

## •实验研究•

[文章编号] 1007-3949(2005)13-02-0146-05

## 重组腺相关病毒载体介导的人载脂蛋白 A iv 及载脂蛋白 A iv Milano 在肌源性细胞 C2C12 中的表达

王志广<sup>1</sup>, 桂 鸣<sup>2</sup>, 蒋 莉<sup>1</sup>, 陈秀英<sup>1</sup>, 黄 峻<sup>2</sup>, 陈 琪<sup>1</sup>, 范乐明<sup>1</sup>

(1. 南京医科大学动脉粥样硬化研究中心, 江苏省南京市 210029;

2. 江苏省人民医院心内科, 江苏省南京市 210029)

[关键词] 细胞生物学; 动脉粥样硬化基因治疗; 基因转移; 腺相关病毒; 载脂蛋白 A iv; 载脂蛋白 A iv Milano; 肌源性细胞

[摘要] 目的 以重组 2 型腺相关病毒为载体介导人载脂蛋白 A iv 及载脂蛋白 A iv Milano 在小鼠肌源性细胞 C2C12 中的表达, 探索一种崭新的预防、治疗动脉粥样硬化性疾病的途径。方法 以正常人肝组织中抽提的 RNA 为模板, 用逆转录聚合酶链反应获得人载脂蛋白 A iv cDNA, 点突变制备载脂蛋白 A iv Milano cDNA。分别将载脂蛋白 A iv、载脂蛋白 A iv Milano 的 cDNA 插入重组 2 型腺相关病毒载体质粒, 并与辅助质粒共转染包装细胞 293T 获得编码人载脂蛋白 A iv 和载脂蛋白 A iv Milano 的重组腺相关病毒载体, 粗提后以冰乙醇法进行浓缩。斑点杂交检测重组 2 型腺相关病毒载体滴度, 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测其纯度。分别用含载脂蛋白 A iv 或载脂蛋白 A iv Milano cDNA 的编码人载脂蛋白 A iv 和载脂蛋白 A iv Milano 的重组腺相关病毒对小鼠肌源性细胞 C2C12 进行感染, 酶联免疫吸附法检测蛋白表达情况。结果 聚合酶链反应产物序列正确, 点突变成功。编码人载脂蛋白 A iv 和载脂蛋白 A iv Milano 的重组腺相关病毒的滴度均在  $2 \times 10^{14}$  个/L 左右。重组 2 型腺相关病毒纯度良好。载脂蛋白 A iv 及载脂蛋白 A iv Milano 分别获得  $0.39 \pm 0.04$  mg/L 和  $0.31 \pm 0.03$  mg/L 的表达水平。结论 成功制备表达载脂蛋白 A iv 或载脂蛋白 A iv Milano 的重组腺相关病毒载体, 并在 C2C12 细胞中获得有效表达, 为进一步探索方便、安全的预防和治疗动脉粥样硬化性疾病的方法打下了基础。

[中图分类号] Q2

[文献标识码] A

## Recombinant Adeno-Associated Viruses Mediated Apolipoprotein A1 and Apolipoprotein A1 Milano Expression in Myogenic C2C12 Cells

WANG Zhi-Guang<sup>1</sup>, GUI Ming<sup>2</sup>, JIANG Li<sup>1</sup>, CHEN Xiu-Ying<sup>1</sup>, HUANG Jun<sup>2</sup>, CHEN Qi<sup>1</sup>, and FAN Le-Ming<sup>1</sup>

(1. Atherosclerosis Research Center, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China; 2. Cardiovascular Division, Jiangsu Province Hospital, Nanjing 210029, China)

[KEY WORDS] Adeno-Associated Viruses; Apolipoprotein A iv; Apolipoprotein A iv Milano; Myogenic Cells; Gene Transfer; Atherosclerosis

[ABSTRACT] Aim To construct recombinant adeno-associated viruses (rAAV) vectors carrying human apolipoprotein A iv (apoA iv) and apo A iv Milano cDNA, and explore a new strategy to prevent and treat the atherosclerotic diseases. Methods

Human apo A iv cDNA with a his-tag in upward of the cDNA sequence was obtained by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and polymerase chain reaction (PCR), human apo A iv Milano cDNA was then prepared by Site-Directed Mutagenesis. The particle numbers of rAAV vectors after extracted with a most economic and convenient method was assayed by Dot-blot, and the purity was assayed by SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The expression efficiency of the apo A iv and apo A iv Milano in C2C12 after infected by rAAV vectors were detected by ELISA method. Results The titre of the

rAAV vectors of apo A iv and apo A iv Milano was about  $2 \times 10^{14}$ /L, and the result of SDS-PAGE showed the purity of the rAAV vectors was good. The expressed apo A iv level is  $0.39 \pm 0.04$  mg/L and the apo A iv Milano is  $0.31 \pm 0.03$  mg/L in the DMEM culture medium. Conclusions The success of the rAAV vectors construction and purification and the expression of

apo A iv and apo A iv Milano in C2C12 cells mediated by these vectors, makes the injection of rAAV encoding human apo A iv (rAAVA) and rAAV encoding human apo A iv milano (rAAVAM) vectors in mouse muscular cells possible, and contributes to the hope of finding a safe and effective way to prevent and treat atherosclerotic diseases.

[收稿日期] 2004-10-22 [修回日期] 2005-01-30

[基金项目] 江苏省教育厅自然科学基金(00KJB31006)、江苏省普通高校自然科学基金计划(01KJB32003)和南京医科大学科技创新基金(CX003001)资助

[作者简介] 王志广, 硕士研究生, 主要从事腺相关病毒介导的基因转移的研究。桂鸣, 博士, 主任医师, 主要从事心血管疾病的相关研究和治疗工作。陈琪, 奥地利 Graz 大学生物化学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化发生的分子机制和信号转导方面的研究。范乐明, 教授, 博士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化的病理生理学分子机制和基因治疗方面的研究, E-mail 为 lmfan@njmu.edu.cn。

载脂蛋白 A iv 是高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 的重要组成部分, 且为卵磷脂胆固醇酰基转移酶 (lecithin cholesterol acyl transferase, LCAT) 的主要激活剂。HDL 和 LCAT 都参与胆固醇的逆转运, 防止胆固醇在外周组织过多沉积, 在抗动脉粥样硬化性疾病中发挥着重要的作用<sup>[1-5]</sup>。人载脂蛋白 A iv Milano 携带者的 HDL 及载脂蛋白 A iv 虽然处于相当低的水平, 而且甘油三酯水平显著升高, 但是他们患心血管疾病的机率并没有比正常人高<sup>[6]</sup>。随后的研究发现载脂蛋白 A iv Milano 比正常人载脂蛋白 A iv 具有更强的抗动脉粥样硬化作用, 因而受到广泛关注。近年国外有用静脉输入重组的载脂蛋白 A iv Milano 蛋白作为防治动脉粥样硬化性疾病的一种方法, 获得一定成效, 但需要反复使用是其一大缺点。我们设想通过基因转移使载脂蛋白 A iv Milano 蛋白能在体内长期表达无疑是一种更为简便实用的方法。鉴于腺相关病毒 (adenovirus-associated virus, AAV) 具有长期、高效、稳定转染组织细胞的特点, 本文以 AAV 质粒载体 PNTC3CMV $\beta$  及其辅助质粒 pDG 为基础, 成功构建了含有正常人载脂蛋白 A iv 和载脂蛋白 A iv Milano 的重组腺相关病毒载体, 以此转染小鼠肌源性细胞获得有效表达。并为探索一种崭新的预防和治疗动脉硬化性疾病的方法提供了希望。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

质粒 PNTC3CMV $\beta$ 、pDG 由 Dickson 教授 (University of London, UK) 惠赠, Lipofectamine 2000 试剂 (美国 Invitrogen 公司), JM109、人胚肾 293T 细胞和小鼠肌源性细胞 C2C12 均为本实验室保存, QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit 试剂盒 (美国 Stratagene 公司), 引物由上海捷倍思基因技术有限公司合成, Taq 酶 (南京生兴公司), 质粒抽提纯化试剂盒、Not-I 和 Xho-I、RNA 酶抑制剂 (日本 Takara Biotech 公司), 胶中回收试剂盒 (北京中鼎生物技术有限公司), DIG 标记试剂盒 (瑞士 Roche 公司), 尼龙膜 (美国 Millipore 公司), HRP (美国 Sigma 公司), 抗人载脂蛋白 A iv 血清 (南京建成生物有限公司), T-A 克隆、小牛肠碱性磷酸酶 (CIAP)、M-MLV 逆转录酶 (美国 Promega 公司), 连接酶 (美国 NEB 公司)。9600 型 PCR 仪 (美国 ABI 公司), 低温高速离心机 (美国 Sorvall 公司), MODEL 2000 型杂交炉 (美国 Robbins Scientific 公司)。

### 1.2 质粒转化、扩增和纯化及感受态细胞制备

质粒的转化扩增按常规方法进行, 抽提及纯化用 Takara 公司试剂盒进行, 感受态细胞制备见《分子克隆》第三版。

### 1.3 聚合酶链反应及点突变

从正常肝组织中提取 RNA。抽提 RNA 及逆转录反应按常规方法进行。逆转录聚合酶链反应引物: 上游 5'-CITGGATCCACCATGAAAGCTGCGGTGCTGACG-3', 下游 5'-CITTAAGCTTTCACTGGTGTGAGCITCTTAGT-3'。反应体系 20  $\mu$ L, 其中模板为逆转录反应后 cDNA (约 300 ng), 10  $\times$  buffer 2  $\mu$ L, 25 mmol/L Mg<sup>2+</sup> 1.5  $\mu$ L, 5 mmol/L dNTP 0.5  $\mu$ L, 10 mmol/L 引物各 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 15  $\mu$ L, 5 Mu/L Taq 酶 0.5  $\mu$ L。反应程序: 94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 50  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环后 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 最后 4  $^{\circ}$ C 保温。为将来动物实验考虑, 本实验所用人载脂蛋白 A iv 及载脂蛋白 A iv Milano 的 cDNA 起始密码子前都加了 HIS 标签<sup>[7]</sup>, 以便对内、外源性蛋白进行区分。

加 HIS 标签的方法是进行三次聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR), 第一次和第二次 PCR 将 6 个编码 HIS 蛋白的碱基加在人载脂蛋白 A iv cDNA 启动密码子前方, 第三次 PCR 引入 Not-I 的酶切位点, 以便连入 AAV 载体质粒。三次 PCR 反应的引物为: 第一次 PCR 上游引物 5'-ATCGCACCATCACCATCACCATATGAAAGCTGCGGTGCTGACCTTG-3', 下游引物 5'-TTGCGGCCGCAATCACTGGGTGTTGAGCITG-3'; 第二次 PCR 上游引物 5'-CITGGATC-CACCATGCGTGGATCGCACCATCACCATCACCAT AT-GAAAG-3', 下游引物 5'-TTGCGGCCGCAATCACTGGGTGTTGAGCITG-3'; 第三次 PCR 上游引物 5'-TTGCGGCCGCAATGCGTGGATCGCACCAT CA-3', 下游引物 5'-TTGCGGCCGCAATCACTGGGTGTTGAGCITG-3'。反应体系 20  $\mu$ L, 第一次 PCR 的模板为连入人载脂蛋白 A iv cDNA 的 T-A 克隆 1  $\mu$ L (200 ng), 第二次及第三次 PCR 依次为上次 PCR 产物 (300 ng), 10  $\times$  buffer 2  $\mu$ L, 25 mmol/L Mg<sup>2+</sup> 1.5  $\mu$ L, 5 mmol/L dNTP 0.5  $\mu$ L, 10 mmol/L 引物各 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 15  $\mu$ L, 5 Mu/L Taq 酶 0.5  $\mu$ L。反应程序: 94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 51  $^{\circ}$ C (第一次 PCR)/53  $^{\circ}$ C (第二次 PCR)/51  $^{\circ}$ C (第三次 PCR) 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环后 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 最后 4  $^{\circ}$ C 保温。第三次 PCR 产物连入 T-A 克隆, 并测序进行鉴定。

利用定点突变试剂盒, 把加了 HIS 标签和 Not-I

酶切位点的正常人的载脂蛋白 A iv cDNA 序列点突变为载脂蛋白 A iv Milano cDNA。上游引物 5'-CTGGGCGAGGAGATG [T] GCGACCGCGCGCG-3', 下游引物 5'-GACCCGCTCCTCTAC [A] CGCTGCGCGCGCG-3', 加框者为突变碱基。按试剂盒说明书进行操作, 并测序鉴定。

#### 1.4 编码人载脂蛋白 A iv 和载脂蛋白 A iv Milano 重组腺相关病毒质粒载体的构建

将连有载脂蛋白 A iv 及载脂蛋白 A iv Milano cDNA 的 T-A 克隆质粒及质粒 PNTC3CMVB 用 Not-I 进行酶切后进行琼脂糖凝胶电泳, 将目的条带进行割胶纯化后, 用小牛肠碱性磷酸酶将 PNTC3CMVB 酶切产物中的 AAV 载体片段进行去磷酸化处理, 然后与载脂蛋白 A iv 及载脂蛋白 A iv Milano 片段按摩尔比 1:3 的比例进行连接反应。取 5  $\mu$ L 连接产物进行转化, 克隆后, 选择数个克隆扩大培养后抽提质粒并用 Xho-I 进行酶切鉴定。

#### 1.5 编码人载脂蛋白 A iv 和载脂蛋白 A iv Milano 的重组腺相关病毒的制备、分离和纯化

HEK293T 细胞以  $(1.0 \sim 2.0) \times 10^7/10$  cm 的密度接种于 10 cm 细胞培养板, 次日达到 70%~80% 的汇合度, 换液后, 以质粒和脂质体 1:3 的比例进行转染, 72 h 后收集细胞及上清。参考文献[8]粗提重组 AAV 载体, 再以冰乙醇法进行浓缩。

#### 1.6 斑点杂交鉴定编码人载脂蛋白 A iv 和载脂蛋白 A iv Milano 的重组腺相关病毒颗粒

标记的探针为从琼脂糖凝胶中回收纯化的上述第二次 PCR 产物。探针制备及斑点杂交方法按试剂盒说明书进行操作。

#### 1.7 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测编码人载脂蛋白 A iv 和载脂蛋白 A iv Milano 的重组腺相关病毒纯度

取 10  $\mu$ L 纯化的 rAAV 样品, 加入  $2 \times$  蛋白上样缓冲液 10  $\mu$ L, 沸水浴 5 min, 加样。分离胶 15%, 浓缩胶 5%, 恒压 110 V, 电泳 140 min。电泳完毕, 用考马斯亮蓝染色 2 h 后, 脱色液脱色 2 h。

#### 1.8 编码人载脂蛋白 A iv 和载脂蛋白 A iv Milano 的重组腺相关病毒感染 C2C12 细胞

35 mm 的 6 孔板以  $1 \times 10^5$  个 C2C12 细胞进行接种, 第二天达到 70%~80% 的汇合度。弃去旧培养基, 滴入预先加 50  $\mu$ L rAAV 的 300~500  $\mu$ L 无血清 DMEM 培养基, 以覆盖细胞表面为准, 置 37  $^{\circ}$ C 细胞培养箱感染 30 min 后换含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基。24 h 后换无血清的 DMEM 培养基, 以覆盖细胞表面为宜, 培养 24 h 后收集细胞培养液, -20  $^{\circ}$ C 保

存, 待以后进行检测。

#### 1.9 HRP 标记抗人载脂蛋白 A iv 血清

用简易过碘酸钠法进行。

#### 1.10 产物表达的检测

酶联免疫吸附法检测载脂蛋白 A iv 及载脂蛋白 A iv Milano 的表达。

## 2 结果

### 2.1 聚合酶链反应

载脂蛋白 A iv cDNA 序列与 Gene Bank 数据库中的人载脂蛋白 A iv cDNA 序列相符, 且 HIS 标签的序列和位置均正确(图 1, Figure 1)。

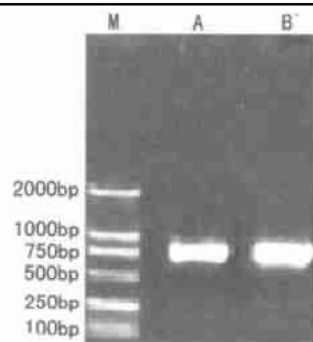


图 1. RT-PCR 及 PCR 产物凝胶电泳 M 为 2 000 bp 的 Marker, A 为以正常人肝组织中提取的 RNA 为模板经逆转录聚合酶链反应扩增出来的人载脂蛋白 A iv cDNA (825 bp), B 为经三次 PCR 反应扩增出来的带有 Not-I 酶切位点及 HIS 标签的人载脂蛋白 A iv cDNA (862 bp)。

Figure 1. The electrophoretogram of RT-PCR and PCR products

### 2.2 定点突变

载脂蛋白 A iv 中的碱基 G 已经变为 A, 可见突变成功(图 2, Figure 2)。

### 2.3 重组腺相关病毒滴度

经分别对编码人载脂蛋白 A iv 的 rAAV (rAAV encoding human apo A iv, rAAVA) 和编码人载脂蛋白 A iv Milano 的 rAAV (rAAV encoding human apoA iv milano, rAAVAM) 进行斑点杂交并计算后, 得出颗粒数均约为  $2 \times 10^{14}$  个/L(图 3, Figure 3)。

### 2.4 重组腺相关病毒纯度

VP1、VP2、VP3 是组成 AAV-2 外壳的三种蛋白质, 分子量依次为 87、72 和 62 kDa, VP1、VP2 和 VP3 三种蛋白在 AAV-2 中的比例约为 1:1:10, 在 SDS-PAGE 电泳后形成了 3 条特征性条带。VP1、VP2 和 VP3 符合大约 1:1:10 的比例, 并且条带清晰, 无其他杂带, 可见纯度良好(图 4, Figure 4)。

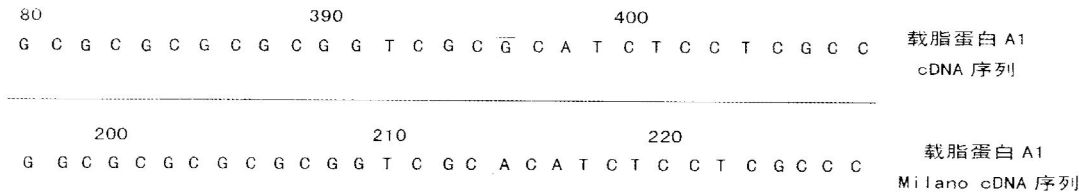


图 2. 定点突变结果  
Figure 2. The results of Site Directed Mutagenesis

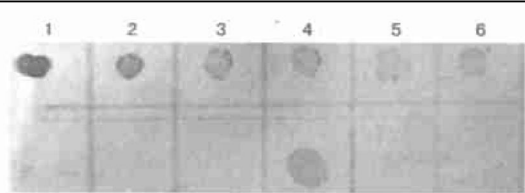


图 3. 斑点杂交检测重组腺相关病毒滴度 1~6 为分别 1: 10, 1: 20, 1: 40, 1: 80, 1: 100, 1: 200 对 rAAV 载体质粒进行稀释以作为标准。  
Figure 3. The result of Dot blot to detect the titre of rAAV

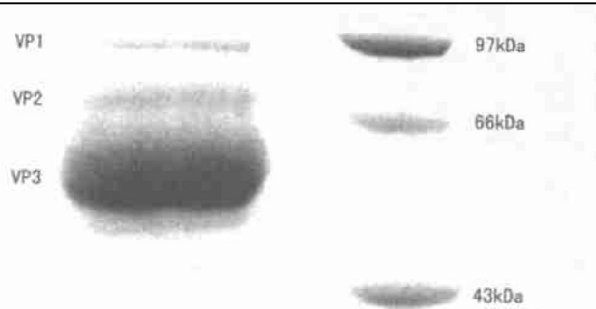


图 4. SDS-PAGE 检测重组腺相关病毒纯度  
Figure 4. The results of SDS PAGE to detect the purity of rAAV

2.5 蛋白表达情况

载脂蛋白 A iv 获得 0.39 ± 0.04 mg/L 的表达水平, 载脂蛋白 A iv Milano 获得 0.31 ± 0.03 mg/L 的表达水平, 可见 rAAV 及 rAAVAM 载体均可以有效的表达目的蛋白(表 1, Table 1)。

表 1. 酶联免疫吸附法检测蛋白表达情况  
Table 1. The ELISA result of the protein expression of human apoA-1 and apoA-1 Milano ( $\bar{x} \pm s$ , n = 5, mg/L)

分 组	蛋白浓度
对照组	0.024 ± 0.015
载脂蛋白 A ivMilano 组	0.31 ± 0.03 <sup>a</sup>
载脂蛋白 A iv组	0.39 ± 0.04 <sup>b</sup>

a: P < 0.01, b: P < 0.01, 与对照组比较。

3 讨论

载脂蛋白 A iv 是人体内一种重要的具有抗动脉粥样硬化性疾病的载脂蛋白。是载脂蛋白 A iv 的一种自然突变体, 系载脂蛋白 A iv 第 173 位的精氨酸突变为半胱氨酸的一种点突变。自从 80 年代在意大利被发现后, 其抗动脉粥样硬化性疾病的作用和作用机理一直是研究热点。迄今已发现四十余名载脂蛋白 A iv Milano 携带者, 都具有严重的低  $\alpha$  脂蛋白、正常到升高的低密度脂蛋白胆固醇和中等程度的高甘油三酯血症, 这些临床情况一般是患冠状动脉疾病的高危因素。流行病学调查表明, 载脂蛋白 A iv Milano 携带者  $\alpha$  脂蛋白、载脂蛋白 A iv 处相当低的水平, 但是心血管病患率却明显比和他们生活在同一环境下的正常人低。研究发现含有载脂蛋白 A iv Milano 的 HDL 从细胞中摄取胆固醇的效率较高, 增加了胆固醇的逆转运效率<sup>[9]</sup>。精氨酸突变成半胱氨酸使载脂蛋白 A iv Milano 比载脂蛋白 A iv 多了一个二硫键, 该二硫键的形成导致同源二聚体载脂蛋白 A-IM/A-IM 和异源二聚体载脂蛋白 A-IM/载脂蛋白 AII 的形成<sup>[10]</sup>, 载脂蛋白 A-IM/A-IM 在血循环中的半衰期比较长, 胆固醇清除效率高, 被认为是发挥载脂蛋白 A-IM 抗动脉粥样性疾病的作用重要成分<sup>[11, 12]</sup>。动物实验证明载脂蛋白 A iv Milano 可以延迟血栓形成、抑制血小板聚集和减轻形成血栓的重量, 对血栓的形成具有明显的抑制作用<sup>[13]</sup>。研究发现重组的载脂蛋白 A iv Milano 和磷脂的复合物可以抑制动脉粥样硬化的发生发展并且减轻载脂蛋白 E 缺陷小鼠动脉斑块中的脂质和巨噬细胞成分<sup>[14]</sup>。研究还发现载脂蛋白 E 缺陷小鼠只给予高剂量的载脂蛋白 A iv Milano 可以迅速动员组织中胆固醇, 减少斑块中脂质和巨噬细胞的量<sup>[15]</sup>。在 2001 年到 2003 年的三年间, 在美国俄亥俄州一个临床研究基地进行的一项研究证明静脉给予急性冠状动脉综合症患者重组载脂蛋白 A iv Milano 和磷脂的复合物(ETC-216), 通过血管内超声可以明显观察到动脉

斑块的消减<sup>[16]</sup>。这些研究结果为载脂蛋白 A iv Milano 防治动脉粥样硬化性疾病提供了理论和实验依据。

本实验采用腺相关病毒作为基因转移的载体,其最突出的优势是安全,至今未发现对人体有任何毒性作用,且其宿主细胞种类广泛,可感染处于分裂和非分裂期的细胞,目的基因可整合入宿主细胞的染色体中<sup>[17,18]</sup>。此外,腺相关病毒载体介导的基因转移不引起T细胞介导的针对载体内部目的基因的免疫反应,从而目的蛋白可以在宿主细胞中长期、持久的表达<sup>[19]</sup>。长期以来 rAAV 的分离纯化最常用的 CsCl 密度梯度离心法操作烦琐,回收率低,而且所需试剂价格昂贵,大大限制了 AAV 的研究和应用。本文采用的方法<sup>[8]</sup>利用 AAV 具有耐受多种有机溶剂(氯仿、乙醇等)的特性进行 rAAV 分离、纯化和浓缩。结果证明该法操作简单,所需试剂价格低廉, rAAV 回收率高,纯度好,功能保持良好,值得推广使用。

静脉给予重组的载脂蛋白 A iv Milano 蛋白是预防和治疗动脉粥样硬化性疾病的一种有效方法,但是由于蛋白的不断降解,要预防和治疗动脉粥样硬化性疾病必须反复使用,不仅费时费钱,而且也很烦琐。通过基因转移使载脂蛋白 A iv Milano 蛋白在体内合成显然是更为合理的途径。本实验选择骨骼肌细胞为靶细胞是由于骨骼肌数量多,分布广,且浅表,容易进行操作, rAAV 载体可以直接注入骨骼肌,长期大量表达目的蛋白。虽然载脂蛋白 A iv/载脂蛋白 A iv Milano 主要是在肝组织合成,但属于分泌性蛋白,在血循环中行使作用,故完全可以在骨骼肌中表达,进入血循环产生抗动脉硬化性疾病的作用。通过肌肉注射高效表达载脂蛋白 A iv Milano 蛋白的腺相关病毒载体,从而使载脂蛋白 A iv Milano 蛋白长期持久的在体内表达无疑是一种更方便、经济和实用的方法。本研究为进一步探索 rAAV 介导的基因转移进行动物水平实验,并将 rAAV 载体用于临床的可行性和安全性研究打下了基础,也为探索一种崭新的预防和治疗动脉粥样硬化性疾病的方法提供了希望。

#### [参考文献]

- [1] Stein O, Stein Y. Atheroprotective mechanisms of HDL. *Atherosclerosis*, 1999, **144** (2): 285-301
- [2] 全其广, 赵水平. 高密度脂蛋白的代谢研究进展. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (2): 169-171
- [3] Berger GM. High-density lipoproteins, reverse cholesterol transport and atherosclerosis-recent developments. *S Afr Med J*, 1984, **65** (13): 503-506
- [4] Kwiterovich PO Jr. The antiatherogenic role of high-density lipoprotein cholesterol. *Am J Cardiol*, 1998, **82** (9A): 13Q-21Q
- [5] 徐燕华, 傅明德. 高密度脂蛋白受体研究进展. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (3): 259-262
- [6] Franceschini G, Sirtori CR, Capurso A, Weisgraber KH, Mahley RW. A iv Milano apolipoprotein: decreased high density lipoprotein cholesterol levels with significant lipoprotein modifications and without clinical atherosclerosis in an Italian family. *J Clin Invest*, 1980, **66**: 892-900
- [7] Bergeron J, Frank PG, Emmanuel F, Latta M, Zhao Y, Sparks DL, et al. Characterization of human apolipoprotein A iv expressed in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, 1997, **1344** (2): 139-152
- [8] 吴小兵, 董小岩, 伍志坚, 屈建国, 侯云德. 一种快速高效分离和纯化重组腺病毒伴随病毒载体的方法. *科学通报*, 2000, **45** (19): 2 071-075
- [9] Franceschini G, Calabresi L, Chiesa G, Parolini C, Sirtori CR, Canavesi M, et al. Increased cholesterol efflux potential of sera from apo A iv Milano carriers and transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, **19** (5): 1 257-262
- [10] Calabresi L, Vecchio G, Frigerio F, Vavassori L, Sirtori CR, Franceschini G. Reconstituted high-density lipoproteins with a disulfide-linked apolipoprotein A iv dimer: evidence for restricted particle size heterogeneity. *Biochemistry*, 1997, **36** (41): 12 428-433
- [11] Chiesa G, Sirtori CR. Recombinant apolipoprotein A iv (Milano): a novel agent for the induction of regression of atherosclerotic plaques. *Ann Med*, 2003, **35**(4): 267-273
- [12] Roma P, Gregg RE, Meng MS, Ronan R, Zech LA, Franceschini G, et al. In vivo metabolism of a mutant form of apolipoprotein A iv, apo A iv Milano, associated with familial hypolipoproteinemia. *J Clin Invest*, 1993, **91**(4): 1 445-452
- [13] Li D, Weng S, Yang B, Zander DS, Saldeen T, Nichols WW, et al. Inhibition of arterial thrombus formation by apo A iv Milano. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, **19** (2): 378-383
- [14] Shah PK, Nilsson J, Kaul S, Fishbein MC, Ageland H, Hamsten A, et al. Effects of recombinant apolipoprotein A-I (Milano) on aortic atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 1998, **97** (8): 780-785
- [15] Shah PK, Yano J, Reyes O, Chyu KY, Kaul S, Bisgaier CL, et al. High-dose recombinant apolipoprotein A iv (milano) mobilizes tissue cholesterol and rapidly reduces plaque lipid and macrophage content in apolipoprotein E-deficient mice. Potential implications for acute plaque stabilization. *Circulation*, 2001, **103** (25): 3 047-050
- [16] Nissen SE, Tsunoda T, Tuzcu EM, Schoenhagen P, Cooper CL, Yasin M, et al. Effect of recombinant apo A iv Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *JAMA*, 2003, **290** (17): 2 292-300
- [17] Linden RM, Ward P, Giraud C, Winocour E, Berns KI. Site-specific integration by adenovirus-associated virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (21): 11 288-294
- [18] Mehrle S, Rohde V, Schlehofer JR. Evidence of chromosomal integration of AAV DNA in human testis tissue. *Virus Genes*, 2004, **28** (1): 61-69
- [19] Kay MA, Manno CS, Ragni MV, Larson PJ, Couto LB, McClelland A, et al. Evidence for gene transfer and expression for factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nature Genetics*, 2000, **24** (3): 257-261

(此文编辑 文玉珊)