

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 31/585 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810104210.X

[43] 公开日 2008 年 10 月 22 日

[11] 公开号 CN 101288671A

[22] 申请日 2008.4.17

[21] 申请号 200810104210.X

[71] 申请人 首都医科大学

地址 100069 北京市丰台区右安门外西头条  
10 号

[72] 发明人 王晓民 胡 静 丁 卫 张 婷

[74] 专利代理机构 北京科龙寰宇知识产权代理有  
限责任公司

代理人 孙皓晨 费碧华

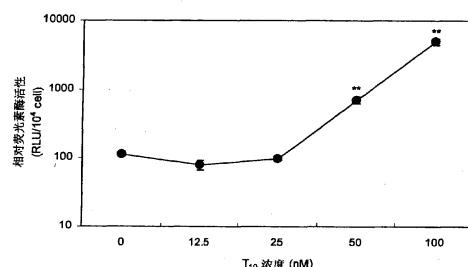
权利要求书 1 页 说明书 19 页 附图 3 页

## [54] 发明名称

雷公藤单体化合物在提高腺相关病毒载体介  
导的基因表达效率及其对神经退行性疾病的  
辅助治疗中的用途

## [57] 摘要

本发明公开了雷公藤单体化合物在提高腺相关病毒载体介导的基因表达效率中的用途，还公开了雷公藤单体化合物在辅助治疗神经退行性疾病中的用途。雷公藤单体化合物(尤其是雷公藤内酯醇)能够显著提高 2 型重组腺相关病毒对多种神经细胞系、原代神经元和大鼠中脑神经组织的转导效率及其所介导的外源基因的表达。此外，雷公藤单体化合物可以抑制小胶质细胞的活化，减少促炎因子的产生，增加神经营养因子的产生，对多巴胺能神经元产生保护作用，可用于辅助治疗神经退行性疾病。本发明有效克服了 AAV 介导的神经疾患基因治疗中的瓶颈问题，充分结合了雷公藤单体化合物对神经元的保护作用和对病毒载体的辅助增效作用，降低了潜在的免疫副作用和应用成本。



1、雷公藤 (*Tripterygium wilfordii Hook. f.*) 单体化合物在制备提高腺相关病毒载体在靶细胞中转导效率药物中的用途。

2、雷公藤单体化合物在制备提高腺相关病毒载体介导的外源基因在靶细胞中表达效率药物中的用途。

3、雷公藤单体化合物在制备抑制神经细胞中促炎因子的合成或释放的药物中的用途。

4、按照权利要求 1、2 或 3 所述的用途，其特征在于，所述的雷公藤单体化合物包括：雷公藤内酯醇、雷公藤内酯二醇、雷公藤内酯三醇、雷醇内酯、雷公藤氯内酯醇或雷公藤红素。

5、按照权利要求 4 的用途，其特征在于：所述的雷公藤单体化合物是雷公藤内酯醇。

6、按照权利要求 1 或 2 的用途，其特征在于：所述的靶细胞包括神经元细胞或神经样细胞。

7、按照权利要求 1 或 2 的用途，其特征在于：所述的腺相关病毒载体是 2 型重组腺相关病毒载体。

## 雷公藤单体化合物在提高腺相关病毒载体介导的基因表达效率及其对神经退行性疾病的辅助治疗中的用途

### 技术领域

本发明涉及中药单体化合物的一种新医药用途，尤其涉及中药雷公藤 (*Tripterygium wilfordii* Hook. f.) 单体化合物在提高腺相关病毒载体介导的基因表达效率中的用途，本发明还涉及雷公藤单体化合物在辅助治疗神经退行性疾病中的用途，属于生物医药领域。

### 背景技术

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是多发于中老年人群的中枢神经系统退行性疾病。在我国，其发病率呈逐年增加趋势。PD 主要的病理特征是黑质致密部的多巴胺能神经元的进行性退变，导致纹状体多巴胺含量降低。其典型的临床表现为震颤、肌僵直和运动徐缓三大症状，严重影响了患者及其家庭的生活质量。目前，针对 PD 的药物替代及外科手术疗法虽然可获得一定疗效，但所引发的副作用也同时给患者的健康带来相当的危害，因而探索包括基因治疗在内的新型 PD 治疗手段迫在眉睫。

以病毒载体为基础的基因治疗替代疗法，在帕金森病的治疗中有较好的前景 (Gene therapy in Parkinson's disease. O. Eberhardt . J. B. Schulz. *Cell Tissue Res.* (2004))，其原因如下：(1) PD 的病理基础比较明确，是由于多巴胺能神经元的选择性功能丧失导致多巴胺缺乏所致的病变；(2) 病灶局限于黑质纹状体

系统，从而使准确的立体定位治疗成为可能；(3)具备成熟的PD动物模型可供临床疗效和安全性评价。

基因治疗成功实施的前提是构建安全有效的基因载体，基因工程病毒载体相比于非病毒类载体，在携带外源基因的表达方面显示了无可比拟的高效率，成为基因治疗载体中的首选。但是，野生型病毒由于其免疫原性、宿主基因组整合、突变特性等潜在的危险，使其直接应用于科研或临床治疗受到了限制。为了解决上述问题，科研者通过对病毒结构解析，利用分子生物学技术，制备基因工程重组病毒载体。它具备如下多种优点：(1) 感染效率高，与相同剂量的非病毒类基因载体比较，可以转化数个数量级以上的细胞；(2) 转化细胞的效果稳定，不易受病毒批次、宿主状态和外界因素干扰；(3) 能够长效表达外源基因；(4) 可嵌入多种转录调节元件，对载体功能进行优化；(5) 一定的细胞靶向性，不同类型病毒类感染不同种类细胞时表现出各自特异嗜性。

在基因治疗或科研中，常用到的重组病毒载体主要有以下三类，即：腺病毒（Adenovirus, Ad）、逆转录病毒（Retrovirus, RV）和腺相关病毒

（Adeno-associated virus, AAV）。其中，腺病毒的免疫原性较强，即使在重组改造后，仍然可发生由于大剂量使用而引发的严重免疫反应致患者死亡的病例（M Wadman. NIH panel to limit secrecy on gene therapy. Nature, 1999; 402(6757): 6.）；而逆转录病毒只能转导处于分裂期的细胞，完全不适用于非增殖性的中枢神经元，而且还有在基因组中随机整合的潜在风险，在临床试验中已有受试患者出现白血病样反应的相关报道。相比之下，AAV具有以下几方面的优势：(1) 无毒性及低免疫性：自发现至今，尚无引起相关疾病的报道。而且近代对AAV的应用从最初的野生型病毒过渡到了新的重组病毒，

去除了参与病毒进行自主复制的元件，应用更加安全；（2）对中枢神经系统具有易感性：2型腺相关病毒（*adeno-associated virus of serotype 2*, AAV2）在同样条件下对不同组织进行感染，对中枢神经系统神经元具有天然嗜性，感染效率最高，更使之成为PD治疗的首选；（3）对分裂及非分裂细胞均可感染：由于神经细胞属于不分裂的终末分化细胞，多数病毒载体不能成功感染。而AAV对分裂及非分裂细胞均可感染，所以AAV在中枢神经系统基因治疗中一枝独秀；（4）长效表达所携带的外源基因：AAV可以在体内长效表达外源基因，有实验证明在大鼠脑内至少可持续表达19个月，与其天然寿命相当，而在灵长类动物脑内也持续表达至少42个月；（5）感染细胞或组织时没有野生病毒基因的表达：重组腺相关病毒载体去除了病毒本身的基因组，所以在进入宿主细胞表达外源基因时不会产生病毒本身的基因，减少了由于病毒自我复制及在宿主基因组中整合带来的潜在风险。

AAV 以其突出的生物安全性，加上其对中枢神经系统的偏嗜性，成为神经系统疾病基因治疗中首选的病毒载体。然而，AAV 作为神经系统疾病的基因治疗载体存在一个严重的缺陷是其对靶细胞转导效率不足，从而限制了其在基因治疗中的疗效和临床应用。近几年，科研者始终在探寻能够增加 AAV 转导效率的方法。依据报道，主要从以下两方面入手来提高 AAV 转导效率：一种是对 AAV 本身结构的改造上，例如衣壳蛋白基因杂合拼接、基因组末端重复序列的改造等，但是其改造过程技术要求高，研发周期长，改造后病毒的性能和副作用有相当的不确定性，所以应用于神经系统尚需进一步研究结果验证；另一种方法就是加入某些小分子药物或生物活性物质作为增强剂提高 AAV 在组织内的转导，例如蛋白酶体抑制剂类化合物等，它们可以起到增强剂的作用，遗憾的是它们对细胞及组织都存在一定的毒性，而且具有潜在

的致畸危险性，如果将其应用于神经系统，尤其是在体实验和临床试验的可能性很小。

综上所述，发现一种安全、简单、高效的提高 AAV 在神经元细胞或神经样细胞中转导效率的方法或药物，将对拓展 AAV 的临床应用具有重大意义。

作为重要天然药物资源的雷公藤，主要产于云南、贵州、浙江、安徽、湖南、福建等地，其来源为卫矛科植物以及同属植物昆明山海棠、黑蔓等。自1936年首次报道从雷公藤根部分离得到萜类色素雷公藤红素至今，已从雷公藤属植物中分离出七十多种化学成分，主要类型为生物碱、二萜、三萜、倍半萜、多糖和木脂素类化合物。

雷公藤在我国已有上千年的药用历史，有祛风除湿、舒筋活络、消肿止痛、杀虫解毒等功效。近年来研究者还发现雷公藤在临床上对器官移植的排斥反应、肾病综合征、癌症等均有疗效。雷公藤在临床上还用于治疗风湿性关节炎、类风湿性关节炎、跌打损伤、肾小球肾炎、红斑狼疮等疾病，同时还具有有抗生育、抗肿瘤、抗菌、止痛等活性（*Medicinal chemistry and pharmacology of genus Tripterygium (Celastraceae)*. Anita M. Brinker.

*Phytochemistry*. (2007)）。经药物化学、药理活性分析，雷公藤抗炎抗免疫活性的有效组份为雷公藤多甙 $T_{II}$ （以下简称 $T_{II}$ ），其在治疗类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮等炎性、变态性、自身免疫性疾病方面已取得确切的效果。雷公藤内酯醇 $T_{10}$ （以下简称为 $T_{10}$ ）是 $T_{II}$ 进一步分离纯化所得的单体化合物，且效价约为 $T_{II}$ 的100~200倍，经结构分析，确定 $T_{10}$ 为环氧二萜内酯类化合物。而且药理活性筛选结果表明， $T_{10}$ 同样具有 $T_{II}$ 的抗炎、免疫抑制和抗生育活性。

迄今为止，尚未有雷公藤的单体化合物能够提高腺相关病毒载体在神经元细胞或神经样细胞中转导效率的有关报道。

## 发明内容

本发明所要解决的技术问题是针对AAV作为中枢神经系统退行性疾病的基因治疗载体时所存在的转导效率相对较低的缺陷，提供一种能够有效提高AAV在神经细胞中的转导效率的药物。该药物能够有效提高AAV在神经元细胞或神经样细胞中的转导效率以及所介导的外源基因在神经元细胞或神经样细胞中的表达效率，此外，该药物适用剂量范围内不仅对人体没有任何毒副作用，还对神经系统退行性疾病具有一定的辅助治疗作用。

本发明所要解决的技术问题是通过以下技术方案来实现的：

本发明人通过大量的实验发现，传统中药雷公藤单体化合物（尤其是 $T_{10}$ ），对AAV在神经元细胞或神经样细胞中的转导效率有明显的增强作用，可有效提高其所介导的外源基因在神经元细胞或神经样细胞中的表达效率；本发明人还发现，雷公藤单体化合物对多巴胺能神经元有保护作用，对PD模型大鼠的异常旋转行为有显著的改善作用，具有其它可增强AAV表达的化学试剂所不能比拟的优势。本发明人经过离体实验与在体实验之间药物剂量换算，发现发挥增强作用的 $T_{10}$ 剂量是远在临床用药毒理剂量之下的，这意味着将其应用于临床是非常安全的。

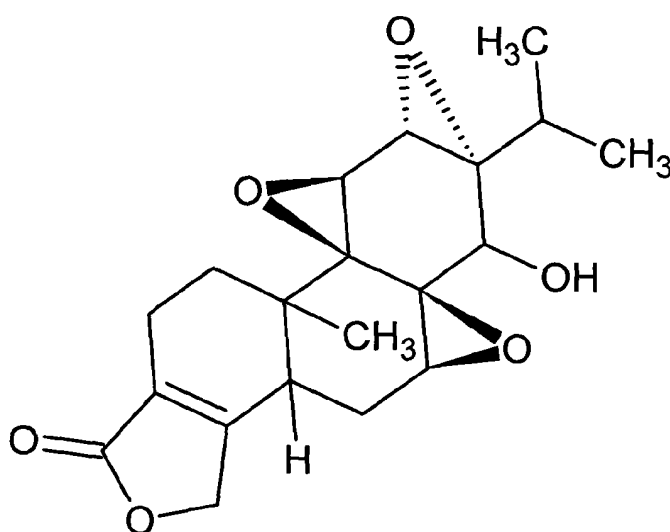
感染人类组织的天然 AAV 亚型主要为 1-6 共 6 种亚型（AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5 和 AAV6），其中，重组 2 型腺相关病毒（rAAV2）已在临床中应用，其它亚型的临床试验也在尝试中。本发明采用其中最具有代表性的 rAAV2 这一血清型进行了试验，证明了雷公藤单体化合物对 rAAV2 在神经元细胞或神经样细胞中的转导效率有确切的增强作用以及有效提高 rAAV2 所介导的外源基因在神经元细胞或神经样细胞中的表达效率。但是根据现有的文献报道，目前已知的促进 AAV 转导的小分子药物或生物活性物质，

可以通过促进 AAV 在细胞内的转运和加工过程以及进入细胞核的能力，调节后续的病毒脱壳和 DNA 双链转化等激活步骤，从而增加对细胞的转导和外源基因的表达效率。因此，促进 AAV 转导的小分子药物或生物活性物质对不同血清型的 AAV 大多具有类似效果，即：促进某一血清型的 AAV 转导的增强剂，可以同时增加其它血清型的 AAV 转导（Yan, et al. Distinct classes of proteasome-modulating agents cooperatively augment recombinant adeno-associated virus type 2 and type 5-mediated transduction from the apical surfaces of human airway epithelia. Journal of virology, Mar.2004,p.2863-2874）。根据现有技术，本领域技术人员可以合理预测：除了对 rAAV2 在神经元细胞或神经样细胞中有增强其转导效率的作用外，雷公藤单体化合物应该对 AAV 其余的五种亚型均具有增强其在神经元细胞或神经样细胞中转导效率以及提高其所介导的外源基因在神经元细胞或神经样细胞中的表达效率的相同效果。

所述的雷公藤单体化合物包括雷公藤内酯醇 T<sub>10</sub>、雷公藤内酯二醇、雷公藤内酯三醇、雷醇内酯、雷公藤氯内酯醇或雷公藤红素，优选为雷公藤内酯醇 T<sub>10</sub>。雷公藤内酯醇 T<sub>10</sub> 可通过各种商业途径购买得到，也可按照文献所公开的方法制备得到（罗兴旺、夏志林.从雷公藤茎叶中提取雷公藤内酯醇工艺研究.传染病药学，第 13 卷第 3 期，2003 年 9 月）。

T<sub>10</sub> 作为雷公藤中的主要药理活性单体，是近年来研究较广泛的传统新药，其化学结构如下：





雷公藤内酯醇 T<sub>10</sub> 的化学结构式

本发明人通过前期实验发现：在体外实验中，T<sub>10</sub>可以抑制细菌脂多糖（lipopolysaccharide, LPS）损伤的帕金森病细胞模型中小胶质细胞的活化，减少促炎因子的产生，并能增加营养因子的产生，对多巴胺能神经元产生保护作用；在体内实验中，T<sub>10</sub>可以改善LPS诱导的PD模型大鼠的异常旋转行为。上述实验结果说明T<sub>10</sub>对脑内神经元具有保护作用，将其应用于中枢神经系统非常安全。

本发明以不同神经细胞系及原代神经元细胞为靶细胞，观察了不同浓度或不同作用时程的T<sub>10</sub>对AAV携带的报告基因-荧光素酶基因的表达效率的影响。实验结果发现，不同浓度的T<sub>10</sub>可以明显提高荧光素酶基因的表达，具有剂量依赖性，而对细胞活性没有影响；不同作用时程的T<sub>10</sub>都能增加病毒所携带外源基因的表达（在感染前将病毒液与培养基预混匀5-10分钟，感染后细胞中荧光素酶活性较高，说明进行预处理的病毒液更加稳定，活性更好；将T<sub>10</sub>与病毒液混合后，同时作用于靶细胞，在感染病毒的24小时始终伴有T<sub>10</sub>作用，其效果为最优）。

本发明以另一多巴胺能细胞系MN9D为靶细胞，观察了不同浓度的T<sub>10</sub>

对荧光素酶基因的表达效率的影响，实验结果发现：不同浓度的  $T_{10}$  均能增强外源基因的表达（最适浓度为 25-50 nM），经验证  $T_{10}$  同样可以增强原代培养的中脑多巴胺能神经元内荧光素酶基因的表达量。

本发明人前期实验中，将 rAAV2 立体定位注射入大鼠脑内一周后取脑组织，进行冰冻切片、免疫荧光染色后发现，85%以上的阳性荧光信号为神经元细胞，只有极少量胶质细胞内有荧光信号。所以由于在不同的细胞系及原代神经元中均有同样效果，而且 85%以上都转导的神经元细胞，所以雷公藤内酯醇  $T_{10}$  增强神经元内 rAAV2 转导效率的作用具有普遍性。

本发明人将  $T_{10}$  通过腹腔注射作用于 PD 模型大鼠，结果发现 PD 模型大鼠的异常旋转行为得到明显改善，证明雷公藤内酯醇  $T_{10}$  可以从外周顺利通过血脑屏障进入脑内发挥神经营养及保护作用，说明在实际应用中，将雷公藤内酯醇  $T_{10}$  通过外周给药或是口服药物而达到增效的目的是切实可行的，这样可大大简化给药途径。

本发明所进行的动物实验中，经立体定位注射进入大鼠脑内的病毒，第 8 周后仍可检测到报告基因丰富表达，所以  $T_{10}$  可以作为 rAAV2 的长效的转导效率增强剂。

另外，由于加入  $T_{10}$  而增加了 rAAV2 的转导效率，这样在临床应用中可以相应减少治疗时病毒的实际用量而达到同等的表达效率，这样就可以大大减少潜在的免疫反应风险，提升了临床应用的安全性，而且可为患者节省购买病毒载体的昂贵费用，大大降低了患者的治疗成本。

#### 附图说明

图 1 不同浓度的  $T_{10}$  对于 rAAV2 在 SH-SY5Y 细胞中转导效率影响的实

验结果；横轴代表不同浓度  $T_{10}$  处理组，纵轴代表测定的荧光素酶活性， $n=3$ ， $MOI$ （multiplicity of infection，感染复数）= $10^5$  v.g/细胞。

图 2 不同作用时程的  $T_{10}$  对于 rAAV2 在 SH-SY5Y 细胞中转导效率影响的实验结果；横轴代表  $T_{10}$  作用的不同时程，纵轴代表荧光素酶活性， $T_{10}=100\text{nM}$ ， $n=3$ ， $MOI=10^5$  v.g/细胞。

图 3 不同浓度的  $T_{10}$  对于 rAAV2 在 MN9D 细胞中转导效率影响的实验结果；横轴代表不同浓度  $T_{10}$  处理组，纵轴代表测定的荧光素酶活性， $n=3$ ， $MOI=10^5$  v.g/细胞。

图 4  $T_{10}$  对活化的小胶质细胞合成和释放促炎因子  $TNF-\alpha$  影响的实验结果。

图 5  $T_{10}$  对活化的小胶质细胞合成和释放促炎因子  $IL-1\beta$  影响的实验结果。

## 具体实施方式

下面结合具体实施例来进一步描述本发明，本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但这些实施例仅是范例性的，并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是，在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换，但这些修改和替换均含在本发明的保护范围内。

## 实验材料

### （一）雷公藤内酯醇

雷公藤内酯醇（Triptolide 10，代号为  $T_{10}$ ）用质谱法进行结构鉴定，高

压液相色谱进行纯度测定，纯度>98%，为白色针状结晶，分子量 360 D。

T<sub>10</sub> 可通过商业途径购买得到，也可参考以下方法制备得到：

雷公藤茎叶 10 Kg 磨制成粗粉，经 95%乙醇回流提取，取乙醇提取液减压浓缩后得到浸膏 1.5 Kg。浸膏用 5 Kg 中性氧化铝吸附，挥干乙醇，样品继续用三氯甲烷提取，提取液减压浓缩去除三氯甲烷得浸膏 500 g。取雷公藤浸膏 450 g 加氯仿 300 ml 溶解备用。称取柱层析硅胶 2 Kg 加氯仿浸泡过夜，湿法装柱，再将上述浸膏加于柱顶，用氯仿洗脱收集流分，每 1000 ml 为一流分，蒸馏回收氯仿。残留物用薄层检查，合并含雷公藤内酯醇流分，用少量硅胶吸附，浸泡于乙酸乙酯-石油醚（1:1.5）中备用。另称取柱层析硅胶 1.3 Kg，加乙酸乙酯-石油醚（1:1.5）浸泡过夜，湿法装柱，再将上述浸膏样品按常规方法操作，用乙酸乙酯-石油醚（1:1.5）洗脱收集流分，每 500 ml 为一份，蒸馏回收溶剂，将残留物进行薄层色谱(Thin Layer Chromatography, TLC)检验后，合并含雷公藤内酯醇单一斑点的馏分，样品再用二氯甲烷-石油醚重结晶，得雷公藤内酯醇 500 mg。从雷公藤茎叶可分离到雷公藤内酯醇，得率约 0.0005%。

## （二）携带荧光素酶报告基因的 2 型重组腺相关病毒

携带荧光素酶报告基因的 2 型重组腺相关病毒（luciferase expressing recombinant adeno-associated virus of serotype 2, rAAV2-luc）可按照有关文献所公开的方法进行构建（彭建强等.2 型重组腺相关病毒体外转导培养细胞的研究.病毒学报，第 20 卷第 2 期，2004 年 6 月），病毒滴度为  $1 \times 10^{12}$  v.g/mL，经银染方法鉴定纯度> 99.5%。病毒在培养细胞内通过表达报告基因，产生荧光素酶蛋白，可以与荧光素酶检测体系中的底物相互作用产生荧光。根据检测到的荧光值，直接反映细胞产生荧光素酶活性强弱。

### （三）细胞

利用 SH-SY5Y 细胞（购自美国 ATCC 公司）进行离体实验。SH-SY5Y 细胞是人神经母细胞瘤细胞，显示中等水平的多巴胺- $\beta$ -羟基酶活性，因此多被用来研究帕金森病的体外实验用材；培养基为加入 10% FBS (fetal betal serum, 胎牛血清) 的 DMEM（购自 GIBCO 公司）。

MN9D 细胞（可以通过与芝加哥大学 Alfred Heller 博士进行实验材料交换协议（material transfer agreement, MTA）得到）是 14 天胎龄的 C57BL/6J 小鼠胚胎中脑神经元与 N18TG2 细胞系融合产生的杂交瘤细胞系，可分泌多巴胺。培养基为加入 10% NCS (Newborn calf serum, 新生牛血清) 的 DMEM/12（购自 GIBCO 公司）

### （四）实验试剂

#### $10^{-4}$ M $T_{10}$ 储存液

准确称取  $T_{10}$  0.0018 g，加入 500  $\mu$ l DMSO，轻柔振荡至  $T_{10}$  完全溶解。加 0.01 M PBS（phosphate buffered saline，磷酸盐缓冲盐水）至 50 ml 得  $10^{-4}$ M  $T_{10}$  溶液，0.22  $\mu$ m 微孔滤膜过滤除菌，分装保存于 -20℃，用前稀释至相应浓度。

LPS (lipopolysaccharide, 脂多糖)

LPS 购自 SIGMA 公司。

#### ELISA 试剂

大鼠 TNF- $\alpha$  及 IL-1  $\beta$  ELISA 检测试剂盒购自 ENDOGEN 公司。

#### 水合氯醛：

350 mg/ 2 ml/ kg 体重，17.5 g 水合氯醛用生理盐水水溶解并定容至 100 ml。4℃ 保存。

### 青霉素钠溶液

青霉素钠  $8 \times 10^5$  U，溶于 5 ml 生理盐水中。

### 安非它明溶液

25 mg 安非它明溶于 10 ml 生理盐水，检测大鼠旋转行为前临时配制。

### (五) 动物

健康 Wistar 雄性大鼠，体重 250~300 g，由中国医学科学院动物繁殖中心提供。

## 实验例 1 不同浓度的 $T_{10}$ 对于 rAAV2 在 SH-SY5Y 细胞中转导效率影响的实验

为探索  $T_{10}$  对 rAAV2 在神经细胞系中转导效率的影响，采用不同浓度  $T_{10}$  与病毒液共同加入 SH-SY5Y 细胞进行孵育，24 小时后检测病毒所携带的报告基因-荧光素酶的活性。因为 MOI 相同及作用时间、条件均相同，所以如果细胞液中检测到的荧光素酶活性高，则证明此浓度的  $T_{10}$  对 rAAV2 的转导效率有增强效应。

### 一、实验方法

选用多巴胺能细胞系 SH-SY5Y 细胞作为代表，以  $1 \times 10^4$  /孔的密度将细胞接种于 96 孔板。以不同的  $T_{10}$  处理浓度将细胞分成 5 组：0 nM、12.5 nM、25 nM、50 nM 和 100 nM 组，每组含 3 个复孔。细胞接种后 24 小时内，感染 rAAV2-luc，MOI 为  $10^5$  v.g/cell。感染前将病毒液加入 DMEM 培养基中混匀，平均分为 5 份，按照不同终浓度加入  $T_{10}$  混匀作为感染液。弃去 SH-SY5Y 细胞中的培养基，加入感染液，每孔 100  $\mu$ l，放入 5%  $CO_2$  孵箱中孵育。作用 24 小时后吸去培养孔中剩余感染液，用 0.05 M PBS 清洗一次，每孔加入荧光素

酶细胞裂解缓冲液 20  $\mu$ l, 作用 3-5 分钟, 每孔吸出 10  $\mu$ l 裂解液加至荧光素酶检测板中, 再加入 20  $\mu$ l 检测底物, 置入荧光素酶检测仪中检测荧光素酶表达量。

## 二、实验结果

从实验结果可看出, 用 50 nM 及 100 nM  $T_{10}$  处理组的细胞表达的荧光素酶活性较高, 与未加  $T_{10}$  处理组有显著性差异 (\*\* $p < 0.01$ )。在以 SH-SY5Y 细胞为代表的多巴胺能细胞系中,  $T_{10}$  可以明显提高腺相关病毒携带的报告基因-荧光素酶基因的表达, 具有剂量依赖性, 而对细胞活性没有影响, 最适作用浓度为 50-100 nM (图 1)。

### 实验例 2 不同作用时程的 $T_{10}$ 对于 rAAV2 在 SH-SY5Y 细胞中转导效率影响的实验

为优化  $T_{10}$  作用时间, 本实验分别采取预处理、全程处理及感染后短时程作用的时间点加入  $T_{10}$  作用, 检测出的荧光素酶活性与未加  $T_{10}$  处理组相比较, 以及不同处理时间组之间比较, 看哪一组对荧光素酶活性增强效果更好。实验结果证实: 加入  $T_{10}$  具有增强转导效率的作用, 而且不同作用时程效果也有差别, 其中 24 小时全程作用组效果最好。

#### 一、实验方法

选用多巴胺能细胞系 SH-SY5Y 细胞作为代表, 以  $1 \times 10^4$ /孔的密度将细胞接种于 96 孔板。以不同时间点  $T_{10}$  处理将细胞分成 4 组: (1) 零小时组: 不加  $T_{10}$  处理, 只有单纯病毒液感染 24 小时; (2) - 6 小时组: 感染病毒前加入 100 nM  $T_{10}$  预孵育 6 小时, 撤掉  $T_{10}$  后感染病毒液作用 24 小时; (3) + 6 小时组: 感染病毒同时加入 100 nM  $T_{10}$ , 6 小时后吸去混合液, 重新加入单纯病

毒液继续作用 18 小时；(4) + 24 小时组：感染同时加入 100 nM  $T_{10}$  作用 24 小时。每组含 3 个复孔，均保证有病毒作用 24 小时。细胞接种后 24 小时内，感染 rAAV2-luc，MOI 为  $10^5$  v.g/细胞。感染前将病毒液加入 DMEM 培养基中混匀，取出一部分配制终浓度为 100 nM  $T_{10}$  的感染液。在相应时间点，弃去 SH-SY5Y 细胞中的培养基，加入感染液，每孔 100  $\mu$ l，放入 5%CO<sub>2</sub> 孵箱中孵育。病毒作用 24 小时后吸去培养孔中剩余感染液，用 0.05 M PBS 清洗一次，每孔加入荧光素酶细胞裂解缓冲液 20  $\mu$ l，作用 3-5 分钟，每孔吸出 10  $\mu$ l 裂解液加至荧光素酶检测板中，再加入 20  $\mu$ l 检测底物，置入荧光素酶检测仪中检测荧光素酶表达量。

## 二、实验结果

即使给药时间不同， $T_{10}$  都能增加病毒所携带报告基因的表达量，最佳效果是与病毒液混合后，全程作用于细胞；三个处理组的荧光素酶活性均明显高于未加  $T_{10}$  处理组，具有统计学差异 (\* $p$ <0.05,\*\* $p$ <0.01) (图 2)。

### 实验例 3 不同浓度的 $T_{10}$ 对于 rAAV2 在 MN9D 细胞中转导效率影响的实验

为证实  $T_{10}$  增加 rAAV2 转导效率的是否具有广泛性，本实验以 MN9D 细胞系为靶细胞（多巴胺能细胞）进行了验证实验。实验结果证实  $T_{10}$  对神经元细胞系荧光素酶活性都有增强作用，各自的有效浓度范围略有差异。 $T_{10}$  对神经细胞内的 rAAV2 转导增强具有普遍性。

#### 一、实验方法

选用多巴胺能细胞系 MN9D 细胞，将 MN9D 细胞以  $1 \times 10^4$ /孔的密度将细胞接种在 96 孔板。以不同的  $T_{10}$  处理浓度将细胞分成 7 组：0 nM、3.1 nM、6.2 nM、12.5 nM、25 nM、50 nM 和 100 nM 组，每组含 3 个复孔。细胞接种



后 24 小时内, 感染 rAAV2-luc, MOI 为  $10^5$  v.g/细胞。感染前将病毒液加入 DMEM 培养基中混匀, 平均分为 6 份, 按照不同终浓度加入  $T_{10}$  混匀作为感染液。弃去 MN9D 细胞中的培养基, 加入感染液, 每孔 100  $\mu$ l, 0 nM 组仅加入培养基 100  $\mu$ l, 放入 5%  $CO_2$  孵箱中孵育。作用 24 小时后吸去培养孔中剩余感染液, 用 0.05 M PBS 清洗一次, 每孔加入荧光素酶细胞裂解缓冲液 20  $\mu$ l, 作用 3-5 分钟, 每孔吸出 10  $\mu$ l 细胞液加至荧光素酶检测板中, 再加入 20  $\mu$ l 检测底物, 置入荧光素酶检测仪中检测荧光素酶表达量。

## 二、实验结果

$T_{10}$  对多巴胺能细胞系 MN9D 中的报告基因表达同样有增强效应, 其最适的作用浓度为 25-50 nM, 25-50 nM 处理组的细胞表达的荧光素酶活性较高, 与未加  $T_{10}$  处理组有显著性差异 (\*\* $p < 0.01$ ) (图 3)。

### 实验例 4 $T_{10}$ 对活化的小胶质细胞合成和释放促炎因子 TNF- $\alpha$ 的影响

#### 一、实验方法

用不同浓度 (0.1 nM、1nM、10 nM、100 nM) 的  $T_{10}$  预处理小胶质细胞 30 分钟, 然后加入 0.25  $\mu$ g/ml LPS 共孵育 24 小时, 收集细胞培养上清液, ELISA 法检测促炎因子 TNF- $\alpha$  的浓度。

ELISA 基本原理: 用特异性单抗包被的酶标板吸附待测抗原, 再顺次将生物素标记的单抗、结合辣根过氧化物酶的链霉亲和素连接于待测抗原, 加底物 TMB(3,3',5,5-Tetramethylbenzidine, 3, 3', 5, 5-四甲基联苯胺)显色, 波长 450 nm 处测吸光度。

ELISA 法操作步骤如下:

(1) 取出待测样品使其融化, 同时提前 20 分钟从冰箱中取出试剂盒,

平衡至室温；

(2) 除空白孔外，分别将标本和不同浓度标准品加入相应孔中，50  $\mu\text{l}$ /孔，用封板胶纸封住反应孔，室温 1~2 小时；

(3) 用微孔板清洗器洗板 3~5 次后，加入生物素化的抗体，50~100  $\mu\text{l}$ /孔，封住反应孔，室温孵育 1 小时；

(4) 再次洗板 3~5 次后，加入标记辣根过氧化物酶的链酶卵白素，100  $\mu\text{l}$ /孔，封住反应孔，室温孵育 30 分钟；

(5) 最后洗板 3~5 次后，加入底物 100  $\mu\text{l}$ ，避光反应 30 分钟。加入终止液（100  $\mu\text{l}$ /孔），混匀后即刻用酶标仪测量吸光度（5 分钟内），设置测量波长为 450 nm；

## 二、实验结果

从实验结果可以看出，0.1-100nM 的  $T_{10}$  均可抑制 0.25  $\mu\text{g/ml}$  LPS 诱导的 TNF- $\alpha$  释放，与对照组相比有统计学差异 (\*\* $p<0.01$ )。其中 100 nM 的  $T_{10}$  几乎可以完全拮抗 LPS 诱导的 TNF- $\alpha$  释放。实验结果说明  $T_{10}$  可以抑制细菌脂多糖 (LPS) 损伤的帕金森病细胞模型中小胶质细胞的活化，减少促炎因子的产生，并能增加营养因子的产生，对多巴胺能神经元产生保护作用 (图 4)。

### 实验例 5 $T_{10}$ 对活化的小胶质细胞合成和释放促炎因子 IL-1 $\beta$ 的影响实验

#### 一、实验方法

用不同浓度 (0.1 nM、1nM、10 nM、100 nM) 的  $T_{10}$  预处理小胶质细胞 30 分钟，然后加入 0.25  $\mu\text{g/ml}$  LPS 共孵育 24 小时，收集细胞培养上清液，ELISA 法检测促炎因子 IL-1 $\beta$  的浓度。ELISA 操作步骤同实验例 4。

#### 二、实验结果

从实验结果可以看出, 10 和 100 nM 的  $T_{10}$  可明显拮抗 0.25  $\mu\text{g/ml}$  LPS 诱导的 IL-1  $\beta$  释放, 分别使 IL-1  $\beta$  的释放量减少 35.5% 和 33.1%, 和对照组比较差异有显著性 (\* $p < 0.05$ )。实验结果说明  $T_{10}$  可以抑制细菌脂多糖 (LPS) 损伤的帕金森病细胞模型中小胶质细胞的活化, 减少促炎因子的产生, 并能增加营养因子的产生, 对多巴胺能神经元产生保护作用 (图 5)。

## 实验例 6 $T_{10}$ 对 PD 模型大鼠异常旋转行为的影响实验

### 一、实验方法

#### LPS 诱导的 PD 大鼠模型建立方法

采用立体定位注射方法向 Wistar 雄性大鼠右侧黑质内注射 10  $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}$  LPS, 建立免疫异常帕金森病大鼠模型, 同时设立黑质内注射 2  $\mu\text{l}$  PBS 的对照组 (参考文献 Lipopolysaccharide intranigral injection induces inflammatory reaction and damage in nigrostriatal dopaminergic system. A Castano, AJ Herrera, J Cano, and A Machado. J Neurochem, 1998; 70(4): 1584-92.)。用 17.5% 水合氯醛 (350 mg/Kg, i.p.) 麻醉动物。插入耳杆, 使头部居中并固定不动, 腹卧位固定于大鼠脑立体定位仪上。手术步骤如下:

- (1) 用单面刀片剃去头部鼠毛, 碘伏消毒头部皮肤;
- (2) 依次切开皮肤、皮下组织及骨膜, 钝性分离骨膜以暴露颅骨;
- (3) 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  烧灼颅骨表面止血, 清晰暴露前、后囟。调整门齿杆, 使前、后囟在同一水平面;
- (4) 根据大鼠脑图谱 (M Del Fiacco, G Paxinos, and AC Cuello. Neostriatal enkephalin-immunoreactive neurones project to the globus pallidus. Brain Res, Jan 1982; 231(1): 1-17.), 选取黑质立体定位坐标为: 前囟

后 5.3 mm，矢状线右侧旁开 2 mm，颅骨下深 7.8 mm。用牙科钻在相应部位钻透颅骨，牙科探针穿透硬脑膜；

(5) 缓慢进针到达所需深度，用微量注射泵向黑质内注射 LPS 或 PBS，注射速度为  $1 \mu\text{l}/\text{min}$ ，注射量为  $2 \mu\text{l}$ ，注射完毕后留针 5 分钟，以防药物沿针道溢出，缓慢出针；

(6) 颅骨表面局部洒少量青霉素粉剂，缝合皮肤；将动物放回鼠笼，置温暖安静处，直至清醒。腹腔注射青霉素 ( $3.2 \times 10^5 \text{ U}/\text{Kg}$  体重)，每日 1 次，连续 3 天。

实验设立 PBS 组、LPS 组和药物处理组。药物处理组动物于建立模型手术前第三天，第二天和手术当天经腹腔注射不同剂量的  $T_{10}$  ( $1 \mu\text{g}/\text{Kg}$  和  $5 \mu\text{g}/\text{Kg}$ )，手术后每天注射 1 次，共 24 天。术后 21 天，按 Ungerstedt 的方法 (Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. U Ungerstedt and GW Arbuthnott. Brain Res, 1970; 24: 485-93.) 检测大鼠偏侧旋转行为。先将大鼠置于旋转行为测试仪中适应约 5 min，待大鼠安静后腹腔注射安非它明 ( $5 \text{ mg}/\text{kg}$ )，诱发大鼠旋转。设定测转时间为 45 min，给药后 2~5 min 内由旋转行为测试仪开始统一记录。旋转行为的表示方法：以向右侧（在本实验中为注射侧）旋转与向左侧（在本实验中为健侧）旋转总转数的差值在 45 min 内的平均数 (cycles/min) 为净旋转次数。

## 二、实验结果

实验结果见表 1。

表 1  $T_{10}$  对 PD 模型大鼠异常旋转行为的影响实验结果

组别	n	旋转 (循环/分钟)	
PBS	7	0.66 ± 1.76*	
LPS	11	4.56 ± 3.04	
T <sub>10</sub> 1.0 μg/Kg	9	2.71 ± 2.37	5
T <sub>10</sub> 5.0 μg/Kg	11	1.38 ± 0.77*	

从实验结果可以看出,5 μ g/Kg T<sub>10</sub>腹腔注射 24 天可明显改善模型鼠的偏侧旋转行为, 与 LPS 组相比, 其平均旋转速度降低 41%, 差异有统计学意义 (\*p<0.05), 1 μ g/Kg 组可使大鼠的偏侧旋转行为出现下降趋势, 但和 LPS 组相比较, 差异无统计学意义。结果显示, T<sub>10</sub>可以有效减缓免疫异常模型大鼠由安非他明诱发的异常旋转行为, 说明 T<sub>10</sub>对脑内神经元有保护作用, 可以将其安全的应用于中枢神经系统。

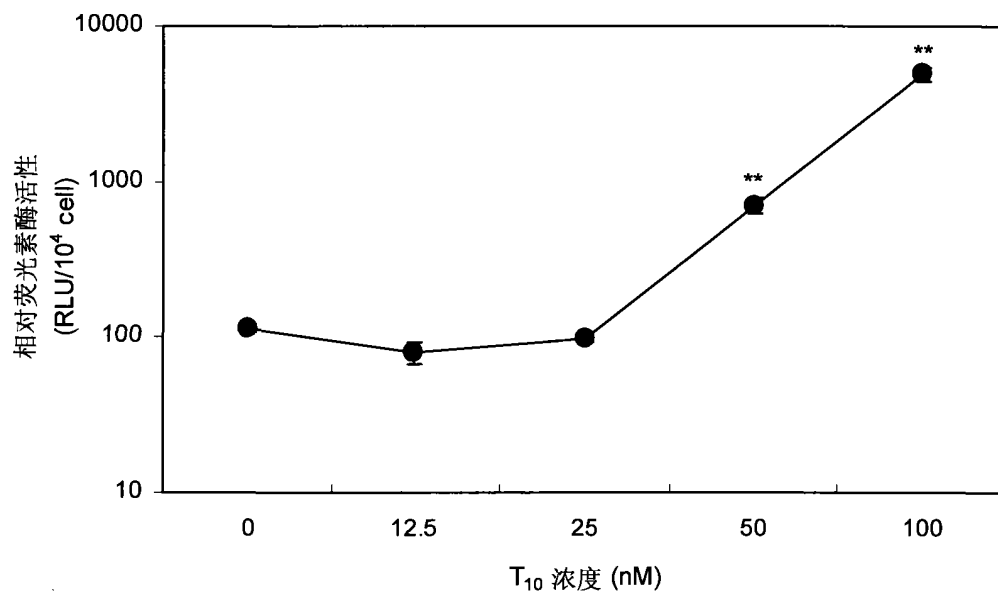


图1

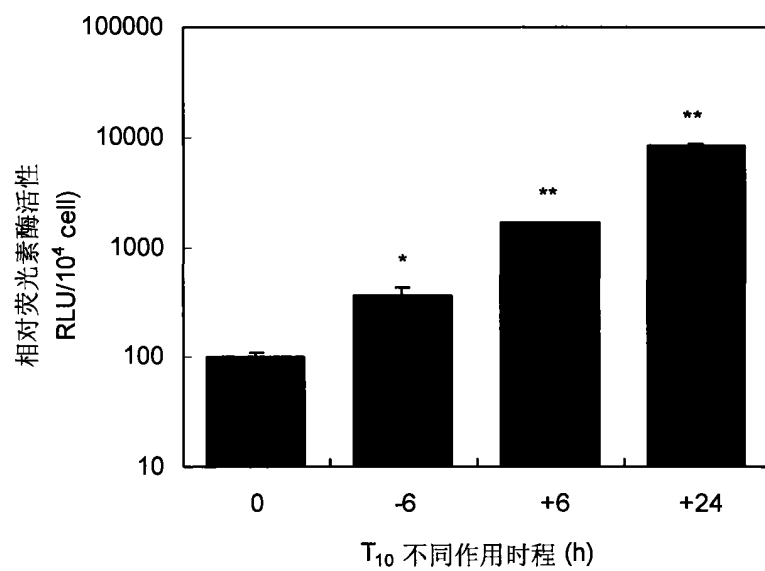


图2

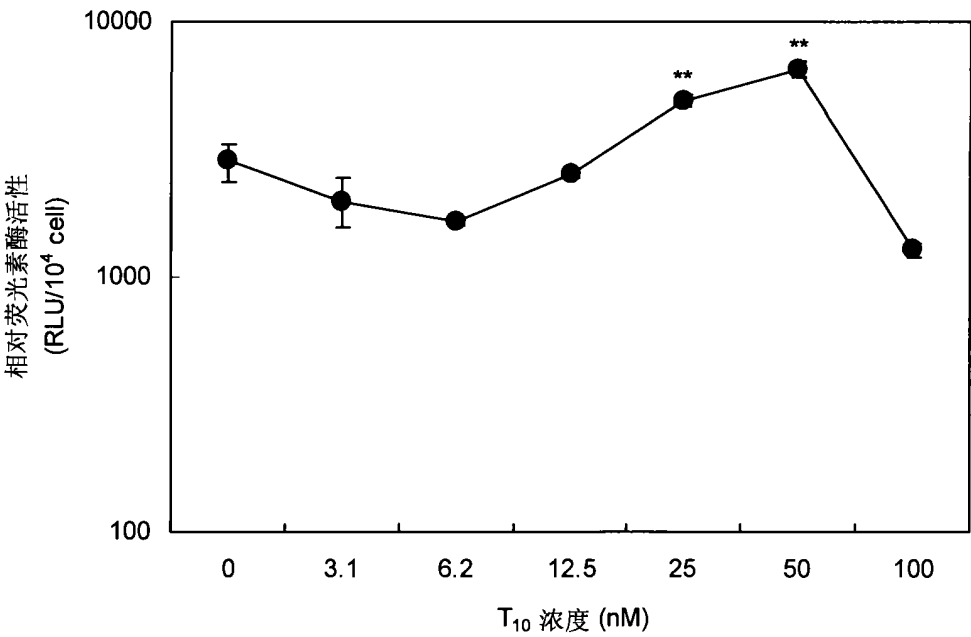


图3

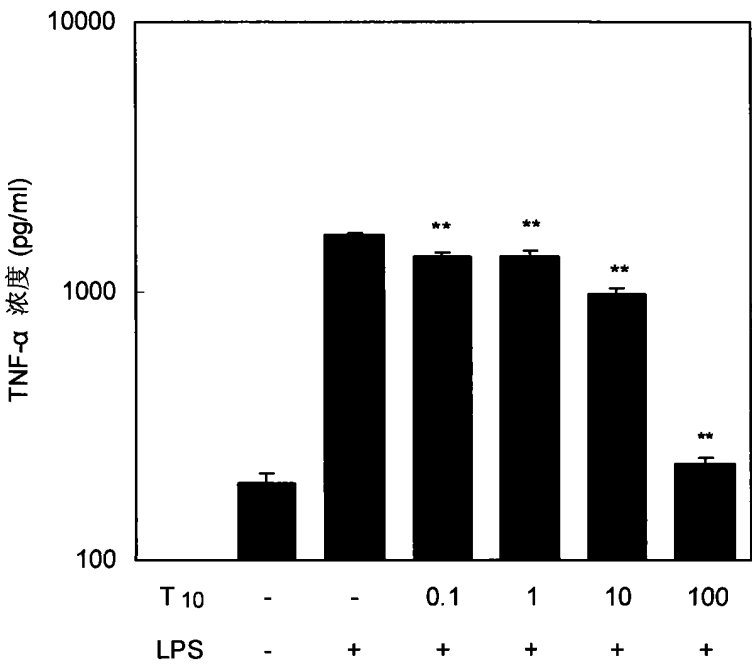


图4

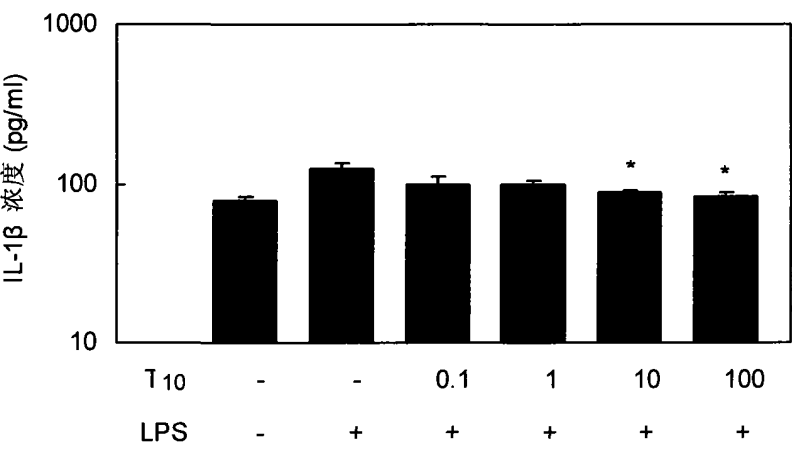


图5