

# 几种重组腺相关病毒亚型载体对小鼠睾丸细胞感染和外源基因表达的特性研究



余欣耐, 王斌驿, 刘 镨

武汉大学泰康医学院 (基础医学院) (武汉 430071)

**【摘要】目的** 评估几种重组腺相关病毒载体 rAAV1、rAAV2、rAAV2/8 和 rAAV6 对小鼠睾丸细胞的感染特性。**方法** 使用 HEK293T 细胞进行 rAAV 包装制备病毒颗粒, 经生精小管内注射或睾丸间质注射给小鼠睾丸接种病毒, 术后第 7 天用颈椎脱臼法处死小鼠, 取睾丸制作冰冻切片, 通过免疫荧光染色检测和评估重组腺相关病毒载体对睾丸细胞的感染情况和外源蛋白表达情况。**结果** rAAV1、rAAV2、rAAV6 三种亚型均可感染支持细胞和生殖细胞, rAAV2 对支持细胞感染能力更强, rAAV2/8 在经生精小管接种病毒时特异地感染支持细胞, 在经间质接种时特异性感染间质细胞。**结论** rAAV1、rAAV6 在睾丸细胞感染中并未表现出明显的偏好性; rAAV2 在可以感染生殖细胞和支持细胞的同时表现出对支持细胞的偏好性; rAAV2/8 无法穿越血睾屏障, 在经生精小管接种时特异性感染支持细胞, 在经间质接种时特异性感染间质细胞。

**【关键词】** 腺相关病毒; 睾丸; 支持细胞; 间质细胞; 生殖细胞; 外源基因递送

## Characterization of several recombinant adeno-associated virus subtypes on testicular cell infection and foreign gene expression in mice

YU Xinnai, WANG Binyi, LIU Rong

Taikang Medical College (School of Basic Medical Sciences), Wuhan University, Wuhan 430071, China

Corresponding author: LIU Rong, Email: liurong19840901@whu.edu.cn

**【Abstract】Objective** To evaluate the infection characteristics of several recombinant adeno-associated virus (rAAV) subtypes including rAAV1, rAAV2, rAAV2/8, and rAAV6 on cells within the mouse testis. **Methods** HEK293T cells were used for rAAV packaging. The viruses were inoculated via intratubular injection or testicular interstitial injection to the mice. On the 7th day postinoculation, testes were collected to make frozen sections after mice were sacrificed by cervical dislocation, and immunofluorescence staining was performed to examine and evaluate the infection and foreign protein expression of rAAV vectors to testicular cells. **Results** rAAV1, rAAV2 and rAAV6 subtypes were capable of infecting both sertoli cells and germ cells, with rAAV2 exhibiting a relative stronger infection capability on sertoli cells. rAAV2/8 demonstrated an infection preference specifically for sertoli cells when inoculated via the seminiferous tubules, while it specifically infected leydig cells when inoculated via

DOI: [10.12173/j.issn.1004-4337.202403139](https://doi.org/10.12173/j.issn.1004-4337.202403139)

基金项目: 湖北省自然科学基金面上项目 (2022CFB010)

通信作者: 刘镨, Email: liurong19840901@whu.edu.cn

<https://slyyx.whuzhmedj.com/>

testicular interstitia. **Conclusion** rAAV1 and rAAV6 did not show specific infection preference in testicular cells. rAAV2 displayed a relative preference towards sertoli cells though it was able to infect both germ cells and sertoli cells. rAAV2/8 was unable to penetrate the blood-testis barrier, showing specific infection on sertoli cells when inoculated via seminiferous tubules and on leydig cells when inoculated via testicular interstitia.

**【Keywords】** Adeno-associated virus; Testis; Sertoli cell; Leydig cell; Germ cell; Foreign gene delivery

重组腺相关病毒 (recombinant adeno-associated virus, rAAV) 载体在临床基因治疗中具有独特优势, 如特定组织和细胞的感染偏好性、相对较低的免疫排斥反应、基因非整合性以及持久稳定的外源基因表达, 这些使其成为临床中最具有应用潜力的基因递送工具<sup>[1-6]</sup>。rAAV 载体在单基因疾病治疗 (如血友病、遗传性失明和肌肉萎缩症等) 的临床试验中取得了阶段性的成果<sup>[7]</sup>, 其临床安全性和有效性相较于之前常用的其他类型病毒载体有显著提高, 目前已有多个基于 rAAV 的基因治疗药物在国际上获准使用。rAAV 的最大优势在于亚型的多样性, 不同亚型在细胞类群的感染偏好上有所不同, 从而可实现基因药物向特定组织和细胞的靶向精准递送, 研究人员也在积极探索特异化 rAAV 衣壳的设计筛选以及现有亚型的应用领域<sup>[8-10]</sup>。本研究针对 rAAV1、rAAV2、rAAV2/8、rAAV6 几种亚型对睾丸中不同细胞类型的感染特性进行评估, 以期为临床上基于睾丸细胞基因治疗男性不育的决策提供参考依据。

## 1 资料与方法

### 1.1 实验动物

SPF 级雄性 C57BL/6JNifdc 小鼠 (6~8 周龄, 20 g ± 2 g) 购自北京维通利华实验动物技术有限公司湖北分公司。小鼠饲养于 SPF 级动物房中 (温度: 23 °C ± 2 °C, 湿度: 50% ± 5%, 12 小时照明光暗循环)。

### 1.2 细胞株及其培养

HEK293T 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。细胞接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中 (每 1 mL 培养基含青霉素和链霉素各 100 U), 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱中培养。

### 1.3 rAAV 病毒包装与提取

使用 prAAV-CMV EGFP、pAAV1-RC、pAAV2-RC、pAAV2/8-RC、pAAV6-RC 和 pHelper 质粒转

化 *E. coli* DH5 $\alpha$  后进行克隆扩增, 无内毒素化提取纯化质粒、并检测浓度。

按每 15 cm 皿 40  $\mu$ L PEI (1 mg/mL)、120  $\mu$ g 质粒 (prAAV-CMV EGFP、pAAV-RC 和 pHelper 质粒摩尔比为 1 : 1 : 1) 和 1.5 mL DMEM 培养基混合 15 min 配制转染试剂, 加入含 25 mL DMEM 培养基和长有 70%~80% 密度 HEK293T 细胞的 15 cm 皿中, 4~6 小时后更换为含血清的常规培养基, 72 小时后分别取培养基和细胞裂解液过滤, 使用 100 kDa 超滤管进行超滤浓缩, 最后通过 qPCR 的方法检测病毒滴度。

### 1.4 病毒接种小鼠睾丸

实验使用 6~8 周龄雄性小鼠, 在小鼠单侧睾丸进行生精小管内注射或睾丸间质注射处理, 另一侧睾丸不进行处理作为对照组, 每组实验使用 3 只鼠作重复。

戊巴比妥钠麻醉小鼠后, 使用玻璃针于睾丸与附睾连接处的输出小管向睾丸内生精小管注射 10  $\mu$ L 病毒 (生精小管内注射<sup>[11]</sup>); 或使用注射针于睾丸白膜扎出小孔, 用玻璃针向间质注射 5  $\mu$ L 病毒 (睾丸间质内注射<sup>[12]</sup>); 接种后缝合并正常饲养。

### 1.5 感染特性分析

接种病毒后第 7 天使用颈椎脱臼法处死实验小鼠, 取睾丸组织进行冰冻切片<sup>[12]</sup>, 10% 山羊血清室温封闭 1 小时, 一抗 SOX9 (Abclonal, A19710, 1 : 100) 或 CYP17A1 (Proteintech, 14447-1-AP, 1 : 100) 4 °C 孵育过夜, 二抗 (1 : 200) (CoraLite594-conjugated Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), Proteintech, SA00013-4) 室温孵育 1 小时, 用含 DAPI 封片剂封片, 最后于荧光显微镜 (Zeiss, Axio Imager) 下观察并拍照。

### 1.6 统计分析

在 Microsoft Excel 2021 中使用线性回归拟合方法得到病毒滴度检测的标准曲线及其决定系数 R<sup>2</sup> 值。

## 2 结果

### 2.1 病毒滴度检测

使用实时荧光定量 PCR 进行病毒滴度检测。首先，将已知浓度为  $1 \times 10^{10}$  molecule/ $\mu\text{L}$  的标准 pAAV-CMV EGFP 溶液进行梯度稀释后用 qPCR 测定得到的 Ct 值，用以绘制标准曲线（图 1），将得到的滴度值计算标准方程用于计算各收获的 rAAV 病毒液的病毒浓度，最后均使用 PBS 溶液稀释至  $1.0 \times 10^7$  molecule/ $\mu\text{L}$  用于病毒接种。

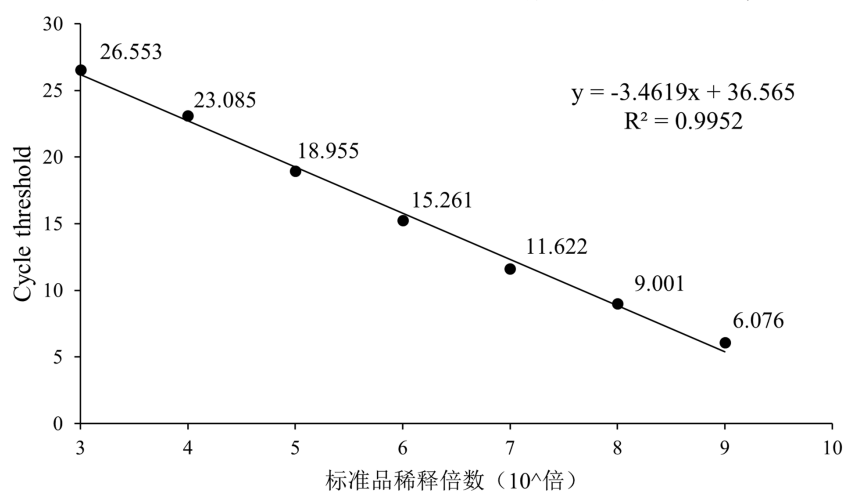


图1 qPCR方法检测病毒浓度的标准曲线

Figure 1. The standard curve for virus concentration calculation generated by using quantitative PCR method

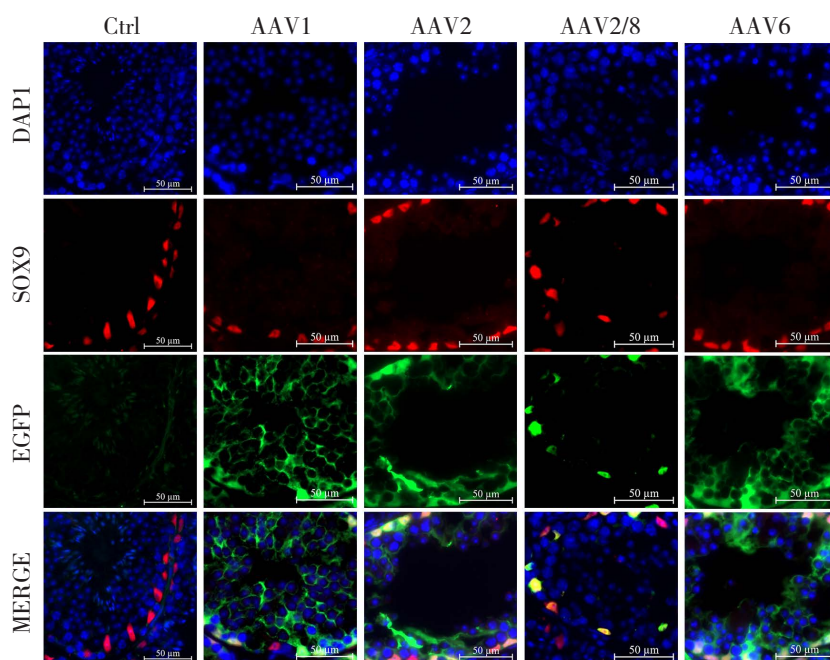


图2 几种重组AAV病毒载体对小鼠睾丸细胞的感染特性

Figure 2. The infection characteristics of several rAAV subtypes on mouse testicular cells

### 2.2 几种rAAV接种感染小鼠睾丸细胞的特性

分别用 rAAV1、rAAV2、rAAV6、rAAV2/8 病毒进行小鼠生精小管内注射，注射剂量为每个睾丸接种  $1.0 \times 10^8$  个病毒颗粒。在接种后第 7 天用颈椎脱臼法处死小鼠，取睾丸进行冷冻切片并免疫荧光染色检测。利用病毒载体携带外源 *Egfp* 报告基因的特点，通过检测 EGFP 荧光信号可表征病毒载体感染的细胞并证实其成功表达了外源蛋白，同时使用 SOX9 抗体标记睾丸支持细胞，可观察评估不同 rAAV 载体对睾丸不同细胞类型的感染情况。如图 2 所示，rAAV1、rAAV2、rAAV6

三种亚型均可感染支持细胞（SOX9 阳性，红色信号）和生殖细胞（靠近生精小管腔面），对生精上皮的支持细胞和生殖细胞的感染能力未表现出明显的偏好性；在 rAAV2 感染组，SOX9 阳性支持细胞中的 EGFP 绿色荧光信号比其他 SOX9 阴性细胞更强，提示 rAAV2 对支持细胞的感染能力相较于对生殖细胞更强，具有一定偏好性；在 rAAV2/8 的感染组，EGFP 阳性信号与 SOX9 阳性信号共定位，SOX9 阴性的细胞也呈现 EGFP 阴性，说明 rAAV2/8 经生精小管注射可特异性感染支持细胞，而不感染生殖细胞。

### 2.3 rAAV2/8 经不同接种方式接种睾丸的感染特性

鉴于 rAAV2/8 在经生精小管接种感染时

呈现出特异性感染支持细胞，本研究进一步将 rAAV2/8 分别经生精小管和睾丸间质注射接种，接种病毒后第 7 天处死小鼠取其睾丸进行冷冻切片和免疫荧光染色以观察 rAAV2/8 感染睾丸细胞的特性。使用 CYP17A1 抗体标记间质细胞，结果显示，与经生精小管接种的感染结果不同，在经睾丸间质注射接种组，EGFP 阳性信号与间质细胞特异性标记 CYP17A1 阳性信号共定位，而生精小管内为阴性，见图 3，说明 rAAV2/8 不能穿越血睾屏障，当经生精小管内接种感染时特异性感染支持细胞，当经睾丸间质接种感染时特异性感染间质细胞。

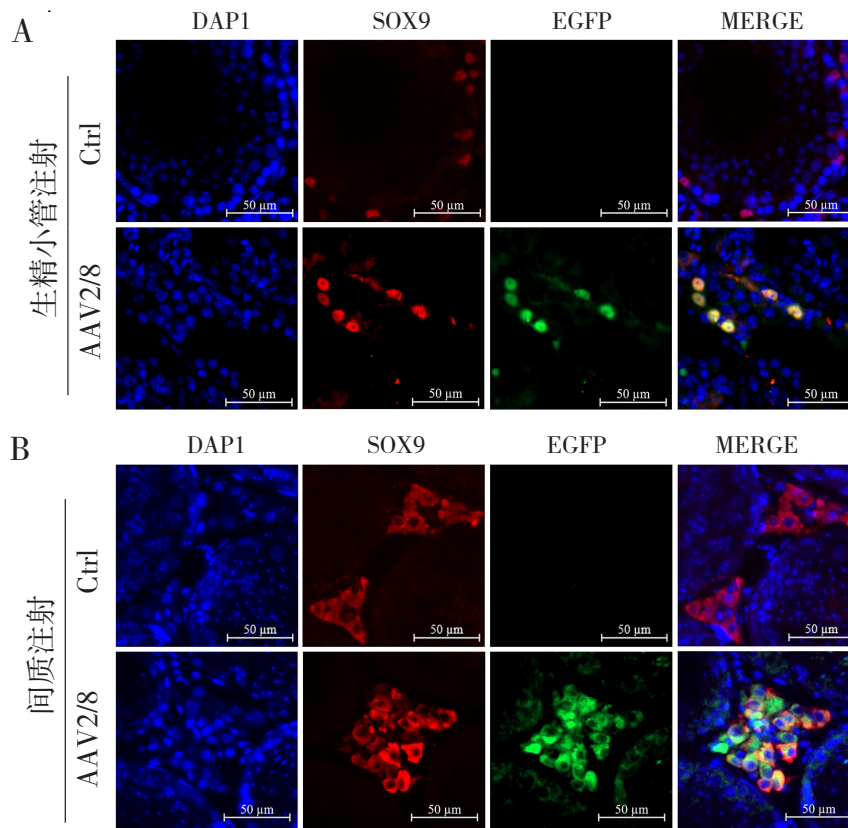


图3 rAAV2/8病毒不同接种方式对睾丸细胞的感染特性

Figure 3. The infection characteristics of rAAV2/8 virus with different inoculation methods on testicular cells

注：A. 经生精小管接种rAAV2/8病毒的感染情况；B. 经睾丸间质接种rAAV2/8病毒的感染情况。

### 3 讨论

男性不育是目前亟待解决的一项重大健康问题，而遗传缺陷是导致男性不育的重要原因之一<sup>[13]</sup>。近年来基因治疗技术的快速发展，给

男性不育患者带来了一线曙光。目前主要应用于临床治疗的基因递送病毒载体有两种，即慢病毒和腺病毒载体，但其在临床应用方面均存在不足<sup>[14]</sup>。腺病毒会引起炎症反应，且其携带目的基因的表达能力逐渐丧失<sup>[15]</sup>；慢病毒递送

载体具有整合性，会将目的基因整合入宿主细胞的基因组<sup>[16]</sup>，因此，在男性不育的治疗过程中由于基因组可遗传而引起安全和伦理问题。

rAAV 治疗手段是目前兴起的基因治疗方式，具有广泛的治疗优势和应用前景，在部分医疗领域临床试验中已经取得了一些成果<sup>[17]</sup>。例如，rAAV 治疗为癌症治疗开辟了新途径，尽管其在癌症治疗方面的应用仍处于早期阶段，但研究人员已开始探索利用 rAAV 载体递送抗癌基因、免疫调节基因等治疗癌症的可行性<sup>[18]</sup>，这为癌症患者带来了新的希望。在不孕不育疾病的治疗尝试方面，已有学者在小鼠上通过 AAV 回补基因，恢复了不孕小鼠的生育能力，并成功产生后代<sup>[19]</sup>。Watanabe 等评估了 AAV1/9 在生精小管中的感染偏好性，发现 AAV1/9 具有穿越血睾屏障并感染多种细胞类型的能力，但却无法满足临床治疗对于精准递送的要求，即只感染某种特定细胞类型<sup>[20]</sup>。在另一项研究中，Xia 等使用 AAV8 作为递送载体对睾丸间质细胞衰竭的 Lhcgr 缺陷小鼠进行了基因治疗，使小鼠成功产生了可育后代，展现出 AAV 进行基因回补治疗生殖障碍疾病的可行性<sup>[12]</sup>。

为系统检测其他几种 AAV 亚型对睾丸细胞的感染特性，本研究利用可获得的几种 rAAV 亚型检测发现，rAAV1、rAAV6 在经生精小管注射感染时未表现出明显的感染细胞类型偏好性，生精小管内大部分细胞均可被感染并表达外源 EGFP 绿色荧光蛋白，这与 Watanabe 等<sup>[20]</sup>报道的 rAAV1 存在穿透血睾屏障的感染能力不一致。本研究发现 rAAV1 经生精小管接种并不能穿透血睾屏障感染间质细胞；此外，rAAV2 虽然可同时感染生殖细胞和支持细胞，但是对支持细胞的感染能力更强；而新增检测的 rAAV2/8 则表现出明显的感染支持细胞偏好性。本研究进一步利用经生精小管和经睾丸间质注射两种感染方式研究了 rAAV2/8 亚型在睾丸中的感染特征，结果发现，在经生精小管注射感染时，rAAV2/8 仅特异性地感染支持细胞，几乎不感染精原细胞、精母细胞、圆形精子等生殖细胞；而在经间质感染时，rAAV2/8 偏好性地感染间质细胞，对血管内皮细胞、基底细胞等其他细胞感染能力弱。以上说明 rAAV2/8 无法穿越血睾屏障，可精准靶向支持细胞或间质细胞递送目的基因，这使得

rAAV2/8 载体有望作为靶向睾丸支持细胞或间质细胞的基因修复治疗或基因编辑的工具，为男性不育等生殖系统疾病的治疗提供参考工具。

本研究检测出几种 rAAV 亚型对小鼠睾丸细胞的感染特性，但由于小鼠和高等动物（包括人）之间存在差异，本研究结论可能无法直接推及到人，未来有待进一步在灵长类动物乃至人的睾丸组织中测试。

## 参考文献

- 1 Pupo A, Fernandez A, Low SH, et al. AAV vectors: the Rubik's cube of human gene therapy[J]. *Mol Ther*, 2022, 30(12): 3515–3541. DOI: [10.1016/j.ymt.2022.09.015](https://doi.org/10.1016/j.ymt.2022.09.015).
- 2 Barnes C, Scheideler O, Schaffer D. Engineering the AAV capsid to evade immune responses[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2019, 60: 99–103. DOI: [10.1016/j.copbio.2019.01.002](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.01.002).
- 3 Jakob M, Mühle C, Park J, et al. No evidence for germline transmission following prenatal and early postnatal AAV-mediated gene delivery[J]. *J Gene Med*, 2005, 7(5): 630–637. DOI: [10.1002/jgm.718](https://doi.org/10.1002/jgm.718).
- 4 Arruda VR, Fields PA, Milner R, et al. Lack of germline transmission of vector sequences following systemic administration of recombinant AAV-2 vector in males[J]. *Mol Ther*, 2001, 4(6): 586–592. DOI: [10.1006/mthe.2001.0491](https://doi.org/10.1006/mthe.2001.0491).
- 5 Schulz M, Levy DI, Petropoulos CJ, et al. Binding and neutralizing anti-AAV antibodies: detection and implications for rAAV-mediated gene therapy[J]. *Mol Ther*, 2023, 31(3): 616–630. DOI: [10.1016/j.ymt.2023.01.010](https://doi.org/10.1016/j.ymt.2023.01.010).
- 6 Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(5): 358–378. DOI: [10.1038/s41573-019-0012-9](https://doi.org/10.1038/s41573-019-0012-9).
- 7 Samelson-Jones BJ, George LA. Adeno-associated virus gene therapy for hemophilia[J]. *Annu Rev Med*, 2023, 74: 231–247. DOI: [10.1146/annurev-med-043021-033013](https://doi.org/10.1146/annurev-med-043021-033013).
- 8 Issa SS, Shaimardanova AA, Solovyeva VV, et al. Various AAV Serotypes and their applications in gene therapy: an overview[J]. *Cells*, 2023, 12(5): 785. DOI: [10.3390/cells12050785](https://doi.org/10.3390/cells12050785).
- 9 Srivastava A. In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors[J]. *Curr Opin Virol*, 2016, 21: 75–80. DOI:

- 10.1016/j.coviro.2016.08.003.
- 10 Zolotukhin S, Vandenberghe LH. AAV capsid design: a goldilocks challenge[J]. Trends Mol Med, 2022, 28(3): 183–193. DOI: 10.1016/j.molmed.2022.01.003.
  - 11 Ikawa M, Tergaonkar V, Ogura A, et al. Restoration of spermatogenesis by lentiviral gene transfer: offspring from infertile mice[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(11): 7524–7529. DOI: 10.1073/pnas.072207299.
  - 12 Xia K, Wang F, Lai X, et al. AAV-mediated gene therapy produces fertile offspring in the Lhcgr-deficient mouse model of Leydig cell failure[J]. Cell Rep Med, 2022, 3(11): 100792. DOI: 10.1016/j.xcrm.2022.100792.
  - 13 Eisenberg ML, Esteves SC, Lamb DJ, et al. Male infertility[J]. Nat Rev Dis Primers, 2023, 9(1): 49. DOI: 10.1038/s41572-023-00459-w.
  - 14 Verdera HC, Kuranda K, Mingozzi F. AAV vector immunogenicity in humans: a long journey to successful gene transfer[J]. Mol Ther, 2020, 28(3): 723–746. DOI: 10.1016/j.ymthe.2019.12.010.
  - 15 Lion T. Adenovirus persistence, reactivation, and clinical management[J]. FEBS Lett, 2019, 593(24): 3571–3582. DOI: 10.1002/1873-3468.13576.
  - 16 Milone MC, O'Doherty U. Clinical use of lentiviral vectors[J]. Leukemia, 2018, 32(7): 1529–1541. DOI: 10.1038/s41375-018-0106-0.
  - 17 Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL 3rd, et al. Adeno-associated virus (AAV) as a vector for gene therapy[J]. BioDrugs, 2017, 31(4): 317–334. DOI: 10.1007/s40259-017-0234-5.
  - 18 Santiago-Ortiz JL, Schaffer DV. Adeno-associated virus (AAV) vectors in cancer gene therapy[J]. J Control Release, 2016, 240: 287–301. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.01.001.
  - 19 Kanatsu-Shinohara M, Lee J, Miyazaki T, et al. Adeno-associated-virus-mediated gene delivery to ovaries restores fertility in congenital infertile mice[J]. Cell Rep Med, 2022, 3(5): 100606. DOI: 10.1016/j.xcrm.2022.100606.
  - 20 Watanabe S, Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, et al. In vivo genetic manipulation of spermatogonial stem cells and their microenvironment by adeno-associated viruses[J]. Stem Cell Reports, 2018, 10(5): 1551–1564. DOI: 10.1016/j.stemcr.2018.03.005.

收稿日期: 2024 年 03 月 25 日 修回日期: 2024 年 04 月 19 日  
本文编辑: 张 苗 黄 笛

引用本文: 余欣耐, 王斌驿, 刘镛. 几种重组腺相关病毒亚型载体对小鼠睾丸细胞感染和外源基因表达的特性研究[J]. 数理医药学杂志, 2024, 37(4): 260–265. DOI: 10.12173/j.issn.1004-4337.202403139.  
Yu XN, Wang BY, Liu R. Characterization of several recombinant adeno-associated virus subtypes on testicular cell infection and foreign gene expression in mice[J]. Journal of Mathematical Medicine, 2024, 37(4): 260–265. DOI: 10.12173/j.issn.1004-4337.202403139.