

学校编码: 10384
学号: B200426036

分类号_____密级_____
UDC_____

厦 门 大 学

博 士 学 位 论 文

慢病毒介导的艾滋病 RNAi 治疗的
可行性研究

Feasibility study on lentiviral RNAi therapy for HIV/AIDS

指导教师姓名: 夏宁邵 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2008 年 09 月

论文答辩时间: 2008 年 11 月

学位授予日期: 2008 年 月

答辩委员会主席: 朱关福 教授

评 阅 人: _____

2008 年 09

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(夏宁邵)课题(组)的研究成果,获得(夏宁邵)课题(组)经费或实验室的资助,在(夏宁邵)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):许辰煜

2008年09月30日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：许辰煜

2008 年 09 月 30 日

摘 要

艾滋病 (AIDS) 是一种危害极大的全球性疾病, 在全世界范围内严重危害人类的健康。因此, 对 AIDS 防治研究就具有极其重要的意义。随着耐药型艾滋病病毒 (HIV) 病毒株的大量出现及现有治疗方式一些难以克服的缺陷, 近年来对 HIV/AIDS 基因治疗的研究得到了越来越广泛的重视及发展。以慢病毒载体系统结合 RNA 干扰 (RNAi) 等新兴技术的 HIV 基因治疗目前还存在着一系列亟待解决的问题: 难以测定治疗性慢病毒滴度; 缺乏有效的用于治疗效果验证的动物模型; 治疗靶细胞的选择尚存在一定争议。针对这些治疗过程中重要的问题及难点, 本研究借助 Taqman 荧光定量 PCR (Q-PCR) 检测及人鼠嵌合模型等手段, 在多个体内外模型中对 HIV/AIDS 基因治疗进行了较为全面的可行性研究。

为保证治疗的有效性与稳定性, 本研究首先探讨了治疗性慢病毒滴度的测定方式。本实验分别引入了绿色荧光蛋白 (GFP)、荧光素蛋白 (Luc) 及新型短肽 tetracysteine (TC) 作为治疗性慢病毒的报告基因, 并从检测的精确度、灵敏度及可重复性等方面全面比较了引入不同报告基因测定慢病毒滴度的可行性。结果表明引入 GFP 及 Luc 可以较为有效地对慢病毒滴度进行测定, 而 TC 在检测灵敏度及准确性方面仍存在的问题, 要将其投入实用尚需该系统进一步的发展。但 GFP 及 Luc 由于其自身分子量较大, 可能导致治疗性目的基因表达量下降及细胞毒性等影响治疗效果的问题, TC 则不存在这方面的问题。综合比较后, 我们认为引入 GFP 是测定慢病毒滴度较适合的方法, 特别是应用于各种细胞水平的研究。本实验同时也探讨了将已有的以慢病毒包装信号 ψ 为靶标的 Taqman Q-PCR 检测方式应用于慢病毒滴度测定的可能性。与 RT-PCR 结合, 该检测系统能可定量细胞中的慢病毒基因水平。精确度、灵敏度及可重复性评价实验结果表明, 该检测系统可较有效地应用于对慢病毒滴度的测定。

基于膜蛋白 H2K^b 的磁珠筛选系统是一种新型的细胞分选系统, 该系统能在体外快速无损伤地对阳性细胞进行筛选富集。本研究首次在治疗性慢病毒载体中引入膜蛋白 H2K^b 基因, 通过相应的磁珠分选解决了 HIV RNAi 动物模型构建过程

中由于治疗靶标细胞阳性率不足而造成的难以比较 HIV RNAi 体内保护性效果的难题。靶细胞在经优化的感染条件下感染含筛选标志基因的慢病毒，经一步磁珠筛选后细胞阳性率都达到了较高的水平，同时整体 RNAi 抑制水平也有了显著提高。在此基础上，本研究以 huPBL-SCID 模型为参照建立 RNAi 保护性动物模型 H2K-SCID 模型，以实现 HIV RNAi 体内攻毒保护性效果快速有效的评价。为更全面比较模型中 HIV RNAi 的抑制效果，本研究还建立了以 HIV pol 基因为检测靶标的 Taqman Q-PCR 检测系统，实现了对模型中脏器内 HIV 水平的更准确有效的评估与比较。通过上述模型我们成功地验证了 RNAi 序列 vif37 及 pol1102 在动物体内对 HIV 的有效抑制，其相关模型动物外周血 p24 蛋白水平及脏器 HIV 病毒水平均明显低于无 RNAi 的对照。此外，我们也利用成系淋巴细胞 MT4 建立了另一个 HIV RNAi 动物模型 SCID-MT4，在此模型中也同样成功地证实了 vif37 及 pol1102 对 HIV 的抑制能力。

HIV 基因治疗的靶标选择是决定治疗成败的一个关键因素，为此本研究分别对以 CD4⁺淋巴细胞及 CD34⁺造血干细胞为靶标的慢病毒治疗方案在细胞水平进行了相关的可行性研究。CD4⁺细胞的相关研究结果表明，CD4⁺淋巴细胞感染 HIV 后对慢病毒的敏感性下降，治疗性基因的进入效率因此受到了较大的影响，RNAi 的整体抑制效果并不明显。在对 CD34⁺干细胞的研究中，感染了前述慢病毒的干细胞，在进一步的体外扩增后可以获得大量带有目的基因的子代细胞，这些子代细胞中 HIV 的复制水平受到了一定程度的抑制。对表达 H2Kk 的干细胞进行磁珠筛选后，其子代细胞基因阳性率及 HIV RNAi 抑制效果均有较大幅度的提升。这表明慢病毒介导的 RNAi 治疗在以 CD34⁺干细胞为靶标时，可以借助慢病毒的稳定整合能力及干细胞的多能性，实现对 HIV 的长效稳定地抑制。因此，以 CD34⁺细胞为靶标的 HIV 慢病毒 RNAi 治疗是一种可行性较高的基因治疗方案。

关键词： 艾滋病；基因治疗；慢病毒；病毒滴度；RNA 干扰；动物模型；干细胞

Abstract

AIDS is a very dangerous worldwide disease and serious harm to people's health. So it is very significant to study on defence and therapy to HIV/AIDS. Recently more and more drug-resistant HIV has emerged and many defects of HAART have been found out. So gene therapy for HIV/AIDS has been more important to develop. Lentiviral vector system combined with RNAi has been proven a potential therapeutic technique for HIV gene therapy. But there are still several key problems need to be solved: lentiviral titer is hard to measure; it's still lack of effective animal model for therapeutic testify; it's controversial to choose the therapeutic target. Aiming at these problems, this study constructs several models in *vitro* and in *vivo* based on techniques such as Taqman Q-PCR and humanized mouse, etc. Based on these models we make a comprehensive feasible research on HIV/AIDS gene therapy.

In order to ensure the efficiency and stability, we investigate the measure of therapeutic lentivirus titer. We introduce several reporters, which include GFP, Luc and newly peptide TC, and compare the feasibilities of introducing them as titer measure on sensitivity, scope and repeatability of detection. Results show that GFP and Luc could measure lentiviral titer so well while TC is not good enough to put into practical application for its sensitivity and accuracy are relatively low that needs further expansion of TC system. But GFP and Luc would bring down the expression of therapeutic gene, affect the cells' biological activity and increasing the probability of unsuccessful or unsafe in therapy in that its molecular weight while TC did not. So it's limited to use these two reporters to measure lentiviral titer *in vitro*. We also try to use a Taqman Q-PCR system which targeted packaging signal ψ to measure lentivirus titer. It can accurately quantify several lentiviral vectors. Combined

with RT PCR, this method can easily calculate copies of lentiviral gene in cell. Its accuracy, sensitivity and repeatability are good enough to detect lentivirus titer effectively.

H2K^k magnetic selection system is a new cell sorting system which can be used to sorting cell quick and harmless. We at first time introduced membrane protein H2K^k gene into therapeutic lentiviral vector and presorting positive cell by magnetic select. It solves the difficulty that it's hard to testify HIV RNAi suppression *in vivo* in existing animal models in that the positive ratio of target cell was too low to measure the RNAi inhibition efficiency. On optimal infection condition, positive ratio and HIV inhibition efficiency of infected cells would increase a lot after magnetic sorting *in vitro*. With these improvements, we build RNAi protection models H2K-SCID based on huPBL-SCID model and to evaluate the RNAi protective efficiency when counteracting HIV toxin *in vivo*. For better evaluation *in vivo*, we build a HIV Taqman Q-PCR system targeted HIV pol gene to effectively detect HIV level in spleen and lymphnod of model mice. By these ways, we successfully testify the HIV suppression abilities of RNAi sequences vif37 and pol1102 *in vivo*. The p24 level of peripheral blood and virus level of organs in RNAi containing animal models are significantly lower than those of without RNAi. We also proved theae results in another humanized mouse modle SCID-MT4 which based on MT4 cell line instead of common used PBMC.

The choice of HIV gene therapy target is also the key of therapeutic success. For that reason, we make a series of researches in cell models to testify the feasibility of CD4⁺ lymphocyte target therapy project and CD34⁺ stem cell target therapy project. In this study we find out that the lentiviral infected efficiency of CD4⁺ cells would decline a lot when it has already infected HIV. Relatively lentiviral infected efficiency of CD34⁺ cells is higher and will be impregnable whether infected HIV or

not. Lentiviral infected stem cells would differentiate and proliferate into amount of offspring cells which containing therapeutic RNAi gene. HIV replication would be strongly suppressed in those offspring CD4⁺ cells. Combined with H2K^b sorting system, the positive ratio and HIV inhibition efficiency of offspring cells would be improved a lot after magnetic selection of infected CD34⁺ cell. So we think CD34⁺ stem cell target therapy project would be a probably choice for HIV RNAi long-term gene therapy.

Key Words: HIV; gene therapy; lentiviral vector; titer; RNA interference; animal modle; stem cell

缩略词

- AGT: O⁶-alkylguanine-DNA-alkyltransferase, O⁶-烷化鸟嘌呤-DNA-烷基转移酶
- AIDS: acquired immuno deficiency syndrome, 获得性免疫缺陷综合征
- BCNU: Carmustine, 卡氮芥
- BG: O⁶-benzylguanine, O⁶-苄甲基鸟嘌呤
- CA: capsid protein, 衣壳蛋白
- CT: Cycle threshold
- CLP: common lymphoid progenitor, 普通淋巴祖细胞
- CTL: cytotoxic T lymphocyte, 细胞毒性 T 淋巴细胞
- EI: entry inhibitor, 进入抑制剂
- ESE: exon splicing enhancers, 外显子剪切增强子
- FCM: Flow Cytometry, 流式细胞仪
- FIV: feline immunodeficiency virus, 猫免疫缺陷病毒
- FRET: fluorescence resonance energy transfer, 荧光共振能量传递
- GFP: green fluorescent protein, 绿色荧光蛋白
- HAART: highly active antiretroviral therapy, 高效抗逆转录病毒治疗
- HIV: human immunodeficiency virus, 人免疫缺陷病毒
- HSC: hematopoietic stem cell, 造血干细胞
- IFN: interferons, 干扰素
- IN: integrase, 整合酶
- IRES: internal ribosome entry site, 核糖体内部进入位点
- LTR: long terminal repeat, 长末端重复序列
- Luc: luciferase, 荧光素酶
- LV: lentiviral vector, 慢病毒载体
- MA: matrix protein, 基质蛋白
- MGMT: O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase, O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA-甲基转移酶
- mPGK: mouse phosphoglycerate kinase promoter

- NC: nucleocapsid protein, 核衣壳蛋白
- NRE: negative regulatory element, 负调节元件
- NRTI: nucleoside reverse transcriptase inhibitor, 核苷类逆转录酶抑制剂
- NNRTI: non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, 非核苷类逆转录酶抑制剂
- OTE: off-target effects, 脱靶效应
- PB: Polybrene
- PI: protease inhibitor, 蛋白酶抑制剂
- PR: protease, 蛋白酶
- PrBS: primer binding site, 引物结合位点
- PTGS: post-transcriptional gene silencing, 转录后抑制
- Q-PCR: Real Time Quantitative PCR, 实时荧光定量 PCR
- RISC: RNA-induced silencing complex, RNA 诱导的静默复合体
- RM: rhesus macaque, 恒河猴
- RN: RetroNectin
- RNAi: RNA interference, RNA 干扰
- RRE: Rev responsive element, Rev 效应元件
- RTe: reverse transcriptase, 反转录酶
- SCID: severe combined immunodeficiency, 严重免疫缺陷
- SIN: self-inactivating, 自激活缺失
- siRNA: small interfering RNA, 小干扰 RNA
- shRNA: small hairpin RNA, 小发卡 RNA
- SIV: simian immunodeficiency virus, 猿免疫缺陷病毒
- SU: surface glycoprotein, 表面糖蛋白
- TAK: Tat associated kinase, Tat 相关激酶
- TAR: transactivation response element, Tat 效应元件
- TC: tetracysteine
- TCID₅₀: 50% tissue-culture infectious dose, 半数组织培养物感染剂量
- TM: transmembrane glycoprotein, 跨膜糖蛋白

WPRE: post-transcription regulatory element of the woodchuck, 美洲旱獭
转录后调节因子

VSVG: vesicular stomatitis virus glycoprotein, 口水疱疹病毒糖蛋白

厦门大学博硕士学位论文摘要库

目录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
缩略词.....	VI
目 录.....	ii
前 言.....	1
1.人免疫缺陷病毒及其治疗研究进展	1
2. HIV 的基因治疗研究.....	17
3. HIV/AIDS 相关动物模型	25
4. 本研究涉及的实验系统	31
5. 本论文研究的思路、目的及意义	55
材料与方 法	57
1. 材 料	57
2. 方 法	62
3. 研究相关实验设计	75
结果与分析	89
第一部分 HIV 来源的慢病毒滴度测定方法的研究	89
1. 引入报告基因测定慢病毒滴度	89
1.1 含不同报告基因慢病毒载体的构建.....	89
1.2 制备后病毒含量比较.....	90
1.3 三种报告基因对目的基因表达的影响.....	90
1.4 三种报告基因对细胞活性的影响.....	93
1.5 三种报告基因荧光持续时间及荧光强度稳定性检测.....	93
1.6 利用报告基因测定慢病毒滴度.....	95
1.7 病毒检测稳定性分析.....	96
2. Q-PCR 法测定慢病毒滴度	98

2.1 慢病毒感染滴度曲线的建立.....	99
2.2 修正系数及病毒滴度的换算.....	99
2.3. 重复性比较.....	100
第二部分 HIV-RNAi 动物模型的建立.....	100
1. Q-PCR 检测 HIV 方法的建立	100
1.1 引物及荧光探针的设计.....	101
1.2 Q-PCR 检测系统有效性验证.....	101
2. SCID-MT4•HIV 小鼠模型	105
2.1 HIV 体内攻毒验证	105
3. H2K-SCID 模型	108
3.1 慢病毒感染 PBMC 的条件优化	108
3.2 含目的基因细胞的筛选富集.....	110
3.3 H2K-SCID 模型的建立	114
第三部分 针对 HIV 的慢病毒介导的 RNAi 基因治疗的靶细胞选择	119
1. 以淋巴细胞为靶标的治疗方案	119
1.1 利用 MT4 细胞进行的治疗性验证.....	119
1.2 利用 PBMC 进行的治疗性验证	121
2.以干细胞为靶标的治疗方案	123
2.1 CD34 ⁺ 细胞的感染与筛选	124
2.2 CD34 ⁺ 细胞感染慢病毒后成克隆比较	124
2.3 慢病毒感染后 CD34 ⁺ 细胞的分化	126
讨论.....	129
1. 报告基因法测定重组慢病毒滴度	129
2.报告基因在慢病毒载体体内示踪上的应用	131
3.重组慢病毒 Q-PCR 滴度测定方法的建立.....	131
4. HIV 病毒荧光定量 PCR 检测方式的建立.....	132
5. SCID-MT4 模型的建立	133

目 录

6. H2K-SCID 模型的建立	134
7. HIV RNAi 动物模型的进一步发展	136
8. 治疗性慢病毒对 HIV 阳性细胞的感染能力	136
9. 以干细胞为靶标的 HIV RNAi 慢病毒治疗	137
10. 磁珠筛选系统在基因治疗中的应用	138
小结与展望	139
参考文献	141
致谢.....	161
附录.....	162

CONTENT

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	III
Abbreviation	VI
Perface	1
1.HIV and its therapeutic research	1
2. Gene therapy for HIV/AIDS	17
3. Animal model of HIV/AIDS	25
4. Experimental systems in study	31
5. The thinking, purpose and significance of this research	55
Materials and Methods	57
1. Materials	57
2. Methods	62
3. Experimental design	75
Results and analysis	89
1. Research for chimeric lentivirus titer	89
1.1 Lentivirus titer by reporter	89
1.2 Lentivirus titer by Q-PCR.....	98
2. Construction of HIV-RNAi animal model	100
2.1 HIV detection by Q-PCR	100
2.2 SCID-MT4•HIV mouse model	105
2.3 H2K-SCID mouse model.....	108
3. Target cell selection for HIV lentiviral RNAi therapy	119
3.1 Lymphocyte-target strategy	119
3.2 Stem cell-target strategy.....	123
Discussion	129

目 录

1.Chimeric lentivirus titer by reporter	129
2.Chimeric lentivirus detection <i>in vivo</i> by reporter	131
3.Chimeric lentivirus titer by Q-PCR	131
4.HIV detection by Q-PCR.....	132
5.Construction of SCID-MT4 model.....	133
6.Construction of H2K-SCID model	134
7.Development of HIV RNAi animal model	136
8. Infected ability of therapeutic lentivirus for HIV positive lymphocyte	136
9.Stem cell-target HIV/AIDS gene therapy	137
10. Application of magnetic selection system in gene therapy	138
Brief Summary and Prospect.....	139
Refernces	141
Acknowledgement	161
Appendix.....	162

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库