

8型 AAV 重组病毒介导的凝血因子的基因表达*

曹佐武^{1)**} 李观贵¹⁾ 梁郁强¹⁾ 何冬梅²⁾

(¹⁾暨南大学生命科技学院, 广州 510632; ²⁾暨南大学血液病研究所, 广州 510632)

摘要 8型 AAV 重组病毒载体是新型的基因转移载体, 能高效转染肌肉细胞和肝细胞. AAV 转染细胞的效果与注射病毒的途径有很大关系. 与门脉注射和肌肉注射相比, 经腹腔注射的 rAAV8 病毒能经血液循环转运到全身其他组织器官, 形成更加广泛和持久的基因转导. 通过腹腔途径把 5×10^{10} gc 的 8 型重组病毒载体注射到小鼠体内, 2 周后, 小鼠血浆中有明显的基因表达, 1 个月至 2 个月期间多数小鼠表达量达到高峰, 然后表达水平下降, 直到 4 个月后血浆中尚维持明显的表达量. 凝血实验显示, 表达的人凝血因子 IX 具有生物活性. 免疫组化实验显示, 病毒载体已进入体内多组织器官中表达. 说明 8 型 AAV 病毒载体经腹腔注射后已经血液循环运送到其他组织, 并在肌肉、肝脏、肾脏和心脏等器官明显表达, 表达产物具有凝血活性.

关键词 腺相关病毒, 腹腔注射, 凝血因子

学科分类号 R394.8

腺相关病毒 (adeno-associated virus, AAV) 是单链 DNA 微小病毒, 是一种复制缺陷性病毒. 它的复制需要辅助病毒如腺病毒的协助. AAV 病毒仅由三个核外壳蛋白和一条 DNA 单链构成, 不含酶、酯类及碳水化合物.

AAV 基因组的两端为 145 个碱基的倒转末端重复序列 (ITR), 其间是 2 个开放性阅读框, 分别编码与 AAV 复制相关的 Rep 蛋白和病毒外壳蛋白 Cap 蛋白. 重组腺相关病毒 (rAAV) 去掉了野生型 AAV 自身的基因, 仅留下其基因组两端的反向重复序列 ITR, 其间插入需要表达的目的基因.

AAV 病毒具有安全性高、免疫原性低、物理性质稳定、感染细胞谱广等优点. 此外, AAV 病毒能够感染多种宿主细胞, 包括分裂期细胞和非分裂期细胞, 插入突变的危险性低, 对宿主固有的免疫系统影响小, 不会引起严重的急性炎症反应. 因此被认为是最有前途的基因治疗载体之一.

根据病毒壳体蛋白的不同, 现在已经确定了不同的 AAV 血清型. 不同血清型 AAV 因外壳蛋白不同在细胞表面存在不同的受体, 决定它们对细胞不同的亲嗜性和转导效率. AAV2 是研究得最清楚的 AAV 病毒. rAAV2 病毒对神经组织和肌肉组织的

感染效率相对较高, 而对于其他组织细胞的感染效率相对较低. 这限制了它在基因治疗中的应用.

8 型 AAV 是从灵长类动物新分离出的腺相关病毒血清型^[1]. 8 型重组 AAV 病毒 (rAAV8) 载体能更有效地转染肌肉和肝脏等组织器官, 而且实验显示, 经腹腔注射能经血液循环转运到其他组织器官^[2].

人凝血因子 IX (hFIX) 是肝脏合成的, 前体蛋白是 461 个氨基酸的单链血浆酶原, 其基因位于 X 染色体远端, 1.383 kb 的编码区编码 415 个氨基酸的肽链. 凝血因子 IX 通过水解激活后形成 FIXa. 凝血因子 IX 的表达缺陷导致凝血障碍, 临床上表现为乙型血友病, 这是一个利用 AAV 病毒广泛进行基因治疗研究的疾病^[3]. 乙型血友病基因治疗的靶细胞多为肌细胞和肝细胞等. AAV 病毒载体的注射途径有多种, 如肌肉注射, 门脉注射和静脉注射等. 由于凝血因子主要在肝脏表达, 因此, 肝门静脉注射曾是一个首选的方法, 这样病毒能较集中地感染

*国家自然科学基金部分资助项目 (30271370).

** 通讯联系人.

Tel: 020-31545871, E-mail: caozuowu@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-06-13, 接受日期: 2006-08-31

肝脏细胞. 然而, 实验显示, AAV8 重组病毒载体导入肝细胞后, 载体 DNA 降解快^[2]. 肌肉注射简单易行, 肌细胞表达的凝血因子也具有凝血活性. 但是, 肌肉注射的病毒感染细胞范围比较局限, 而且往往需要两点或多点注射以增加病毒感染范围.

腹腔注射简便易行, 经腹腔注射的 rAAV8 病毒能经血液循环转运到全身其他组织器官, 并能在多种组织器官广泛而持久地表达绿色荧光蛋白^[2]. 然而, 作为一种较新型的血清型病毒, 是否能够通过腹腔注射 rAAV8 进行凝血因子基因的治疗性研究尚不确定. 本文通过腹腔注射 8 型 AAV 病毒载体, 探讨 rAAV8 病毒介导的凝血因子 IX 在体内表达效果.

1 材料和方法

1.1 重组质粒的体外表达功能鉴定

8 型 AAV 辅助质粒由美国 Wilson 教授实验室构建. 人凝血因子 IX (hFIX) 的表达载体 pCAhF9 由美国 Welsh 博士赠送, 它是一个约 7.2 kb 的质粒. 其间有凝血因子 IX 的 cDNA 和剪接的第一内含子. 该基因的上游有一个 CMV 增强子和 CBA 启动子, 下游有牛生长激素的 polyA 序列. 两侧翼各有一个 145 bp 的 ITR 序列.

人胚胎肾细胞 (HEK293 细胞) 经胰蛋白酶消化后接入 6 孔板, 在细胞密度达 60%~70% 时换上含 10% 去凝血因子 IX 小牛血清 (Hyclone) 的 DMEM 培养基, 2 h 后用磷酸钙沉淀法把该质粒转入 293 细胞, 2 天后收集 293 对照细胞和转导重组质粒的细胞, 用 PBS 洗涤后用 M-PER 细胞裂解液 (Pierce) 裂解细胞, 加完全蛋白酶抑制剂 (Roche). 离心后取上清, -20℃ 保存备用.

取对照的 293 细胞裂解液和转染的 293 细胞裂解液电泳. 采用 10% 的聚丙烯酰胺分离胶. 用双色预染蛋白质标准品 (Bio-Rad) 作对照. 然后将 SDS-PAGE 分离的蛋白质转移到 Hybond PVDF 膜 (Amersham Biosciences) 上. 用兔抗人 FIX 单克隆抗体 (Sigma) 和羊抗兔 IgG-HRP 进行蛋白质印迹以鉴定凝血因子 IX 的表达.

1.2 8 型 AAV 重组病毒的制备和小鼠试验

用 DMEM 培养 293 细胞, 在细胞密度为 60%~70% 时, 参照 3 种质粒共感染方法^[4] 通过磷酸钙沉淀法把腺病毒辅助质粒 PXX680、AAV 辅助质粒 AAV8 和 pCAhF9 3 种质粒同时导入 20 皿 293 细胞, 48 h 后收集感染细胞. 用两轮 CsCl 密度梯度

离心^[4] 分离纯化重组的 AAV 病毒. 病毒样品先经 1.1 U/ μ l 的 DNase 37℃ 消化 1 h, 再用蛋白酶 K 50℃ 消化 1 h, 然后通过斑点杂交法^[5] 确定病毒在梯度离心液中的分布. 利用生物素标记的凝血因子 9 的 cDNA 片段为探针, 用 Phototope 检测试剂盒 (New England Biolabs) 化学发光法显示病毒斑. 取出含 AAV 病毒的悬液, 透析过夜, 更换 PBS 2 次, 用 PEG 浓缩病毒液, 用斑点杂交法测定病毒滴度. 用 pCAhF9 质粒 DNA 梯度稀释液点样作标准曲线. 根据病毒斑的杂交信号强度估算出对应的基因拷贝数.

凝血因子 FIX 基因剔除小鼠 (F9 K/O C57BL/6) 是美国 Stafford 博士实验室制备^[6], 约 15 g, 编号标记后, 通过吸入 Forane 麻醉, 腹腔注射凝血因子 IX-AAV8 病毒 (rAAV8-hF9) 125 μ l (5×10^{10} gc). 注射病毒前, 用毛细管眼球取血约 50 μ l. 毛细管管先用 3.8% 的柠檬酸钠湿润以防凝血, 13 000 r/min 离心 10 min 分离血浆, 以后每隔 2 周采血一次, 分离的血浆分小份 -80℃ 保存.

1.3 ELISA 测定 8 型 AAV 重组病毒感染小鼠后的基因表达

把兔抗人凝血因子 IX 单克隆抗体铺在 ELISA 板上, 每孔约 400 ng, 参照美国 High 教授实验室的双抗体夹心 ELISA 方法^[7] 进行 ELISA. 把 1:100 稀释的血浆样品或标准品 100 μ l 加入预设的孔里, 37℃ 孵育 1 h. 再加入耦联 HRP 的人凝血因子 IX 抗体 (HRP-anti-hF9), 37℃ 孵育 1 h. 用 ABTS 底物液 (Roche) 显色后, 405 nm 光波测定 A 值.

把用稀释液 5 倍稀释的通用凝血参考血浆标准品 UCRP (Pacific Hemostasis) 定为含 100% 凝血因子, 用稀释液梯度稀释 UCRP 配成 50%、25%、12.5%、6.25%、3.12%、1.56%、0.78% 的系列标准品制作标准曲线, 以计算样品血浆中的重组凝血因子 IX.

1.4 测定小鼠血浆中重组人凝血因子 IX 的活性

小鼠血浆中的人凝血因子 IX (hFIX) 的活性通过测定活化部分凝血活酶时间 (APTT) 来评价^[7]. 把 5 倍稀释的通用凝血参考血浆标准品 UCRP 定为 100% 凝血因子, 利用梯度稀释 UCRP 配制 100%、50%、25%、12.5%、6.25%、3.12%、1.56% 系列标准品, 制作标准曲线. 血浆 1:10 稀释后测定凝血时间. 用注射病毒前的小鼠血浆作对照. 取 APTT 试剂 Kontakt (Pacific Hemostasis) 75 μ l, 加 hFIX 缺乏血浆 (Trinty Biotech) 75 μ l、UCRP 标准品 (Pacific

Hemostasis)或稀释的血浆样品 75 μ l, 混匀, 置 37 $^{\circ}$ C 保温 3 min, 加预热至 37 $^{\circ}$ C 的 0.025 mol/L 氯化钙溶液 (Pacific Hemotasis) 75 μ l, 记录凝血时间. 每个样品测试 3 次以计算平均值.

1.5 免疫组化检测重组病毒在小鼠体内的分布和表达

2 只小鼠在注射重组 8 型 AAV 病毒 6 周后, 取感染小鼠的组织块 (腹肌、后腿肌、肝脏、肾脏和心脏) 和未注射病毒的对照小鼠的卵巢组织, 福尔马林固定液固定, 石蜡包埋, 切片后用兔抗 hF IX 单克隆抗体 (Sigma) (10 mg/L) 和羊抗兔 IgG-HRP 进行免疫组化分析.

2 结 果

2.1 表达载体的体外表达功能

把人凝血因子 IX 的基因表达载体 pCAhF9 导入 293 细胞后, 收集细胞, 用细胞裂解液电泳, 把电泳分离蛋白质转移到膜上进行蛋白质印迹分析. 结果见图 1.

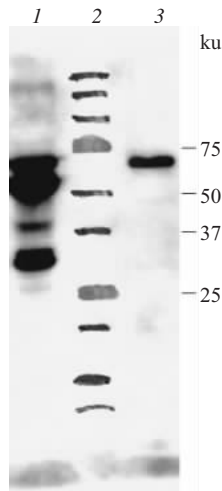


Fig. 1 Western blotting of the expression product of recombinant hFIX gene transferred into HEK293 cells

1: Lysate of the cells transfected with recombinant hFIX gene; 2: Prestained dual color protein standard (Bio-Rad); 3: Lysate of the control HEK293 cells.

与对照的 293 细胞裂解液相比, 重组病毒转染的 293 细胞裂解液有一条杂交信号明显的带, 其分子质量大小与凝血因子 IX 的分子质量相当. 而另一条与抗体结合的带, 分子质量在 30 ku 上下, 可能是凝血因子 IX 的水解产物. 说明凝血因子 IX 基因转入 293 细胞后表达出该基因产物, 该表达载体具有表达功能.

不过, 转导后的 293 细胞与对照的 293 细胞都有另一个相同的杂交信号蛋白. 其分子质量约为 70 ku, 可能是 293 细胞本身染色体上的凝血因子 IX 基因表达的前体蛋白.

2.2 8 型 AAV 重组病毒感染小鼠后体内表达的检测

用稀释液梯度稀释 UCRP 配成系列标准品, 用定量 ELISA 测得相应的 A 值, 制作标准曲线 (图 2). UCRP 系列标准品的浓度为 50%、25%、12.5%、6.25%、3.12%、1.56%、0.78%, 对应的 A 值分别为 1.506、1.288、1.118、0.988、0.695、0.464、0.257. 凝血因子的含量百分比值 y 与相应的光密度值 x 成指数关系. $y=0.3179e^{3.2952x}$, 相关系数 $R^2=0.9924$.

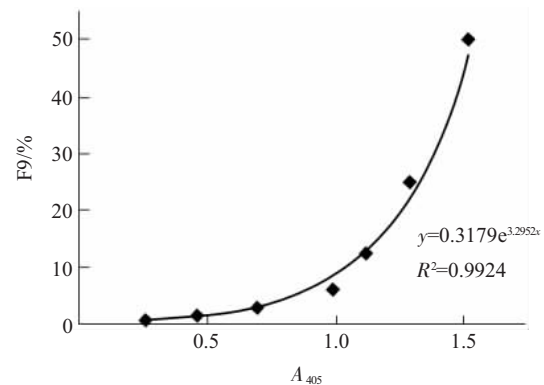


Fig. 2 ELISA standard curve produced from the exponentially diluted UCRP

Axis y stands for the percentage amount of coagulation factor IX, axis x stands for A_{405} value. $y=0.3179e^{3.2952x}$, relation coefficient $R^2=0.9924$.

根据该公式可算出小鼠血浆中的人凝血因子 IX 的相对表达量. 6 只小鼠腹腔注射 8 型 AAV 病毒后, 血浆中出现人的凝血因子 IX. 其表达量随时间变化的规律见图 3. 注射病毒前, 血浆中的人凝血因子 IX 的含量低于 ELISA 检测的范围, 几乎为零. 2 周后, 人凝血因子的表达明显, 1 个月后至 2 个月期间多数小鼠表达量达到高峰, 然后凝血因子水平下降. 直到 4 个月后血浆中凝血因子 IX 尚维持明显的表达水平, 多数水平在 200%~500% 左右.

2.3 小鼠血浆中重组人凝血因子 IX 的活性

凝血因子 IX 的生物活性通过其促进人凝血因子 IX 缺陷血浆凝血来确定. 活化部分凝血活酶时间用梯度稀释的通用凝血参考血浆作标准曲线 (图 4). 系列稀释的 UCRP 标准品的浓度为 100%、50%、25%、12.5%、6.25%、3.12%、1.56%, 测得的凝

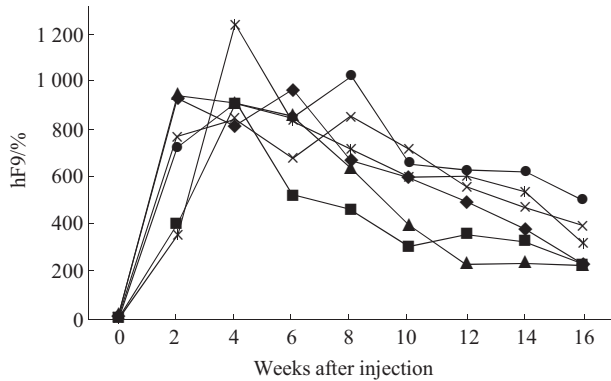


Fig. 3 The expression curve of recombinant human coagulation FIX gene in the plasma of mice injected with recombinant AAV vector

Axis *x* stands for the weeks post-injection (before injection, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 weeks after injection), axis *y* stands for the percentage of coagulation factor IX corresponding to the UCRP. ◆—◆: Mouse 1; ■—■: Mouse 2; ▲—▲: Mouse 3; ×—×: Mouse 4; *—*: Mouse 5; ●—●: Mouse 6.

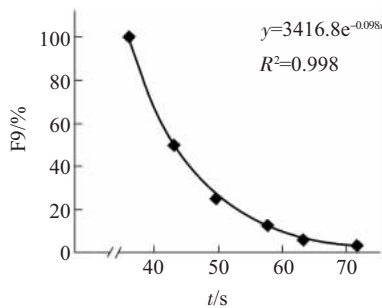


Fig. 4 The relation between the clotting time and the coagulation activity of the reference plasma

Axis *x* stands for the APTT (seconds), axis *y* stands for the relative concentration of reference plasma (%).

血时间分别为 36.23、43.15、49.73、57.9、63.4、71.78、75.97 s. 凝血因子的活性 *y* 与凝血时间 *x* 成指数相关. $y=3416.8e^{-0.098x}$. 相关系数(R^2)为 0.998. 根据该公式可计算小鼠血浆中凝血因子的相对含量.

293 细胞裂解液 1/5 稀释液的凝血时间为 84.7 s.

注射病毒前小鼠血浆的凝血时间大于 300 s, 凝血因子 IX 相对含量小于 5.8×10^{-10} , 相当于 0.

5 号小鼠注射重组病毒 4 周后的 ELISA 值为 1 400, 1/10 血浆稀释液的凝血时间为 35 s, 凝血因子相对含量为 114%.

6 号小鼠注射 2 周后的 ELISA 为 1 440, 1/10 血浆稀释液的凝血因子相对含量为 123%.

1 号小鼠注射病毒 12 周后的 ELISA 值为 488, 1/10 血浆稀释液的凝血时间为 41.4 s, 凝血因子的相对含量为 59.1%.

2 号小鼠注射 14 周后的 1/10 血浆稀释液的凝血时间为 55 s, 凝血因子 IX 的相对含量为 15.7%, 因此还有明显的凝血因子活性.

其中 1 号小鼠不同时间血浆样品的凝血活性及其 ELISA 检测的人凝血因子 IX 表达量的变化见图 5. 横坐标代表不同的取血时间(注射前, 注射后 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 周), 纵坐标代表 hF9 对应于标准品的相对百分含量.

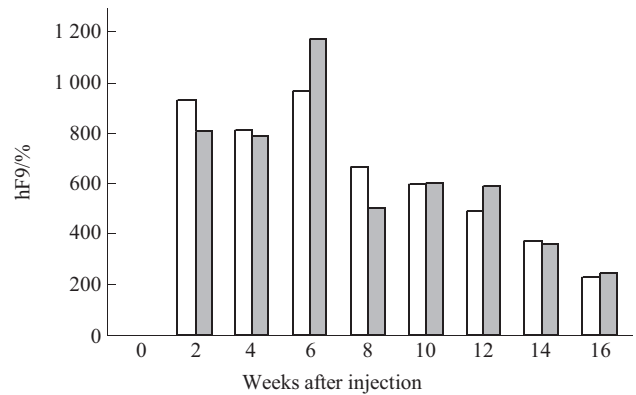


Fig. 5 Comparison of recombinant human coagulation factor IX in the plasma of a transfected mouse via ELISA and APTT assays

Axis *x* stands for the sampling time (weeks after injection), axis *y* stands for the relative concentration of hFIX to the reference plasma (%). Blank bar stands for the values from ELISA, gray bar stands for the values from APTT.

可见, ELISA 测得的凝血因子含量高的小鼠血浆, 其表现的凝血活性也强. 重组病毒表达的凝血因子 IX 是有活性的.

2.4 人凝血因子 IX 在小鼠组织中的表达分布

感染小鼠和对照小鼠的组织切片用兔抗 hFIX 单抗和羊抗兔 IgG-HRP 进行免疫组化实验. 在肝脏、肾脏和心脏有明显的表达, 在腹肌和后腿肌肉中也有表达(图 6). 说明 AAV 病毒经腹腔注射后已通过血液循环感染全身其他器官组织, 包括后腿肌肉和心脏. 而在肝脏和肾脏, 表达量较高, 表达产物较集中在肝小管和肾小管周围, 可能是因为该基因带分泌信号肽因而分泌到细胞外或肝小管和肾小管管腔.

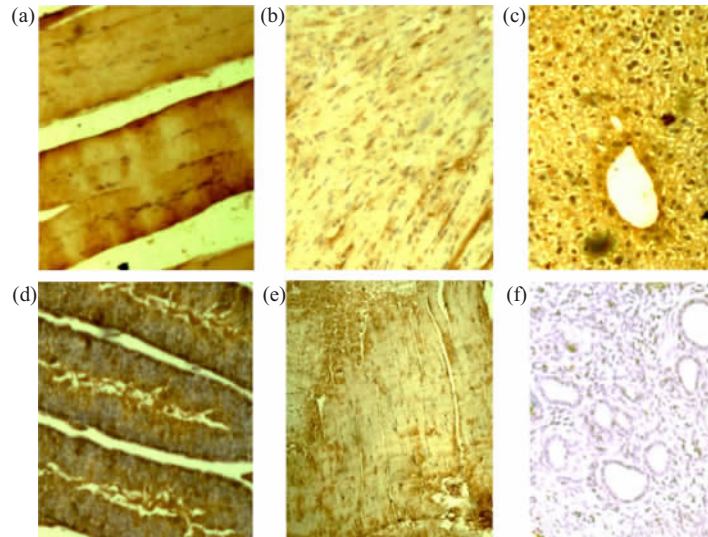


Fig. 6 Immunohistochemical analysis of recombinant hFIX in different organs of mice transfected with rAAV8 virus

Panel (a) is from the hind leg muscle, panel (b) is from the heart muscle, panel (c) from liver, panel (d) from kidney, panel (e) from abdominal muscle, panel (f) from the ovarian tissue of a control mouse. (original magnification: $\times 100$).

3 讨 论

凝血因子IX是体内肝细胞产生的, 凝血因子IX的基因变异造成凝血障碍, 临床上表现为乙型血友病. 乙型血友病已成为利用重组 AAV 病毒进行基因治疗研究的一个典型的疾病模型. 乙型血友病基因治疗的靶细胞多为肌细胞和肝细胞等. AAV 病毒载体进行基因治疗的途径有多种, 如肌肉注射, 静脉注射和门脉注射等.

随着 AAV 病毒载体的不断发展, 已有近 10 种不同血清型 AAV 病毒载体用于基因治疗研究. AAV2 是研究得最为清楚的一种腺相关病毒血清型, 但它转染细胞的能力较弱. 如有实验报道, 通过静脉注射 AAV 重组病毒产生的凝血因子IX仅 $55 \sim 110 \mu\text{g/L}$, 肝门静脉注射 AAV 病毒载体产生的血浆凝血因子IX为 $200 \sim 320 \mu\text{g/L}$ ^[8]. 另有报道, 肝门静脉注射 hFIX 的 AAV 病毒载体到小鼠体内, 可产生正常血浆中的 $16\% \sim 25\%$ 的人凝血因子IX^[3], 相当于 $800 \sim 1250 \mu\text{g/L}$. 肌肉注射 AAV2 病毒在小鼠血浆中产生约 $300 \mu\text{g/L}$ 的 hFIX^[9]. AAV1 病毒对肌肉的感染型很强, 有研究报道, 肌肉注射 AAV1 重组病毒在小鼠体内表达的狗凝血因子IX高达 80 mg/L , 而 AAV2 介导的表达仅为 $90 \mu\text{g/L}$ ^[10]. 可见不同的血清型 AAV 感染细胞表达转基因的能力相差很大.

AAV8 是从猴子组织中分离出来的新病毒. 与

早先的 AAV2 相比, AAV8 感染细胞的能力强, 感染的细胞种类多^[11,12]. AAV8 感染肝脏细胞, 比 AAV2 的感染能力强 10 到 100 倍^[11,13~15]. 一次肝门静脉或尾静脉注射 AAV8 重组病毒即可有效感染肝细胞^[16]. AAV8 感染骨骼肌细胞的能力也很强, 与 AAV1 相当. 而且, 经腹腔注射的 AAV8 病毒能经血液循环转运到其他组织器官, 尤其是其感染心脏和骨骼肌细胞的能力甚至比 AAV1 还强^[2].

本文探讨 AAV8 病毒载体经腹腔注射后病毒的分布和基因表达效果. 结果显示, AAV8 病毒载体经腹腔注射后在小鼠体内有效地表达了人凝血因子IX基因, 通过特异的抗人凝血因子IX单克隆抗体检测注射 2 周后血浆中有明显的表达产物. 相比之下, 注射前的小鼠血浆中未能检测到人凝血因子IX. 这是因为所用的小鼠的凝血因子IX基因被剔除, 而且选用的抗体也只与人凝血因子IX反应.

测定小鼠血浆样品的活化部分凝血活酶时间 (APTT) 显示, 病毒在小鼠体内表达的人凝血因子IX具有凝血活性. 利用 10 倍稀释的血浆样品可以大大缩短人凝血因子IX缺乏的血浆活化部分凝血活酶时间, 有的样品可以使活化部分凝血活酶的时间减少至 32 s, 相当于约 1 500% 的凝血因子. 而注射病毒前的血浆促使人凝血因子IX缺乏的血浆凝血的活性非常差, 检测到的活化部分凝血活酶的时间超过 300 s, 意味着几乎没有人凝血因子IX活性.

通过免疫组化实验分析发现, 病毒经腹腔注射

后, 在肝脏、心脏、肾脏检测到明显的表达, 而在腹肌、后腿肌肉细胞中也有表达. 说明病毒可通过血液向全身扩散, 有效感染其他器官组织.

与标准血浆相比, 100%的凝血因子相当于正常血浆 1/5 的凝血因子, 即为 1 mg/L 的凝血因子 IX. 据此, 本实验的表达量峰值达到 10 mg/L 左右的凝血因子 IX, 比以往大多数研究报道的值还高. 可见, 腹腔注射重组 AAV8 病毒获得高表达的凝血因子 IX.

AAV 病毒介导转基因的表达效果与其血清型、表达载体的结构和注射途径有很大关系. 本实验中通过腹腔注射 AAV8 重组病毒获得了高表达的凝血因子 IX, 原因可能有: 腹腔注射的 AAV8 病毒已经过血液循环进入身体多组织器官; AAV8 病毒能高效感染内脏和骨骼肌细胞; 表达载体 pCAhF9 中凝血因子 IX 的 cDNA 上游有一个 CMV 增强子和 CBA 启动子, 这些是很强的表达调控元件.

基因表达的量 and 维持的时间还与注射剂量有关^[4]. 本文中的小鼠注射 5×10^{10} gc 病毒, 注射 2 周后有明显的基因表达, 1 个月后表达水平达到高峰. 高峰水平维持到 2 个月以后, 然后表达量下降. 由于 AAV8 转移基因与病毒剂量有明显关系, 可以预想, 增加病毒的剂量, 如 2.5×10^{11} gc^[10]、 5×10^{11} gc^[4], 基因表达可望明显增强, 表达维持时间也可能明显延长.

另外, 小鼠年龄对病毒的接受性也有影响. 本实验选用约 4 周龄的幼鼠, 鼠龄过大对病毒的反应差(未发表数据).

从免疫组化结果看, 重组病毒表达的凝血因子 IX 向肝脏和肾脏管腔分泌, 这与表达载体的分泌信号肽有关. 但是, 过量的凝血因子进入血液是否会引起过度凝血尚需要进一步探讨以确定基因治疗的最佳剂量. 凝血是一系列的因子活化和相互作用的复杂过程, 单一因子的过量表达并不一定引起过度凝血, 正常血液中的凝血因子 IX 比实际需要的量高许多, 通常血浆中 5% 的凝血因子 IX 即可以防止乙型血友病.

综上所述, 本项研究利用新型的 AAV8 重组病毒载体介导人凝血因子 IX 在小鼠体内的表达, 在血浆中产生了高表达量的功能活性凝血因子 IX, 腹腔注射的 AAV8 病毒已经过血液循环进入身体多组织器官, 并高效感染肝脏、心脏、肾脏和肌肉细胞, 高效表达人凝血因子 IX.

参 考 文 献

- Gao G P, Alvira M R, Wang L, *et al.* Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (18): 11854~11859
- Wang Z, Zhu T, Qiao C P, *et al.* Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nature Biotechnology*, 2005, **23** (3): 321~328
- Snyder R O, Miao C, Meuse L, *et al.* Correction of hemophilia B in canine and murine models using recombinant adeno-associated viral vectors. *Nature Medicine*, 1999, **5** (1): 64~70
- Zolotukhin S, Byrne B J, Mason E, *et al.* Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Therapy*, 1999, **6**: 973~985
- Grieger J C, Samulski R J. Packaging capacity of adeno-associated virus serotypes: impact of larger genomes on infectivity and postentry steps. *J Virology*, 2005, **79** (15): 9933~9944
- Lin H F, Maeda N, Smithies O, *et al.* A coagulation factor IX-deficient mouse model for human hemophilia B. *Blood*, 1997, **90** (10): 3962~3966
- Walter J, You Q, Hagstrom J N, *et al.* Successful expression of human factor IX following repeat administration of adenoviral vector in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (7): 3056~3061
- Nakai H, Herzog R W, Hagstrom J N, *et al.* Adeno-associated viral vector-mediated gene transfer of human blood coagulation factor IX into mouse liver. *Blood*, 1998, **91** (12): 4600~4607
- Hagstrom J N, Couto L B, Scallan C, *et al.* Improved muscle-derived expression of human coagulation factor IX from a skeletal actin/CMV hybrid enhancer/promoter. *Blood*, 2000, **95** (8): 2536~2542
- Chao H, Liu Y, Rabinowitz J, *et al.* Several log increase in therapeutic transgene delivery by distinct adeno-associated viral serotype vectors. *Molecular Therapy*, 2000, **2** (6): 619~623
- Broekman M L D, Comer A C L A, Hyman A B T, *et al.* Adeno-associated virus vectors serotyped with AAV8 capsid are more efficient than AAV1 or -2 serotypes for widespread gene delivery to the neonatal mouse brain. *Neuroscience*, 2006, **138** (2): 501~510
- Klein R L, Dayton R D, Leidenheimer N J, *et al.* Efficient neuronal gene transfer with AAV8 leads to neurotoxic levels of tau or green fluorescent proteins. *Molecular Therapy*, 2006, **13** (3): 517~527
- Barbon C M, Ziegler R J, Li C, *et al.* AAV8-Mediated hepatic expression of acid sphingomyelinase corrects the metabolic defect in the visceral organs of a mouse model of niemann-pick disease. *Molecular Therapy*, 2005, **12** (3): 431~440
- Davidoff A M, Gray J T, Ng C Y C, *et al.* Comparison of the ability of adeno-associated viral vectors pseudotyped with serotype 2, 5, and 8 capsid proteins to mediate efficient transduction of the liver in murine and nonhuman primate models. *Molecular Therapy*, 2005, **11** (6): 875~888
- Sarkar R, Tetreault R, Gao G P, *et al.* Total correction of hemophilia a mice with canine FV III using an AAV 8 serotype. *Blood*, 2004, **103** (4): 1253~1260

16 Ding Z, Georgiev P, Thöny B. Administration-route and gender-independent long-term therapeutic correction of phenylketonuria (PKU) in a mouse model by recombinant

adeno-associated virus 8 pseudotyped vector-mediated gene transfer. *Gene Therapy*, 2006, **13** (7): 587~593

Study on The Expression of Coagulation Factor Mediated by Recombinant AAV Serotype 8*

CAO Zuo-Wu^{1)**}, LI Guan-Gui¹⁾, LIANG Yu-Qiang¹⁾, HE Dong-Mei²⁾

¹⁾College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

²⁾Institute of Hematology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract Recombinant AAV serotype 8 (rAAV8) vector is new and promising for gene delivery, which transduces muscular and hepatic cells highly efficiently. The transduction varies with the administration routes. It was observed that the rAAV8 virus injected intraperitoneally had been delivered to many different tissues through the blood circulation and resulted in extensive and prolonged gene expression. The interest gene (human coagulation factor IX) has been highly expressed *via* the rAAV8 vector injected intraperitoneally into mice at the dose of 5×10^{10} gc/ mouse. Considerable expression was detected in mouse plasma at two weeks after the administration. Expression peak up to 1 000% level compared to the UCRP occurred between 1~2 months after administration, and then the expression declined gradually but obvious expression persisted at 4 months post administration. APTT test proved the clotting activity of the recombinant hF IX in mouse plasma. Immunohistochemical assay showed that the human coagulation factor has been expressed significantly in several organs including liver, kidney, heart and muscles (abdominal and hindleg). These suggest that the rAAV8 virus injected intraperitoneally has been delivered *via* blood circulation and transduced different cells of multi-organs, and the product of the gene mediated by the rAAV8 vector is biologically active.

Key words AAV, intraperitoneal injection, coagulation factor

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30271370).

**Corresponding author . Tel: 86-20-31545871, E-mail: caozuowu@yahoo.com.cn

Received: June 13, 2006 Accepted: August 31, 2006