

· 早产儿视网膜病变研究 ·

腺伴随病毒载体介导 Kringle5 基因治疗早产儿视网膜病变大鼠视网膜新生血管

宋哲 黎晓新

【摘要】目的 观察腺伴随病毒载体介导血管抑素 Kringle5 基因对 SD 大鼠早产儿视网膜病变 (ROP) 模型视网膜新生血管的影响, 探寻治疗 ROP 的新方法。 **方法** 亚克隆构建 pSNAV-Kringle5-gfp 载体, 腺伴随病毒包装形成 rAAV-Kringle5-gfp。21 只鼠高氧环境下建立 ROP 模型, 随机分为实验组和对照组 (各 21 只眼)。两组各取 18 只眼作视网膜组织切片; 各剩 3 只眼作聚合酶链反应 (RT-PCR) 和 Western blotting 检测。另设正常对照 5 只大鼠。实验组每只眼注入滴度为 2.5×10^{12} vg/ml 的 rAAV-Kringle5-gfp $10 \mu\text{l}$, 对照组每只眼注入滴度为 2.5×10^{11} vg/ml 的 rAAVlacZ $10 \mu\text{l}$ 。荧光显微镜下观察目的基因在眼组织中的表达。12 周后, 麻醉下处死大鼠, 行血管内皮细胞 VIII 因子相关抗原染色、血管内皮细胞细胞核计数。

结果 pSNAV-Kringle5-gfp 载体经测序正确; 腺伴随病毒载体介导血管抑素 Kringle5 在玻璃体腔及视网膜有大量表达; 目的基因在 mRNA 水平及蛋白水平均有表达; 实验组、阴性对照组视网膜表面内皮细胞细胞核分别为 $(19.954 \pm 3.825 \times 7)$ 、 $(7.335 \pm 2.731 \times 3)$ 个, 两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。 **结论** 腺伴随病毒载体介导血管抑素 Kringle5 对 ROP 视网膜新生血管具有抑制作用。

【关键词】 视网膜病, 早产儿/治疗; 病毒载量; 凝血致活酶; 生长抑素; 基因疗法

中图分类号: R772 R774.105

Adeno-associated-virus induced angiostatin Kringle5 gene treatment of retinal neovascularization in rats with retinopathy of prematurity SONG Zhe, LI Xiao-xin. Centre of Ophthalmology, Second Hospital of Peking university, Beijing 100044, China

Corresponding author: SONG Zhe, Email: songzslong@sina.com

【Abstract】Objective To detect the effect of adeno-associated-virus induced Kringle5 gene on retinal neovascularization in rats with retinopathy of prematurity (ROP), and to explore the new ways of treatment for ROP. **Methods** pSNAV-Kringle5-gfp carrier was constructed by subclone and adeno-associated-virus was packed to form rAAV-Kringle5-gfp. ROP model was set up under circumstances of high oxygen in 21 SD rats which were divided into experimental (21 eyes) and control group (21 eyes). Eighteen eyes from each group was used to making the histologic section of retina, and the other 3 eyes in each group was detected by polymerase chain reaction (PCR) and Western blotting. There were 5 rats in the normal control group. AAV-Kringle5-gfp with the dosage of $10 \mu\text{l}$ and titer of 2.5×10^{12} vg/ml was injected into the eyes in experimental group, while rAAVlacZ with the same dosage and titer of 2.5×10^{11} vg/ml was injected in to the eyes in control group. The expression of target gene in ocular tissues was observed under the fluoroscope. Twelve weeks later, the rats were executed, and the staining of VIII factor related antigens in retinal vascular endothelial cells was performed and number of nucleolus of vascular endothelial cells were counted. **Results** The plasmid of pSNAV-Kringle5-gfp was correct according to the sequence measurement; the expression of rAAV-Kringle5-gfp was found in vitreous cavity and on retina; the expression of target gene was found on the level of mRNA and protein; the number of nucleolus of vascular endothelial cells on the surface of retina was $(19.954 \pm 3.825 \times 7)$ in experimental group and $(7.335 \pm 2.731 \times 3)$ in the control group, which had significant difference between the two groups ($P < 0.01$). **Conclusions** Adeno-associated-virus induced Kringle5 gene can inhibit the occurrence of retinal neovascularization in patients with ROP.

【Key words】 Retinopathy of prematurity/therapy; Viral load; Thromboplastin; Somatostatin; Gene therapy

Kringle5 能抑制肿瘤的生长, 是目前发现抑制新生血管作用最强的抑制剂^[1]。有文献报道用其治疗脉

络膜新生血管、角膜新生血管等^[2-4]。Kringle5 是纤维溶酶原一个片段, 由 80 个氨基酸组成^[5], 主要是通过提取纤维溶酶原裂解获得。理想的方案是利用基因重组技术将其在生物体内长期表达达到治疗新生血管目

的载体。我们将重组 Kringle5 腺伴随病毒随机注入早产儿视网膜病变(ROP)模型鼠玻璃体腔中,观察其对视网膜新生血管的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

SD 母鼠 2 只及仔鼠 28 只,体重 5~6 g,雌雄不分(北京大学动物中心饲养)。

含 Kringle5 基因的质粒 pSECTAG-Kringle5(北京大学人民医院眼科中心提供);腺伴随病毒载体 pSNAV(基因本元正阳基因公司),为带有腺相关病毒末端反向重复序列的真核表达载体,含 CMV 启动子 AMP 抗性及 G418 抗性并含有 KpnI 和 XbaI 等多克隆位点及 GFP 基因;限制性内切酶, T4DNA 连接酶, M-MLV 逆转录酶, VII 因子相关抗原抗体(美国华美公司);戊二醛(北京大学中心实验室提供);氯胺酮,复方托品酰胺(北京制药工业研究所实验药厂);荧光显微镜,手术显微镜(日本 TOPCON 公司),光学显微镜;二磷酸腺苷(ADP)(美国 Sigma 公司)。

1.2 方法

1.2.1 ROP 模型的建立 模型建立方法同文献[6]。

1.2.2 pSNAV-Kringle5-gfp 重组腺伴随病毒载体的构建和鉴定 Kringle5 及其信号肽由 pSECTAG-Kringle5 载体克隆至 pSNAV 形成 pSNAV-Kringle5-gfp。根据 pSECTAG-Kringle5 载体设计上游和下游引物 primer1:5'-ATTCGGTACCAAGCTTGGAAAGAACTGTATG; primer2:5'-CGACGAATTCTCTAGAAAGGGGCCGCAC。在两条引物中分别加入 KpnI 和 XbaI 限制内切酶位点。PCR 产物回收纯化后,与 T 载体连接,转化后用 AMP 进行筛选 KpnI 和 XbaI 酶切,回收片段,同样消化 pSNAV 并回收载体。将回收的载体和回收目的基因片段连接、转化、挑选克隆并用 KpnI 和 XbaI 酶切鉴定,测序鉴定,命名为 pSNAV-Kringle5-gfp。将构建 pSNAV-K5-gfp 进行腺伴随病毒包装,形成 rAAV-Kringle5-gfp。21 只 ROP 模型鼠用复方托品酰胺双眼散瞳,按 0.1 ml/kg 的剂量腹腔注射氯胺酮麻醉大鼠,随机取模型鼠左眼或右眼作为实验组,对侧眼为对照组。在手术显微镜下,实验组眼球玻璃腔注射滴度为 2.5×10^{12} vg/ml rAAV-Kringle5-gfp 病毒颗粒 10 μ l;对照组玻璃体腔注射滴度为 2.5×10^{12} vg/ml LacZ 病毒颗粒 10 μ l。注药后,每天双眼滴 0.25% 氯霉素眼药水 3 次,直到炎症消失。荧光显微镜下观察 rAAV-Kringle5-gfp 在视网膜及玻璃体的表达。

1.2.3 RT-PCR rAAV-Kringle5-gfp 注射后 12 周后,麻醉下处死大鼠 1 只,摘取实验组和对照组眼球各 1 只。收取两组视网膜组织加 Trizol 1 ml 混匀,移入标记 1.5 ml EP 管,室温下放置 5 min,溶解核蛋白;加 0.2 ml 氯仿,盖紧,用力摇数次,冰上 15 min;4 C 下以离心半径 6 cm、12 000 r/m 离心 15 min,将液相移入另外已编号 1.5 ml EP 管中;加等体积异丙醇,-20 C 放置 1 h 以上,4 C 下以离心半径 6 cm、离心 15 min;弃除上清液,75% 冷乙醇洗沉淀一次,勿打散;4 C 下以离心半径 6 cm、8 000 r/m 离心 10 min,弃除上清液,真空抽干;二乙基焦碳酸酯水溶解沉淀 RNA 向提取 RNA 2.5 μ l 按顺序加入 5 倍 RT 缓冲液 5 μ l, M-MLV 200 μ l, 寡核苷酸结合引物 2 μ l, RNA 酶 0.5 μ l, 脱氧核糖核苷酸 2.5 μ l, 42 C, 1 h; 2 倍 mastermix PCR 反应体系: 反转录模板 8.5 μ l, 上游引物 2 μ l, 下游引物 2 μ l, 2 倍 mastermix 12.5 μ l; PCR 反应条件: 预变性 95 C 5 min, 预变性 95 C 5 min, 变性 94 C 40 s, 退火 56 C 40 s, 延伸 72 C 40 s, 后延伸 72 C 10 min, 循环 30 次。以磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为内参,上游引物基因序列:5'ACG-CATTTGGTCGTATTGGG;下游为:5'TGATTTT-GGAGGGATCTCGCCC3'行 PCR。反应条件同前。

1.2.4 Western blotting 检测 rAAV-Kringle5-gfp 注射 12 周后,麻醉下断颈处死大鼠 2 只,摘取实验组和对照组眼球各 2 只。0.1% Triton X-100 及磷酸盐缓冲液(PBS)中,收取两组视网膜组织,剪碎并用研磨器研磨。4 C 以下离心半径 6 cm、1 500 r/m 离心 10 min,收集上清液,冷冻抽干 1/6 体积行蛋白电泳,步骤同前。

1.2.5 rAAV-Kringle5-gfp rAAV-Kringle5-gfp 注射 12 周后,麻醉下断颈处死 18 只实验大鼠、5 只正常对照大鼠。摘除眼球,4% 甲醛固定眼球,石蜡包埋,切片,每只眼球切片 10 张。实验组及对照组各 180 张,正常对照组 50 张,共 410 张。视网膜血管内皮细胞 VII 因子相关抗原染色。光学显微镜下计数实验组、对照组和正常对照组视网膜表面血管内皮细胞细胞核数目。

2 结果

2.1 ROP 模型建立结果

21 只鼠 ROP 模型建立成功。

2.2 pSNAV-Kringle5-gfp 重组质粒构建、结果鉴定

PCR 产物含有信号肽及 Kringle5,片段约 300 碱基对(bp),大小约为目的基因及信号态基因之和。根据测序和阅读框码证实为 Kringle5 基因(图 1)。根据

酶切、双向测序及阅读框校正,证实所构建 pSNAV-Kringle5-gfp 正确(图 2)。将构建好的 pSNAV-Kringle5-gfp 载体进行腺伴随病毒包装(病毒所完成)形成滴度为 2.5×10^{13} vg/ml。

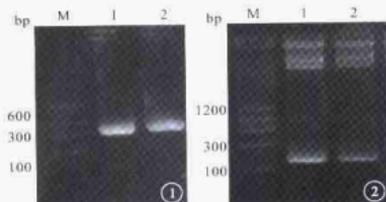


图 1 pSNAV-Kringle5 质粒目的基因 PCR 电泳图。M: DNA 标记物; 1, 2: Kringle5 的 PCR 产物 图 2 构建 pSNAV-Kringle5-gfp 载体酶切 KpnI 和 XbaI 双酶切电泳图。M: DNA 标记物; 1, 2: 酶切

Fig. 1 Photograph of electrophoresis of target gene of pSNAV-Kringle5 by PCR. M: marker of DNA; 1, 2: products of Kringle5 Fig. 2 Photograph of electrophoresis of pSNAV-Kringle5-gfp-out by KpnI and XbaI enzyme. M: marker of DNA; 1, 2: enzyme cutting

2.3 荧光显微镜检查结果

实验组玻璃体及视网膜组织可见 rAAV-Kringle5-gfp 强荧光表达(图 3)。

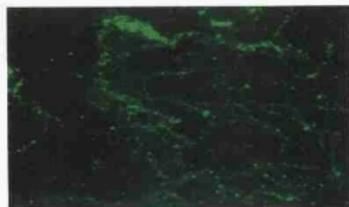


图 3 rAAV-Kringle5-gfp 表达的荧光显微镜像。在视网膜及玻璃体中大量绿色荧光蛋白 $\times 100$

Fig. 3 Photograph of fluorescence microscope of expression of rAAV-Kringle5-gfp. Abundant green fluorescent protein expressed on retina and in vitreous body $\times 100$

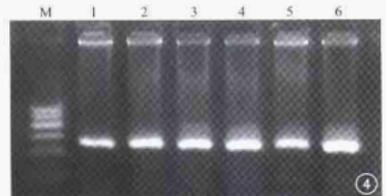


图 4 实验组和对照组内参基因 RT-PCR 电泳图。M: DNA 标记物; 1, 2, 3: 实验组内参基因(GAPDH); 4, 5, 6: 对照组内参基因(GAPDH) 图 5 实验组和对照组 rAAV-Kringle5-gfp 转染视网膜 RT-PCR 电泳图。M: DNA 标记物; 1, 2, 3: 实验组; 4, 5, 6: 对照组

图 6 实验组和对照组 rAAV-Kringle5-gfp 转染视网膜 Western blotting 蛋白电泳图。1, 2, 3: 实验组; 4, 5: 对照组

Fig. 4 Photograph of electrophoresis of GAPDH by RT-PCR. M: marker of DNA; 1, 2, 3: experimental group; 4, 5, 6: GAPDH in control group Fig. 5 Photograph of electrophoresis of rAAV-Kringle5-gfp-transfected retina by RT-PCR. M: marker of DNA; 1, 2, 3: experimental groups; 4, 5, 6: control group Fig. 6 Photograph of electrophoresis of rAAV-Kringle5-gfp-transfected retina by Western blotting. 1, 2, 3: experimental group; 4: control group

2.4 RT-PCR 结果

以 GAPDH 基因设计引物进行 PCR 结果显示,实验组和对照组均表达稳定(图 4)。以目的基因设计引物进行 PCR, PCR 产物电泳结果为:对照组 DNA 电泳片段大小为 100 bp,为引物片段(图 5);正常对照组 PCR 产物大小约 300 bp,同目的基因大小(图 5)。

2.5 Western blotting 结果

实验组相对分子质量为 14×10^3 处出现条带;对照组未见有杂条带出现(图 6)。

2.6 Ⅷ因子相关抗原染色结果

对照组及实验组视网膜表面可见较多或少量血管内皮细胞(图 7, 8)。实验组、对照组、正常对照组视网膜表面平均血管内皮细胞细胞核数分别为 $(7.335 \pm 2.731 \text{ 3})$ 、 $(19.954 \pm 3.825 \text{ 7})$ 、 $(0.420 \pm 0.609 \text{ 1})$ 个。实验组和对照组、对照组和正常对照组比较差异有统计学意义(P 均 < 0.01)。

3 讨论

ROP 是由于新生儿早产、低体重、吸氧等因素引起的新生儿视网膜出现分界线、嵴、新生血管、视网膜部分脱离及视网膜全部脱离^[3]。新生血管由于其血管通透性较高,血管易出血,血管内成分易于渗漏,可引起视网膜组织的增生、牵拉形成视网膜脱离。因此预防视网膜新生血管形成是治疗 ROP 的关键。

Kringle5 是纤维溶酶原一个环。在研究肿瘤中发现它对新生血管具有极强的抑制作用,可以抑制血管内皮细胞增生^[7]。因此眼科医生也试图利用它来治疗新生血管,但是它的获得在质和量上均受到限制。虽然有报道利用真核载体介导采用电转染方法治疗角膜新生血管取得成功^[8],但是电转染方法对组织细胞损伤极大^[9]。因此我们寻找腺伴随病毒载体介导 Kringle5,这种载体可以感染增生期和非增生期细胞,由它介导

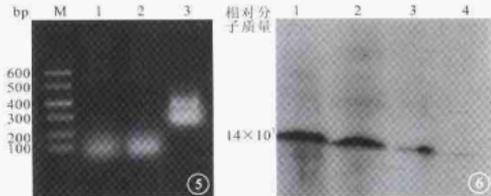


图 4 实验组和对照组内参基因 RT-PCR 电泳图。M: DNA 标记物; 1, 2, 3: 实验组内参基因(GAPDH); 4, 5, 6: 对照组内参基因(GAPDH) 图 5 实验组和对照组 rAAV-Kringle5-gfp 转染视网膜 RT-PCR 电泳图。M: DNA 标记物; 1, 2, 3: 实验组; 4, 5, 6: 对照组

图 6 实验组和对照组 rAAV-Kringle5-gfp 转染视网膜 Western blotting 蛋白电泳图。1, 2, 3: 实验组; 4, 5: 对照组

Fig. 4 Photograph of electrophoresis of GAPDH by RT-PCR. M: marker of DNA; 1, 2, 3: experimental group; 4, 5, 6: GAPDH in control group Fig. 5 Photograph of electrophoresis of rAAV-Kringle5-gfp-transfected retina by RT-PCR. M: marker of DNA; 1, 2, 3: experimental groups; 4, 5, 6: control group Fig. 6 Photograph of electrophoresis of rAAV-Kringle5-gfp-transfected retina by Western blotting. 1, 2, 3: experimental group; 4: control group

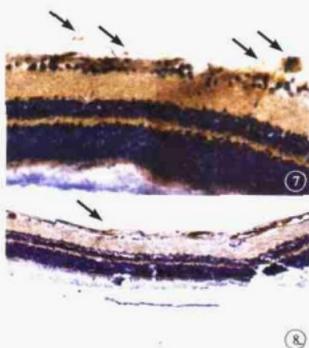


图7 对照组视网膜血管内皮细胞因子相关抗原染色情况。视网膜表面较多血管内皮细胞(黑箭)。因子相关抗原染色 $\times 100$ 图8 实验组视网膜血管内皮细胞因子相关抗原染色。视网膜表面少许血管内皮细胞(黑箭) 因子相关抗原染色 $\times 100$

Fig. 7 Photograph of staining of α factor related antigens in retinal vascular endothelial cells in control group (black arrows). Abundant vascular endothelial cells on the surface of retina. Staining of α factor related antigens $\times 100$ Fig. 8 Photograph of staining of α factor related antigens in retinal vascular endothelial cells in experimental group. A few vascular endothelial cells on the surface of retina (black arrows). Staining of α factor related antigens $\times 100$

的外源基因可以在中枢神经系统、视网膜、骨骼肌等器官和组织上长期表达,可以整合到宿主染色体上,副作用小,能够长效表达^[23,24]。

本实验中,我们根据 pSECTAG-Kringle5 质粒的信号肽序列设计引物,在引物中引入 KpnI 和 XbaI 酶切位点,将 kringle5 基因及 γ 信号肽基因克隆至质粒 pSNAV 形成 pSNAV-Kringle5,经过测序证实了引入片段及读码正确性。将构建好的 pSNAV-Kringle5 质粒进行腺伴随病毒包装,包装滴度为 2.5×10^{12} vg/ml。经检测,滴度和纯度均达到试验要求。

利用可调控氧浓度饲养箱形成了 ROP 模型,根据 ADP 酶染色显示 ROP 模型鼠和正常鼠视网膜血管改变很明显。在选材方面实验的可靠性得到保证;另外,实验结果显示对照组和正常对照组细胞核数有显著差异,说明未进行干预的模型鼠新生血管数明显多于正常鼠的新生血管,进一步说明了实验取材的可靠性。在本研究中,我们在 rAAV Kringle5 后加 GFP,它可以反映目的基因表达情况,发现在玻璃体腔及视网

膜表达较强。说明利用这一载体能够高效表达目的基因。

我们首次利用腺伴随病毒载体介导 Kringle5 基因治疗 ROP 新生血管,结果显示实验组新生血管明显减少,与对照组比较差异显著,说明利用腺伴随病毒载体介导 Kringle5 基因能够有效抑制 ROP 新生血管的形成。这和文献报道的血管抑素 Kringle5 能够抑制血管内皮细胞增生及抑制新生血管形成相符^[2,12,13]。提示利用基因重组技术,由腺伴随病毒载体介导血管抑素 Kringle5 有望成为治疗 ROP 视网膜新生血管理想方法。

4 参考文献

- Cao Y, Ji RW. Kringle domains of human angiotensin characterization of the anti-proliferative activity on the endothelial cells. *J Biol Chem*, 1996, 271: 29461-29467.
- Stechelschulte S, Jousens AM, Van RH. Rapid ocular angiogenic control via naked DNA delivery to cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 42: 1975-1979.
- Moore JE, McMullen TCB, Campbell IL, et al. The inflammatory milieu associated with conjunctivalized cornea and its alteration with IL-1RA gene therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43: 2906-2915.
- Murata M, Nakagawa M, Takahashi S. Inhibitory effects of plasminogen fragment on experimentally induced neovascularization of rat corneas. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 1997, 235: 584-586.
- Cao YH, Chen A. Kringle-5 of plasminogen is a novel inhibitor of endothelial. *J Vasc Chem*, 1997, 272: 2292-2298.
- John S, Penn B. Variable oxygen exposure causes prenatally neovascularization in the newborn rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1983, 34: 570-585.
- The Committee for the Classification of Prematurity. The international classification of retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol*, 1984, 102: 1130-1135.
- Yu WZ, Li XX. Gene transfer of Kringle-5 of plasminogen by electroporation inhibits corneal neovascularization. *Ophthalmic Res*, 2003, 35: 239-246.
- 奥斯特利 F, 布伦特 R, 金斯顿 RE, 等. 胚胎干细胞生物学实验指南. 顾子佩, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1999, 284-288.
- Harrison PT, Dalziel RG, Ditchfield N, et al. Neuronal-specific and nerve growth factor-inducible expression directed by the preprotrkyskinin-A promoter delivered by an adeno-associated virus vector. *Neuroscience*, 1999, 94: 997-1003.
- Rolling F, Shen WY, Tabarias H, et al. Evaluation of adeno-associated gene transfer into the rat retina by clinical fluorescence photography. *Hum Gene Ther*, 1995, 10: 641-648.
- Lu H, Dhanraj M, Volk R, et al. Kringle5 causes cell cycle arrest and apoptosis of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 258: 668-673.
- Zhang D, Kouffman PL, Gao G, et al. Intravitreal injection of plasminogen Kringle5, an endogenous angiogenic inhibitor arrests retinal neovascularization in rats. *diabetologia*, 2001, 44: 757-765.
- Liu ZG, Zhang ZH, Ma JX, et al. An experimental study of anti-angiogenesis with recombinant human kringle5. *Chin J Ophthalmol*, 2002, 38: 415-418.

(收稿日期: 2005 04 06)

(本文编辑: 朱敏)