

# 腺相关病毒介导FMRP在成年*Fmr1* KO小鼠脑组织中获得性表达

龚仕涛<sup>1</sup>, 李锦超<sup>1</sup>, 邹媛媛<sup>1</sup>, 李欣<sup>1</sup>, 侯雪飞<sup>1</sup>, 李凡<sup>2</sup>, 张明<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>昆明医科大学生物医学工程研究中心, 云南省干细胞和再生医学重点实验室, 云南 昆明

<sup>2</sup>昆明医科大学基础医学科学院病理和病理生理学系, 云南 昆明

Email: zhangming99@gmail.com

收稿日期: 2020年9月1日; 录用日期: 2020年9月16日; 发布日期: 2020年9月23日

## 摘要

脆性X综合征(Fragile X syndrome, FXS)是一种智力缺陷和自闭症谱系的单基因遗传疾病。位于Xq27.3染色体的*Fmr1*基因沉默, 造成该基因编码的mRNA翻译抑制因子FMRP表达缺失, 从而导致FXS患者神经系统发育障碍。本研究采用质粒转染293T细胞获取AAV9-FMRP腺相关病毒载体, 通过立体定位方法将AAV9-FMRP注射到成年*Fmr1* KO小鼠侧脑室。免疫组化检测发现AAV9介导的FMRP可以在*Fmr1* KO小鼠海马和顶叶皮层等脑组织中获得性表达; 免疫荧光检测发现FMRP定位于小鼠海马神经元胞质。研究表明, 通过腺相关病毒可以介导FMRP在成年*Fmr1* KO小鼠脑组织中获得性表达。

## 关键词

脆性X综合征, 脆性X智力低下蛋白, 腺相关病毒

# Adeno-Associated Virus-Mediated FMRP Expression in Brain Tissues of Adult *Fmr1* KO Mice

Shitao Gong<sup>1</sup>, Jinchao Li<sup>1</sup>, Yuanyuan Zou<sup>1</sup>, Xin Li<sup>1</sup>, Xuefei Hou<sup>1</sup>, Fan Li<sup>2</sup>, Ming Zhang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Yunnan Key Laboratory of Stem Cell and Regenerative Medicine, Biomedical Engineering Research Center, Kunming Medical University, Kunming Yunnan

<sup>2</sup>Department of Pathology and Pathophysiology, School of Basic Medical Sciences, Kunming Medical University, Kunming Yunnan

Email: zhangming99@gmail.com

Received: Sep. 1<sup>st</sup>, 2020; accepted: Sep. 16<sup>th</sup>, 2020; published: Sep. 23<sup>rd</sup>, 2020

\*通讯作者。

文章引用: 龚仕涛, 李锦超, 邹媛媛, 李欣, 侯雪飞, 李凡, 张明. 腺相关病毒介导 FMRP 在成年 *Fmr1* KO 小鼠脑组织中获得性表达[J]. 生物医学, 2020, 10(4): 95-101. DOI: 10.12677/hjbm.2020.104013

## Abstract

**Fragile X syndrome (FXS) is a genetic disease with mental retardation and autism spectrum, caused by the silence of *Fmr1* gene on chromosome xq27.3 and the expressing loss of FMRP, which largely functions as an mRNA translational repressor. Silencing of *Fmr1* gene leads to developmental disorders of the nervous system in FXS patients. In this study, adeno-associated virus 9-mediated FMRP vector (AAV9-FMRP) was obtained by transfecting 293T cells with plasmids. AAV9-FMRP was injected into the lateral ventricle of adult *Fmr1* KO mice stereotactically. Immunohistochemistry assay showed that AAV9-FMRP was able to be expressed in hippocampus and parietal cortex in *Fmr1* KO mice, and immunofluorescence assay showed that FMRP expression localized in the cytoplasm of hippocampal neurons. The results indicate that it is feasible to acquire FMRP expression mediated by adeno-associated virus in brain tissues of adult *Fmr1* KO mice.**

## Keywords

**Fragile X Syndrome, Fragile X Mental Retardation Protein, Adeno-Associated Virus**

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

脆性 X 综合征(Fragile X syndrome , FXS)是一种智力缺陷和自闭症谱系的单基因遗传病[1]。FXS 患者在智力发育方面存在缺陷, 语言交流能力较弱, 人际交流时回避直接对视, 存在社交障碍和广泛性焦虑。FXS 患者具有与正常人不同的体态特征, 伴有前额和下颌突出、耳朵外凸、腭弓较高、嘴大唇厚、关节松弛、脊柱侧凸等外在症状[2]。已有大量研究表明, FXS 是一种单基因遗传疾病, 位于 Xq27.3 染色体的 *Fmr1* (*Fragile X mental retardation 1*)基因在 5'端的 CGG 三核苷酸重复系列扩增超过 200 拷贝, 导致启动子区域的胞嘧啶发生甲基化修饰[3], 染色质组蛋白过度乙酰化[4], 致使 *Fmr1* 基因沉默。该基因编码的蛋白 FMRP (Fragile X mental retardation protein)是一种 mRNA 结合蛋白, 它所调控的 mRNA 靶分子具有广泛性和不确定性。FMRP 的功能主要是抑制 mRNA 翻译, 然而也有 FMRP 促进孤独症相关大分子蛋白 mRNA 翻译的报道[5]。此外, FMRP 通过 RNA 结合蛋白参与 pre-mRNA 的剪切[6]。

*Fmr1* 基因敲除(Knockout, KO)小鼠是 FXS 的动物模型, 具有学习记忆障碍、易发癫痫、多动等行为学症状。在 *Fmr1* 基因敲除后, 由于 FMRP 的缺失, 失去 FMRP 抑制作用的 mRNA 翻译水平升高, 造成神经元蛋白表达量过度增加, 突触的数量呈现非活动依赖性增加, 使神经网络信号传递出现异常[7] [8]。

腺相关病毒(AAV)是一种非包膜微小病毒, 病毒颗粒直径约 20~26 nm, 其所介导的基因独立于宿主基因组稳定表达。与其它类型的病毒载体相比, AAV 具有较低的免疫原性, 在宿主神经组织中可以长时间介导外来基因表达, 例如, AAV 介导的基因可以在帕金森疾病非人灵长类动物模型脑组织中持续表达 15 年[9], 在帕金森病人脑中持续表达 5 年[10]。因此, AAV 作为安全性较高的病毒载体应用于中枢神经系统疾病的基因治疗受到广泛关注。据前人报道, 基于 AAV 构建的 FMRP 表达载体可以有效修复 *Fmr1* KO 小鼠的海马脑区 LTD [11], 并改善幼年 *Fmr1* KO 小鼠成年后的重复刻板行为和社交支配行为[12]。本研究采用成年 *Fmr1* KO 小鼠, 观察 AAV9-FMRP 在成年 *Fmr1* KO 小鼠各脑区的分布表达情况, 为今后进一步应用基因疗法治疗成年后的 FXS 病患提供参考依据。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 实验动物

本研究采用的 *Fmr1* KO 小鼠由美国密歇根州立大学 Wang H.B. 教授惠赠。动物房的温度控制在 21℃~23℃、湿度保持在 50% 左右，每天光照时间 12 h。小鼠自由饮食饮水。同窝出生的野生型(Wildtype, WT)小鼠作为对照组，所有实验小鼠均为成年(≥3 月龄)雄性小鼠。

### 2.2. AAV9 质粒共转染 293T 细胞

使用去内毒素的质粒提取试剂盒进行质粒提取，将获得的质粒-20℃保存。配制 Ca-DNA 转染液：取质粒 DNA 共 75 μg，包括两个 AAV9 辅助质粒(p-Rac, p-Helper)和目的基因质粒(pAAV-SYN1-Fmr1)各 25 μg，加入 500 μL 0.25 M 的 CaCl<sub>2</sub> 溶液，用 ddH<sub>2</sub>O 补足 CaCl<sub>2</sub> 溶液体积至 2.5 mL，再加入 2.5 mL 2 × BES 溶液，充分混合均匀。将 293T 细胞培养皿中的旧培养基移除，更换为培养基 A(将含 10% FBS 的 DMEM 按体积 1000:1 加入 25 mM 的氯喹溶液)15 mL，孵育 15 min，向培养基中均匀滴加 Ca-DNA 转染液 5 mL。滴加转染液后，将培养皿置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 3~4 h。移除所有培养基，每个 15 cm 皿中沿壁缓慢加入 2~3 mL PBS 溶液洗涤一次。吸弃 PBS，加入培养基 B(按体积 100:1 在含 10% FBS 的 DMEM 中加入 500 mM 的丁酸钠溶液) 25 mL，培养 72 h 后收集细胞。收取细胞后反复冻融 3 次，配制不同浓度的碘克沙醇溶液，通过离心、沉淀、透析等步骤获得纯化的 AAV9-FMRP 病毒载体溶液，保存于-80℃。

### 2.3. 实时定量 PCR 测定基因组拷贝数

将 5 μL 待测 AAV9-FMRP 样品或对照质粒(pAAV-SYN1-Fmr1, 5 × 10<sup>7</sup> GC/μL)加入 15 μL DNase I 消化反应液中，37℃孵育 30 min，对 DNase I 失活处理后转入 95℃，孵育 10min，取出放在冰盒中。对 AAV9-FMRP 样品或对照质粒进行稀释。实时定量 PCR 反应体系 20 μL，包括 2 × SYBR Mix 10 μL、poy A forward primer 1 μL、poy A reverse primer 1 μL、待测样品 2 μL、无核酸酶水 6 μL，每个样品各 3 个重复。设置以下程序运行 PCR：预变性 95℃ 10 min；然后 95℃ 30 s，60℃ 20 s，72℃ 20 s，35 个循环；溶解曲线：95℃ 5 s，65℃ 1 min，40℃ 10 min。Q-PCR 运行结束后，利用换算系数和 AAV 基因组单链性质计算 AAV9-FMRP 载体基因组拷贝数： $GC \text{ 拷贝数/mL} = PCR \text{ 运行得到的平均拷贝数} \div 5 \mu\text{L} \times 2 \times \text{稀释倍数}(\text{DNase 稀释 4 倍} \times \text{后续稀释 10,000 倍}) \times 1000$ 。

### 2.4. 立体定位注射

使用 1% 戊巴比妥钠将小鼠深度麻醉(100 mg/kg)，固定于立体定位仪，使用体温加热垫保持麻醉小鼠肛温 37 ± 1℃。玻璃毛细管顶端定位于双侧侧脑室(前囟旁开 ±0.8 mm，前囟后 0.3 mm，颅骨表面向下深度 2.2 mm)。使用微量进样器，将 1 μL AAV9-FMRP 或 PBS 以 0.1 μL/min 的速率注入单侧侧脑室，注射完成后玻璃管静置 10min。按照基因型和注射溶液把小鼠分为 4 组，分别是 WT + PBS 组、WT + AAV9-FMRP 组、KO + PBS 组、以及 KO + AAV9-FMRP 组。手术后的各组小鼠返回笼中饲养 4 周。

### 2.5. 免疫组化检测

各组小鼠深度麻醉后进行心脏灌流取脑，30%蔗糖脱水，OTC 包埋，冰冻切片(15 μm)。PBST (0.3% Triton X-100)浸洗切片 10 min，5% BSA 室温封闭 1 h，FMRP (Cell Signaling Technology, USA)一抗 4℃孵育过夜。二抗 HRP (Millipore, USA)室温孵育 1 h，DAB 显色，显微镜观察、拍照。采用 ImageJ 软件，对脑组织切片进行 DAB 染色强度和阳性细胞数初步分析。

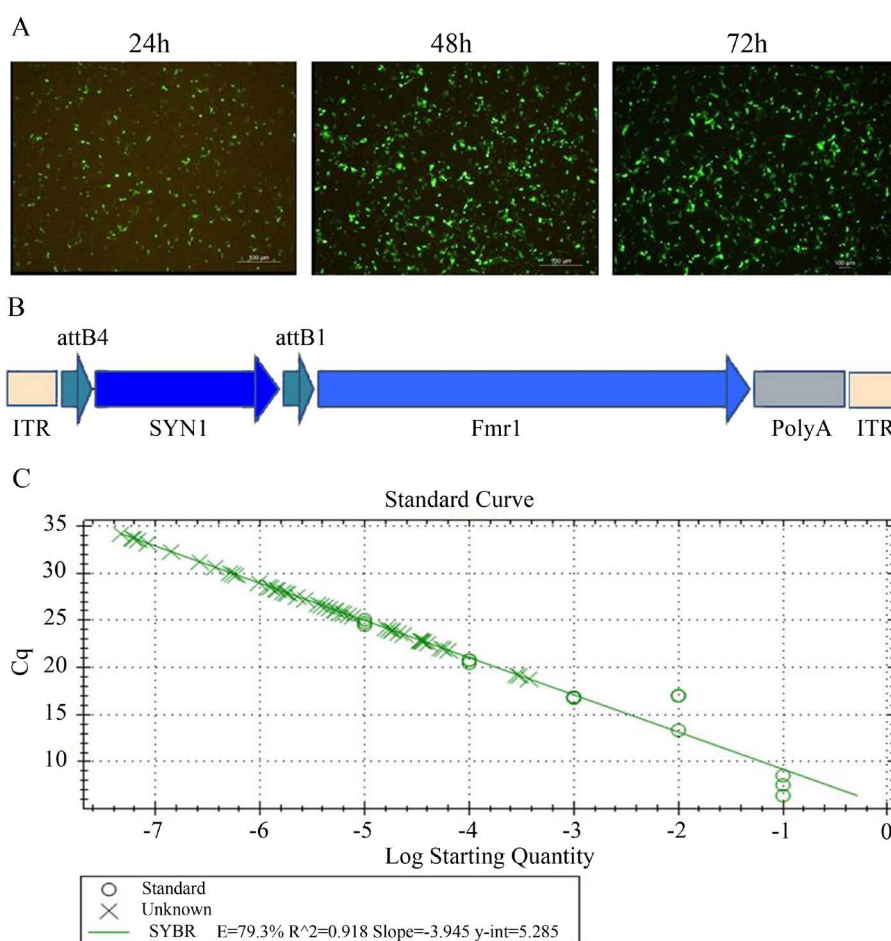
## 2.6. 免疫荧光检测

使用适量的 EDTA-柠檬酸钠抗原修复液,在微波炉中使用低火,对切片进行 20 min 的抗原修复。PBST (0.3% Triton X-100)浸洗切片 3 次,每次 10 min。5% BSA 室温孵育 1 h, FMRP、Neun 一抗 4℃孵育过夜, 1 × PBS 浸洗切片 3 次,每次 10 min。DAPI 室温孵育 10 min, 1 × PBS 浸洗切片 10 min。荧光二抗室温孵育 1 h, 对切片进行封片。荧光显微镜观察、拍照。

## 3. 结果

### 3.1. AAV9-FMRP 病毒载体制备

为了验证氯化钙转染细胞方法的可靠性,我们以 p-EGFP 质粒转染 293T 细胞,在不同的时间点(24 h、48 h 和 72 h)用荧光显微镜观察,发现在 p-EGFP 质粒转染 48 h 和 72 h 后, 293T 细胞已经能够稳定呈现较强的绿色荧光(图 1(A))。因此,我们采用氯化钙转染细胞方法,将两个辅助质粒(p-Rac, p-Helper)和目的基因质粒(pAAV-SYN1-Fmr1)共同转染 293T 细胞,得到包含目的基因的 AAV9-FMRP 病毒载体(图 1(B))。在转染 293T 细胞 72 h 后,裂解 293T 细胞获取病毒载体,进行病毒载体富集和纯化,经基因测序证明病毒载体构建成功。Q-PCR 测定结果显示 AAV9-FMRP 病毒载体拷贝数为  $1.5 \times 10^{11}$  GC/mL (图 1(C))。



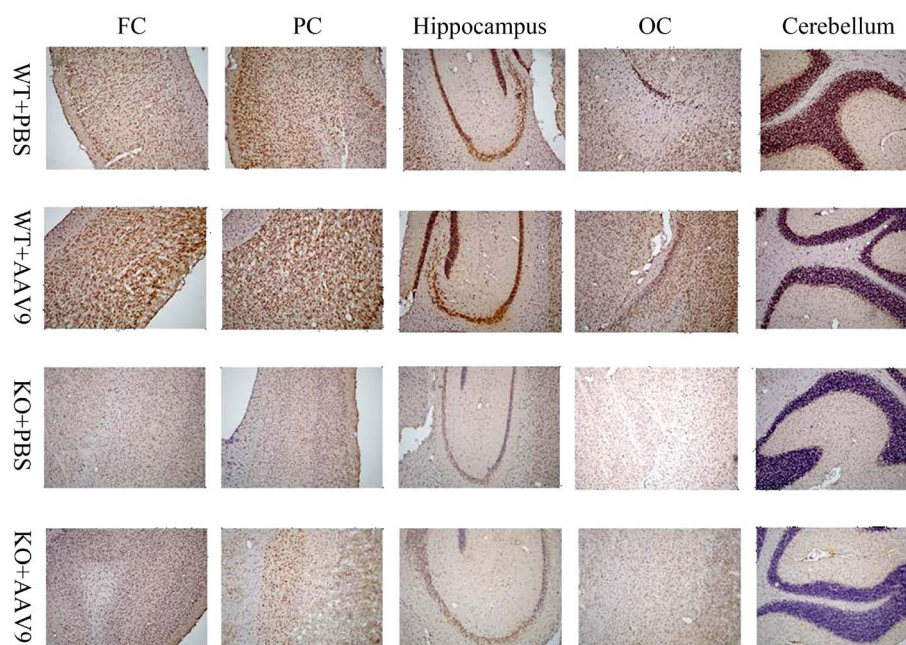
(A) p-EGFP 质粒转染 293T 细胞。(B) AAV9-FMRP 结构示意图。(C) Q-PCR 结果分析。

**Figure 1.** Acquired AAV9-FMRP viral vector through 293T cell transfection

**图 1.** 转染 293T 细胞获取 AAV9-FMRP 病毒载体

### 3.2. AAV9-FMRP 介导 FMRP 在各脑区的表达分布

免疫组化结果发现, FMRP 在野生型小鼠的额叶皮层、顶叶皮层、海马、枕叶皮层和小脑等脑区均有表达。在侧脑室注射 AAV9-FMRP 病毒载体后, 野生型小鼠除小脑外, 其它各脑区的 FMRP 表达水平有所增加。然而, *Fmr1* KO 小鼠所有脑区的 FMRP 表达缺失, 在注射病毒载体后, 其额叶皮层、顶叶皮层和海马脑区出现了表达 FMRP 的阳性细胞, 说明 AAV9-FMRP 病毒载体使 *Fmr1* KO 小鼠的这些脑区获得了 FMRP 的表达(图 2)。



FC: Frontal cortex; PC: Parietal cortex; OC: Occipital cortex. 100 $\times$ .

**Figure 2.** AAV9-FMRP vector-mediated FMRP expression in various brain regions

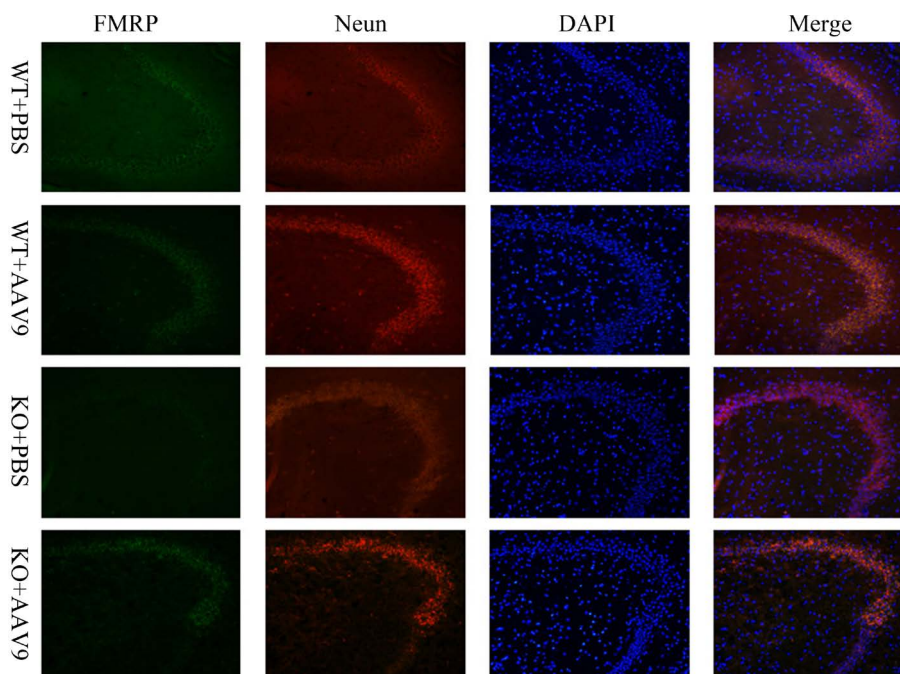
**图 2.** AAV9-FMRP 载体介导 FMRP 在各脑区的表达

### 3.3. AAV9-FMRP 介导的 FMRP 表达与海马神经元共定位

免疫荧光检测结果显示, FMRP 的表达定位于野生型小鼠海马 CA3 区神经元胞质。在侧脑室注射病毒载体后, *Fmr1* 基因缺失小鼠海马 CA3 区可检测到 FMRP 阳性神经元, 表明 AAV9 病毒载体介导的 FMRP 在海马神经元存在获得性表达(图 3)。

## 4. 讨论

有多种 AAVs 包括 AAV2、AAV5、AAV8、AAV9 等可用于中枢神经系统疾病的基因治疗, 其中 AAV9 可以在大脑和脊髓中广泛表达, 优先结合神经元和胶质细胞[13]。本研究采用氯化钙转染 293T 细胞的方法制备了 AAV9-FMRP 病毒载体, 该病毒载体包含神经元特异性启动子 SYN1, 有助于提升 FMRP 在神经元的特异表达。通过侧脑室注射 AAV9-FMRP, 可以使 *Fmr1* 基因缺失的成年小鼠大脑重新获得 FMRP 的表达, 其表达范围主要集中在额叶皮层、顶叶皮层和海马脑区。在 *Fmr1* KO 小鼠距离侧脑室较远的脑区, 如小脑和枕叶皮层, 未发现 AAV9 介导的 FMRP 表达或表达较少, 其原因可能是由于病毒载体注射位点与 FMRP 未表达脑区之间物理距离较远; 另外, 前人报道发现 AAV9-FMRP 在幼年 *Fmr1* KO 小鼠侧脑室注射 56 天后, FMRP 在海马神经元的表达水平达到野生型小鼠正常水平的 50% [12], 因此, 本研究



绿色荧光为 FMRP，红色荧光为 Neun，蓝色荧光为 DAPI。200×。

**Figure 3.** FMRP expression in hippocampal CA3 neurons of four groups of mice  
**图 3.** FMRP 在各组小鼠海马 CA3 神经元的表达情况

在 AAV9-FMRP 注射 4 周后采样检测，有可能病毒载体拷贝数量尚未达到峰值，从而影响 FMRP 在 *Fmr1*KO 小鼠各脑区的表达水平。

前人研究表明，从基因水平通过 AAV9 载体介导 FMRP 在 FXS 模型小鼠脑中获得性表达，可以改善该模型小鼠的重复刻板行为和异常的社交支配行为[12]，恢复正常的长时程突触抑制[11]，可以推测 FMRP 获得性表达之后，FXS 模型小鼠某些脑区神经元的结构和功能能够得到一定程度的修复。AAVs 病毒载体相较于慢病毒和腺病毒具有较低的免疫原性，可以介导不依赖于宿主基因组的目的基因进行长时间的稳定表达[14]，因此 AAVs 是介导目的基因在体内表达的较优选择。有研究发现，AAV8-GFP 在 CMV 启动子控制下，过量表达的 GFP 对黑质多巴胺能神经元存在一定程度的毒性作用[15]。然而，本研究采用的 AAV9-FMRP 是通过 *SYN1* 启动子调控，该启动子具有神经元特异性[16]，目前我们尚未见 *SYN1* 调控的 AAV9 载体具有神经毒性的报道。基于 AAV9 开展针对 FXS 以及其它中枢神经系统疾病(如帕金森病)的基因治疗手段，安全性较好，对于治疗神经系统疾病具有潜在的应用前景[17]。

### 基金项目

本研究受到国家自然科学基金项目(31660273)和云南省教育厅基金研究生项目(2018Y045)资助。

### 参考文献

- [1] Kidd, S.A., Lachiewicz, A., Barbooth, D., Blitz, R.K., Delahunty, C., McBrien, D., Visootsak, J. and Berry-Kravis, E. (2014) Fragile X Syndrome: A Review of Associated Medical Problems. *Pediatrics*, **134**, 995-1005. <https://doi.org/10.1542/peds.2013-4301>
- [2] Heulens, I., et al. (2013) Craniofacial Characteristics of Fragile X syndrome in Mouse and Man. *European Journal of Human Genetics*, **21**, 816-823. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2012.265>
- [3] Sutcliffe, J.S., Nelson, D.L., Zhang, F.P., Pieretti, M., Thomas Caskey, C., Saxe, D. and Warren, S.T. (1992) DNA Methylation Represses *FMR-1* Transcription in Fragile X Syndrome. *Human Molecular Genetics*, **1**, 397-400.

- <https://doi.org/10.1093/hmg/1.6.397>
- [4] Coffee, B., Zhang, F.P., Ceman, S., Warren, S.T. and Reines, D. (2002) Histone Modifications Depict an Aberrantly Heterochromatinized FMR1 Gene in Fragile X Syndrome. *The American Journal of Human Genetics*, **71**, 923-932. <https://doi.org/10.1086/342931>
- [5] Greenblatt, E.J. and Spradling, A.C. (2018) Fragile X Mental Retardation 1 Gene Enhances the Translation of Large Autism-Related Proteins. *Science*, **361**, 709-712. <https://doi.org/10.1126/science.aas9963>
- [6] Zhou, L.T., *et al.* (2017) A Novel Role of Fragile X Mental Retardation Protein in Pre-mRNA Alternative Splicing through RNA-Binding Protein 14. *Neuroscience*, **349**, 64-75. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.02.044>
- [7] Dahlhaus, R. (2018) Of Men and Mice: Modeling the Fragile X Syndrome. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, **11**, 41. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00041>
- [8] Kazdoba, T.M., *et al.* (2014) Modeling Fragile X Syndrome in the Fmr1 Knockout Mouse. *Intractable & Rare Diseases Research*, **3**, 118-133. <https://doi.org/10.5582/irdr.2014.01024>
- [9] Sehara, Y., Fujimoto, K.-I., Ikeguchi, K., Katakai, Y., Ono, F., Takino, N., Ito, M., Ozawa, K. and Muramatsu, S.I. (2017) Persistent Expression of Dopamine-Synthesizing Enzymes 15 Years after Gene Transfer in a Primate Model of Parkinson's Disease. *Human Gene Therapy Clinical Development*, **28**, 74-79. <https://doi.org/10.1089/humc.2017.010>
- [10] Marks Jr., W.J., Baumann, T.L., Bartus, R.T. and the CERE-120 Study Group (2016) Long-Term Safety of Patients with Parkinson's Disease Receiving rAAV2-Neurturin (CERE-120) Gene Transfer. *Human Gene Therapy*, **27**, 522-527. <https://doi.org/10.1089/hum.2015.134>
- [11] Zeier, Z., Kumar, A., Bodhinathan, K., Feller, J.A., Foster, T.C. and Bloom, D.C. (2009) Fragile X Mental Retardation Protein Replacement Restores Hippocampal Synaptic Function in a Mouse Model of Fragile X Syndrome. *Gene Therapy*, **16**, 1122-1129. <https://doi.org/10.1038/gt.2009.83>
- [12] Gholizadeh, S., Arsenault, J., Xuan, I.C.Y., Pacey, L.K. and Hampson, D.R. (2014) Reduced Phenotypic Severity Following Adeno-Associated Virus-Mediated Fmr1 Gene Delivery in Fragile X Mice. *Neuropsychopharmacology*, **39**, 3100-3111. <https://doi.org/10.1038/npp.2014.167>
- [13] Foust, K.D., Nurre, E., Montgomery, C.L., Hernandez, A., Chan, C.M. and Kaspar, B.K. (2009) Intravascular AAV9 Preferentially Targets Neonatal Neurons and Adult Astrocytes. *Nature Biotechnology*, **27**, 59-65. <https://doi.org/10.1038/nbt.1515>
- [14] Kalesnykas, G., *et al.* (2017) Comparative Study of Adeno-Associated Virus, Adenovirus, *Baculovirus* and Lentivirus Vectors for Gene Therapy of the Eyes. *Current Gene Therapy*, **17**, 235-247. <https://doi.org/10.2174/1566523217666171003170348>
- [15] Klein, R.L., Dayton, R.D., Leidenheimer, N.J., Jansen, K., Golde, T.E. and Zweig, R.M. (2006) Efficient Neuronal Gene Transfer with AAV8 Leads to Neurotoxic Levels of Tau or Green Fluorescent Proteins. *Molecular Therapy*, **13**, 517-527. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.10.008>
- [16] Bey, K., Ciron, C., Dubreil, L., Deniaud, J., Ledevin, M., Cristini, J., Blouin, V., Aubourg, P. and Colle, M.-A. (2017) Efficient CNS Targeting in Adult Mice by Intrathecal Infusion of Single-Stranded AAV9-GFP for Gene Therapy of Neurological Disorders. *Gene Therapy*, **24**, 325-332. <https://doi.org/10.1038/gt.2017.18>
- [17] Hampson, D.R., Hooper, A.W.M. and Niibori, Y. (2019) The Application of Adeno-Associated Viral Vector Gene Therapy to the Treatment of Fragile X Syndrome. *Brain Sciences*, **9**, 32. <https://doi.org/10.3390/brainsci9020032>