

## phiC31 整合酶介导的低密度脂蛋白受体基因治疗对小鼠动脉粥样硬化病变的影响

邓 艳, 许晓婷, 雷霆雯, 欧海龙

(贵州医科大学生物化学与分子生物学教研室, 贵州省贵阳市 550025)

[关键词] 家族性高胆固醇血症; 低密度脂蛋白受体; 动脉粥样硬化; LDLR<sup>-/-</sup>小鼠

[摘要] 目的 phiC31 整合酶可以介导携带含有 attB 序列的外源 DNA 与基因组特定的位点重组, 文章分析该 phiC31 整合酶所介导的外源 LDLR 表达对家族性高胆固醇血症模型小鼠(LDLR<sup>-/-</sup>)血脂代谢及动脉粥样硬化病变的影响。方法 雄性小鼠进行高脂饲料喂养诱导病变后, 通过尾静脉共注射表达整合酶的 pCMV-int 和带有 attB 序列的 pcDNA3.1-TBG-LDLR-attB 的靶向整合载体, 同时设置共注射 pCMV-int 和非靶向无 attB 序列 pcDNA3.1-TBG-LDLR 的 LDLR 表达载体小鼠作为对照。结果 LDLR 在 phiC31 整合酶的介导下, 在小鼠肝细胞系中高效、持久表达; 体内检测还发现 LDLR 在肝脏特异甲状腺球蛋白启动子的作用下在肝细胞内特异表达, 而且该表达明显改善血脂代谢状况, 与非靶向小鼠相比, 携带 attB 靶向整合的 LDLR 可以使血浆低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)低 35% 左右, 主动脉斑块/管腔总面积比减小了 19%。结论 位点特异性整合的 LDLR 的表达, 降低 LDLR<sup>-/-</sup>小鼠血浆胆固醇、改善动脉粥样硬化病变。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Effect of phiC31 integrase-mediated low density lipoprotein receptor gene therapy on atherosclerosis in mice

DENG Yan, XU Xiao-Ting, LEI Ting-Wen, OU Hai-Long

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

[KEY WORDS] Familial hypercholesterolemia; Low density lipoprotein receptor; Atherosclerosis; LDLR<sup>-/-</sup> mice

[ABSTRACT] **Aim** PhiC31 integrase directs foreign DNA containing with attB integration into specific genomic DNA, incurring long-term and stable expression. This study analyzed the effect of LDLR expression mediated by phiC31 integrase on lipoprotein profile and atherosclerosis in family hypercholesterolaemia mice (LDLR<sup>-/-</sup>). **Methods** Male LDLR<sup>-/-</sup> mice were tail vein co-injected with phiC31 integrase expression plasmid pCMV-int and plasmid pcDNA 3.1-TBG-LDLR-attB carried with LDLR gene and attB sequence. Mice co-injected with pCMV-int and pcDNA3.1-TBG-LDLR lacking attB sequence were used as control. **Results** LDLR directed by thyroxine binding globulin promoter and mediated by phiC31 integrase maintained higher and persistent expression in H22 cells and specifically in livers from mice injected with pcDNA3.1-TBG-LDLR-attB. The expression reduced serum low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels up to 35%, and resulted in decreases by 19% of plaque size/lumen area in cross section at ascending aorta compared with mice co-injected with pCMV-int and pcDNA3.1-TBG-LDLR. **Conclusion** The expression of LDLR mediated by phiC31 integrase improved lipoprotein profile and ameliorated atherosclerosis in LDLR<sup>-/-</sup> mice.

家族性高胆固醇血症(familial hypercholesterolemia, FH)即Ⅱa型高脂蛋白血症是由于细胞膜上的低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)基因缺陷,血浆中富含胆固醇酯的

低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)不能通过 LDLR 进入细胞分解代谢,而引起的一种常染色体显性遗传代谢性疾病,在临床上表现为儿童期血浆胆固醇水平显著升高、皮肤肌腱出现黄色瘤和早

[收稿日期] 2018-01-04

[修回日期] 2018-02-05

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81460277)

[作者简介] 邓艳,硕士研究生,主要从事脂代谢与动脉粥样硬化方向的研究。通讯作者欧海龙,教授,硕士研究生导师,主要从事脂代谢与动脉粥样硬化方向的研究,E-mail 为 ouhailong@hotmail.com。

发动脉粥样硬化等<sup>[1]</sup>。目前对 FH 的治疗主要依赖于终生服用如他汀类等各种降脂类药物,但效果受个体遗传背景,特别是 LDLR 的基因突变类型影响很大,而且长期的药物服用,也会带来如横纹肌溶解、肝脏损伤等毒副作用<sup>[2]</sup>。基因治疗的方法可以纠正体内受损基因或代偿性表达 LDLR,改善体内脂质代谢,是治疗 FH 的一种理想方法。目前,对 FH 的基因治疗基本上是以经过改造的病毒载体作为目的基因的输送工具,包括慢病毒载体、腺病毒载体以及腺相关病毒载体等,但是这些病毒载体的随机整合或者非整合性缺点,以及由于病毒自身的安全性、免疫原性等问题,限制了其在临床上的应用。phiC31 整合酶介导噬菌体的 attP 序列与细菌的 attB 序列特异性重组,与常见的 Cre 酶和 Flp 酶相比,phiC31 整合酶还具有单向重组即不会发生回复切除的特点,以及可介导含有 attB 序列的外源 DNA 与真核生物基因组中的某些未经修饰的特定位点,即“假 attP”位点发生特异性重组的优点<sup>[3]</sup>;而且研究还表明,phiC31 整合酶介导的外源基因在受体内能更持久、高效地表达<sup>[4-5]</sup>。所以,其常应用于基因治疗和转基因动物制备中<sup>[3]</sup>。本研究中,我们将分析在 phiC31 整合酶介导下,含 attB 序列、表达 LDLR 的载体在家族性高胆固醇血症模型小鼠即 LDLR 基因敲除小鼠(LDLR<sup>-/-</sup>)中的表达,以及该表达对 LDLR<sup>-/-</sup>小鼠血脂代谢改善和动脉粥样硬化病变的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂和仪器

体视显微镜(江南永新,南京),倒置显微镜(TS100F, Nikon 公司,日本),石蜡切片机(2016, Leica 公司,德国);小鼠基础饲料由贵州医科大学实验动物中心提供;伊红、苏木素购自北京索来宝生物公司;油红 O 购自北京鼎国生物公司;总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglycerides, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)检测试剂盒购自南京建成生物公司;其余试剂均为国产分析纯。

### 1.2 载体构建

通过逆转录 PCR 方法克隆小鼠 LDLR 基因(Genbank:NM\_010700.3)到肝脏特异表达的甲状腺结合球蛋白(thyroxine binding globulin, TBG)启动子下游,并在 LDLR 的 3' 端加上 attB 序列构建成

pcDNA 3.1-TBG-LDLR-attB。同时,构建成表达 LDLR 基因,但无 attB 序列的 pcDNA3.1-TBG-LDLR,作为对照。

### 1.3 细胞培养与转染

小鼠肝细胞系 H22 用 10% 血清的 DMEM 培养基,在 37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下培养。转染的前 1 天,接种(0.5~2)×10<sup>6</sup> 个细胞于细胞培养板中培养,细胞丰度达到 90% 以上时进行转染,具体步骤根据 Lipofectamine™ 2000 操作说明书(Invitrogen 公司)。

### 1.4 实验动物与小鼠尾静脉注射

LDLR<sup>-/-</sup>小鼠(南京大学国家遗传工程小鼠资源库,合同编号:NBRI 销售合字[2012]497 号)饲养在室温 20~25℃,相对湿度 40%~70% 的环境中。对 6~8 周龄左右、体重为 25~30 g 的雄性 LDLR<sup>-/-</sup>小鼠进行高脂肪饲料喂养(21% 脂肪、0.15% 胆固醇),喂食 8 周之后,分为三组,每组 8 只小鼠:载体 pcDNA3.1-TBG-LDLR-attB 和 pCMV-int 尾静脉共注射组;pcDNA3.1-TBG-LDLR 和 pCMV-int 共注射组作为对照;生理盐水注射组。再继续高脂喂养 12 周。

### 1.5 血脂生化检测

TC、TG、LDLC 及 HDLC 通过酶法进行检测,操作步骤根据公司说明进行。

### 1.6 ELISA

提取总蛋白后,用含 2% 的牛血清白蛋白封闭液稀释,利用夹心酶联免疫分析方法对 LDLR 的水平进行检测(R&D system, Minneapolis, USA),最后每孔加 50 μL 终止反应液终止反应,用酶联仪在 450 nm 波长检测各孔光密度(OD)值。

### 1.7 主动脉的病理分析

小鼠采血后,麻醉之后,用 PBS 进行灌注,分离整体主动脉,于 4% 多聚甲醛中固定 12 h 以上,再纵向剖开。主动脉经 70% 乙醇浸泡 2 min 后进行油红 O 染色 30 min(以 3:2 的比例,将 0.5% 的母液稀释成工作液);70% 乙醇漂洗,经蒸馏水清洗后拍照。同时,取出心脏固定 48 h 后,石蜡包埋,从心耳下方切取靠近根部的升主动脉切片,厚度为 5 μm 左右,再进行常规的 HE 染色。用 Image-Pro Plus 6.0 软件(Media Cybernetics)对斑块面积进行定量分析。

### 1.8 Western blot

分别提取各组蛋白,测定总蛋白含量后,分别取 30 μg 蛋白进行电泳分离,转膜、封闭后,加入抗 LDLR 抗体,4℃ 过夜;洗脱后,用辣根过氧化物酶标记的二抗,再孵育 2 h, ECL 法显色,凝胶成像分析

系统显影、保存图像。

### 1.9 统计学分析

通过 SPSS18.0 软件进行数据分析,实验数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,多样本均数间的比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK-q 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 LDLR 在小鼠肝细胞系中的表达

将含有 attB 短序列、表达 LDLR 的 pcDNA3.1-TBG-LDLR-attB 质粒与表达 phiC31 整合酶的

pCMV-int 共转染 H22 细胞,在 72 h 后,检测 LDLR 表达水平,结果发现特异性整合的,即含有 attB 序列的 LDLR 表达水平比未经处理的细胞或者无 attB 序列即转染 TBG-LDLR 细胞显著提高,分别达 2.4 倍和 1 倍多(图 1A)。在转染后不同时间进行检测,显示靶向整合的 LDLR(TBG-LDLR-attB 组)在转染后 12~24 h 之间表达最高,之后略有下降,而非靶向的 LDLR(TBG-LDLR 组)表达在转染 24 h 后下降更为明显(图 1B),说明 LDLR 在 phiC31 整合酶的介导下,表达相对比较持久、稳定,而且时间越长,优势越明显。

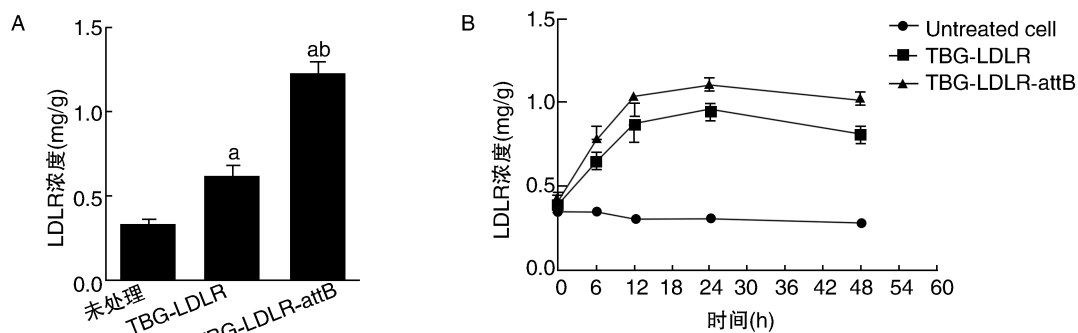


图 1. LDLR 在小鼠肝 H22 细胞系中的表达 A 为 LDLR 分别在未经处理的细胞、转染 TBG-LDLR、TBG-LDLR-attB 质粒载体的细胞中 72 h 后的表达;B 为 LDLR 在三组细胞中不同时间(0~48 h)的表达水平。a 为  $P < 0.05$ ,与未经处理的细胞相比;b 为  $P < 0.05$ ,与 TBG-LDLR 细胞相比。

Figure 1. The expression of LDLR in H22 cell line

### 2.2 LDLR 在 LDLR<sup>-/-</sup>小鼠体内表达

通过质粒尾静脉共注射,分析 LDLR 在小鼠体内肝脏细胞中的表达情况。结果显示靶向注射小鼠的 LDLR 表达可达到 2.38 mg/g,比非靶向注射小鼠(1.81 mg/g)高了 24%(图 2A)。另外对靶向注射

小鼠的各脏器(包括肝脏、肌肉、肺、胃、肾和脾脏等)LDLR 水平进行检测分析,ELISA 和免疫印迹结果均表明,TBG 启动子驱动的 LDLR 在体内肝细胞中特异表达(图 2B、2C)。

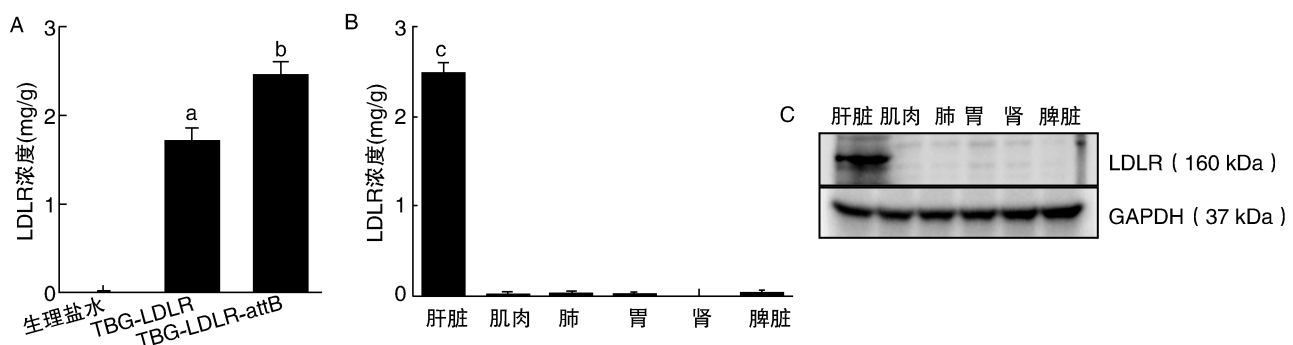


图 2. 外源 LDLR 在 LDLR<sup>-/-</sup>小鼠肝脏中的表达( $n=8$ ) A 为生理盐水注射组、TBG-LDLR 组和 TBG-LDLR-attB 组小鼠肝脏中 LDLR 的表达;B 为 ELISA 检测 TBG-LDLR-attB 注射小鼠 LDLR 在各脏器中的表达;C 为 Western blot 检测 TBG-LDLR-attB 注射小鼠中,LDLR 在各脏器中的表达。a 为  $P < 0.05$ ,与生理盐水组相比;b 为  $P < 0.05$ ,与 TBG-LDLR 组相比;c 为  $P < 0.05$ ,与肌肉、肺、胃、肾和脾脏相比。

Figure 2. The foreign LDLR expression in livers of LDLR<sup>-/-</sup> mice ( $n=8$ )



### 2.3 LDLR 的表达对 LDLR<sup>-/-</sup>小鼠血脂水平的影响

对经处理小鼠各种血浆脂蛋白进行检测,发现靶向注射、非靶向注射的 LDLR 均能显著降低 TC 和 TG 的水平,而非靶向注射的 LDLR 相比,靶向整合的 LDLR 可以使血浆 TC 降低 16%,LDLC 水平降低高达 35%左右(表 1)。

表 1. LDLR 表达小鼠血脂水平的影响 (mmol/L, n=8)

Table 1. Effect of LDLR expression on serum lipid levels (mmol/L, n=8)

分 组	TG	TC	LDLC	HDLC
生理盐水组	4.2±0.3	28.6±2.1	14.2±1.9	3.2±0.8
TBG-LDLR 组	3.2±0.4 <sup>a</sup>	20.4±2.1 <sup>a</sup>	12.1±1.5	3.9±0.7
TBG-LDLR-attB 组	2.3±0.2 <sup>ab</sup>	17.2±2.6 <sup>ab</sup>	7.8±0.9 <sup>ab</sup>	3.0±0.2 <sup>b</sup>

a 为  $P<0.05$ ,与生理盐水组比较;b 为  $P<0.05$ ,与 TBG-LDLR 组比较。

### 2.4 LDLR 的表达对 LDLR<sup>-/-</sup>小鼠主动脉斑块形成的影响

对不同处理过的小鼠进行解剖,获取主动脉,经油红 O 染色后发现,注射 TBG-LDLR-attB 组的主动脉斑块比生理盐水组及 TBG-LDLR 组均明显降低(图 3);而靠近主动脉根部的升主动脉处病理切片分析显示,TBG-LDLR-attB 组斑块面积/管腔总面积比较生理盐水组和 TBG-LDLR 组分别减少 84% ( $26.15\% \pm 4.23\%$  比  $48.33\% \pm 5.68\%$ ) 和 19% ( $26.15\% \pm 4.23\%$  比  $32.33\% \pm 5.13\%$ ) ( $P<0.05$ ;图 3)。

## 3 讨 论

phiC31 整合酶是从链霉菌噬菌体中分离出的一种位点特异性重组酶,与来源于 P1 噬菌体的 Cre

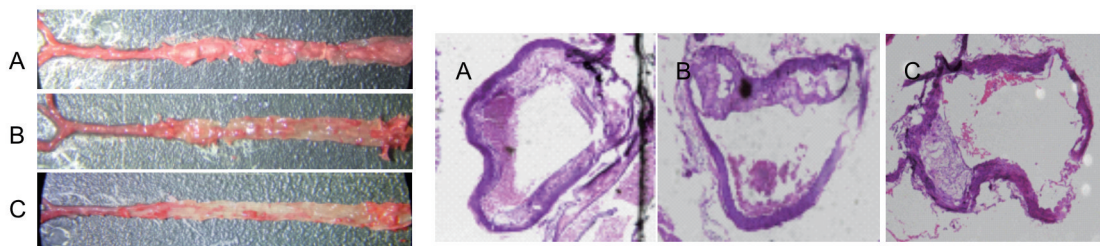


图 3. 不同处理对主动脉斑块形成的影响 (n=8) 左为整体主动脉的油红 O 染色结果;右为靠近心脏端主动脉切片的 HE 染色结果。A 为生理盐水组,B 为 TBG-LDLR 组,C 为 TBG-LDLR-attB 组。

Figure 3. The effect of three different treatments on lesion formation (n=8)

酶和来源于酵母 2 $\mu$  质粒的 F1p 酶一样,phiC31 整合酶可介导一些精细的遗传操作,如进行重组酶介导的自剪切、重组酶介导的盒式交换等,用于基因功能的分析<sup>[3]</sup>。此外,与 Cre 酶和 F1p 酶不同的是,phiC31 整合酶识别的是两个不同的序列即 attB 和 attP,所以一旦整合之后便不会发生回复切除。更重要的是 phiC31 整合酶可以介导含有 attB 序列的外源 DNA 与真核生物基因组中的某些未经修饰的特定位点发生特异性重组,该特点使其可以直接应用于基因治疗和转基因动物的遗传操作中<sup>[3]</sup>。真核生物宿主染色体上的这种未经修饰的、可被 phiC31 整合酶识别的特异整合位点被称为“假 attP 位点”。目的基因在 phiC31 整合酶的介导下,整合进假 attP 位点,实现稳定、高效表达。本研究中,体外实验结果也显示 phiC31 整合酶介导的 LDLR 表达水平比非酶介导的要持久、稳定,而且体内的治疗效果也表明比非靶向的要好,这可能有两种原因:一是由于其整合型的载体,一旦整合之后,表达水平不会随时间而显著降低;另一个可能与其所

整合在染色体上的位点,即假 attP 位点的位置有关,所以我们将进一步分析外源 LDLR 在基因组中的整合情况。另外,尽管理论上 phiC31 整合酶可以使外源基因在染色体上相对安全的位点上整合,但是它毕竟是一种整合型载体,该外源 DNA 的插入是否会对肝脏带来损伤,以及是否会带来其他的安全性问题,需要结合空质粒对照小鼠的治疗效果,进行进一步综合、全面评价。

HDL 可以将外周组织多余的脂质逆向转运至肝脏,进行进一步的代谢,从而减少循环中的脂质水平,降低动脉粥样硬化的患病风险。但是从文中可以看出,携带有 attB 靶向载体除了可以降低血浆中 LDLC、TC 以及 TG 水平,还能明显减少 HDLC 含量。所以,该整合酶介导的特异性整合系统是否影响了胆固醇逆向转运系统中相关事件,如巨噬细胞的胆固醇流出、载脂蛋白的交换和 HDL 的成熟等,需要进一步研究。

血浆中富含胆固醇酯的低密度脂蛋白通过细胞膜上的 LDLR 进入细胞,在溶酶体内进行进一步

的分解代谢。体内通过该途径清除约 2/3 的血浆胆固醇。所以, LDLR 基因功能缺陷时, LDL 分解异常, 引起高脂血症。代偿性表达 LDLR 基因是 FH 治疗的最直接手段, 但是血脂代谢是一个复杂的调控系统, 已知过表达卵磷脂胆固醇酰基转移酶(lecithin-cholesterol acyltransferase, LCAT)、载脂蛋白 A (apolipoprotein A I, ApoA I) 和肝 X 受体(liver X receptor, LXR) 或者通过 RNAi 的方法降低羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶等方法均可在一定程度上缓解高脂血症<sup>[6-9]</sup>。所以在设计 FH 基因治疗方案时, 可以尝试改变单一表达 LDLR 的方法, 通过联合调节血脂代谢过程中其他分子, 特别是胆固醇逆向转运过程中相关分子的方法, 从多个方面, 降低血浆脂质。

目前对于 FH 的基因治疗主要是以经过改造的病毒载体为外源基因的输送工具, 包括慢病毒载体、腺病毒载体以及近年来常被用的腺相关病毒载体等。如 Hibbitt 等<sup>[10]</sup> 利用慢病毒载体为运送工具, 通过尾静脉高压注射的方法, 实现 LDLR 基因在 FH 模型小鼠 (LDLR<sup>-/-</sup>) 细胞内稳定整合并长期表达; Craeyveld 等<sup>[11]</sup> 用重组腺病毒载体使目的基因 LDLR 高效进入靶细胞; 而 Chen 以及 Kassim 等<sup>[12-13]</sup> 人则分别以腺相关病毒作为载体工具, 介导 LDLR 基因在 LDLR<sup>-/-</sup> 小鼠体内表达, 使 FH 症状得到明显改善。但是慢病毒存在随机整合引起的突变问题, 以及腺病毒等非整合型病毒载体介导外源基因表达的持久性问题一直没有得到很好解决。另外, 尽管野生型的腺相关病毒能表现出 19 号染色体特定区段的定向整合能力, 但重组腺相关病毒却能和宿主 DNA 发生随机整合<sup>[14]</sup>。同时, 还有病毒自身带来的安全性、免疫原性等问题。所以在不断优化病毒载体的同时, 人们也一直在寻找一种优良的非病毒定点载体系统。本研究采用位点特异性的重组酶作为目的基因与染色体整合的介导工具, 并且使 LDLR 实现稳定、持久表达, 这为非病毒载体研究和 FH 基因治疗提供一条新的思路。

#### [参考文献]

- [1] 王绿娅, 许瑛杰, 陈保生. 家族性高胆固醇血症样表型的临床特点及基因诊断[J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16 (1): 69-71.
- [2] 陈保生, 李德岭, 任渝棠. 越低越好, 越快越好? ——他汀类药物强化降脂利弊谈[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14 (9): 737-740.
- [3] 马晴雯.  $\varphi$ C31 整合酶系统介导的位点特异性整合研究

进展[J]. 遗传, 2011, 33 (6): 567-575.

- [4] Otani Y, Kawakami S, Mukai H, et al. Long-term in vivo gene expression in mouse kidney using  $\varphi$ C31 integrase and electroporation [J]. J Drug Target, 2015, 23 (5): 427-435.
- [5] Ortiz-Urda S, Thyagarajan B, Keene DR, et al. Stable nonviral genetic correction of inherited human skin disease [J]. Nat Med, 2002, 8 (10): 1 166-170.
- [6] Chen Z, Chu D, Castro-Perez JM, et al. AAV8-mediated long-term expression of human LCAT significantly improves lipid profiles in hCETP; Ldlr (+/-) mice [J]. J Cardiovasc Transl Res, 2011, 4 (6): 801-810.
- [7] Belalcazar LM, Merched A, Carr B, et al. Long-term stable expression of human apolipoprotein A-I mediated by helper-dependent adenovirus gene transfer inhibits atherosclerosis progression and remodels atherosclerotic plaques in a mouse model of familial hypercholesterolemia [J]. Circulation, 2003, 107 (21): 2 726-732.
- [8] Li G, Biju KC, Xu X, et al. Macrophage LXR $\alpha$  gene therapy ameliorates atherosclerosis as well as hypertriglyceridemia in LDLR (-/-) mice [J]. Gene Ther, 2011, 18 (8): 835-841.
- [9] Hibbitt O, Agkatsev S, Owen C, et al. RNAi-mediated knock-down of HMGCoA reductase enhances gene expression from physiologically regulated low-density lipoprotein receptor therapeutic vectors in vivo [J]. Gene Ther, 2012, 19 (4): 463-467.
- [10] Hibbitt OC, McNeil E, Lufino MM, et al. Long-term physiologically regulated expression of the low-density lipoprotein receptor in vivo using genomic DNA mini-gene constructs [J]. Mol Ther, 2010, 18 (2): 317-326.
- [11] Craeyveld EV, Gordts SC, Nefyodova E, et al. Regression and stabilization of advanced murine atherosclerotic lesions: a comparison of LDL lowering and HDL raising gene transfer strategies [J]. J Mol Med, 2011, 89 (6): 555-567.
- [12] Chen SJ, Sanmiguel J, Lock M, et al. Biodistribution of AAV8 vectors expressing human low-density lipoprotein receptor in a mouse model of homozygous familial hypercholesterolemia [J]. Hum Gene Ther Clin Dev, 2013, 24 (4): 154-160.
- [13] Kassim SH, Li H, Vandenberghe LH, et al. Gene therapy in a humanized mouse model of familial hypercholesterolemia leads to marked regression of atherosclerosis [J]. PLoS One, 2010, 5 (10): e13 424.
- [14] Kaeppl C, Beattie SG, Fronza R, et al. A largely random AAV integration profile after LPLD gene therapy [J]. Nat Med, 2013, 19 (7): 889-891.

(此文编辑 许雪梅)