

Microdystrophin 基因重组腺病毒的构建及转染 *mdx* 骨髓间充质干细胞的表达

Construction of Recombinant Adenovirus Including Microdystrophin and Expression in the Mesenchymal Cells of *mdx* Mice

熊 符^{1,2} 张 成^{1,2*} 肖少波³ 李美山² 王淑辉² 于美娟¹ 尚延昌²

XIONG Fu^{1,2} ZHANG Cheng^{1,2*} XIAO Shao-Bo³ LI Mei-Shan² WANG Shu-Hui² YU Mei-Juan¹ and SHANG Yan-Chang²

1 中山大学干细胞与组织工程研究中心, 广州 510080

2 中山大学附属第一医院神经内科, 广州 510080

3 华中农业大学农业微生物国家重点实验室, 武汉 430070

1 Center for Stem Cell Biology and Tissue Engineering of Sun Yat-sen University Guangzhou 510080, China

2 Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

3 Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Ministry of Agriculture, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

摘 要 构建含有人 microdystrophin 基因的重组腺病毒, 来感染 dystrophin 基因敲除小鼠 *mdx* 的骨髓间充质干细胞(MSC)进行基因修饰, 为同种异体基因修饰的干细胞移植治疗 DMD 疾病奠定基础。用 *Not* I 酶切含 microdystrophin 基因的 pBSK-MICRO 质粒, 获得 microdystrophin 基因。片段回收后定向插入腺病毒穿梭质粒 pShuttle-CMV, 获得重组质粒 pShuttle-CMV-MICRO。Pme I 线性化重组质粒 pShuttle-CMV-MICRO 去磷酸化后回收后与腺病毒骨架质粒 pAdeasy-1 共电转化 BJ5183 感受态细胞。同源重组后用选择性培养基筛选阳性克隆, 提取质粒, 用脂质体介导转染 293 细胞, 通过观察 293 细胞病变及 PCR 扩增目的基因等方法鉴定重组的腺病毒。然后将病毒上清转染 DMD 模型鼠 *mdx* 小鼠的骨髓间充质干细胞, 通过 RT-PCR 以及间接免疫荧光检测 microdystrophin 的转录及蛋白表达。成功构建了含有 microdystrophin 基因的重组腺病毒, 病毒滴度为 5.58×10^{12} vp/mL。间接免疫荧光检测可见 microdystrophin 蛋白在 *mdx* 小鼠 MSCs 中高效表达。该重组腺病毒载体的构建及成功转染到 *mdx* MSCs 内表达为下一步用 microdystrophin 基因修饰的 *mdx* MSCs 进行同种异体移植治疗 DMD 疾病奠定了基础。

关键词 腺病毒载体, Microdystrophin, *Mdx* 鼠间充质干细胞, DMD

中图分类号 R730.5 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)01-0027-06

Abstract Construction of recombinant adenovirus, which contain human microdystrophin, and then transfection into mesenchymal cells(MSCs) of *mdx* mice were done, and genetically-corrected isogenic MSCs were acquired; the MSCs transplantation into the *mdx* mice was then done to treat the Duchenne muscular dystrophy(DMD). Microdystrophin cDNA was obtained from recombinant plasmid pBSK-MICRO digested with restrictive endonuclease *Not* I; the production was inserted directionally into pShuttle-CMV. The plasmid of pShuttle-CMV-MICRO was digested by *Pme* I, the fragment containing

Received: July 21, 2006; Accepted: September 13, 2006.

This work was supported by the grants from the National Natural Science Foundation of China(No. 30170337)and Research Fund for the Doctoral Program of Ministry of Education(No. 20030558058).

* Corresponding author: Tel: +86-20-87333055; Fax: +86-20-87333122; E-mail: czym@gzsums.edu.cn.

国家自然科学基金(No.30170337)和教育部博士点基金(No.20030558058)资助。
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

microdystrophin was reclaimed and transfected into *E. coli* BJ5183 with plasmid pAdeasy-1. After screening by selected media, the extracted plasmid of positive bacteria was transfected into HEK293 cells with liposome and was identified by observing the CPE of cells and by the PCR method. Finally, MSCs of *mdx* mice were infected with the culture media containing recombinant adenovirus, and the expression of microdystrophin was detected by RT-PCR and immunocytochemistry. Recombinant adenovirus including microdystrophin was constructed successfully and the titer of recombinant adenovirus was about 5.58×10^{12} vp/mL. The recombinant adenovirus could infect MSC of *mdx* mice and microdystrophin could be expressed in the MSC of *mdx* mice. Recombinant adenovirus including microdystrophin was constructed successfully, and the microdystrophin was expressed in the MSC of *mdx* mice. This lays the foundation for the further study of microdystrophin as a target gene to correct the dystrophin-defected MSC for stem cell transplantation to cure DMD.

Key words Adenovirus vector, Microdystrophin, Mdx MSCs, DMD

Duchenne 型肌营养不良症 (Duchenne muscular dystrophy, DMD) 是一种以骨骼肌进行性变性、坏死为主要病理特征的致死性的 X-性连锁隐性遗传性疾病, 发病率为男性活婴的 1/3500。此病发生的主要原因是 DMD 基因部分区域的缺失、重复或点突变, 导致肌细胞膜上该基因编码的抗肌萎缩蛋白 dystrophin 的缺乏或结构变异, 引起肌细胞膜的形态和功能损害, 致使肌纤维变性坏死而致, 目前尚无有效的治疗方法^[1]。基因治疗和干细胞移植被认为是治疗该病最有希望的两种途径^[2], 但是基因治疗的方式主要是局部肌肉注射, 这极大限制了累及全身所有骨骼肌包括膈肌和心肌在内的 DMD 的治疗; 而干细胞移植则存在免疫排斥问题, 因此最理想的方法就是将基因治疗和细胞移植结合起来, 进行 DMD 的治疗。本研究则是基于此想法, 利用腺病毒载体 Adeasy™ 系统成功构建了含 microdystrophin 基因的腺病毒, 同时用此病毒转染 DMD 模型鼠 *mdx* 鼠的间充质干细胞 (MSC), 证实 microdystrophin 基因在 *mdx* 鼠的 MSCs 中得到了表达, 此为对 *mdx* 鼠 MSCs 进行基因修饰后对同种异体的 *mdx* 鼠做 MSC 移植治疗的研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 腺病毒载体和菌株 pShuttle-CMV、pAdeasy-1 Vector, BJ5183, XL-10 Gold 细胞, 293 高传代细胞由华中农业大学农业微生物国家重点实验室保存提供。293 低传代细胞由中山大学肿瘤医院黄文林教授惠赠。DH5 α 菌株由本室保存。

1.1.2 含 microdystrophin 基因的质粒 pBSK-MICRO: 由美国 Washington 大学医学院神经内科 Prof. J. S. Chamberlain 惠赠。DMD 模型鼠 *mdx* 小鼠购自美国 Jackson 实验室, 饲养并繁殖于中山大学中山医学院

实验动物中心二级动物室。

1.1.3 试剂: 限制性内切酶 *Not* I、*Hind* III 及 *Taq* 酶、T4 DNA 连接酶、去磷酸化酶购自宝生物工程有 限公司; *Pme* I、*Pac* I 购自 New England 生物技术有 限公司; 脂质体转染试剂盒 (Lipofectamine 2000) 购自 Invitrogen 公司; Trizol 试剂盒购自美国 Fermentas 公 司; 胎牛血清、DMEM 及 R/MINI-1640 培养基培养基 购自 GIBCO 公司; 小鼠抗 Dystrophin 单克隆抗体 (氨基端) 及山羊抗小鼠 - CY3 IgG 二抗均购自 CHEMICON 公司。

1.2 方法

1.2.1 重组穿梭转移质粒的构建 *Not* I 单酶切 pBSK-MICRO 质粒, 回收 3.75kb 的 microdystrophin 基 因片段, 再与用 *Not* I 酶切后去磷酸化的腺病毒穿 梭质粒 pShuttle-CMV 连接过夜, 连接产物转化新 鲜感受态大肠杆菌 DH5 α , 接种卡那霉素平板培养, 挑取阳性克隆扩增培养, 碱裂解法提取并纯化质粒, 经 *Not* I 酶切鉴定和 *Hind* III 酶切鉴定方向后获得插 入正向的重组穿梭质粒命名为 pShuttle-CMV - MICRO。

1.2.2 BJ5183 细菌内同源重组产生腺病毒质粒 用 *Pme* I 线性化重组穿梭质粒 pShuttle-CMV-MICRO, 去 磷酸化后回收, 取 1.0 μ g 与腺病毒骨架质粒 pAdeasy- 1(0.1 μ g) 共电转化 BJ5183 感受态细胞, 电转条件为 2.5kV、200 Ω 、25 μ F。转化子涂布于 Kan 抗性平板, 碱裂解法提取并纯化质粒, *Pac* I 酶切鉴定; 同时进 行 PCR 扩增及测序鉴定。PCR 扩增上游引物: 5' GCTGGGTCCGACAATC3'; 下游引物: 5' ATGGCTTCAA TGCTCACT3', 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 变性 1min, 50 $^{\circ}$ C 退火 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5min, 35 次循环, 扩增长度为 319bp, 将鉴定正确的重组质粒命名为 pAde-MICRO。 用同样的方法, 将空载穿梭质粒 pShuttle-CMV 与 pAdeasy-1 电转空重组腺病毒质粒。

作为阴性对照。

1.2.3 重组病毒在 293 细胞的包装、病毒纯化:

(1) 酚/氯仿/异戊醇法提纯酶切片:将 1.2.2 中的 pAde-MICRO 重组质粒氯化钙法转化 XL-10Gold 细胞,碱裂解法大量提取重组质粒,用 *Pac* I 酶切后用酚/氯仿/异戊醇法提纯,即在酶切产物中加入适量 ddH₂O 和等体积酚/氯仿/异戊醇混合液(25:24:1)轻微震荡混匀,13200r/min 5min 离心、分层,将上层水相小心转移至另一 1.5mL 的 Eppendorf 管中同时加入 2 倍体积的无水乙醇,1/10 体积的 3mol/L NaAc, -20℃ 放置 30min,13200r/min 离心 5min,弃上清,沉淀用 75% 乙醇漂洗,空气中自然干燥 15min, ddH₂O 溶解回收产物,核酸蛋白测定仪测定其浓度, -20℃ 保存备用。

(2) 重组病毒的包装:转染前 24h,用胰酶消化低传代 293 细胞,计数细胞,按 5×10^5 /孔接种细胞于六孔板中,当细胞生长到 60% ~ 70% 的时候开始转染。转染步骤按经 Lipofectamine™ 2000 说明书进行,即在两只无菌离心管中加入无血清培养液,按脂质体:pAde-MICRO 体积质量比为 3:1 分别加入脂质体 15 μ L, pAde-MICRO 5 μ g,轻柔混匀,室温孵育 5min,然后将两管混合,室温孵育 25min 后将上述混合液加入已用无血清培养基 OPTI-MEM 洗涤 2 次的六孔板中的 293 细胞,6h 后换含 5% 胎牛血清的 DMEM,期间视培养基消耗情况换液 1 ~ 2 次。7 ~ 10d 后,293 细胞变圆,吹打收集 293 细胞。-80℃/+37℃ 反复冻融 3 次,2000r/min 离心 5min,收集上清液重新感染高传代 293 细胞。同时取上清 100 μ L,加入蛋白酶 K (20mg/mL) 1 μ L,56℃ 1 ~ 2h,再用等体积酚/氯仿/异戊醇(25:24:1)抽提 2 次,无水乙醇沉淀提取病毒 DNA,再用 PCR 鉴定重组病毒,引物及扩增条件同 1.2.2。用同样的方法,将空载穿梭质粒 pAdeasy-CMV 制备重组腺病毒 Adeasy-CMV,作为阴性对照。

(3) 重组病毒的扩增、纯化和滴度测定:培养高传代 293 细胞,当细胞长到 70% ~ 80% 的时候,滴加(2)收集的病毒上清液,在 5% CO₂、37℃ 恒温箱中培养,至大多数 293 细胞变圆,吹打后 2000r/min、5min 离心收集 293 细胞,溶于 PBS 中, -80℃/+37℃ 反复冻融 3 次,5000r/min、4℃ 离心 30min,收集上清液。当扩增到足够量的病毒(至少需要接种 3×10^8 293 细胞)时,用 CsCl 法纯化病毒,在离心管中缓慢加入 1mL 1.40g/mL 氯化铯,再轻缓地加入 2mL 1.25g/mL 氯化铯,最后加入 10mL 上清液,4℃、36000r/min 离

心 60min,穿刺吸取白色病毒带转移于另一离心管中,再加入 1.35mg/mL 氯化铯至满,4℃、65000r/min 离心 3h,穿刺吸取白色病毒带转移于处理过的透析袋里,在含 10% 甘油的 PBS 中,4℃ 下透析过夜浓缩,浓缩液分装转移到 Eppendorf 管中, -80℃ 保存。测定病毒颗粒在 260nm 处的吸光度(A),以 1 个 A 值相当于 1.1×10^{12} 个病毒颗粒计算病毒含量(vp/mL)。

(4) 重组病毒中 microdystrophin 基因在 *mdx* MSCs 中的表达:

① *mdx* 鼠 MSC 的分离培养参照文献[3],取 5 ~ 6 周龄 *mdx* 小鼠,乙醚麻醉后颈动脉处死,75% 酒精中浸泡 5 ~ 10s,取股骨、胫骨于无菌烧杯中,去除肌肉,剪刀剪断骨的两端,用 1mL 注射器从一端骨髓开口处,推入 D-Hanks 液冲出骨髓,置于另一无菌烧杯中。全部冲出后,用吸管吹吸,至骨髓分散为止,再加入 2 倍 D-Hanks 液以上的 DMEM(含胎牛血清 15%,青霉素 100u/mL,链霉素 100u/mL)的培养液,均分入 2 块 6 孔培养板培养,放入 5% CO₂、37℃、饱和湿度的二氧化碳培养箱内,静置培养 3d 后换液,待长满后传代培养。

② 病毒液转染 *mdx* 鼠 MSC 取生长良好的第五代细胞进行实验,将浓缩的病毒液用 PBS 稀释成 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 、 1×10^9 vp/mL 的病毒液,感染长满至 80% ~ 90% 的 MSC 细胞,37℃ 感染 2h 后,添加含 5% 小牛血清的 DMEM 继续培养 48h,用细胞免疫组化法检测 microdystrophin 基因的表达,计算各个浓度 microdystrophin 的表达效率(阳性细胞数量/总细胞数量),同时镜下观察细胞形态和死亡情况,确定最佳范围的病毒感染量。免疫组化方法如下:首先 PBS 冲洗 3 次,每次 5min 后,用 4% 多聚甲醛固定 30min,再用 PBS 冲洗 3 次,每次 5min 后,用 3% H₂O₂ 于室温封闭内源性过氧化氢酶 10min,然后用 PBS 冲洗 3 次,每次 5min 后,用 3% Triton-100 室温 30 ~ 45min,再 PBS 冲洗 3 次,每次 5min 后用正常山羊血清封闭 20min,甩去多余的液体后加入抗 microdystrophin 一抗(1:30)4℃ 湿盒中过夜,次日拿出室温放置 30min 后,用 PBS 冲洗 3 次,每次 5min 后加入 CY3 标记的山羊抗小鼠 IgG(1:200)孵育 45min, PBS 冲洗 3 次,每次 5min 后置于荧光倒置显微镜观察。

③ RT-PCR 检测转染后 *mdx* MSC 中 microdystrophin 基因的表达:取病毒上清, PBS 稀释成由②确定的最佳感染病毒粒子数(1×10^7 vp/mL),感染长满至 30% ~ 90% 的 MSC 细胞,37℃ 感染 2h 后,添加含 5%

小牛血清的 DMEM 继续培养 48h, 离心收集细胞。细胞沉淀用 Trizol 试剂盒提取总 RNA, 加入无 RNase 的 DNaseI 37°C 孵育 10min 后, 于 70°C 15min 灭活。用获得的 RNA 进行逆转录, 取 2 μ L cDNA 产物为模板, 用 1.2.2 所述的引物及反应条件进行目的基因 microdystrophin 的 PCR 扩增。同法, 获得空载腺病毒 Adeasy-CMV 的 cDNA 产物作为阴性对照, 进行 microdystrophin 的 PCR 扩增, 同时扩增内参 β -肌动蛋白, 上游引物: 5' TCGTACCACAGGCATTGTGATGG3'; 下游引物: 5' GCTATGCCTGGGTACATGGTGG3', 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

④ 免疫组化检测转染后的 *mdx* MSCs 中 microdystrophin 基因表达用上述同样的方法感染接种于硅化处理的盖玻片上的 *mdx* 鼠 MSC 细胞, 48h 后, 进行 microdystrophin 免疫组化检测, 检测方法同②, 最后用 DAPI 复染细胞核。同时做阴性对照用空载腺病毒 Adeasy-CMV 转染的 *mdx* MSC 和空白对照用 PBS 代替一抗。并随机选取 5 个视野, 计数阳性细胞数量, 用阳性细胞数量/总细胞数量计算出 microdystrophin 的表达效率。

2 结果

2.1 重组穿梭转移质粒 pBSK-MICRO 的鉴定

pBSK-MICRO 质粒经 *Not* I 单酶切获得 3.75kb 和 3.0kb 片段, 回收 3.75kb 的片段连接到长 7.5kb 的 pShuttle 穿梭质粒中, 用 *Not* I 和 *Hind* III 进行鉴定。*Not* I 切出 3.75kb 的目的带, *Hind* III 则切出正向插入的 9.95kb 和 1.30kb 片段 (图 1)。

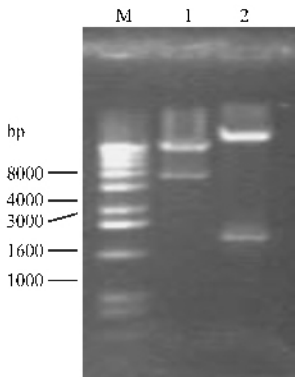


图 1 重组质粒 pAd-MICRO 的酶切鉴定

Fig.1 R.E. identification of the plasmid pAd-MICRO

M :DNA Marker(DL-10000); 1 :pAde-MICRO/*Not* I ; 2 :pAde-MICRO/*Hind* III .

2.2 pAde-MICRO 的鉴定

酶切鉴定: 用 *Pac*I 酶切 pAde-MICRO 得到约 30kb

和 4.5kb 两个片段 (图 2)。PCR 鉴定: 分别以 pAdeasy 和 pAde-MICRO 为模板, 以目的基因 microdystrophin 中部分片段合成的上下游引物进行 PCR 扩增, 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 得到大约 319bp 的片段。测序鉴定: 测序结果与 GenBank 报道一致。

2.3 重组病毒的鉴定

用重组病毒 Ad-MICRO 基因组 DNA 以及阳性质粒、阴性为模板, 用前面合成的上下游引物进行 PCR 扩增, 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 得到大约 319bp 的片段。

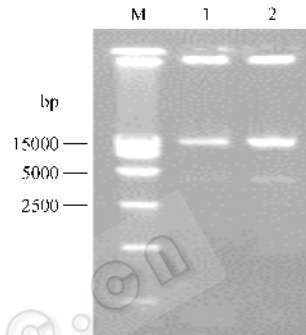


图 2 重组质粒 pAde-MICRO 的酶切鉴定

Fig.2 R.E. identification of the plasmid pAde-MICRO

M :DNA Marker(DL-15000); 1 :pAde-MICRO/*Pac* I .

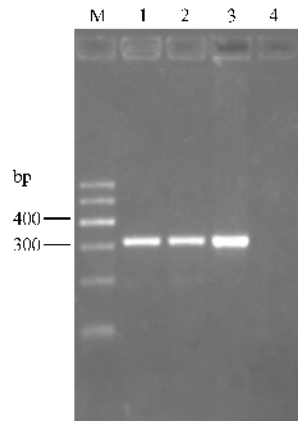


图 3 重组质粒 pAde-MICRO 的 PCR 鉴定

Fig.3 Identification of the plasmid pAde-MICRO by PCR

M :DNA Marker(DL-600); 1, 2 :Microdystrophy gene(319bp); 3 :Positive control ; 4 :Negative control .

2.4 RT-PCR 检测目的基因的转录

用 Trizol 试剂盒提取 Ad-MICRO 感染的 MSCs 细胞总 RNA, 经逆转录后进行 RT-PCR, 并用和 Adeasy-CMV 感染 MSCs 细胞的 RT-PCR 作为阴性对照。结果可见, Ad-MICRO 感染的 MSCs 细胞有 microdystrophin 片段的扩增, 而阴性对照无特异性条带产生, 表明插入的目的基因 microdystrophin 在

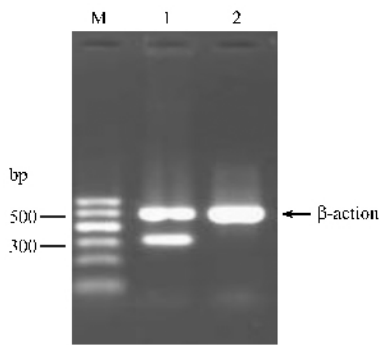


图4 RT-PCR 检测 microdystrophin 在 MSCs 细胞中的转录

Fig.4 Detection of microdystrophin transcription in MSCs cells by RT-PCR

M :DNA marker(DL-600);1 :microdystrophy gene(319bp);2 :negative control.

2.5 目的蛋白在 *mdx* 鼠 MSCs 中的表达

确定了 1×10^7 vp/mL 为最佳感染量后,用 1×10^7 vp/mL 的 Ad-MICRO 感染 MSCs 细胞,用抗 Dystrophin 单克隆抗体对表达产物进行免疫组化检测。结果在 *mdx* 鼠 MSC 的细胞核和膜中均可见有 microdystrophin 蛋白表达,而阴性对照组(未转染组)MSC 未见有 microdystrophin 蛋白表达(图5),计算阳性细胞数/总细胞数,得到 microdystrophin 的表达效率约 50% ~ 60%,说明 microdystrophin 基因成功转入 *mdx* 鼠 MSC 中并有效地实现了目的基因 microdystrophin 的高效表达。

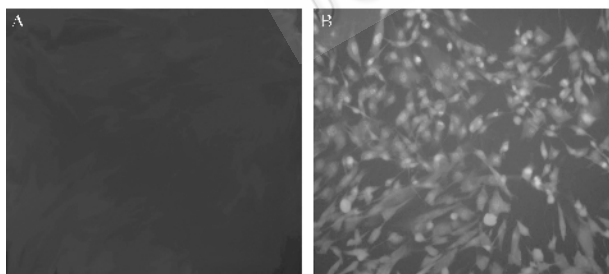


图5 免疫组化检测 Microdystrophin 蛋白在 *mdx* 鼠 MSC 中的表达

Fig.5 Identification of the expression of microdystrophin transfected Mdx MSC by immunocytochemistry

A :negative control ;B :Ad-MICRO infected Mdx Mscs.

3 讨论

DMD 主要是由于表达抗肌萎缩蛋白的基因 dystrophin 缺失、突变所致,而对此病的治疗主要在于纠正 dystrophin 基因,让其如何得到正确有效地表达。而全长 dystrophin 基因 cDNA 长 14kb,由于基因太大,致使其操纵困难。因此,诸多学者致力于在

dystrophin 功能改变不大的情况下删减一些对功能无甚影响的区段构建出一系列功能小基因^[4],本实验采用的 microdystrophin 就是保留了 N 端区 3 个杆状重复区(R1、R2、R24) 3 个铰链区(H1、H2、H4)的一段长 3.7kb 的微小基因。实验已证实,在表达该微小基因的转基因鼠中,肌纤维不像 DMD 模型鼠 *mdx*,没有出现核中心移位及单核细胞浸润现象,也未有肌肉的坏死和重建,膈肌的结构和功能也表现正常。用 AAV 表达该微小基因注射 6 ~ 7 周龄 *mdx* 鼠,可观察到 *mdx* 鼠腓肠肌、膈肌等病理改变明显好转,核中心移位明显下降,还能有效保护外界给予 *mdx* 鼠肌肉的损伤性刺激,由此可见该微小基因对于 DMD 疾病的基因治疗有很好的前景^[5,6]。

本实验所使用腺病毒载体为腺病毒 AdEasy™ 系统,其骨架质粒 pAdEasy-1(氨苄青霉素抗性) 包含腺病毒除 E1 和 E3 外的大部分 DNA 以及人工创建的酶切位点稀有 *Pac* I,穿梭质粒 pShuttle-CMV(卡那霉素抗性) 具有与 pAdEasy-1 同源的左右臂区和多克隆位点及稀有酶切位点 *Pme* I,将经 *Pme* I 线性化的带目的基因的 pShuttle-CMV 与 pAdEasy-1 两种质粒以适当的比例(质量比 = 10:1) 共电转化 *coli* BJ5183,借助 *E. coli* BJ5183 细菌内高效的同源重组机制并进行抗生素筛选,可以在很短的时间内得到重组腺病毒质粒,再用 *Pac* I 酶切去掉重组质粒上的卡那霉素抗性基因和 *ori* 区段,暴露其反向末端重复序列 ITRs,即可用来转染、包装细胞,得到表达外源基因的重组腺病毒,该方法较以前方法简单,腺病毒质粒重组效率高、出毒快,大大缩短了实验时间和周期。但是应用本系统也存在一定的缺陷,因为两种质粒在细菌中发生重组,可能导致基因的突变。在实验中,我们就发现在挑取的同源重组克隆子中有一株在 293 包装细胞中不发生病变,不能正确包装出我们所需的腺病毒。因此在利用本系统包装腺病毒时,应尽量多挑取几个克隆子,以免由于基因的突变而包装不出病毒或包装出的病毒的滴度很低,不能达到我们实验的要求。

骨髓干细胞移植被认为是治疗遗传病极有希望的一条途径,本实验室利用骨髓基质干细胞治疗 DMD 模型鼠 *mdx*、*dko* 鼠就取得了很好的疗效,不仅改善了它们的肌肉状况,还延长了 *dko* 鼠的寿命^[7,8]。但在临床上应用该项技术时由于免疫排斥的原因较难找到合适的供体,同时需放疗或化疗破坏体内的免疫系统,而使受体易发生并发症感染给其移植带来了较大的困难,而许多研究已证实腺病

毒可高效感染骨髓间充质干细胞^[9],而现在用于基因治疗较热的病毒载体腺相关病毒却对骨髓间充质干细胞的感染率很低^[10,11],本研究则利用腺病毒对骨髓间充质干细胞高感染性的特点成功构建了含 microdystrophin 的腺病毒并在 *mdx* 鼠骨髓间充质干细胞中得到了高效表达(约 50% ~ 60%),为进一步利用修饰的 DMD 基因缺陷的 *mdx* 鼠骨髓间充质干细胞,进行同种异体的干细胞移植来治疗 DMD 奠定了基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Liu H(刘焯霖), Liang X(梁秀龄), Zhang C(张成). Genetics in Neurology(神经遗传病学). The second edition(第2版). Beijing: People's Medical Publishing House(北京:人民卫生出版社) 2002, pp. 207 - 216.
- [2] O'Brien KF, Kunkel LM. Dystrophin and muscular dystrophy: past, present, and future. *Mol Genet Metab*, 2001, **74**: 75 - 88.
- [3] Meirelles Lda S, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, *in vitro* expansion, and characterization. *Br J Haematol*, 2003, **123**: 702 - 711.
- [4] Scott JM, Li S, Harper SQ, et al. Viral vectors for gene transfer of micro-, mini-, or full-length dystrophin. *Neuromuscul Disord*, 2002, **12**: S23 - S29.
- [5] Harper SQ, Hauser MA, Dello Russo C, Duan D, Crawford RW, Phelps SF, et al. Modular flexibility of dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Med*, 2002, **8**: 253 - 261.
- [6] Yue Y, Li Z, Harper SQ, Davisson RL, Chamberlain JS, Duan D. microdystrophin gene therapy of cardiomyopathy restores dystrophin-glycoprotein complex and improves sarcolemma integrity in the *mdx* mouse heart. *Circulation*, 2003, **108**: 1626 - 1632.
- [7] Li Z(李中), Zhang C(张成), Xie YM(谢有梅), et al. Dystrophin and utrophin expression in muscle tissues of DMD mouse model after transplantation treatment by bone marrow mesenchymal stem cells. *Acta Academiae Medicinae Sinicae*(中国医学科学院学报) 2004, **6**: 294 - 297.
- [8] Chen SL(陈松林), Zhang C(张成), Huang W(黄文), et al. Effect of bone marrow stem cells transplantation on microstructure of skeleton muscle in dystrophin/utrophin gene double knock-out mice. *Journal of Sun Yet-sen University*(Medical Sciences)(中山大学学报-医学科学版) 2005, **1**: 16 - 19.
- [9] Partridge K, Yang X, Clarke NM, Okubo Y, Bessho K, Sebald W, et al. Adenoviral BMP-2 gene transfer in mesenchymal stem cells: *in vitro* and *in vivo* bone formation on biodegradable polymer scaffolds. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **292**: 144 - 152.
- [10] Qing K, Li W, Zhong L, Tan M, Hansen J, Weigel-Kelley KA, et al. Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: role of cellular T-cell protein tyrosine phosphatase in transgene expression in established cell lines *in vitro* and transgenic mice *in vivo*. *J Virol*, 2003, **77**: 2741 - 2746.
- [11] Ju XD, Lou SQ, Wang WG, Peng JQ, Tian H. Effect of hydroxyurea and etoposide on transduction of human bone marrow mesenchymal stem and progenitor cell by adeno-associated virus vectors. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, **25**: 196 - 202.

欢迎订阅 2007 年《生物工程学报》

刊期 双月刊 页码 176 单价 45.00 元 全年 270 元

2007 年本刊有以下几种订阅方式:

一、邮发:

邮发代号 82-13 刊号 ISSN1000-3061 CN11-1998/Q

全国各大邮局均可订阅。

二、邮购:

欢迎直接联系编辑部邮购,免收邮费。订刊款邮汇或银行转帐均可。

收款单位:中科院微生物研究所

开户银行:中国工商银行北京分行海淀镇支行

帐号:0200004509089117425

邮寄地址:北京中关村 中科院微生物所《生物工程学报》编辑部

邮编:100080 电话 010-62554303

E-mail: cjb@sun.im.ac.cn

三、科学出版社期刊分社发行部

联系地址 北京东城区东黄城根北街 16 号(100029)

E-mail: journal@csppg.net 电话 010-64034563

欢迎订阅! 欢迎投稿! 愿《生物工程学报》成为您忠实的朋友