

## 直接注射含人Ⅸ因子 cDNA 质粒在小鼠体内的表达

卢珂 邱信芳 薛京伦

复旦大学遗传学研究所 上海 200433

**摘要** 本文报道了2种分别由人巨细胞病毒(hCMV)启动子和SV40早期启动子控制的人Ⅸ因子cDNA质粒pCMV-Ⅸ, pKG5-Ⅸ直接注射小鼠骨骼肌内,在肌细胞中可产生Ⅸ因子蛋白,并分泌至血液中,在注射后约第10d表达量最高,最高含量可达25ng/ml,为采用直接注射法进行遗传病基因治疗提供1种可能。

**关键词** 基因表达;人凝血因子Ⅸ;肌肉直接注射

## EXPRESSION OF HUMAN FACTOR Ⅸ cDNA BY INTRAMUSCULAR INJECTION WITH PLASMID IN MICE

Lu Ke, Qiu Xinfang, Xue Jinglun

*Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433*

**Abstract** This study showed that human factor Ⅸ protein can be produced in myocytes and secrets into blood stream after plasmid containing human factor Ⅸ cDNA driven by hCMV and SV40 early promoter is directly injected into skeletal muscles of mice respectively. The maximum level in mouse plasma we have detected is 25ng/ml at 10d. This experiment explores the possibility of gene therapy for hereditary diseases by direct injection *in vivo*.

**Key words** gene expression; human clotting factor Ⅸ; direct intramuscular injection

血友病B是由于凝血因子Ⅸ(简称Ⅸ因子)缺乏所致的1种严重的遗传性出血性疾病,呈X连锁隐性遗传。其临床治疗主要靠输血或补充人Ⅸ因子浓缩制剂,但反复输血不仅费用昂贵,且可能使患者感染爱滋病毒及肝炎病毒。因此,建立1套方便、有效的血友病基因治疗方法有着极其重要的意义。目前采用的基因治疗方法是先取出病人的体细胞(如成纤维细胞),培养到一定数量后,使用病毒载体或物理、化学方法将外源基因转入受体细胞,经过

选择,测定表达量,然后进行一系列安全性检测,确定其安全性和一定的表达量后,再输回病人体内。即所谓*ex vivo*基因治疗,它虽具有整合稳定,高效表达等优点,但手续繁琐,其应用也有一定的限制。

1990年Wolff JA.等首次将含lacZ和CAT基因的质粒注射到小鼠骨骼肌及心肌内<sup>(1,2)</sup>,结果在肌肉中检测到相应的蛋白产物,持续时间达1年之久<sup>(3)</sup>。1991年,他们又将含DMD基因cDNA的质粒注射到mdx小鼠肌肉中<sup>(4)</sup>,结果在肌纤维中检

测到肌营养不良蛋白, 该试验为基因治疗展现了1条崭新的途径。

为寻求更简捷的技术进行基因治疗, 我们采用直接注射基因法的小鼠试验, 将含人巨细胞病毒(hCMV)启动子和由SV40启动子分别启动的人IX因子cDNA的2种质粒注射到小鼠大腿骨骼肌, 结果用ELISA和免疫组织化学的方法在肌肉组织和外周血液中均检测到IX因子蛋白的存在, 血浆中IX因子浓度最高为25ng/ml, 但表达持续时间一般在15d左右。

## 材料和方法

### 1. 材料

1.1 质粒: pKG5-IX 质粒由英国牛津大学 G.G. Brownlee 教授赠送 (图 1), pCMV-IX 质粒由本实验室构建(图 2)。(5)

1.2 动物: 昆明种小白鼠, 年龄 50~60d, 体重 30~40g, 购自第二军医大学动物实验中心。

1.3 ABTS 为美国 Sigma 公司产品。

牛血清白蛋白(BSA)购自上海长阳生化制药厂, 鼠抗人IX因子单克隆抗体 3A6, 由日本奈良医院 Yoshioka 博士赠送。

兔抗人IX因子抗血清和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体, 均为美国 Calbiochem-Behring 公司产品。

1.4 ABC(卵白素生物素-过氧化物酶复合物, Avidin biotin peroxidase complex)法染色 Kit 盒购自美国 Vector 公司。

### 2. 方法

2.1 注射用 DNA 溶液的制备: 参照 Sambrook 等(6)的碱变性法提取, 纯化质粒 pKG5-IX, pCMV-IX, 并以电泳法测定其浓度和纯度, 然后按 1mg/ml 的浓度稀释质粒于生理盐水或 PBS 中。

2.2 质粒的肌肉直接注射: 先将小鼠用戊巴比妥钠麻醉 (70μg/g 体重), 然后在皮

肤上划开 1cm, 以使观察到肌肉组织 (操

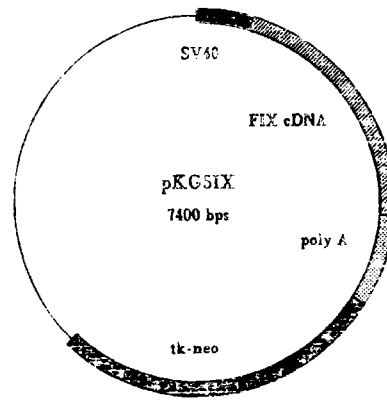


图1 重组质粒 pKG5-IX 的结构

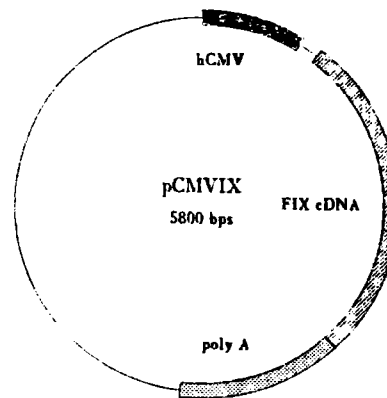


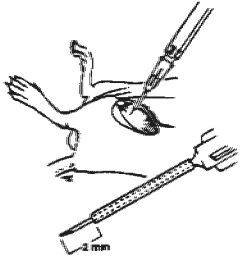
图2 质粒 pCMV-IX 结构图

作熟练者可省略此步骤) 使用 1ml 注射器及 5 号针头将质粒溶液注射到小鼠四头肌肉, 针头进入肌肉 0.2cm, 注射时间 30s~60s, 注射量为 50~100μl。对照组注射等量的生理盐水或 PBS(图 3)。

2.3 血浆标本收集: 实验前, 小鼠均预先抽取血样作为注射前对照。注射质粒后, 每隔 3~5d 抽血 1 次, 由尾静脉抽血, 肝素 (20U/ml 血) 抗凝, 10,000r 离心 2min 后, 取血小板的血浆 -20℃ 保存。

2.4 ELISA 法测定人IX因子蛋白含量, 按本实验室已建立的方法(7)。

2.5 免疫酶标组织化学: 按 PAP 法进行(8)。



本图引自文献(14)

图3 颗粒液直接注射于小鼠头肌内

- ① 将小鼠肌肉组织块以10%中性福尔马林溶液固定，然后作石蜡切片。
- ② 切片脱蜡至水。
- ③ 1%过氧乙酸，80%甲醛溶液处理20min，以抑制内源性过氧化物酶。
- ④ PBS洗涤3次，每次3min。

- ⑤ 以鼠抗人IX因子单克隆抗体(3A6，按1:100稀释)覆盖标本，置37℃保温1h。
- ⑥ PBS洗涤3次，每次3min。
- ⑦ 以生物素化马抗鼠IgG(按1:200稀释)覆盖标本，置37℃保温1h。
- ⑧ PBS洗涤3次，每次3min。
- ⑨ 以ABC(按1:1000稀释)覆盖标本，置37℃保温1h。
- ⑩ PBS洗涤3次，每次3min。
- ⑪ DAB(联苯胺)-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液显色。
- ⑫ 苏木精复染、脱水、透明、封片、镜检、拍照。

### 结果

#### 1. IX因子在肌肉中的表达:

鼠#11注射pKGS-IX后12d，注射部位肌肉切片的免疫组织化学结果如图4所示，深色部分为具有IX因子表达的肌纤维。

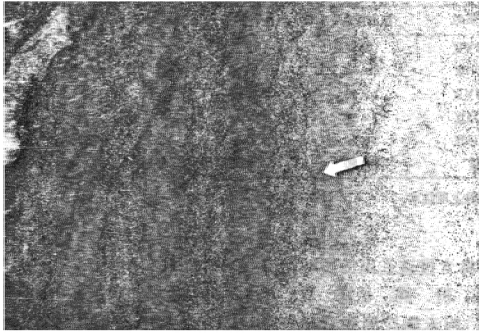


图4 鼠#11注射部位肌肉切片ABC法染色结果的照片  
图中深色部份为表达因子的肌纤维

#### 2. 血浆IX因子的分布:(图5、表1)

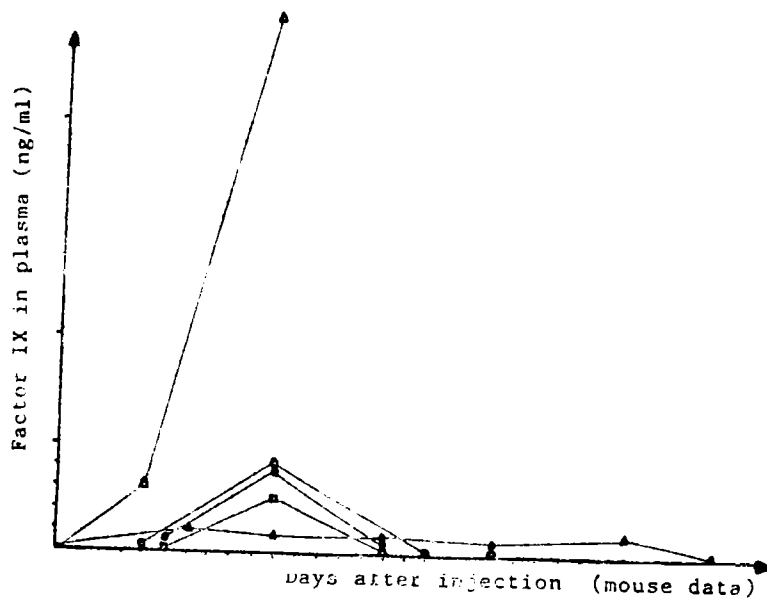


图5 注射后小鼠血浆中IX因子变化曲线(ELISA检测)

▲: 鼠<sup>#</sup>9      ○: 鼠<sup>#</sup>10      □: 鼠<sup>#</sup>12      △: 鼠<sup>#</sup>11      ●: 鼠<sup>#</sup>8

表1 质粒注射小鼠肌肉后IX因子在血浆中的表达

小鼠	注射质粒	注射量( $\mu$ l)	注射部位(后肢)	最高表达量(ng/ml)	持续时间(d)
9 <sup>#</sup>	PCMVIX	50	右腿	1.2	30
11 <sup>#</sup>	pKG5IX	2 × 50	双腿	25	10 <sup>* *</sup>
10 <sup>#</sup>	pCMVIX	2 × 50	双腿	3.2	17
8 <sup>#</sup>	pKG5IX	2 × 50	双腿	3.0	15
12 <sup>#</sup>	pKG5IX	2 × 50	双腿	2.0	15
1 <sup>#</sup>	对照 <sup>*</sup>	2 × 50	双腿	0	0

\*: 对照鼠仅注射生理盐水      \* \*: 在第10d杀死

## 讨论

Wolff 小组将含报道基因的质粒注射到各种动物的脑、肝、脾、子宫、胃、肺和肾等组织后,均未能检测到质粒的表达,用现有方法只在小鼠肌肉组织中才能检测到外源 DNA 的表达<sup>(2)</sup>。

然而肌纤维吸收质粒 DNA 的机制并不完全清楚,骨骼肌具有多核细胞、细胞膜穴样内陷和横管状系统(transverse (T) tubules)等特性。目前一般认为肌纤维吸收

DNA 是借助于 T 管状系统,因高渗溶液有助于液体进入 T 管状系统,而高渗的蔗糖或盐溶液可提高质粒表达量,估计吸收 DNA 得益于肌肉内部的生理过程,如通过 T 管状系统的细胞内吞作用。而肌纤维允许多核存在的机制可能也是外源质粒 DNA 不易降解的原因。

本实验不仅在肌肉组织中检测到 IX 因子的表达,而且在血浆中也观察到一定的

IX因子含量,说明肌肉组织不仅可以吸收、表达IX因子cDNA,而且可将蛋白产物分泌至血液中,提供了直接法基因转移治疗血友病的可能性。正常人血浆中IX因子的浓度为5 $\mu$ g/ml,比本实验中最高表达量25ng/ml高得多;但考虑到人IX因

子在小鼠体内是外源蛋白比在人体内的半衰期(20h短得多,约为7h),据此,我们得到的这一表达量还是有价值的,与用反转录病毒介导的方法在大鼠和小鼠中的表达量相当。表2列出几种基因转移方法在动物试验中结果的比较。

表2 几种动物试验的比较

方法	受体细胞	基因转移方法	最高表达量(ng/ml)	持续时间(d)	参考文献
<i>ex vivo</i>	人成纤维细胞	反转录病毒介导	190	14	9
<i>ex vivo</i>	大鼠成纤维细胞	反转录病毒介导	23	45	9
<i>ex vivo</i>	小鼠胚胎成纤维细胞	反转录病毒介导	25	23	10
<i>ex vivo</i>	人成纤维细胞	反转录病毒介导	105	12	11
<i>ex vivo</i>	人角质细胞	反转录病毒介导	3	7	12
<i>in vivo</i>	小鼠骨骼肌	直接注射质粒	25	30	本文

Southern blotting的结果表明直接注射到肌肉组织中的质粒并没有整合到染色体上<sup>(1)</sup>,这可能是造成直接注射法表达量偏低、持续时间不长的主要原因。

最近M.Liu小组将含甲型流感(influenza A)病毒核蛋白基因的质粒注射到小鼠肌肉内,结果可产生病毒核蛋白特异的细胞毒性T淋巴细胞(CTLs),这些遗传免疫的小鼠可抵御异源流感病毒的感染<sup>(13)</sup>。

虽然直接注射法的表达量低于*ex vivo*方法的结果,但直接活体注射方法具方便、费用低廉和易被接受等优点,使其在基因治疗(特别是治疗一些肌肉性的疾病)发展中具有潜在的应用前景。

### 参考文献

1. Wolff JA, Malone RW, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science*, 1990; 247(49):1465
2. Acsadi G, Jiao S, Jani A, et al. Direct gene transfer and expression into rat heart *in vivo*. *New Biol*, 1991; 3(1):71
3. Acsadi G, Jani A, Malone RW, et al. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Vth International Congress Inborn Errors of Metabolism. Pacific Grove, CA p.73*
4. Acsadi G, Dickson G, Love DR, et al. Human

dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs. *Nature*, 1991; 352(6338):815

5. 王平,戴一凡,邱信芳,等.人类巨细胞病毒启动子控制的人IX因子cDNA在人体细胞中的高效表达. *科学通报*, 1991; 36(13):1021
6. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, *Molecular Cloning—A Laboratory Manual*. 1 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 1.21-1.52
7. 戴一凡,刘坚,邱信芳,等.双抗体夹心ELISA法测定人凝血因子IX蛋白. *复旦学报(自然科学版)*, 1990; 29(4):413
8. 朱培坤. *免疫酶技术* 济南:山东科技出版社, 1983
9. Palmer TD, Thompson AR, Miller AD. Production of human factor IX in animal by genetically modified skin fibroblast: potential therapy for hemophilia B. *Blood*, 1989; 73(2):433
10. Louis DS, Verma IM. An alternative approach to somatic cell gene therapy. *PNAS*, 85(9):3150
11. 周洁民,戴一凡,邱信芳,等.转染人凝血因子IX cDNA的血友病B患者皮肤成纤维细胞在小鼠体内的高效表达. *中国科学(B辑)*, 1992; 22(6):611
12. Gerrard AJ, Hudson DL, Brownlee GG, et al. Towards gene therapy for haemophilia B using primary human keratinocytes. *Nature Genet*, 1993; 3(2):180
13. Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*, 1993; 259(5102):1745