

不同途径感染后 5 型腺病毒在 C57BL/6J 小鼠体内的分布

陈伟盛, 高亚奇, 梁 宁, 陈海宇, 陈兴致, 詹纯列, 张修彦
(中国人民解放军南部战区总医院, 广州 510010)

[摘要] 目的 通过 4 种途径感染后检测 5 型腺病毒(Ad5)在 C57BL/6J 体内的分布。方法 112 只 C57BL/6J 小鼠分为 4 组, 以滴鼻、灌胃、尾静脉及腹腔注射方式每只小鼠给予 1×10^9 pfu/mL 的 Ad5 溶液 100 μ L, 分别在感染后 1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d 和 7 d 每组处死雌雄小鼠各 2 只, 取淋巴结、睾丸、附睾、子宫、卵巢、脾脏、肾脏、肝脏、肺、心脏、脑、血液和骨髓组织进行荧光定量 PCR 检测。结果 滴鼻组在肺和脊髓组织中检测到 Ad5, 肺组织中 Ad5 在感染后 4 d 下降比较多; 灌胃组在所有组织中均没有检测到 Ad5; 尾静脉注射组在肝脏和脾脏中检测到 Ad5, 且下降速度比较慢; 腹腔注射组在脊髓、脾脏、附睾和睾丸中检测出 Ad5。腹腔注射组脊髓中 Ad5 的含量比滴鼻组约高 10 倍, 脾脏中 Ad5 的含量与尾静脉注射组脾脏中的含量相当, 附睾和睾丸中 Ad5 含量只有其他阳性组织中检测出含量的 1%~10%。结论 Ad5 的肺部感染实验, 可每 3 d 滴鼻一次; 肝脏感染实验, 可以用尾静脉注射方法; 脾脏感染实验, 可以采用尾静脉注射或腹腔注射方法; 脊髓感染实验, 可以采用腹腔注射方法。

[关键词] 5 型腺病毒; 荧光定量 PCR; 滴鼻; 灌胃; 尾静脉注射; 腹腔注射; 小鼠

[中图分类号] R73-3; Q95-33 [文献标志码] A [文章编号] 1674-5817(2020)02-0334-05

腺病毒(adenovirus, Ad)作为基因表达载体的研究始于 1960 年代^[1], 主要研究 Ad 载体引入外源基因的可行性和安全性^[2-5]。Ad 载体转导基因有很多优点^[6]: ①宿主范围广, 既可以感染分裂期细胞, 也可以感染非分裂期细胞^[7-8]; ②安全性好, Ad 无需整合进宿主细胞基因组, 整合突变致癌率低, 基因毒性小; ③相对稳定, 病毒基因组重排频率低; ④容量大, 理论上最大容量可达 35 kb; ⑤相对容易制备, 滴度高。Ad 载体是目前基因治疗最为常用的病毒载体之一。

本文旨在研究滴鼻、灌胃、尾静脉注射及腹腔注射 5 型腺病毒(Ad5)后, 病毒在 C57BL/6J 小鼠体内的分布情况, 从而为 Ad 载体作为基因治疗的小鼠研究提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6J 小鼠 112 只, 雌雄各半, 6~8 周龄, 体质量 16~20 g, 购自广东省医学实验动物中心[SCXK(粤)2018-0002], 饲养于南部战区总医院动物实验中心[SYXK(粤)2019-0100], 实验程序符合南部战区总医院实验动物伦理委员会要求(20180051812), 并遵守国际惯例。

1.2 主要试剂和仪器

TRIzol(9109)购自日本 TaKaRa 公司; Bestar™ qPCR RT kit(2220)、Bestar™ qPCR

[收稿日期] 2019-09-09

[基金项目] 广东省科技计划项目(2017A030303058)。

[作者简介] 陈伟盛(1989—), 男, 技师, 研究方向: 疾病动物模型。E-mail: 119916373@qq.com

[通信作者] 詹纯列(1963—), 男, 主任医师, 研究方向: 实验动物标准化研究与疾病动物模型。

E-mail: zyh200521@qq.com

MasterMix(2043)均购自德国 DBI 公司; DEPC (6079)购自上海 Macklin 公司; Ad 购自深圳市百恩维生物科技有限公司; 反转录试剂盒购自德国 DBI 公司; Phanta® Max Super-Fidelity DNA Polymerase、2 × Phanta Master Mix 均购自诺唯赞生物科技有限公司; DNAzol Reagent 购自美国 Invitrogen 公司; Stratagene Real time PCR (Mx3000P)仪购自美国 Agilent 公司; PCR 扩增仪器(K960)购自杭州品格科学仪器有限公司; 微量紫外分析仪(Q6000UV)购自美国 Quawell Technology 公司; 高速离心机(TGL-16G)和低速离心机(TDL-80-2B)均购自上海安亭科学仪器厂。

1.3 标准曲线

使用 DNAzol Reagent 提取病毒 DNA, 取 1×10^9 pfu/mL 的 Ad5 溶液 125 μ L, 加入含有 250 μ L DNAzol 的离心管中, 上下颠倒混匀, 室温放置 5 min, 加入 100 μ L 异丙醇, 置于旋涡混合器上充分混匀, 室温放置 5 min。6 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 500 μ L 75% 乙醇溶液后, 再 6 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 8 mmol/L NaOH 溶液 20 μ L 溶解。提取的病毒 DNA 的吸光度(A)比值 A_{260}/A_{280} 为 1.86, 质量浓度为 1.33 μ g/ μ L。将 DNA 原液 5 μ L 加 45 μ L 双蒸水稀释 10 倍, 以此类推稀释 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 和 10^7 倍, 最后用稀释液作为模板进行 qPCR 检测, 绘制标准曲线。

1.4 动物处理及定量聚合酶链反应(qPCR)检测

112 只小鼠分为滴鼻组、灌胃组、尾静脉注射组和腹腔注射组, 每组 28 只, 雌雄各半。每只小鼠 Ad 用量 100 μ L(1×10^9 pfu/mL)。于 4 种途径感染后 1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d 和 7 d

分别取 4 组中雌雄各 2 只小鼠, 脱颈椎处死, 解剖取淋巴结、睾丸、附睾、子宫、卵巢、脾脏、肾脏、肝脏、肺、心脏、脑、血液和骨髓组织, 提取 RNA。以 2 μ g RNA 为模板, 按照 Bestar qPCR RT Kit 说明书配制反转录反应体系, 总体积为 10 μ L, 反转录成 cDNA。以 cDNA 为模板, 配制 qPCR 体系。Ad5 上游引物为 5'-AGGTGC-TTGCCACCTATCAC-3', 下游引物为 5'-TTTT-GGCACTTCGTTGAGCG-3'。内参 β -actin 上游引物为 5'-CATTGCTGACAGGATGCAGA-3', 下游引物为 5'-CTGCTGGAAGGTGGACAGTGA-3'。

在 PCR 反应管中充分混匀, 置入 Agilent Stratagene 荧光定量 PCR 仪 Mx3000P 进行荧光定量 PCR 实验。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 2 min, 94 $^{\circ}$ C 20 s, 58 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 20 s, 40 循环。每个样本检测重复 3 次。

2 结果

2.1 标准曲线

构建标准品的扩增曲线和标准曲线如图 1A 和图 1B。从图 1A 中可以看出 10 倍梯度稀释后的标准品质粒有良好的特异性扩增。图 1B 所得到的标准曲线方程为 $y = -3.3877x + 27.204$, 相关系数 R^2 为 0.9999, 标准品起始反应模板浓度与 Ct 值呈良好的线性关系。

2.2 Ad5 在各组织中的分布

滴鼻组在肺和脊髓中检测出 Ad5, 肺组织中 Ad5 含量随着时间降低, 处理后 7 d 肺组织中 Ad5 含量比处理后 1 d 下降 91.9%, 4 d 比 3 d 下降 29.6%; 脊髓组织在处理 1~3 d, Ad5 含量随时间增加, 之后开始下降, 7 d 比 1 d 下降 26.1%。

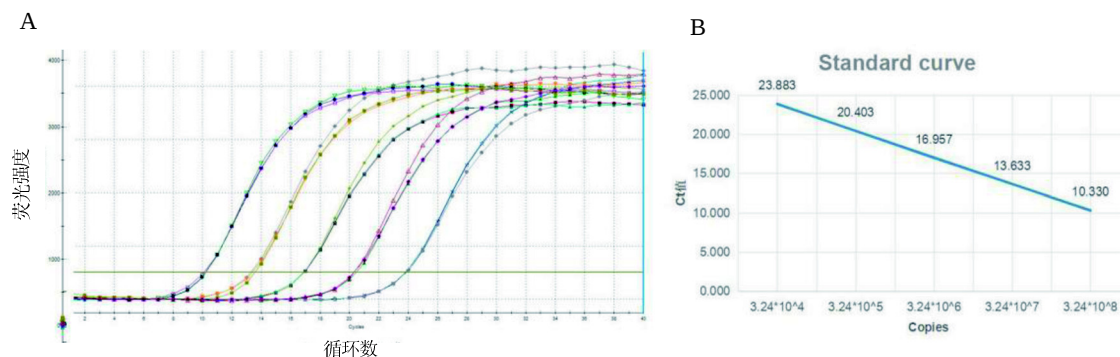


图 1 标准品的扩增曲线(A)和标准曲线(B)

Figure 1 Amplification curve (A) and standard curve (B) of standard samples

尾静脉注射组在肝脏和脾中检测出 Ad5, 肝脏和脾脏中 Ad5 含量随时间逐渐下降。7 d 肝脏 Ad5 含量比 1 d 下降 23.4%; 脾脏含量 7 d 比 1 d 下降 93.9%, 其中 5 d 比 4 d 下降 43.8%, 下降最快。

腹腔注射组在脊髓、脾脏、附睾和睾丸中检测出 Ad5, 脊髓 Ad5 含量在感染后 2 d 最高,

7 d 比 1 d 含量下降 39.3%; 脾脏和附睾中 Ad5 的含量随时间逐渐下降, 脾脏 Ad5 含量 7 d 比 1 d 下降 94.2%, 附睾含量 7 d 比 1 d 下降 54.3%; 睾丸中 Ad5 含量有波动, 可能是因为 Ad5 含量太少, 实验误差造成, 其总体呈下降趋势, 7 d 比 1 d 含量下降 64.7%。

灌胃组小鼠各器官和组织中均未检出 Ad5。

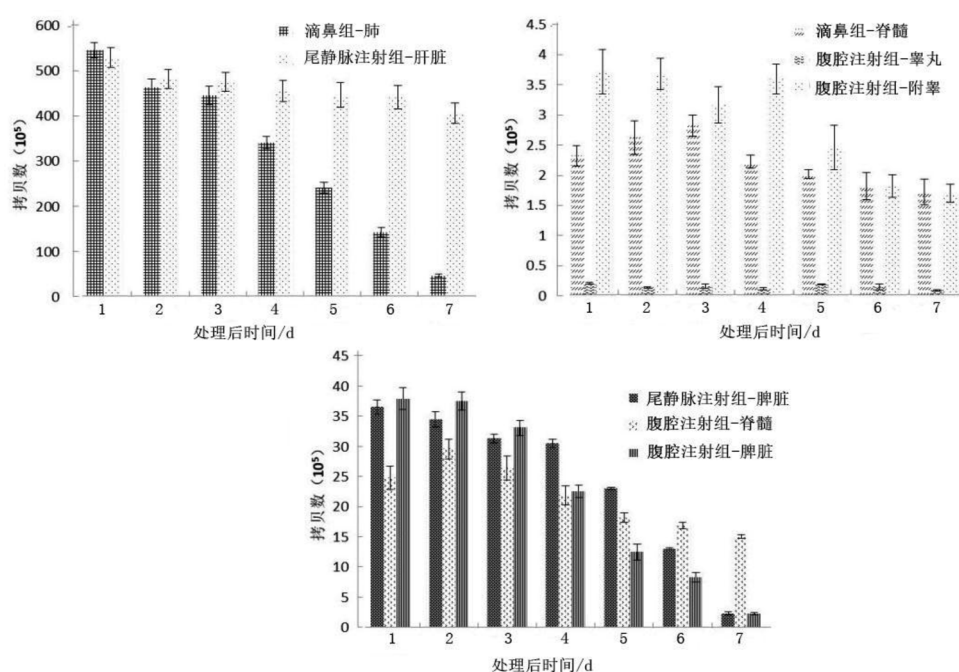


图2 检测到Ad5的小鼠组织

Figure 2 Tissues of different groups with detectable adenovirus type 5

3 讨论

Ad 广泛应用于肿瘤、心血管等领域的基因传递、再生医学以及疫苗载体^[9-13]。在许多临床试验中, Ad 都被证明是安全的载体^[14]。研究不同途径感染后 Ad5 在体内主要脏器的生物分布, 可为基因治疗、疫苗载体的小鼠实验研究中给药途径选择提供可靠的实验数据。

本实验结果显示, 滴鼻组小鼠在肺组织和脊髓中, 可以检测到 Ad。本课题组曾将 Cre Ad 滴入 B6.129S4-Krastm4Tyj/J 转基因小鼠鼻内, 诱导其表达突变 *Kras* 基因, 从而获得肺癌模型^[15]。根据本实验结果, 滴鼻感染后 4 d Ad 下降比较多,

可将每 7 d 滴鼻一次优化为每 3 d 滴鼻一次。

本实验结果还显示, 灌胃组在所有组织中均未检测到 Ad5, 这可能与消化系统对 Ad5 的灭活有关。

本研究中, 尾静脉注射组在肝脏和脾脏中检测到 Ad5。王鸣等^[16]通过尾静脉注射 Ad 后 7 d 在肝脏基本检测不到 Ad, 而 Ohashi 等^[17]给 β -葡萄糖醛酸酶缺陷小鼠静脉注射表达人 β -葡萄糖醛酸酶的重组 Ad, 肝脏、脾脏中酶的表达至少持续到 35 d。本研究结果表明, 肝脏中 Ad 下降速度较慢, 可每 7 d 重复注射一次。苗玉发等^[18]给 C57BL/6 小鼠肌肉注射治疗性 HIV 的 Ad 载体疫苗, 发现病毒载体在脾脏、骨髓有较少分布, 性

腺中没有检测到病毒载体。

本实验结果显示,腹腔注射 Ad5 后,附睾和睾丸中有病毒载体,子宫和卵巢中未发现 Ad5,附睾和睾丸中 Ad5 含量只有其他阳性组织中检测出含量的 1%~10%,脊髓中 Ad5 的含量比滴鼻组高 10 倍。

综上,肺部感染实验,可每 3 d 滴鼻一次;肝脏感染实验,可以用尾静脉注射 Ad5 的方法;脾脏感染实验,可以采用尾静脉注射或腹腔注射 Ad5 的方法;脊髓感染实验,可以采用腹腔注射 Ad5 的方法。

参考文献:

- [1] Descamps V, Duffour MT, Mathieu MC, et al. Strategies for cancer gene therapy using adenovirals vectors[J]. J Mol Med(Berl), 1996, 74(4):183-189.
- [2] Liu F, Xu K, Yang H, et al. A novel approach to glioma therapy using an oncolytic adenovirus with two specific promoters[J]. Oncol Lett, 2018, 15(3):3362-3368.
- [3] Dennis L, Zsolt R, Christian T, et al. Evaluation of adenovirus 19a as a novel vector for mucosal vaccination against influenza A viruses[J]. Vaccine, 2018, 36(19):2712-2720.
- [4] Kalesnykas G, Kokki E, Alasaarela L, et al. Comparative study of adeno-associated virus, adenovirus, baculovirus and lentivirus vectors for gene therapy of the eyes[J]. Curr Gene Ther, 2017, 17(3):235-247.
- [5] Quantin B, Perricaudet L, Tajbakhsh S, et al. Adenovirus as an expression vector in muscle cells *in vivo*[J]. Proc Natl Acad, 1992, 89(7):2581-2584.
- [6] Lee CS, Bishop ES, Zhang R, et al. Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine[J]. Genes Dis, 2017, 4(2):43-63.
- [7] Patrick E, Ningning X, Jing Q, et al. Precisely control mitochondria with light to manipulate cell fate decision[J]. Biophys J, 2019, 117(4):631-645.
- [8] Ran L, Tan X, Li Y, et al. Delivery of oncolytic adenovirus into the nucleus of tumorigenic cells by tumor microparticles for virotherapy[J]. Biomaterials, 2016, 89:56-66.
- [9] Ellen Sk, Marjolein M, Gerard W, et al. An inventory of shedding data from clinical gene therapy trials[J]. J Gene Med, 2007, 9:910-921.
- [10] Hammer SM, Magdalena S, Janes H, et al. Efficacy trial of a DNA/rAd5 HIV-1 preventive vaccine[J]. N Engl J Med, 2013, 369(22):2083-2092.
- [11] Tony R, Robert W, David K. Intravascular adenoviral agents in cancer patients: lessons from clinical trials[J]. Cancer Gene Ther, 2002, 12(9):979-986.
- [12] William W, Karoly T. Adenovirus vectors for gene therapy, vaccination and cancer gene therapy[J]. Curr Gene Ther, 2013, 13(6):424-433.
- [13] Raper SE, Chirmule N, Lee FS, et al. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer[J]. Mol Genet Metab, 2003, 80(1-2):148-158.
- [14] Ramon A, Kaori S, David C. Blood clearance rates of adenovirus type 5 in mice[J]. J Gen Virol, 2000, 81:2605-2609.
- [15] 张修彦, 高亚奇, 陈伟盛, 等. 肺腺癌小鼠模型的建立及其血生化、血常规、尿常规、病理检测[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 11(28):53-59.
- [16] 王鸣, 郭健文, 习东, 等. 腺病毒载体在小鼠肝脏的分布及其表达规律研究[J]. 实用肝脏病杂志, 2012, 6(15):216-219.
- [17] Tony O, Kazuhiko W, Keiko U, et al. Adenovirus-mediated gene transfer and expression of human β -glucuronidase gene in the liver, spleen, and central nervous system in mucopolysaccharidosis type VII mice[J]. Proc Natl Acad Sci, 1997, 2(94):1287-1292.
- [18] 苗玉发, 王欣, 沈连忠, 等. 治疗性 HIV 腺病毒载体疫苗的生物分布[J]. 毒理学杂志, 2007, 21(4):313-314.

Distribution of Adenovirus Type 5 in C57BL / 6J Mice Infected by Different Routes

CHEN Weisheng, GAO Yaqi, LIANG Ning, CHEN Haiyu,

CHEN Xingzhi, ZHAN Chunlie, ZHANG Xiuyan

(General Hospital of Southern Theatre Command, Guangzhou 510010, China)

[Abstract] **Objective** To detect the distribution of adenovirus type 5 (Ad5) in C57BL / 6J infected by four different routes. **Methods** One hundred and twelve C57BL / 6J mice were divided into 4 groups, each mouse was given 100 μ L of Ad5 solution (1×10^9 PFU / mL) by intranasal drip, intragastric administration, tail vein injection and intraperitoneal injection. On the 1 st, 2 nd, 3 rd, 4 th, 5 th, 6 th and 7 th day after infection, two males and two females in each group were sacrificed for the real-time PCR quantitative detection of Ad5 content in lymph nodes, testis, epididymis, uterus, ovary, spleen, kidney, liver, lung, heart, brain, blood and bone marrow. **Results** Ad5 was detected in lung and spinal cord tissue in intranasal drip group, the content of Ad5 in lung decreased mostly 4 days after infection; Ad5 was not detected in all tissues in intragastric administration group; Ad5 was detected in liver and spleen in tail vein injection group, and the decline rate was slow; Ad5 was detected in spinal cord, spleen, epididymis and testis in intraperitoneal injection group, the content of Ad5 in the spinal cord was about 10 times higher than that in the intranasal drip group, the content of Ad5 in spleen was similar to that in tail vein injection group, and the content of Ad5 in epididymis and testis was only 1% ~ 10% of that in other positive tissues. **Conclusion** The lung infection test of Ad5 can be carried out by intranasal drip once every 3 days, the liver infection test by tail vein injection, the spleen infection test by tail vein injection or intraperitoneal injection, and the spinal cord infection test by intraperitoneal injection.

[Key words] Adenovirus type 5; Real-time PCR; Intranasal drip; Intragastric administration; Tail vein injection; Intraperitoneal injection; Mice