

# 腺伴随病毒载体介导 Kringle5-GFP 基因在眼组织中的表达

宋哲<sup>1</sup>, 黎晓新<sup>2</sup>

作者单位:<sup>1</sup>(100078)中国北京市,北京中医药大学东方医院眼科;<sup>2</sup>(100078)中国北京市,北京大学人民医院眼科  
作者简介:宋哲,博士,副主任医师,副教授,研究方向:玻璃体视网膜疾病。

通讯作者:宋哲. songzslong@sina.com

收稿日期:2012-03-08 修回日期:2012-05-25

## Expression of adeno-associated-virus induced angiostatin Kringle5-GFP gene in SD rats' ocular tissues

Zhe Song<sup>1</sup>, Xiao-Xin Li<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China;

<sup>2</sup>Department of Ophthalmology, People's Hospital, Peking University, Beijing 100078, China

**Correspondence to:** Zhe Song. Department of Ophthalmology, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China. songzslong@sina.com

Received:2012-03-08 Accepted:2012-05-25

### Abstract

• **AIM:** To investigate the distribution of adeno-associated-virus induced angiostatin Kringle5-GFP gene in rats' ocular tissues after injected in vitreous cavity and to provide experiment basis to retinopathy treatment.

• **METHODS:** After injected rAAV-Kringle5-GFP with the titer  $2.5 \times 10^{12}$  vg/mL  $10 \mu\text{L}$  in vitreous cavity, the SD rats were sacrificed at day 1, 5, 10, 20, 40, 60 and 90. The distribution and expression of GFP in ocular tissues such as vitreous, retina, choroid, iris and so on were observed under green microscopy. The expression degrees were recorded as -, +, ++, +++ and ++++.

• **RESULTS:** Kringle5 expressed in vitreous at the day 1 after injection and increased with the time. After 5 days, it expressed in retina, ranged from optic disc to peripheral retinal tissues. In iris and choroid, Kringle5 showed a strong expression. It could also be found in corneal endothelium and crystalline lens.

• **CONCLUSION:** The adeno-associated-virus induced angiostatin Kringle5-GFP gene can strongly express not only in retina but also in other ocular tissues. Thus, adeno-associated virus is the best vector for gene in curing retina disease.

• **KEYWORDS:** rAAV-Kringle5-GFP; ocular tissues; animal experimentation

**Citation:** Song Z, Li XX. Expression of adeno-associated-virus induced angiostatin Kringle5-GFP gene in SD rats' ocular tissues. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2012;12(7):1251-1253

### 摘要

**目的:**探寻腺伴随病毒载体介导 Kringle5 基因注入玻璃体腔后,在眼球组织中的分布规律,为基因治疗视网膜病变提供实验依据。

**方法:**将已经构建包装好的 rAAV-Kringle5-GFP,滴度为  $2.5 \times 10^{12}$  vg/mL  $10 \mu\text{L}$  注入 SD 大鼠玻璃体腔后,分别在 1, 5, 10, 20, 40, 60, 90d 处死 SD 大鼠,在荧光显微镜下观察 GFP 在玻璃体、视网膜、脉络膜、虹膜等眼组织分布及表达情况。根据表达强度从无表达到强表达分别记为 -, +, ++, +++, +++++。

**结果:**在注射后第 1d,玻璃体中有轻度表达,随着时间的推移表达缓慢增强,分布较广泛;在玻璃体注射后第 5d 视网膜有表达,分布范围从视盘到周边部视网膜组织均出现且随着时间的推移表达增强;在虹膜、脉络膜组织表达也有较强表达;甚至在角膜内皮及晶状体组织也有表达。

**结论:**选用腺伴随病毒载体介导目的基因能够在视网膜组织和色素膜组织有较强表达,腺伴随病毒载体介导目的基因是治疗 ROP 视网膜新生血管较为理想的载体。

**关键词:**rAAV-Kringle5-GFP;眼组织;动物实验

DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2012.07.08

**引用:**宋哲,黎晓新.腺伴随病毒载体介导 Kringle5-GFP 基因在眼组织中的表达.国际眼科杂志 2012;12(7):1251-1253

### 0 引言

基因治疗是通过转染的方法将目的基因在机体组织内表达。至今发展的转染方法有多种,大致可分为非病毒介导法(物理、化学)和病毒介导法<sup>[1,2]</sup>。病毒介导的基因转移明显的优势是总体转染效率普遍较高,在细胞内不易降解,但多数只能对分裂状态时的细胞进行转染。腺伴随病毒是一种缺陷病毒,只有在伴随病毒存在的情况下才能在宿主内复制、包装,利用它作载体是目前认为比较理想的载体。本实验通过对 SD 大鼠玻璃体腔注入 rAAV-Kringle5-GFP,以观察腺伴随病毒载体介导目的基因在眼组织中的分布和表达规律,为基因治疗眼组织疾病提供实验依据。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** SD 大鼠 7 只由北京大学人民医院动物中心提供,属二级清洁动物;rAAV-Kringle5-GFP 由北京大学人民医院眼科中心提供;荧光显微镜;手术显微镜;托品酰胺;眼科纤维器械;微型注射器;2.5g/L 氯霉素眼药水。

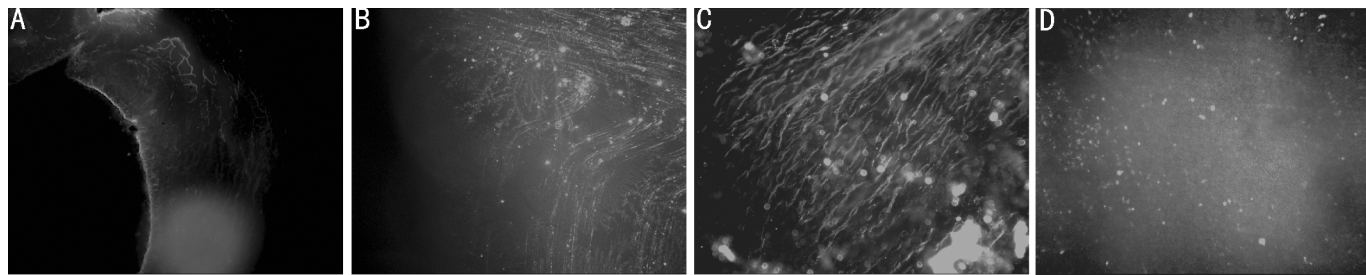


图1 玻璃体腔注射 Kringle5-GFP 腺病毒载体颗粒后 60d 在眼组织中的表达 A:虹膜;B:玻璃体;C:脉络膜;D:视网膜。

表1 玻璃体腔注射 Kringle5-GFP 腺病毒载体颗粒后不同时间在眼组织中的表达强度

眼内组织	1d	5d	10d	20d	40d	60d	90d
玻璃体	+	+	+	+	++	++	++
视网膜	-	+	++	+++	++++	++++	++++
虹膜	-	-	-	+	++	+++	+++
脉络膜	-	-	+	++	++	++	++

**1.2 方法** 取7只SD大鼠,用托品酰胺双眼散瞳孔。手术显微镜下,每只SD大鼠左右眼球玻璃体腔注射滴度为  $2.5 \times 10^{12}$  vg/mL rAAV-Kringle5-GFP 10 $\mu$ L,并编号。注射后,给SD大鼠双眼滴用2.5g/L氯霉素眼药水,3次/d,连续用药1wk,直至无炎症。分别在注射 rAAV-Kringle5-GFP 后第1,5,10,20,40,60,90d 麻醉下摘取眼球。用眼科显微器械分离角膜、虹膜、晶状体、玻璃体、视网膜、脉络膜组织并在荧光显微镜下观察 GFP 强度,并照相。根据荧光强度从无表达到强表达记为-,+,++,+++,++++。

## 2 结果

注射 rAAV-Kringle5-GFP 后第1d,玻璃体可见弱荧光,视网膜组织及其它组织未见荧光表达。第5d,玻璃体可见荧光点扩大,视网膜组织也见到荧光弱表达。第10d,玻璃体荧光较前稍有增加,范围扩大;视网膜组织表达较以前范围明显扩大,荧光强度稍微增强但是仍为弱表达;脉络膜组织及虹膜组织也可见到表达。第20d,玻璃体同前,视网膜组织表达增强,脉络膜组织及色素膜组织也增强,范围也在扩大。第40d,玻璃体荧光强度同前没有显著变化,视网膜组织荧光强度在范围和程度上较前有所增加,脉络膜及虹膜组织变化基本同前。第60d,视网膜、虹膜、脉络膜、玻璃体荧光强度较前均有所增加(图1)。第90d 上述组织除玻璃体组织表达有所下降外,其余组织表达同前,基本维持在原先表达水平上(表1)。另外我们在角膜内皮层及晶状体上也发现有荧光出现。说明利用腺伴随病毒载体介导目的基因可以在眼球各个组织中均有出现。

## 3 讨论

基因治疗需要目的基因在体内长期表达,就须使目的基因进入细胞核并与宿主染色体整合或在染色体外稳定地复制,选择有效的载体是解决这一问题的关键。理想的载体系统应具备<sup>[3]</sup>:(1)高浓度(病毒颗粒数  $>10^8$  vg/mL)可使许多细胞转染;(2)能整合到宿主染色体特定部位或能在染色体外稳定地复制;(3)产物可扩增;(4)能特异性地转染所需的细胞类型;(5)调节因子能对翻译产物进行调节;(6)不含免疫反应的成分。

腺伴随病毒 AAV 是一种无包膜的单链 DNA 缺陷型病毒,属细小病毒科,是目前世界上动物病毒中最小的病毒。病毒颗粒的直径只有20nm,呈20面体,正负链各半。

基因组 DNA 约4.7kb,由4680个碱基组成,具有2个开放性阅读框架(ORF)和反向末端重复序列。野生型腺伴随病毒不能单独存在,只有在辅助病毒存在的条件下才能在宿主中复制包装,产生新的病毒颗粒,否则只能是溶原性潜伏状态。腺伴随病毒可以 dsDNA 的形式整合入宿主染色体中,保持一种稳定的潜伏状态。潜伏感染人体时可以特异地整合到宿主细胞的19号染色体上<sup>[4]</sup>,在各种病毒载体系统中 AAV 载体系统安全性相对较高<sup>[5]</sup>。重组的 AAV 不具有 rep 基因,所以不能进行定位整合,但是它有其他优点:能减少宿主的免疫反应,减少基因治疗时的负作用;缺失 rep 基因的转染效率比有 rep 基因时更高。分裂期细胞和静止期细胞均能被感染<sup>[6]</sup>,外源基因可以长期稳定表达<sup>[7]</sup>,易于感染神经细胞,本实验也证实腺伴随病毒载体介导 GFP 基因在视网膜组织中表达最强。由于以上特点,AAV 载体逐渐受到人们重视<sup>[8]</sup>。

本实验中,我们采用示踪蛋白 GFP 跟踪目的基因表达情况,将一定的滴度 rAAV-Kringle5-GFP 注入玻璃体腔中来观察其在眼球组织中的分布情况。发现表达产物不仅早期在原始部位玻璃体腔中有较早表达,而且表达时间较长,随着时间的推移表达有所增强,然后表达下降,可能和玻璃体细胞数目少有关;由腺伴随病毒载体介导目的基因在视网膜中较早也有表达,表达随着时间的推移而增加,而且这种增加幅度较大,这可能和腺伴随病毒易于亲和视网膜神经组织有关。另外我们发现,目的基因在脉络膜组织和虹膜组织中也有较高表达,而且持续时间较长,至于虹膜组织为什么表达较强,是否和血液循环有关,这有待于进一步研究;另外我们在晶状体和角膜内皮组织中也发现有目的基因的表达。根据以上的研究,我们发现利用腺伴随病毒载体来介导目的基因比较适合于视网膜组织病变,也适合于色素膜组织的新生血管的治疗。玻璃体组织中新生血管的治疗也有一定的作用。在我们研究治疗 ROP 视网膜新生血管实验中,腺伴随病毒载体是一个比较理想的载体。

本实验中我们将 AAV-Kringle5-GFP 注入玻璃体腔中,根据 GFP 在不同时间、组织、表达强度绘制成图,根据图形曲线可以看出利用 AAV 载体介导目的基因在不同组织表达趋势:在视网膜组织中,目的基因表达随着时间推移而增强,可以较长时间维持在较高表达水平。说明利用

AAV 载体比较适合于视网膜病变如新生血管治疗、视网膜劈裂等疾病的治疗;根据图示曲线,在脉络膜组织中,目的基因开始是低表达,稳定一段时间后表达较强,虽然这种表达强度没有视网膜组织强,但是仍旧维持一个比较高的水平。脉络膜组织出现的病变如年龄相关性黄斑变性(AMD)、高度近视眼新生血管、中渗等眼底疾病往往是较难治疗的疾病,手术效果往往欠佳,利用 AAV 能够在脉络膜组织中有较高表达而且维持较长时间,如果将目的基因注入脉络膜组织中则可以起到预防和治疗这些疾病的目的;虹膜组织新生血管可以引起难治性青光眼,因此对其新生血管的治疗和预防也是至关重要。我们发现,虹膜组织表达情况除了最初长时间无表达和低表达外,其余基本同脉络膜组织表达情况,表达也能达到较高水平,根据这一特点我们可以反复多次注射或就近病变部位注射来维持高表达,达到治疗目的。因此利用 AAV 载体治疗和预防虹膜新生血管也可能达到一定效果。我们发现在玻璃体组织中 GFP 表达一直维持在较低水平,这是否和玻璃体组织细胞数少有关,还需要进一步研究。总之,利用 AAV 载体基因介导目的基因不仅是治疗 ROP 视网膜新生血管或视网膜疾病理想载体,也可能是治疗脉络膜、虹膜组织疾病理想的载体。

#### 参考文献

- 1 Boulton M, Gregor Z, McLeod D, *et al.* Intravitreal growth factors in proliferative diabetic retinopathy: correlation with neovascular activity and glycaemic management. *Br J Ophthalmol* 1997;81(3):228-233
- 2 Stone J, Chan-Ling T, Pe'er J, *et al.* Roles of vascular endothelial growth factor and astrocyte degeneration in the genesis of retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37(2):290-299
- 3 Cao G, Li Y, Zhang D, *et al.* Unbalanced expression of VEGF and PEDF in ischemia-induced retinal neovascularization. *FEBS Lett* 2001;489(2-3):270-276
- 4 Goldspiel BR, Green L, Calis KA, *et al.* Human gene therapy. *Clin Pharm* 1993;12(7):488-505
- 5 Marshall E. Gene therapy's growing pains. *Science* 1995;269(5227):1050-1055
- 6 Halbert CL, Alexander IE, Wolgamot GM. Adeno-associated virus vectors transduce primary cells much less efficiently than immortalized cells. *J Virol* 1995;69(3):1473-1479
- 7 Flotte TR, Afione SA, Conrad C, *et al.* Stable *in vivo* expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with an adeno-associated virus vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90(22):10613-10617
- 8 Ussell DW, Way MA. Adeno-associated virus vectors and Hematology. *Blood* 1999;94(3):864-874