临床治疗的要求^[3]. 目前 rAAV 已经被广泛应用于临床治疗中, 并取得了非常好的疗效^[4]. 已经被发现的 AAV 血清型主要有 13 种, 不同血清型的 rAAV 具有特异的组织靶向性, 包括肝、肺、脑、心脏、肌肉等^[5-6]. 9 型 AAV 是近年发现的具有高组织靶向性新血清型 AAV. 研究发现: 9 型 AAV 对心脏特别是心肌层具有非常高的转导效率, 顺序依次为 rAAV9>rAAV8>rAAV7>rAAV2=rAAV5^[7]. 同时 rAAV9 可以在体内反复给药, 并能维持较高的基因表达水平. 这使 rAAV2/9 可以在临床上介导基因药物更加长期高效的表达^[8]. Kallistatin 为丝氨酸蛋白酶抑制剂, 可有效地抑制肿瘤新血管生成^[9]. 本研究组之前的研究发现其还可有效地抑制肝癌增殖^[10]. 本文在此基础上, 制备出符合临床前研究的 rAAV2/9-Kallistatin 并对其体外表达效率进行了初步的研究.

1 材料与方法

1.1 实验材料

细胞与菌株: 人胚肾细胞 293(HEK293); 人脐静脉内皮细胞 HUVEC(ATCC); 空白大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保存.

腺相关病毒表达质粒 pAM-Kallistatin, 包装辅助质粒 pH22, pH29 和 pFd6 为本实验室保存.

实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)测定 rAAV 病毒滴度的引物为

WPRE-U: 5'-TGGCGTGGTGTGCACTGT-3'; WPRE-L: 5'-GTTCCGCCGTGGCAATAG-3'.

RT-PCR 基因鉴定引物为

收稿日期: 2012-05-24

通信作者: 许瑞安(1948-), 男, 教授, 主要从事分子药物、分子医学、海洋与基因工程药物的研究. E-mail: ruianxu@hqu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81072578); 福建省自然科学基金资助项目(2010J05026); 福建发改委项目(20090205); 福建省厦门市科技计划项目(3502Z20053046)

Kallistatin-U: 5'-AACCATATGGATGGTGAGAGTTGCAGTAA-3';
Kallistatin-L: 5'-CACAATTCTGGTTTCGTGGGGTCGACGACCTTG-3';
18S RNA-U: 5'-CTTAGCTGAGTGTCCCGCG-3'; 18S RNA-L: 5'-GGCTGAACGCCACTT-GTCC-3'.

1.2 主要试剂

限制性内切酶、DNase I, MBI 公司;蛋白酶 K, Promega 公司;新生牛血清、DMEM 培养基和 IMEM 培养基, Gibco 公司;银染试剂盒, 碧云天公司;AAV 一抗, Abnova 公司;Real-Time SYBR 试剂盒, 大连宝生物公司;质粒大提试剂盒, Qiagen 公司;人 Kallistatin-ELISA 试剂盒, R&D 公司.

1.3 质粒的大量提取

pAM-kallistatin, H22, H29 和 pFd6 质粒转化进感受态大肠杆菌 DH5 α , 制备出单克隆. 使用 Qia-gen 质粒大量提取试剂盒, 按照说明书大量提取各质粒.

1.4 rAAV 的包装与纯化

转染前 24 h 接种 HEK293 细胞至平皿中;转染前 1~3 h, 换成 IMEM 培养基. 将载体质粒、包装质粒、辅助质粒与 2.5 mol \cdot L⁻¹ CaCl₂ 溶液混匀;再加入等量 2 \times HeBS 震荡混匀. 将此溶液加到培养皿中;然后放入到 CO₂ 培养箱中培养 16 h 后, 将培养液换为含有 10% FBS 的 DMEM, 继续培养 60~72 h 后收获病毒. 裂解细胞后, 加入核酸酶 (500 μ kat \cdot L⁻¹), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 后离心去除细胞碎片. 使用 PEG8000-CsCl 梯度离心纯化病毒^[11-12].

1.5 银染法、Western blotting 法和 qPCR 法鉴定 rAAV

十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离纯化后的病毒, 然后分别用银染法和 Western blotting 法鉴定. qPCR 法测病毒滴度: 待测病毒液加入 DNase I 于 25 $^{\circ}$ C 消化 1 h. 加入等体积蛋白酶 K 溶液, 37 $^{\circ}$ C 消化 1 h. 酚-氯仿-异戊醇法纯化病毒 DNA, 醋酸钠冰乙醇法沉淀. 病毒 DNA 用去离子水溶解后, 酶切处理后使用 qPCR 法测定 rAAV 的基因组滴度.

1.6 mRNA 表达水平的测定

1 \times 10⁵ 个 HUVEC 细胞培养于 24 孔板中, 24 h 后分别用纯化后的 rAAV2/9-Kallistatin 和 rAAV2/2-Kallistatin 感染细胞, 感染复数 (MOI, 即平均每个细胞感染病毒的基因组数 (V. G.)) 为 1 \times 10⁴ V. G. \cdot cell⁻¹. 培养后 24 和 72 h 时收集并提取细胞总 RNA, RT-PCR 后琼脂糖电泳鉴定. 使用 18S RNA 作为参照.

1.7 蛋白表达水平的测定

5 \times 10³ 个 HUVEC 细胞培养于 96 孔板中, 24 h 后分别用纯化后的 rAAV2/9-Kallistatin 和 rAAV2/2-Kallistatin 感染细胞, MOI=1 \times 10⁴ V. G. \cdot cell⁻¹. 感染后分别在 24 和 72 h 用 ELISA 试剂盒检测细胞培养液中 Kallistatin 的蛋白表达量.

2 结果与讨论

2.1 rAAV 的纯度和滴度鉴定

银染法鉴定 rAAV 纯度的结果, 如图 1 所示. 由图 1 可知: 纯化后的 rAAV 的纯度达到 98% 以上. Western Blotting 法测定 2 种血清型腺相关病毒载体的大小, 如图 2 所示. 由图 2 可知: rAAV2/2 外壳蛋白 VP1, VP2, VP3 大小与之前报道的 87, 72 和 62 ku 大小一致. 比较 rAAV2/9 与 rAAV2/2 的外壳蛋白大小发现 rAAV2/9 的外壳蛋白比 rAAV2/2 的外壳要大. 之前也有研究表明: rAAV9 的病毒外壳略大于蛋白分子标准 81, 66 和 60 ku^[13]. 采用 Real-time qPCR 法测定 rAAV 的滴度, 所有纯化后的 rAAV 基因组滴度 (以基因组数量 \cdot mL 表示⁻¹, 即 V. G. \cdot mL⁻¹) 约为 1 \times 10¹² V. G. \cdot mL⁻¹.

2.2 rAAV2/9 介导 Kallistatin 在 HUVEC 中的 mRNA 表达水平

RT-PCR 检测结果, 如图 3 所示. 由图 3 可知: rAAV2/9-Kallistatin 和 rAAV2/2-Kallistatin 分别感染 HUVEC 后 24 h 即可表达 Kallistatin, 且随着时间增强. 72 h 时的 mRNA 表达水平明显高于 24 h 时的表达水平. 而且在 HUVEC 中, rAAV2/9-Kallistatin 在 24 和 72 h 时表达 Kallistatin 的水平都比

rAAV2/2-Kallistatin 高.

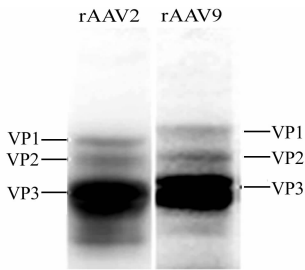


图 1 rAAV 的纯度

Fig. 1 Purity of rAAV

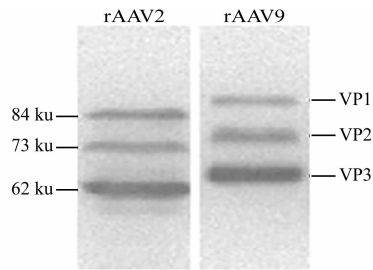


图 2 rAAV 的外壳蛋白大小

Fig. 2 Molecular weight of rAAV

2.3 rAAV2/9 介导 Kallistatin 在 HUVEC 中的蛋白表达水平

Kallistatin 的标准样品为人源 Kallistatin,测得标准曲线为: $y=2\,559.8x-27.912$. 感染后 24 h, rAAV2/9 即可介导 Kallistatin 在 HUVEC 表达,如图 4 所示. 由图 4 可知:感染后 72 h,Kallistatin 的表达水平 ρ (Kallistatin)明显比 24 h 时高,达到 $(322.56\pm2.7)\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$;而 rAAV2/2 介导 Kallistatin 的表达量为 $(271.32\pm3.93)\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. 在 24 和 72 h 时,rAAV2/9 介导 Kallistatin 在 HUVEC 中的表达水平都要高于 rAAV2/2.

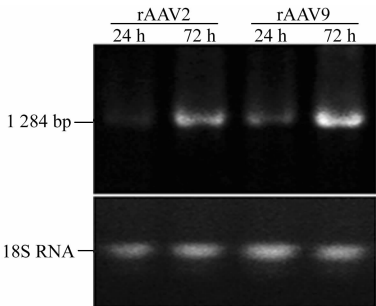


图 3 Kallistatin 的 mRNA 表达水平

Fig. 3 mRNA levels of Kallistatin

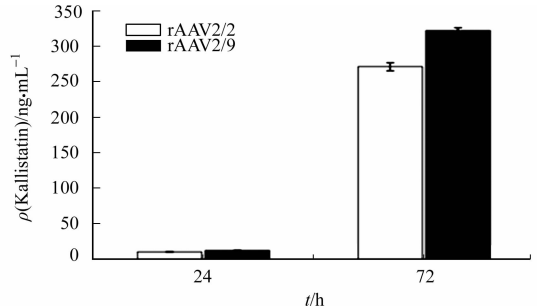


图 4 Kallistatin 的蛋白表达水平

Fig. 4 Protein level of Kallistatin

3 结束语

AAV9 是从人体中发现的新血清型腺相关病毒. rAAV2/9 被发现在肝脏、肺部和肌肉组织中的表达效率比其他血清型的 rAAV 高^[5]. 目前在基因治疗中使用最多的为 rAAV2/2,因为它是最早应用于基因治疗,也是特性研究的最为清楚的血清型. 但在临床应用中研究表明:人体的血液中预先存在大量针对 AAV2 的免疫球蛋白 G,从而影响其介导基因药物的长期高效表达^[14]. 而 AAV9 却不存在这样的问题,所以 rAAV2/9 在基因治疗的应用前景是非常巨大的.

Kallistatin 被证明可以有效的降低肿瘤的新血管生成,对肿瘤的再生长和迁移都具有抑制作用. 本实验室之前的研究发现 Kallistatin 可以有效的抑制肿瘤新血管的生成^[15]. 本实验成功构建了可表达 Kallistatin 的 rAAV2/9,此病毒载体的纯度和滴度都符合临床前研究的要求. 而且 rAAV2/9 介导 Kallistatin 在人脐静脉血管内皮细胞中表达效率高于 rAAV2/2,这为进一步的肿瘤基因治疗奠定基础.

目前癌症已成为人类的最大杀手,其中仅肺癌每年致死人数就达 137.8 万^[16]. 而癌症不易治疗的主要原因在于其发病机制非常复杂,非单一途径. 所以仅仅通过一种基因治疗方法很难取得较好疗效. 研究者开始使用联合治疗方法治疗肺癌,并且取得了非常好的疗效. rAAV2/9 已经被证明可以在多种组织中高效表达目的基因,本研究表明:其还可以在血管内皮细胞中高效表达 Kallistatin. 这为今后利用 rAAV2/9 介导 Kallistatin 联合其他基因药物对癌症进行联合治疗提供了可能.

参考文献:

[1] XU Rui-an,SUN Xue-ying,TSE Lai-yin,et al. Long-term expression of angiostatin suppresses metastatic liver cancer

er in mice[J]. Hepatology,2003,37(6):1451-1460.

[2] 舒静波,刁勇,肖卫东,等. 腺病毒-腺相关病毒嵌合载体的研发趋势[J]. 华侨大学学报:自然科学版,2008,29(2):172-176.

[3] 王峰,刁勇,肖卫东,等. 重组腺相关病毒规模化生物包装技术[J]. 生物工程学报,2009,25(11):1608-1613.

[4] MAGUIRE A M,SIMONELLI F,PIERCE E A, et al. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis[J]. N Engl J Med,2008,358(21):2240-2248.

[5] GAO Guang-ping,VANDENBERGHE L H,ALVIRA M R,et al. Clades of adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues[J]. J Virol,2004,78(12):6381-6388.

[6] 许瑞安,陈凌,肖卫东. 分子基因药理学[M]. 北京:北京大学出版社,北京大学医学出版社,2008:26-32.

[7] QI Yan-fei,LIU Xuan,LI Hong-wei,et al. Selective tropism of the recombinant adeno-associated virus 9 serotype for rat cardiac tissue[J]. J Gene Med,2010,12(1):22-34.

[8] LIMBERIS M P,WILSON J M,Adeno-associated virus serotype 9 vectors transduce murine alveolar and nasal epithelia and can be readministered[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2006,103(44):12993-12998.

[9] MIAO R Q,AGATA J,CHAO L,et al. Kallistatin is a new inhibitor of angiogenesis and tumor growth[J]. Blood,2002,100(9):3245-3252.

[10] TSE Lai-yin,SUN Xue-ying,JIANG Hong-chi,et al. Adeno-associated virus-mediated expression of kallistatin suppresses local and remote hepatocellular carcinomas[J]. J Gene Med,2008,10(5):508-517.

[11] XU R,RAHIMI M,MA H,et al. Stability of infectious recombinant adeno-associated viral vector in gene delivery [J]. Med Sci Monit,2005,11(9):R305-R308.

[12] GRIEGER J C,CHOI V W,SAMULSKI R J,Production and characterization of adeno-associated viral vectors[J]. Nat Protoc,2006,1(3):1412-1428.

[13] MITCHELL M,NAM H J,CARTER A, et al. Production, purification and preliminary X-ray crystallographic studies of adeno-associated virus serotype 9[J]. Acta Crystallogr F,2009,65:715-718.

[14] BOUTIN S,MONTEILHET V,VERON P,et al. Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1,2,5,6,8, and 9 in the healthy population: Implications for gene therapy using AAV vectors[J]. Hum Gene Ther,2010,21(6):704-712.

[15] DIAO Yong,MA Jun,XIAO Wei-dong,et al. Inhibition of angiogenesis and Hg-116 xenograft tumor growth in mice by kallistatin[J]. World J of Gastroenterol,2007,13(34):4615-4619.

[16] JRMSL A,BTSY F,CENTER M M,et al. Global cancer statistics[J]. Cancer J Clin,2011,61(2):69-90.

Production and Expression Efficiency in Vitro of Recombinant Adeno-Associated Virus 9 Mediating Kallistatin

WANG Feng^{1,2}, XU Rui-an^{1,2}

(1. Institute of Molecular Medicine, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China;
2. Engineering Research Center of Molecular Medicine, Ministry of Education, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

Abstract: Recombinant adeno-associated virus 9 (rAAV2/9) and recombinant adeno-associated virus 2 (rAAV2/2) had been produced by three plasmids packaging system. rAAV2/9 and rAAV2/2 could express Kallistatin that had the activity of anti-angiogenesis. The purity of rAAV was detected by Silver stain. The molecular weight of rAAV2/9 and rAAV2/2 were detected by Western Blotting. The titers of rAAV were detected by real-time quantitative PCR (qPCR). After rAAV2/9- or rAAV2/2-Kallistatin infecting human umbilical vein endothelial cell (HUVEC), the expression levels of mRNA and protein were detected by reverse transcription PCR (RT-PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) respectively. The results indicated that the purity of rAAV was more than 98% and molecular weight of rAAV2/9 was more than rAAV2/2's. After infecting HUVEC, the expression levels of mRNA and protein of Kallistatin mediated by rAAV2/9 were higher than rAAV2/2's.

Keywords: recombinant adeno-associated virus type 9; Kallistatin; expression efficiency; HUVEC