

腺病毒载体介导的 lac Z 基因在 NG 细胞系及大鼠黑质的表达^①

万有 马端端 王晓民 王昕虹 经兴军 徐国恒 于常海* 韩济生

(北京医科大学 神经科学研究中心, 卫生部神经科学重点实验室, 北京 100083;

*香港科技大学 生物学系)

关键词 腺病毒载体 标记基因 基因表达 NG 细胞系 黑质

摘要 本实验用标记基因 lac Z 5 型重组腺病毒(Ad₅CMVlacZ)转染培养的 NG 细胞系, X-gal 染色检测转染效率。在培养的 NG 细胞系, 当病毒滴度为 2×10^8 时, 转染率达到 50%, 当滴度为 2×10^9 时, 转染率达 100%, 有较好的量效关系; 固定病毒滴度为 10^{10} , 培养 2~16 h, 细胞的转染率随时间延长而提高, 有较好的时效关系。将 Ad₅CMVlacZ 注射到大鼠黑质部位后, 分别于注射后 3~120 d 取脑、切片、X-gal 染色, 发现黑质局部从第 7 d 开始有部分蓝染, 第 10 d 达高峰, 注射局部感染率 100%; 90 d 时开始下降, 持续至 120 d; 纹状体等其它部位无蓝染。上述结果提示, 腺病毒载体介导的标记基因可在培养的神经细胞系和中脑黑质部位高效表达, 为进一步开展中枢神经系统退变性疾病尤其是帕金森氏病的基因治疗奠定基础。

为了将外源基因转移到脑内进行中枢神经系统疾病的基因治疗研究, 选择安全有效的载体系统至关重要。逆转录病毒(retrovirus, RV)是目前基因转移最常用的载体, 已应用于绝大多数临床基因治疗实验, 这与其生活周期和基因组结构了解清楚有关。但 RV 因为不能感染分裂终止的神经元而无法应用于中枢神经系统^[1,2]。近些年来腺病毒(Adenovirus, Ad)载体发展很快, 目前它已成功地 will 外源基因转移至多种细胞和器官, 包括肝细胞和肌管细胞(myotube)^[3,4]。

帕金森氏病(PD)是中枢神经系统的慢性退行性疾病, 虽然病因不清, 但其病理改变明确, 即黑质局部的多巴胺(DA)能神经元变性、坏死。在常规治疗长期效果欠佳的情况下, 人们试图采用两种方式来进 行基因治疗: 一是以 DA 合成的限速酶——酪氨酸羟化酶

(TH)为目的基因来进行补充治疗, 另一种方法是以神经营养因子为目的基因来进行治疗, 以减缓 DA 神经元的变性、坏死。这两种方式都需要高效且安全的载体系统。Akli 等^[6]曾报道过重组腺病毒可高效地将标记基因 lac Z 转入小鼠大脑半球, 并表达持续 8 周。很明显, 要进行 PD 这样的慢性病的基因治疗, 表达仅仅 8 周还不够, 只能在大脑半球表达也还远远不够。从 PD 的基因治疗的角度考虑, 能在黑质表达、并长时程地表达, 才能满足要求。为此, 本文首先观察了含 lac Z 标记基因的重组 5 型复制缺陷型腺病毒(Ad₅CMVlacZ)在培养的 NG 108-15 细胞系的表达的量效关系和时效关系, 借以确定该重组腺病毒表达 lac Z 的效率, 在此基础上, 观察了 Ad₅CMVlacZ 在大鼠中脑黑质部位表达的时程及空间分布关系, 以期为应用重

① 国家自然科学基金资助项目

组腺病毒载体进行PD的基因治疗奠定基础。

材料和方法

1. 材料

重组5型复制缺陷型腺病毒lacZ(Ad₅CMVlacZ):由陈光慧博士和汤健教授惠赠; NG 108-15细胞系:瑞典卡罗琳斯卡学院Lars Terenius教授惠赠; Wistar大鼠:北京医科大学实验动物部供应; X-gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside), BRL Life Technologies; DMEM培养基、氨基嘌呤、次黄嘌呤、胸腺嘧啶核苷、Nonidet P-40(NP-40, non-ionic detergent); Sigma公司; 铁氰化钾、亚铁氰化钾:北京化工厂; 25%戊二醛水溶液:北京益利精细化学品有限公司。

2. 溶液准备

HT母液(100 \times):含次黄嘌呤 10^{-2} mol/L、胸腺嘧啶核苷 1.6×10^{-3} mol/L。

A母液(100 \times):含氨基嘌呤 4×10^{-5} mol/L。

PBS: 150 mmol/L NaCl, 15 mmol/L Na₂HPO₄-NaH₂PO₄缓冲液, pH 7.3。

组化液: PBS含5 mmol/L铁氰化钾, 5 mmol/L亚铁氰化钾, 2 mmol/L MgCl₂。

染色液: 用上述组化液将20% X-gal的DMSO溶液稀释1,000倍。

3. NG 108-15细胞系的培养

将细胞种植于24孔培养板, 所用培养基为DMEM+10%小牛血清。每1,000 ml培养基于用前加入100 \times HT母液10 ml和100 \times A母液25 ml(终浓度: 次黄嘌呤 10^{-4} mol/L、胸腺嘧啶核苷 1.6×10^{-5} mol/L、氨基嘌呤 10^{-6} mol/L), 以抑制细胞突变。细胞置于37 $^{\circ}$ C含5% CO₂的培养箱中培养。

4. Ad₅CMVlacZ转染NG细胞系

当细胞长至80%~90%融合、细胞数约为 10^5 时, 换为无血清培养基0.5 ml, 分别加

入 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 1×10^{10} pfu/ml不同滴度的Ad₅CMVlacZ, 继续培养24 h, 观察不同滴度重组病毒对转染效率的影响, 即量效关系; 固定病毒滴度为 10^{10} pfu/ml, 加入病毒后继续培养2、4、8、12、16 h后进行X-gal染色, 观察不同孵育时间对转染效率的影响, 即所谓的时效关系。

5. 转染的NG细胞X-gal染色

上述Ad₅CMVlacZ转染的NG细胞培养到一定时间进行X-gal染色, 蓝染者为阳性。染色程序如下: ①培养皿经0.1 mol/L PBS洗3次; ②0.25%戊二醛溶液4 $^{\circ}$ C固定10 min; ③PBS洗3次; ④加入X-gal组化染色液1.0 ml, 置于37 $^{\circ}$ C湿盒24 h; ⑤PBS洗3次; ⑥酒精脱水; ⑦二甲苯透明; ⑧封片, 光镜下观察, 并计算转染率(%)。

6. 大鼠脑立体定位注射

Wistar大鼠30只, 雌雄兼用, 体重276 \pm 23 g, 10%三氯水合乙醛(0.3~0.4 ml/100 g体重)腹腔麻醉。将动物固定于立体定位仪, 在无菌条件下, 按照Paxinos和Watson鼠脑解剖图谱^[6]埋管, 坐标为前囟后4.8 mm, 中线旁开1.8 mm。术后3 d, 在麻醉状态下经外套管的内芯注入Ad₅CMVlacZ溶液, 病毒滴度为 2.2×10^{10} pfu/ml, 注射量为4 μ l, 深度为颅骨表面下8 mm。注射速度为0.5 μ l/min, 注射后留针5 min。对于对照组动物注射等量和等滴度的缺乏lacZ的、E₁区缺陷的5型野生型腺病毒。手术后按常规饲养动物。

7. 大脑切片的X-gal染色

分别于注射后3、7、14、21、30、45、60、90、120 d, 在麻醉状态下取出完整的脑组织。每一时间点, lacZ组两只动物, 对照组一只动物。OCT包埋下, 速入-50 $^{\circ}$ C正己烷冷冻, -20 $^{\circ}$ C恒冷箱做额状冰冻切片, 片厚15 μ m。存于-20 $^{\circ}$ C冰箱内, 待X-gal染色。染色程序与前述的NG细胞染色相同。染色后在

光学显微镜下观察细胞蓝染状况,并计算阳性蓝染百分率。

结 果

1. Ad₅CMVlacZ 转染 NG 细胞系的量效曲线

不同滴度的重组病毒 ($10^5 \sim 10^{10}$ pfu/ml) 加到上述的 NG 细胞培养孔中, 细胞数

约为 10^5 。24 h 后进行 X-gal 染色, 细胞内如果有 lac Z 基因的表达, β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase) 则将 X-gal 分解, 生成蓝色产物, 从而使该细胞蓝染。如 Fig. 1 所示, 细胞转染率随着病毒滴度的增加而提高, 当病毒滴度达到 1×10^8 时, 转染率已达 50%; 达到 2×10^9 时已达 100%。有良好的剂量-效应关系。

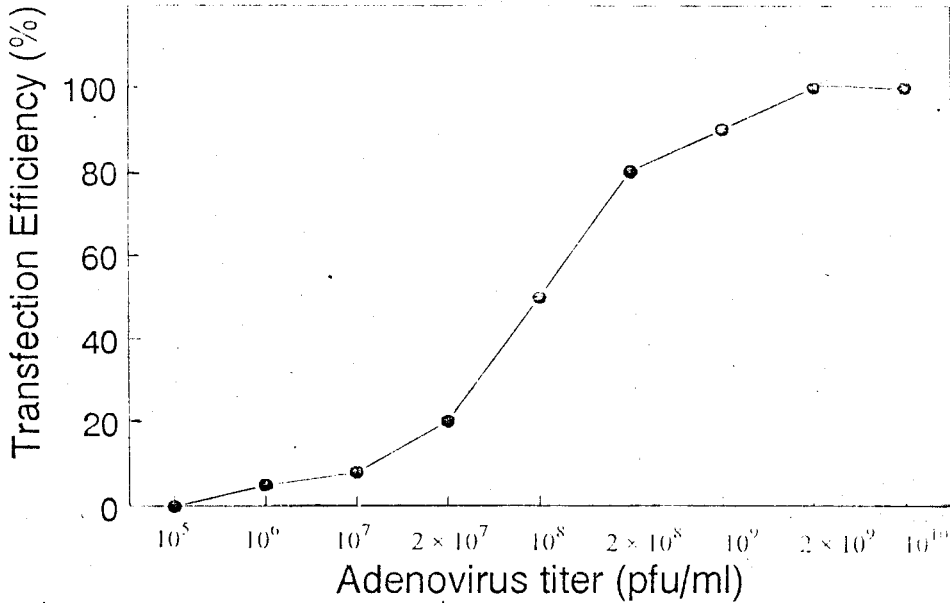


Fig. 1 Dose-effect relationship of Ad₅CMVlacZ transfection in NG cell line.

2. Ad₅CMVlacZ 转染 NG 细胞系的时效曲线

向培养的细胞加入 1×10^{10} pfu/ml 固定浓度的 Ad₅CMVlacZ, 分别培养 2~16 h 后, X-gal 染色观察转染率。由 Fig. 2 可见, 转染后 8 h 即有大约 50% 的细胞呈现阳性, 12 h 已近 100%。有良好的时间-效应关系。

3. Ad₅CMVlacZ 大鼠黑质立体定位注射在体表达的时程、部位分布

注射部位仅仅局限于黑质致密部。切片上可清晰见到针孔部位, 有少数黑褐色的出血点状坏死物质。全部蓝染均围绕在针孔的周围。在表达的最高峰时, 表达范围直径不超过 1,000 μ m。在观察 lac Z 黑质部位表达的

时程时发现, 注射后 3 d 有极个别蓝染细胞, 7 d 开始有部分 (约 20%) 蓝染的细胞, 随着时间的延长, 蓝染的程度越来越强烈, 高峰出现于第 30 d, 几近 100%; 随后蓝染细胞百分率有所下降, 45 d 约 50%, 60 d 约 30%, 90 d 约 20%, 但一直持续到 120 d 仍有约 10% (Fig. 3)。本文 Fig. 4 的 A~D 示黑质部位注射后第 7, 30, 120 d 和纹状体注射后 30 d 的 lac Z 的表达状态。

注射野生型 5 型腺病毒的黑质, 注射 Ad₅CMVlacZ 对侧黑质及其它结构, 如大脑皮层、纹状体、小脑等, 无论哪个时程, 均未见到蓝染细胞。

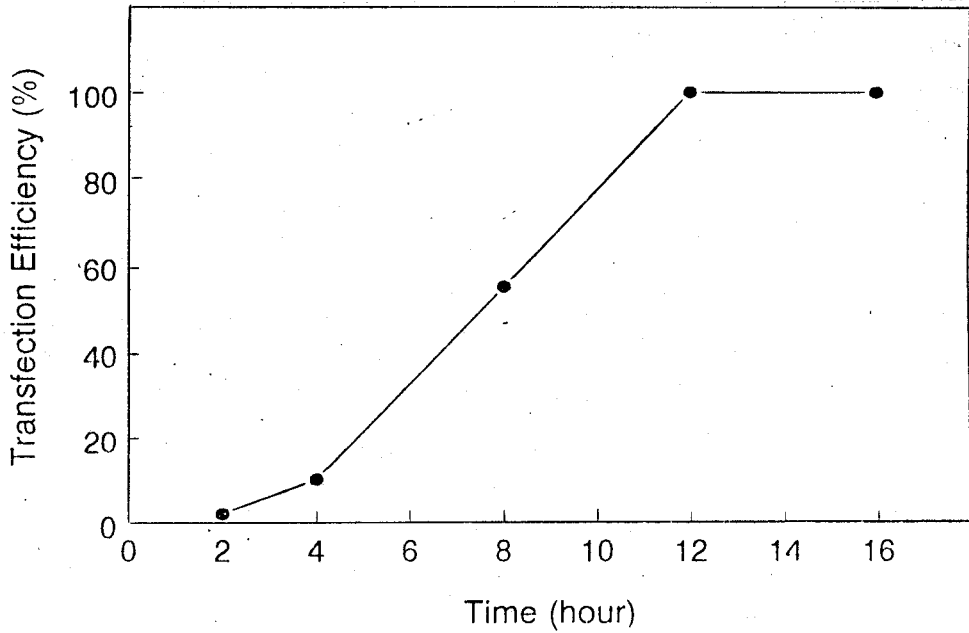


Fig. 2 Time-effect relationship of Ad₅CMVlacZ transfection in NG cell line.

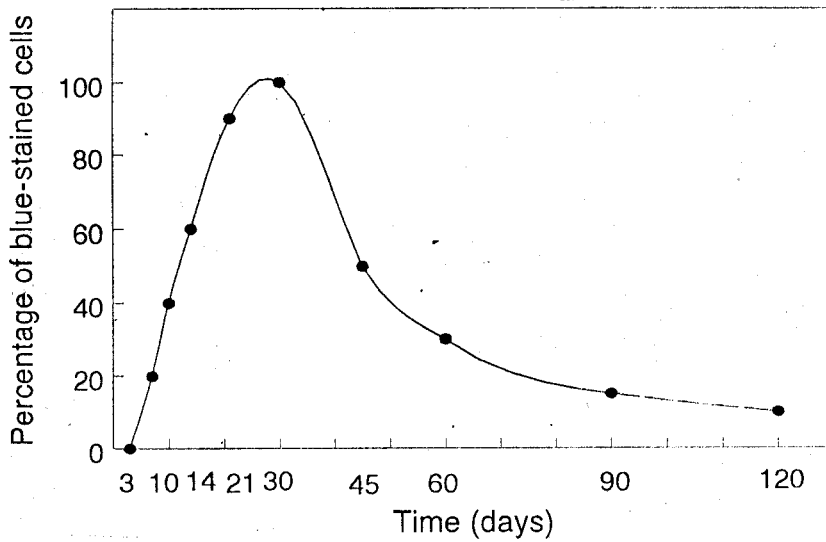


Fig. 3 Percentage change of X-gal-stained blue cells in brain slices after injection of Ad₅CMVlacZ into substantia nigra.

在整个观察过程中,有极个别动物出现脑内化脓性感染,对此删除不用。未发现动物出现其它病态或死亡,亦未发现行为异常。

讨 论

重组复制缺陷型腺病毒是近年发展起来的较理想的基因转移载体。具有以下优点^[2]: (1) 转染效率高,几近100%; (2) 不仅可以感染分裂的细胞,还可以感染完成分裂的细胞,比如神经元; (3) cDNA 包装容量大; (4) 培养时病毒的产量高。所以近年来在脑内基

因转移中,重组腺病毒开始得到广泛应用。

从实验的结果可以看出,本实验采用 Ad₅CMVlacZ 在转染培养的 NG 细胞时,有较好的量效关系和时效关系。当病毒滴度达到 2×10^9 pfu/ml 时,转染率达到 100%;当病毒滴度为 10^{10} pfu/ml 时,培养 12 h 后转染率达到 100%。这说明 Ad₅CMVlacZ 具有很高的转染率。

在细胞实验的基础上,本文作者还观察了 Ad₅CMVlacZ 注射黑质部位后的标记基因 lac Z 的表达状况。同样,Ad₅CMVlacZ 有很高的转染率,在注射后 7 d 即可见明显的蓝染,第 30 d 转染率达到近 100%,这样的表达可持续 120 d 之久。说明该重组腺病毒载体在中枢神经同样有较高的转染效率。

本实验所用的重组腺病毒 Ad₅CMVlacZ 来自 E₁ 区缺陷的 5 型野生型腺病毒。人巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)早期启动子/增强子用来驱动 lac Z 的表达,SV 40 多聚腺苷酸序列(poly A)位于该报道基因的下游^[7]。Davidson 等^[8]用同样重组腺病毒 lac Z 直接注射到 C3H/HeJ 小鼠的右侧大脑半球近纹状体部位,采用 X-gal 染色检测 lac Z 的表达,发现 lac Z 的表达可持续 8 周。本实验结果说明,腺病毒介导的外源基因在大鼠黑质的表达可持续更长的时间,直至 120 d。

对照组注射不含标记基因 lac Z 的野生型腺病毒未出现蓝染,表明 Ad₅CMVlacZ 的蓝染是 lac Z 特异性的。

对于 PD 的基因治疗,目前采用的目的基因主要有 TH 和神经营养因子两大类。影响基因治疗效果的另一重要因素是载体。国内外开展的 PD 基因治疗已取得初步成果。Ono 等^[9]采用脂质体包裹标记基因质粒 DNA 注射到小鼠大脑,外源基因的表达不超过 3 周;曹 蕾等^[10]用同样的脂质体包裹的方法观察了直接注射 TH 裸质粒对实验性 PD 的治疗作用,虽方法简便,但疗程亦过短;最近徐群渊等^[11]用 *ex vivo* 的方法,先在体外用脂质体将 TH 真核表达质粒转染至原代培养的骨骼肌细胞内,再将这些细胞植入模型大鼠的纹状体,在所观察的 23 周内,可改善动物的异常运动,这种方法比裸质粒注射的时间长,但是全部操作比较烦琐。本文则将 Ad₅CMVlacZ 直接注射到大鼠黑质,外源 lac Z 基因表达可经过较长时间,达 120 d 之久,一定程度上结合了上述两种方法的优点:操作简便和表达时程较长。lac Z 基因是标记基因,只要用目的基因如 TH 基因或神经营养因子基因将 lac Z 基因置换下来,即可用此载体有效地将外源基因导入中脑的黑质部位或其它脑区,从而可用于基因治疗或其它脑功能的研究。

本研究得到国家教委跨世纪优秀人才基金,卫生部特别基金,香港北美医学基金会等的资助;北京医科大学汤 健教授和陈光慧博士惠赠 5 型重组腺病毒 lac Z,谨在此并致谢忱。

(收稿 1996-08-14)

本文图 4 见版图 53 页

参 考 文 献

- [1] Culver KW, Ram Z, Wallbridge S, et al. *In vivo* gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science*, 1992;256:1550~1552
- [2] Ali M, Lemoine NR, Ring CJA. The use of DNA viruses as vectors for gene therapy. *Gene Therapy*, 1994;1:367~384
- [3] Quantin B, Perricaudet LD, Tajbakhsh S, et al. Adenovirus as an expression vector in muscle cells *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992;89:2581~2584

- [4] Jaffe HA. Adenovirus-mediated *in vivo* gene transfer and expression in normal rat liver. *Nature Genetics*. 1992;1:372~378
- [5] Aklis S, Caillaud C, Vigne E, *et al.* Transfer of a foreign gene into the brain using adenovirus vectors. *Nature Genetics*, 1993;3:224~228
- [6] Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Second edition, Australia, Academic Press, 1982
- [7] Zhou H, Zeng GB, Zhou AR, *et al.* Adenovirus mediated gene transfer of vascular smooth muscle cells and endothelial cells *in vitro*. *Chinese Medical Journal*, 1995;108:493~496
- [8] Davidson BL, Allen ED, Kozarsky KF, *et al.* A model system for *in vivo* gene transfer into the central nervous system using an adenoviral vector. *Nature Genetics*, 1993;3:219~223
- [9] Ono T, Fujino Y, Tsuchiya T, *et al.* Plasmid DNAs directly injected into mouse brain with lipofectin can be incorporated and expressed by brain cells. *Neurosci Lett*, 1990;117:259~263
- [10] 曹 蕾, 郑仲承, 刘新垣, 等. 帕金森病 DNA 法基因治疗的实验研究. *生物化学与生物物理进展*, 1994;21:369~370
- [11] 徐群渊, 田克生, 张进禄, 等. 基因治疗帕金森氏病大鼠模型的实验研究. *神经解剖学杂志*, 1996;12:95~102

ADENOVIRUS-MEDIATED LAC Z GENE EXPRESSION IN CULTURED NG CELL LINE AND IN RAT SUBSTANTIA NIGRA

Wan You, Ma Duanduan, Wang Xiaomin, Wang Xinhong,
Jing Xingjun, Xu Guoheng, *Albert C. H. Yu, Han Jisheng

(Neuroscience Research Center, Key Laboratory for Neuroscience Research,
the Ministry of Public Health, Beijing Medical University, Beijing;

*Department of Biology, Hong Kong University of Science and Technology, Hong Kong)

Key words adenovirus vector, marker gene, gene expression, NG cell line, substantia nigra

The present study was undertaken to investigate the efficiency of transfection of adenovirus vector-mediated foreign marker gene by observing the expression of adenovirus-lac Z (Ad₅CMVlacZ) in cultured NG cell line and in rat substantia nigra. In cultured NG cell line, the transfective rate is about 50% when the virus titer is 2×10^8 pfu/ml, whereas up to 100% when the virus titer is 2×10^9 pfu/ml, indicating a well-established dose-effect relationship. Furthermore, there is a perfect time-effect relationship when the NG cell is cultured from 2~16 hours after Ad₅CMVlacZ transfection with virus titer fixed at 10^{10} pfu/ml. *In vivo* experiment of rat, the recombinant virus is stereotaxically injected into substantia nigra with $4 \mu\text{l}$ of 2×10^{10} pfu/ml. Brain slices at $15 \mu\text{m}$ thickness is collected at 3 days to 120 days after injection respectively. Then the slices is stained with X-gal. If infected with Ad₅CMVlacZ, the transfected cells (including neurons and glia cells) will be stained blue. It is found that the blue staining appears at the day 7, reaches peak at day 10 with the infections rate of nearly 100%, comes down from 90 days and sustains at day 120. No blue staining is found in striatum and other areas for the whole experiment. The above results indicate that the recombinant adenovirus Ad₅CMVlacZ can transfect and express in the cultured NG cell line as well as in the dopaminergic neurons of rat substantia nigra with high efficiency. These results give us a clue to the basic research on the adenovirus-mediated gene therapy of Parkinson's disease.

(Figure 4 on plate 53)

Explanation of Figures

Fig. 4 Expression of transfected marker gene lac Z in substantia nigra after Ad₅CMVlacZ injection. A, substantia nigra at day 7 B, substantia nigra at day 30 C, substantia nigra at day 120 D, striatum at day 30

万 有等 腺病毒载体介导的 lac Z 基因在 NG 细胞系及大鼠黑质的表达

(图说明见正文末页)

