

[文章编号] 1007-385X(2004)01-0005-05

经犬肝动/静脉输入反义 c-myc 重组腺病毒的安全性研究

余昌中^{1,2}, 林晨¹, 张海增¹, 查圆圆¹, 梁萧¹, 付明¹, 张雪艳¹, 吴旻¹ (1. 中国医学科学院中国协和医科大学, 肿瘤研究所, 分子肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021; 2. 北京军区总医院肝胆外科, 北京 100700)

[摘要] **目的:** 经 Beagle 犬肝脏血管注射重组腺病毒介导反义 c-myc 基因 (Ad-ASmyc) 载体, 观测其体内分布及毒副作用, 以评价 Ad-ASmyc 治疗肝癌的临床前期安全性。 **方法:** 选择 4 只体重 8~10 kg 健康 Beagle 犬, 全麻后开腹, 经肝动脉或门静脉注射 Ad-ASmyc, 注射 Ad-ASmyc 前及注射后第 3, 7, 14, 21 天取肝组织及抽取静脉血化验, PCR 检测 Ad-ASmyc 在各器官组织中的分布, 常规切片观察各器官病理变化, ELISA 方法检测血中抗腺病毒抗体的产生。 **结果:** 经 Beagle 犬肝脏血管注射后, Ad-ASmyc 可持续转导正常肝细胞达 3 周, 实验犬一般情况好, 血、肝、肾功能无明显异常, 在肝脏、脾脏、肾脏、胃、心脏、皮肤中可检测到重组腺病毒的分布, 镜下可见 Ad-ASmyc 剂量依赖性的肝组织轻微的炎症反应, 注射后 7 d 血中有抗腺病毒载体的抗体产生, 14 d 达高峰, 21 d 开始下降。 **结论:** 经 Beagle 犬肝动脉或门静脉途径注射 Ad-ASmyc 均可转导至肝细胞, Ad-ASmyc 对实验犬的毒副作用较轻。

[关键词] 腺病毒载体; 基因治疗; 安全性

[中图分类号] R730.59; R735.7 [文献标识码] A

The Safety of Adenovirus-Mediated Antisense c-myc Infused into Hepatic Artery or Portal Vein in Beagle Dogs

YU Chang-zhong^{1,2}, LIN Chen¹, ZHANG Hai-zeng¹, ZHA Yuan-yuan¹, LIANG Xiao¹, FU Ming¹, ZHANG Xue-yan, WU Min (1. National Lab of Molecular Oncology, Cancer Institution CAMA, PUMC, Beijing 100021; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, Beijing Military General Hospital, Beijing 100700)

[Abstract] **Objective:** To assess the preclinical safety of recombinant adenovirus-mediated antisense c-myc infusion of the hepatic vascular of Beagle dogs. **Methods:** Four 8 to 10 kg healthy Beagle dogs underwent hepatic artery or portal vein cannulation infusion of $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11}$ plaque forming units recombinant adenovirus vectors. Serial sequenced liver biopsies were taken for microscopic examination and PCR analysis. Venous blood samples were obtained from the dogs for liver, renal function tests and hematology analysis after infusion of days 0, 3, 7, 14, and 21. PCR was used to screen the vital organs for the presence of adenovirus DNA. Microscopic examination of the vital organs was performed to observe the pathogenicity of Ad-ASmyc. ELISA was performed to assay the neutralizing antibody to adenovirus vectors. **Results:** Ad-ASmyc could infect both kinds of normal human fetal lung cell line 2BS and normal human hepatocyte line LO2 effectively, but could not inhibit their growth *in vitro*. Results of liver, renal function and hematology values were within normal ranges. The adenovirus vectors were present in the liver, spleen, heart, kidney, stomach and skin at days 14 or 21. Microscopic examination revealed no cytopathic effects in distant organs, as was gross pathology, despite the presence of vector. Ad-ASmyc was transferred into hepatocytes persistently and induced dose-dependent inflammation response. Production of anti-adenovirus antibodies appeared at days 7, reached high-level at days 14 and declined at days 21. **Conclusions:** Ad-ASmyc can be transferred into hepatocellulars via hepatic artery or portal vein and generates no obvious toxicity in Beagle dogs, which suggests the safety of Ad-ASmyc infused into the hepatic vascular for gene therapy.

[Key words] recombinant adenovirus vector; gene therapy; safety

* 复制缺陷型腺病毒载体被广泛应用于基因治疗, 多种肝脏疾病的肝脏导向基因治疗也逐步开展, 体外实验证明腺病毒载体介导的基因可高效转入肝癌细

[基金项目] 国家 863 高科学技术发展基金资助项目(Z20-01-02)

[作者简介] 余昌中(1965-), 男, 河南省潢川县人, 副主任医师, 博士, 主要从事临床内镜微创外科治疗及肝癌基因治疗方面的研究, 现在北京军区总医院肝胆外科工作

[通讯作者] 林晨

胞并引起癌细胞生长抑制、凋亡,在鼠、兔、狒狒、猴进行了经门静脉、大隐静脉、肝动脉、胆道途径注射腺病毒载体的体内实验^[1-3],结果显示腺病毒载体介导的基因可有效转入正常肝细胞,毒副作用表现为剂量依赖性,一过性的转氨酶升高、肝窦及汇管区的炎症及抗腺病毒载体抗体产生。本研究经 Beagle 犬的肝动脉、门静脉途径注射重组腺病毒介导反义 c-myc 基因(Ad-ASmyc)载体,观测其是否能有效转入正常肝细胞、持续时间、体内器官分布及毒副作用,以评价 Ad-ASmyc 治疗肝癌的临床前期安全性。

1 材料与方法

1.1 细胞系

腺病毒 E1 基因转化的人胚肾细胞系 293(购自加拿大 Microbix Biosystems Inc.),正常人肝细胞 L02 细胞系(由军事医学科学院张开泰博士惠赠),人胚肺二倍体细胞 2BS 均为本室保存。

1.2 重组腺病毒构建、扩增、纯化和滴度测定

采用同源重组法构建表达反义 c-myc 基因的重组腺病毒 Ad-ASmyc,方法按文献[4-5]进行。用构建好的重组 Ad-ASmyc 感染 293 细胞,24~48 h 后,细胞出现完全病变时,收集细胞,离心,弃去上清,PBS 重悬,冻融 3 次,再离心,取上清,加入 10% 甘油后,经 0.25 μm 滤器过滤、分装后于 -70℃ 保存。用有限稀释法进行滴度测定。

1.3 病毒感染率的测定

用带有 LacZ 报告基因的重组腺病毒 Ad-LacZ 按不同的感染复数(MOI)感染细胞,24~48 h 后固定细胞,X-gal 染液染色,显微镜下观察被染成蓝色的细胞即为 LacZ 基因表达的阳性细胞,计数蓝染百分率,确定重组腺病毒的感染效率。

1.4 细胞生长曲线

于 35 mm 培养皿接种一定量的细胞,培养过夜,按 100 MOI 感染细胞,观察形态,定期消化收集细胞,2% 台盼兰染色,显微镜下分别计数活/死细胞,每种处理于每个时间点设 3 个平行组,求平均值及标准差,绘制生长曲线。

1.5 经犬肝动脉/静脉导入 Ad-ASmyc

Beagle 犬术前 12 h 禁食、术前 2 h 禁饮,氯胺酮 100 mg + 阿托品 0.5 mg 肌肉注射进行诱导麻醉,5 min 后将实验犬仰卧固定四肢于手术台上,然后腹腔内注射 3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)。按常规无菌手术程序剪除手术区域毛发、碘伏消毒、铺无菌巾。取上腹正中切口,长约 6 cm,入腹探查肝脏无异常,楔形切取肝中叶肝组织约 2 g,然后经胃网膜右动脉插细塑料管入肝动脉或经结肠中静脉插塑料管入门静脉,经该管注射美兰证实塑料管入肝动脉或门静脉。所需量腺病毒用无菌生理盐水稀释成 30 ml,在 30 min 内缓慢注射,最后分层关腹,术毕观察犬恢复至清醒状态。实验犬情况(见表 1)。

表 1 实验犬一般情况

Tab. 1 Common condition in dogs

Dog	Gender	Age(month)	Weight(kg)	Dose	i. a/ i. v	Health
Dog1	♂	5	8.5	1.0×10^{10}	i. a.	good
Dog2	♀	5	8.5	3.2×10^{10}	i. v.	good
Dog3	♂	6	9.0	1.0×10^{11}	i. a.	good
Dog4	♂	6	9.5	1.0×10^{10}	i. a.	good

1.6 器官组织标本采集方法

分别于肝血管内注射 Ad-ASmyc 前及术后第 3, 7, 14, 21 天再次开腹手术取肝组织,麻醉及手术方法同上,每次开腹手术切口均不在同一位置,分别选择左或右侧肋缘下斜切口入腹,长约 3 cm。活检肝组织分成两部分,分别放入液氮冻存,提取 DNA 做 PCR 及福尔马林固定做常规 H, E 染色。

实验结束,Beagle 犬经氯胺酮、阿托品复合诱导麻醉后,腹腔内注射 3% 戊巴比妥钠至完全麻醉,然后开腹放血杀死,按减少病毒交叉污染的预定程序切取肝

脏、脾脏、心脏、肺脏、主动脉、肾脏、胃、肠、皮肤各 2 块,分别液氮冻存及福尔马林固定。

术前及术后 1 h 及第 3, 7, 14, 21 天从实验犬大隐静脉或肠系膜静脉抽血 10 ml,分别送检血常规、肝功能、肾功能及不抗凝血(5 ml)离心提取血白细胞中 DNA 备作 PCR,抗凝血(3 ml)离心取血清分装后存于 -20℃ 备测抗体。

1.7 ELISA 法检测血清中抗体

腺病毒抗原的包被:重组腺病毒 Ad-ASmyc 经超声波破碎后测蛋白含量,用碳酸氢盐缓冲液将抗原

浓度稀释为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 塑料微孔板中每孔加 150 μl , 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜。

一抗为冻存的犬血清。二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗犬 IgG(购于 Sigma, USA), 显色剂选用 TMB, 显色 10 min 后在 A490 nm 处酶标仪测 OD 值。以实验犬术前血清为对照。

1.8 PCR 检测器官组织中的 Ad-ASmyc

提取细胞、组织中的 DNA 定量后进行 PCR 检测。腺病毒引物(扩增产物为 860 bp)上游: 5'-TCGTTT CTCAGCAGCTCTTG-3', 下游: 5'-CATCTGAACTCAAA GCGTGG-3'。退火温度为 55 $^{\circ}\text{C}$, 38 个循环, PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 紫外灯下观察、照相。

2 结果

2.1 Ad-ASmyc 体内体外均可转入正常人肝细胞且细胞正常生长

重组腺病毒纯化后的滴度较高, 可达到 5×10^{10} PFU/ml。当 MOI 大于 100 的感染强度时, 重组腺病毒即可实现对人胚肺二倍体细胞 2BS 及正常人肝细胞 LO2 近 100% 的转导效率。

2BS 细胞为贴壁生长的人胚肺细胞, 呈长梭形, LO2 细胞为培养的正常人肝细胞, 可贴壁生长, 呈长圆形, 两种细胞感染 Ad-LacZ 和 Ad-ASmyc 后都没有明显

的形态学改变。生长曲线结果显示感染 Ad-ASmyc 至第 7 天, 2BS 和 LO2 细胞活细胞数分别为对照组的 92.71% 和 86.37%, 与对照组相比, 差别不明显, 细胞生长正常。

2.2 Ad-ASmyc 经 Beagle 犬肝脏血管注射毒副作用较轻

2.2.1 一般情况

术后观察体温、脉搏、呼吸、神志、食欲等均无明显异常, 无呕吐, 无腹泻, 未见皮肤过敏。

2.2.2 血常规、肝肾功能

注射 Ad-ASmyc 后第 7 天, Dog3 有轻微的转氨酶升高(54 IU / L), 其余各犬各时间点血常规、肝肾功能检查均无异常。

2.3 病理检测

大体形态观察, 肝脏、心、肺、胃、肠、脾、肾、主动脉、皮肤等器官外观、质地、色泽均无异常。显微镜下行常规病理切片(H. E 染色)观察, 除肝脏有轻微的炎症外, 其余各器官心、肺、胃肠、肾、皮肤、主动脉均无异常, 注射 Ad-ASmyc 3 d 后开始可见肝窦及汇管区有炎症细胞浸润, 第 7 天开始可见混浊肿胀及炎症细胞浸润。至第 14, 21 天仍可见混浊肿胀。病变以 Dog3 较为明显, Dog2 较轻, Dog4 无明显异常, 呈剂量依赖性。脾脏组织切片第 21 天可见骨髓淋巴细胞数量减少(图 1)。

图 1 注射 Ad-ASmyc 后肝脏病理变化(Dog 3, HE $\times 100$)

Fig. 1 Pathological changes in livers of dogs after infusion with Ad-ASmyc (dog 3, HE $\times 100$)

A: d0 dog liver before infusion with Ad-ASmyc via the hepatic artery (H&E). Magnification, $\times 100$. B: d3 same dog 3 days after infusion with Ad-ASmyc via the hepatic artery. There is infiltration sporadically of sinusoids by mononuclear inflammatory cells (H&E). Magnification, $\times 100$. C: d7 same dog 7 days after infusion with Ad-ASmyc via the hepatic artery. There is extensive infiltration of sinusoids and the portal tract by mononuclear inflammatory cells and lymphocytes (H&E). Magnification, $\times 100$.

D: d14 same dog 14 days after infusion with Ad-ASmyc via the hepatic artery. There is extensive infiltration of sinusoids and the portal tract by mononuclear inflammatory cells and lymphocytes. The hepatocytes show mild balloon (H&E). Magnification, $\times 100$.

2.4 腺病毒抗体的检测

血清产生针对腺病毒载体的中和抗体, 滴度范围 1: 75 ~ 1: 225。ELISA 法检测抗体, 在注射 Ad-ASmyc 后第 3 天不存在, 第 7 天开始出现, 到第 14 天达到高峰, 第 21 天时开始下降。其中大剂量犬(1×10^{11} PFU)较小剂量犬(1×10^{10} PFU)抗体滴度高(图 2)。

2.5 Ad-ASmyc 经 Beagle 犬肝脏血管注射后的器官分布

实验犬术前血液及肝组织中 PCR 检测腺病毒为阴性, 术后第 3, 7, 14, 21 天血液及肝组织中 PCR 均可检测到 Ad-ASmyc 存在; 且 Ad-ASmyc 的量在术后第 3, 7, 14 天较高, 第 21 天明显下降。实验结束时取肝脏、

脾脏、心脏、肺脏、主动脉、肾脏、胃、肠、皮肤等组织提取 DNA, PCR 检测 Ad-ASmyc 器官分布, 经肝动脉注射后 14 d (Dog3) 肝脏、心脏、胃、肾脏、皮肤阳性, 经门静脉注射后 21 d (Dog2) 肝脏、心脏、胃、脾脏阳性。21 d 时小剂量犬 (Dog4) 各器官均为阴性 (表 2 和图 3)。

3 讨论

人体肿瘤基因治疗的核心问题是选用安全有效的载体并将治疗基因导入靶细胞。腺病毒载体是继逆转录病毒载体之后基因治疗中应用最广泛最有效的载体, 由于具有宿主范围广, 感染效率高, 制备容易的优点而备受重视, 截止 2000 年 12 月, 《human gene therapy》公布经 NIH 批准的基因治疗、标记方案共 409 项, 其中有 74 项是使用腺病毒为基因转移载体, 占有方案的 18.1%。复制缺陷型 5 型腺病毒载体介导反义 c-myc 基因, 体外实验发现可高效转入肝癌细胞并抑制其生长及导致其凋亡, 治疗裸鼠肝癌皮下移植瘤模型, 可抑制肿瘤生长, 初步结果证明 Ad-ASmyc 治疗人体肝癌有效^[6]。同时, Ad-ASmyc 对体外培养的正常人肝细胞 LO2 和正常人胚肺细胞 2BS 生长无明显影响, 提示应用 Ad-ASmyc 进行基因治疗具有安全性。

图 2 注射 Ad-ASmyc 后血清中和抗体产生

Fig. 2 Production of anti-adenovirus antibodies appeared after infusion with Ad-ASmyc

表 2 PCR 检测 Ad-ASmyc 在体内器官的分布

Tab. 2 The distribution of Ad-ASmyc in dogs' body at the end of experiment by PCR

Dog	Dose	D	Heart	Lung	Stomach	Gut	Spleen	Kidney	Aorta	Skin	Liver	Normal dog liver
Dog2	3.2×10^{10}	d21	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
Dog3	1.0×10^{11}	d14	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-
Dog4	1.0×10^{10}	d21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

图 3 PCR 检测 Ad-ASmyc 在体内器官的分布

Fig. 3 The distribution of Ad-ASmyc in dogs' body at the end of experiment by PCR

1: Heart; 2: Lung; 3: Stomach; 4: Gut; 5: Spleen; 6: Kidney; 7: Aorta; 8: skin; 9: Liver;

10: Normal liver; A: Dog2 1. 3. 5. 9 PCR(+); B: Dog3 1. 3. 6. 8. 9 PCR(+); M: Mark ; C: Dog4 PCR(-)

Sullivan^[3]使用携带有报告基因 LacZ 的重组腺病毒载体经恒河猴门静脉、大隐静脉、总胆管途径注射的方法, 发现重组腺病毒载体经门静脉、大隐静脉均可高效转入肝细胞, 并可在肝细胞内持续表达至少 60 d,

实验猴无明显全身毒性反应, 仅肝脏有轻微的炎症。Li^[7]报道 1×10^{10} PFU 病毒颗粒经鼠门静脉注射后 95% 的肝细胞被转导, 转导的基因可表达 3 ~ 4 周。Kozarsky^[8]经兔门脉血管注射 1×10^{13} PFU 病毒颗粒,

基因表达最高峰在 7 ~ 10 d, 持续 3 周。然而, Jaffe^[9] 的实验结果是仅 1% 的鼠肝细胞被转导, 提示腺病毒介导的基因转移可能有一定的种属特异性。本研究首次经 Beagle 犬肝动脉和门静脉两种途径注射 (1×10^{10}) ~ (1×10^{11}) PFU 的 Ad-ASmyc, 实验动物 3 周后 PCR 检测肝脏组织中仍有重组腺病毒存在, Ad-ASmyc 被高效持续地转导入肝细胞, Beagle 犬无明显全身毒性反应, 仅肝脏有轻微的一过性的炎症反应。选择经肝动脉途径是考虑到在临床实际应用中, 可经肝动脉插管栓塞化疗的途径注入 Ad-ASmyc, 而不必象经门静脉途径必须开腹手术进行, 同时经肝动脉注射, Ad-ASmyc 被全身血液循环稀释以前, 在肝脏组织中能够达到较高的浓度, 对提高肝细胞转导率有利, 优越于经大隐静脉注射。Takehera 及 Yang 对经胆道途径注射重组腺病毒也进行过研究, 同 Sullivan^[3] 的结果相一致, 经胆总管逆行注入重组腺病毒, 胆管上皮细胞可有部分转染, 但肝细胞的转染率很低, 不到 1%, 毒副作用包括汇管区肝炎。

注射重组腺病毒后, 动物体内产生针对腺病毒及转基因表达产物的中和抗体, 可导致炎症反应及转基因表达的灭活、消失。Sullivan 经猴门静脉注射携带有报告基因 LacZ 的重组腺病毒载体, 发现有明显的针对腺病毒的 T 细胞增生, 产生抗腺病毒抗体和抗 β -Gal 抗体, 其它副作用包括轻微的转氨酶升高, 剂量依赖性的肝组织炎症反应, 最大剂量时 (1×10^{13} PFU/只) 可见散在的点状肝细胞坏死。本研究经肝动脉和门静脉两种途径注射 (1×10^{10}) ~ (1×10^{11}) PFU 的 Ad-ASmyc 均产生较低滴度针对腺病毒的中和抗体, 由于采用反义 c-myc 基因在体内并不表达特异的蛋白, 故无相应的抗体产生之虞。实验犬一般情况好, 除大剂量犬 (1×10^{11} PFU) 有轻微的一过性转氨酶升高外, 血常规、肝肾功能检查均无异常, 肝脏、脾脏、心脏、肺脏、主动脉、肾脏、胃、肠、皮肤等器官常规病理检查仅发现肝脏存在肝窦及汇管区的炎症细胞浸润, 小剂量犬 (1×10^{10} PFU) 较大剂量犬 (1×10^{11} PFU) 病理变化轻, 其余各器官常规病理检查无明显异常。PCR 检测 Ad-ASmyc 器官分布经肝动脉注射后 14 d 肝脏、心脏、胃、肾脏、皮肤阳性, 而经门静脉注射后 21 d 肝脏、心脏、胃、脾脏阳性, 两种方法表现一定的器官差异性, 可能与注射剂量及途径有关。

重组腺病毒载体进行基因治疗具有较高的安全性。针对腺病毒免疫原性, Englehardt^[1] 采用第二代腺病毒, 去除了更多的腺病毒基因, 降低其免疫原性, 减少抗体产生, 因此能够延长转基因表达时间, 但其转导效率有所降低。采用免疫抑制剂环磷酰胺或甲基强的松, 抑制宿主免疫反应, 可明显延长转基因表达时间, 减轻肝脏炎症反应^[10], 具体应用方案还需进一步研究。

[参考文献]

- [1] Englehardt JF, Litzky L, Wilson JM. Prolonged transgene expression in cotton rat lung with recombinant adenoviruses defective in E2a[J]. *Hum Gene Ther*, 1994, 5: 1217-1229.
- [2] Raper SE, Haskal ZJ, Ye X, *et al.* Selective gene transfer into the liver of non-human primates with E1-deleted, E2A-defective, or E1-E4-deleted recombinant adenoviruses[J]. *Hum Gene Ther*, 1998, 9: 671-679.
- [3] Sullivan DE, Dash S, Du H, *et al.* Liver-directed gene transfer in non-human primates[J]. *Hum Gene Ther*, 1997, 8: 1195-1206.
- [4] Graham FL, Prevec L. Gene transfer and expression protocols [M]. In: Murray ZJ ed. *Methods in molecular biology*, Vol 7, humane Press Inc, Clifton, 1991, 109-128.
- [5] 隗 玥, 林 晨, 张雪艳, 等. 腺病毒介导的反义 C-myc 选择性诱导肿瘤细胞 G₁ 期阻滞和凋亡的研究[J]. *中华医学杂志*, 1999, 79(8): 617-620.
- [6] Li Q, Kay MA, Fiengold M, *et al.* Assessment of recombinant adenoviral vectors for hepatic gene therapy[J]. *Hum Gene Ther*, 1993, 4: 403-409.
- [7] 余昌中, 林 晨, 张海增, 等. 重组腺病毒介导的反义 c-myc 基因对人肝癌细胞系的治疗作用[J]. *癌症*, 2000, 19(12): 1072-1076.
- [8] Kozarsky KF, Mckinley DR, Austin LL, *et al.* *in vivo* correction of low density lipoprotein receptor deficiency in the wantanabe heritable hyperlipidemic rabbit with recombinant adenoviruses[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269: 13695-13702.
- [9] Jaffe HA, Danier D, Longenecker M, *et al.* Adenoviral-mediated *in vivo* gene transfer and expression in normal rat liver[J]. *Nat Genet*, 1992, 1: 372-378.
- [10] Dai Y, Schwarz EM, Gu D, *et al.* Cellular and humoral immune responses to adenoviral vectors containing factor IX gene: Tolerization of factor IX and vector antigens allows for long-term expression [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92: 1401-1405.

[收稿日期] 2003 - 07 - 02

[修回日期] 2003 - 09 - 25