

# 人白介素 10 重组腺相关病毒血清型 2/1 杂合载体的构建及转导供肝的效果

张新宇, 姜洪池, 孙 备, 周令望, 邵 升, 王志东, 孙世波, 吴德全, 韩德恩

张新宇, 邵升, 王志东, 孙世波, 吴德全, 韩德恩, 哈尔滨医科大学附属第二临床医学院普外一科 黑龙江省哈尔滨市 150086  
姜洪池, 孙备, 哈尔滨医科大学第一临床医学院普外科 黑龙江省哈尔滨市 150086  
周令望, 中国疾病预防控制中心地方病分中心 黑龙江省哈尔滨市 150086  
张新宇, 男, 1970-03-05 生, 医学博士, 副主任医师、副教授。  
国家自然科学基金资助项目, No. 30100177, No. 30400416  
通讯作者: 张新宇, 150086, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨医科大学附属第二临床医学院普外一科。 xinyuzhang3052000@yahoo.com.cn  
电话: 0451-89705906  
收稿日期: 2005-04-04 接受日期: 2005-04-09

## Construction of an adeno-associated viral vector serotype 2/1 containing human interleukin-10 and its expression in donor liver

Xin-Yu Zhang, Hong-Chi Jiang, Bei Sun, Ling-Wang Zhou, Sheng Tai, Zhi-Dong Wang, Shi-Bo Sun, De-Quan Wu, De-En Han

Xin-Yu Zhang, Sheng Tai, Zhi-Dong Wang, Shi-Bo Sun, De-Quan Wu, De-En Han, the First Department of General Surgery, the Second Clinical Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China  
Hong-Chi Jiang, Bei Sun, Department of General Surgery, the First Clinical Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China  
Ling-Wang Zhou, Endemic Disease Branch, Chinese Center for Disease Control, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China  
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30100177, and No. 30400416  
Correspondence to: Xin-Yu Zhang, the First Department of General Surgery, the Second Clinical Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, Heilongjiang Province, China. xinyuzhang3052000@yahoo.com.cn  
Received: 2005-04-04 Accepted: 2005-04-09

## Abstract

**AIM:** To construct an adeno-associated viral vector serotype 2/1 (AAV2/1) containing human interleukin-10 (hIL-10) gene and to observe its expression in donor liver.

**METHODS:** hIL-10cDNA amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) from human peripheral blood mononuclear cells was cloned into vector pMD18-T. After confirming the sequence, hIL-10cDNA was isolated and inserted into eukaryotic expression vector pSNAV. The recombinant plasmid pSNAV-hIL-10 was transfected into BHK21 cells. BHK21 cells which contained ITR-hIL-10-ITR were obtained by G418 screening. Then the cells were transfected with rHSV/r2c1 containing

rep2-cap1 gene. The cells were cultured and purified to obtain rAAV2/1-hIL-10. The expression of hIL-10 gene was detected after this vector was transfer into donor liver *in vivo*.

**RESULTS:** The sequence of cloned hIL-10cDNA was identical with that published on GenBank. A new adeno-associated virus vector containing hIL-10cDNA was constructed. And the transcription and expression of hIL-10 were detected in donor liver for 24 weeks. hIL-10 was significantly expressed in test group than that in empty and rAAV2/1-GFP controls 24 wk after transferred ( $219.15 \pm 45.83$  ng/L vs  $40.02, 38.64$  ng/L,  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** The adeno-associated viral vector serotype 2/1 of hIL-10 is successfully established, which provides the basis for applying IL-10 in clinical organ transplantation.

**Key Words:** Interleukin 10; Clone; Adeno-associated virus; Donor liver

Zhang XY, Jiang HC, Sun B, Zhou LW, Tai S, Wang ZD, Sun SB, Wu DQ, Han DE. Construction of an adeno-associated viral vector serotype 2/1 containing human interleukin-10 and its expression in donor liver. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(12):1390-1394

## 摘要

**目的:** 构建含人白介素10(hIL-10)的腺相关病毒血清型2/1杂合载体(AAV2/1), 并观察其在供肝移植中的表达。

**方法:** 采用RT-PCR方法从人外周血淋巴细胞中扩增hIL-10cDNA, 将其克隆至pMD18-T载体中, 测序后, 再经酶切定向插入真核表达载体pSNAV, 用脂质体介导转染BHK21细胞, 经G418筛选得到含ITR-hIL-10-ITR的BHK21细胞株, 用携带rep2-cap1基因的辅助病毒(rHSV/r2c1)感染该细胞株。通过细胞孵育、裂解和病毒纯化, 得到含hIL-10的AAV2/1载体。在供肝灌注、保存中应用该重组病毒载体转染供肝移植, 移植后检测其在移植中的表达。

**结果:** RT-PCR扩增的hIL-10cDNA序列与GenBank中hIL-10cDNA序列一致, 构建了rAAV2/1-hIL-10表达载体。转染供肝移植后可检测到hIL-10, 持续24 wk表达。移植后24 wk, 实验组供肝中hIL-10

的表达比空白对照组和 rAAV2/1-GFP 对照组显著增高( $219.15 \pm 45.83$  ng/L vs  $40.02, 38.64$  ng/L,  $P < 0.05$ ).

**结论:** 成功构建了 rAAV2/1-hIL-10 表达载体系统, 并在大鼠供肝中持续表达 hIL-10, 为 IL-10 在器官移植中的生物学作用机制及临床应用的深入研究奠定基础.

**关键词:** 白介素-10; 克隆; 腺相关病毒; 供肝

张新宇, 姜洪池, 孙备, 周令望, 邵升, 王志东, 孙世波, 吴德全, 韩德恩. 人白介素10重组腺相关病毒血清型2/1杂合载体的构建及转导供肝的效果. 世界华人消化杂志 2005;13(12):1390-1394  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1390.asp>

## 0 引言

白介素10(interleukin10, IL-10)是较强的内源性免疫抑制因子, 他在器官移植保存-再灌注损伤及排斥反应中起重要作用<sup>[1-5]</sup>. 真核细胞表达的IL-10蛋白产品在人体内的半衰期很短, 在临床上需要反复注射才能维持疗效. 这样的疗法价格昂贵, 有待改进. 采用重组腺相关病毒作载体进行的基因治疗有可能克服常规疗法的弊端. 腺相关病毒载体(adeno-associated viral vector, AAV vector)是目前被公认为最安全的病毒载体<sup>[6-8]</sup>. 业已证实, 利用血清型2的重组腺相关病毒载体(rAAV2)携带治疗基因导入可产生足够的治疗蛋白而纠正多种基因缺陷<sup>[9-15]</sup>, 但在正常人群中存在针对AAV2的抗体<sup>[16-19]</sup>. 而重组血清型1的腺相关病毒(rAAV1)对肝细胞及骨骼肌则有更高的转导效率, 用于人体临床基因治疗时可能避免已存在的抗AAV2抗体产生的干扰<sup>[20-22]</sup>. 并且可以转导外源基因在实质脏器持续稳定表达<sup>[23-24]</sup>. 然而, 目前尚未见将rAAV1应用于IL-10基因转导的报道. 本试验旨在制备携带hIL-10的rAAV2/1杂和载体, 并观察其在供肝移植中的表达.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 克隆载体pMD18-T和*E. coli* JM109购自Takara公司, 真核表达载体PSNAV、PSNAV-GFP、携带rep2-cap1基因的辅助病毒(rHSV/r2c1)购自中国预防医学科学院病毒学研究所, BHK21细胞由哈尔滨医科大学克山病研究所提供. TRIzol 和DMEM 购自GIBCO公司, 逆转录系统、质粒纯化系统购自Promega公司, ExTaqDNA聚合酶、PCR产物回收试剂盒、*EcoR* I、*Sal* I、*T<sub>4</sub>*DNA连接酶和感受态细胞JM109为Takara公司产品, 脂质体2000试剂购自 invitrogen公司, hIL-10单克隆抗体(mAb)购自北京中山公司, hIL-10 ELISA检测试剂盒购自晶美公司.

**1.2 方法** 根据GenBank hIL-10cDNA(accession No.

M57627)设计引物: 上游引物: 5' -GAATTCGCCAC-CATGCACAGCTC-3'; 下游引物: 5' -TAGCGGCCGCTTAGT TTCGTATCTTCATT-3'. 取人外周血, 分离、培养淋巴细胞, 经ConA刺激活化后, 提取淋巴细胞总RNA, 用Oligo引物逆转录成cDNA, 行PCR扩增. 分离并回收PCR产物, 经*T<sub>4</sub>*DNA连接酶作用与pMD18-T连接, 转化感受态细胞JM109, 筛选阳性克隆, 提取质粒测序鉴定. 用*EcoR* I, *Sal* I双酶切pMD18-T-hIL-10和真核表达载体pSNAV, 回收目的片段、连接, 构建真核表达载体命名为pSNAV-hIL-10. 按Lipofectamine Plus Reagent说明进行转染HeLa细胞, 分为pSNAV-hIL-10组、pSNAV空载体对照组、脂质体对照组和空白细胞对照组. 分别于转染48和72 h后收集细胞和上清, 进行瞬时基因及蛋白表达检测. PCR检测hIL-10mRNA的转录, 引物扩增条件同前; 细胞爬片免疫组化检测细胞内hIL-10的表达; ELISA法检测各组细胞上清中hIL-10的分泌和表达产物对活化淋巴细胞分泌INF- $\gamma$ 的抑制率. Westernblot检测rhIL-10结构完整性. 将pSNAV-2-hIL-10及pSNAV-2-GFP分别转染BHK-21细胞, 经G418选择培养, 得到G418抗性克隆, 扩大培养该两种细胞株分别命名为BHK/GFP和BHK/hIL-10. rAAV2/1-hIL-10及rAAV2/1-GFP的制备、纯化及滴度测定参照Wu *et al*<sup>[25-26]</sup>的方法, 以辅助病毒(rHSV/r2c1)分别感染扩大培养后的BHK/hIL-10和BHK/GFP细胞株, 收集培养物. 用氯仿处理-PEG/NaCl沉淀-氯仿抽提三步法分离浓缩纯化rAAV2/1<sup>[27]</sup>. 用SDS-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)检测纯度. 滴度测定采用点杂交方法进行<sup>[28]</sup>. 体质量250-300 g雄性Wistar大鼠90只, 随机分为3组, 每组各15对. A组: 无病毒载体; B组: rAAV2/1-GFP转染,  $1 \times 10^{11}$  病毒基因组个数(v.g)/只; C组: rAAV2/1-hIL-10转染  $1 \times 10^{11}$  v.g/只. 离体门-腔静脉灌洗转染: 病毒载体以0.5 mL HTK液稀释后通过供肝门静脉注入后, 夹闭门、腔静脉, 4°C保存于HTK液中3 h. 采用改进的双袖套法行大鼠原位肝移植<sup>[29]</sup>. 每组分别于移植后4, 24 wk各处死7只大鼠, 取肝组织进行检测. 分别于移植后3, 7, 14, 30, 60, 120, 180 d采血检测. GFP检测采用肝组织冰冻切片, 荧光显微镜观察; ELISA法检测移植物及血清hIL-10表达; 免疫组化法分析移植物hIL-10蛋白水平.

## 2 结果

**2.1 rAAV2/1-hIL-10表达载体的构建** ConA活化的正常人外周血淋巴细胞经RT-PCR扩增, 在550 bp处可见特异条带(图1). 构建了pMD18-T-hIL-10重组质粒. hIL-10的全长cDNA共534 bp, 包括信号肽和成熟肽序列, 克隆测序结果为559 bp序列(包括酶切

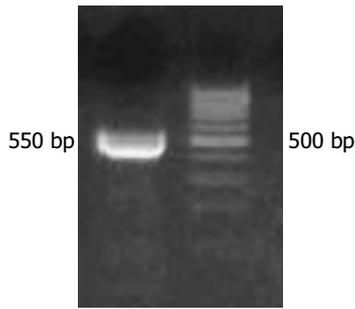


图1 人外周血淋巴细胞 PCR.

位点), 与 GenBank 中 hIL-10cDNA 序列一致.

pSNAV-hIL-10(图2), 双酶切鉴定可见约 550 bp 和 5 kb 2 条电泳带(图3). pSNAV-hIL-10 转染组细胞 PCR 检测结果(图4)在 550 bp 处可见特异条带. 爬片细胞免疫组化结果显示 pSNAV-hIL-10 转染组细胞可见阳性表达, 而其余 3 个对照组未见表达(图5). 培养细胞上清中 ELISA 检测结果, pSNAV-hIL-10 转染组可测到 hIL-10 分泌与各对照组相比差异显著(表1). 上清 Western blot 结果, pSNAV-hIL-10 转染组细胞上清在 18 ku 处有 IL-10 的目标条带出现, 而其余各对照组未见杂交带(图6). 表达产物 rhIL-10 能明显抑制 INF- $\gamma$  的分泌, 并随含量的增加, 抑制作用增强(图7). 纯化后的 rAAV2/1 的纯度 >95%, 物理滴度约为  $8 \times 10^{11}$  病毒颗粒(v.g)/mL.

表1 细胞培养物上清中 hIL-10 含量检测结果(ng/L)

| 组别             | 48 h                             | 72 h                             |
|----------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 细胞对照组          | 15.5 $\pm$ 6.3                   | 40.0 $\pm$ 8.4                   |
| 脂质体对照组         | 40.2 $\pm$ 8.3                   | 39.3 $\pm$ 6.5                   |
| pSNAV-GFP 对照组  | 39.2 $\pm$ 8.51                  | 38.6 $\pm$ 8.0                   |
| pSNAV-hIL-10 组 | 3 480.6 $\pm$ 173.3 <sup>b</sup> | 3 218.3 $\pm$ 194.6 <sup>d</sup> |

<sup>b</sup> $P < 0.001$ , <sup>d</sup> $P < 0.001$  vs 其他各组.

2.2 rAAV2/1 介导的 hIL-10 在大鼠体内的表达 采用绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP) 基因为报告基因, 将病毒颗粒数为  $1 \times 10^{11}$  个的

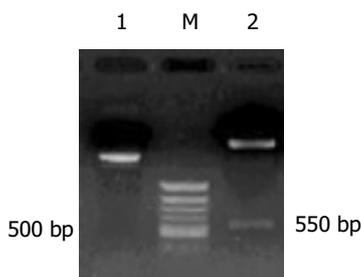


图3 pSNAV-hIL-10 酶切鉴定结果. M: marker; 1: pSNAV-hIL-10 质粒; 2: pSNAV-hIL-10 双酶切.

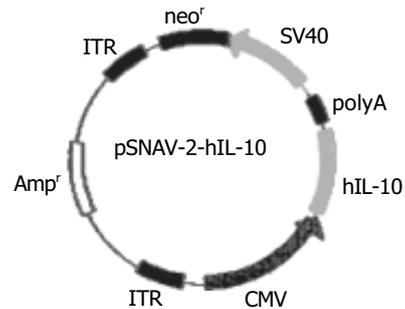


图2 重组表达载体.

rAAV2/1-GFP通过离体门-腔静脉灌洗转染大鼠供肝. 结果 rAAV2/1-GFP 转染后 4 wk 即能观察到 GFP 在大鼠供肝移植植物中的表达, 至移植后 24 wk 仍可观察到 GFP 的较高表达(图8). 免疫组化法检测显示, 移植后 4, 24 wk rAAV2/1- hIL-10 转染组肝细胞可阳性表达(图9). 其余 2 个对照组未见表达. ELISA 法检测供肝移植植物中 hIL-10 表达结果见表2. rAAV2/1- hIL-10 转染组可测到 hIL-10 表达与各对照组相比差异显著. ELISA 法检测血清中的 hIL-10 表达(图10). 移植后 7 d 血清中的 hIL-10 开始升高, 60 d 达到高峰, 此后, 血清中的 hIL-10 的含量有所下降, 至 24 wk 时, hIL-10 在大鼠体内的表达量仍然维持较高水平.

表2 供肝移植植物中 hIL-10 含量检测结果(ng/L)

| 分组                | 4 wk               | 24 wk              |
|-------------------|--------------------|--------------------|
| 空白对照组             | 0                  | 40.02              |
| rAAV2/1-GFP 组     | 39.18              | 38.64              |
| rAAV2/1- hIL-10 组 | 182.64 $\pm$ 36.27 | 219.15 $\pm$ 45.83 |

### 3 讨论

在对编码人和动物的真核蛋白的各种基因进行重组表达时, 表达产物能否保持其天然构象并具有生物学活性是重组表达成功的关键, 翻译后修饰在其中起非常重要的作用. 本实验应用真核表达系统, 同时克隆表达了 IL-10 的成熟肽和信号肽, 以保证重组 hIL-10 能够被正确表达分泌. 根据 Kozak<sup>[30]</sup> 对数百个真核序列的分析, 认为启动子下游第 1 个 ATG 常作为起始

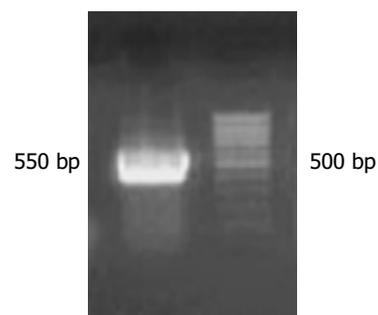


图4 pSNAV-hIL-10 转染组细胞 PCR.

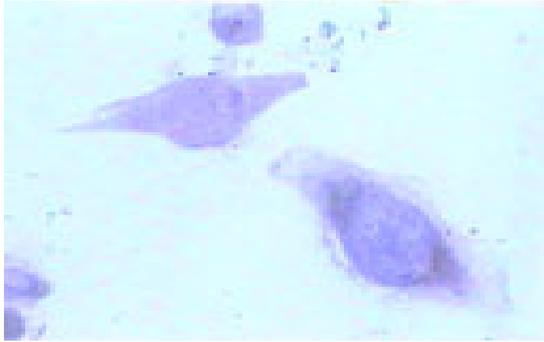
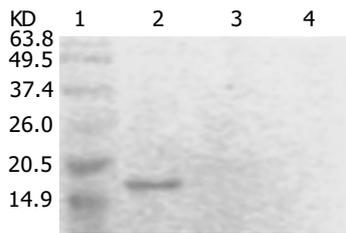
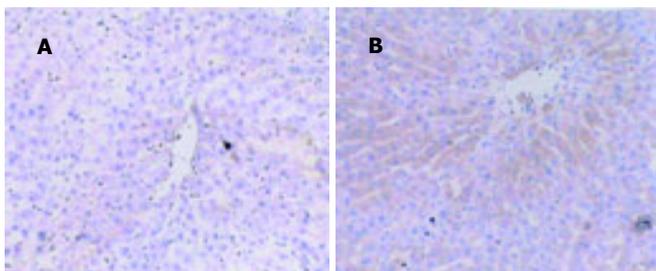
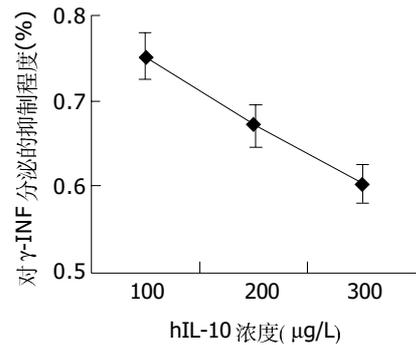
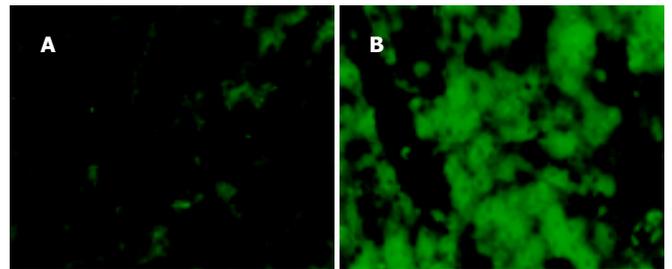
图5 pSNAV-hIL-10 转染组细胞免疫组化结果( $\times 350$ ).

图6 培养上清中重组 hIL-10 蛋白的 Westernblot 分析. 1: Prestained protein marker; 2: HeLa/pSNAV-hIL-10; 3: HeLa/pSNAV; 4: HeLa/Lipofectamine.

密码子, 同时 95% 表达的真核基因在 ATG 前 -3 位是嘌呤(而且常是 A), +4 位是 G. 如果这 2 个位点的嘌呤有 1 个被嘧啶替代, 翻译水平就下降至 1/10-1/5; 如果均被嘧啶替代, 翻译水平就下降至 1/20. 因此, (GCC)GGCA/GCCAUGG 是高等真核基因起始密码附近的保守序列, 其中 -3 位 A 最为保守. 我们在设计引物时, 在 ATG 前设计为 GCCACC, 以提高翻译效率; 并在下游引物中的 5' 端添加了 TAA 终止密码子, 以防止基因通读, 有效保证翻译终止. 我们成功地克隆了 hIL-10cDNA, 构建了 pSNAV-hIL-10 真核表达载体, 分别于转录和翻译水平在转染细胞和培养上清中检测到 hIL-10 的表达, 并通过大鼠活化淋巴细胞抑制试验证实了我们克隆的 hIL-10 具有生物学活性. 在此基础上进一步成功构建了 rAAV2/1-hIL-10 杂合载体系统, 用携带 AAV 的 rep2-cap1 基因的辅助病毒 (rHSV/r2c1) 感染已经整合了 ITR-hIL-10-ITR 的 AAV 包装细胞株,

图9 24 wk 时肝脏移植中 IL-10 表达情况( $\times 200$ ). A: rAAV2/1-GFP 组; B: rAAV2/1-hIL-10 组图7 不同浓度的 rhIL-10 对 PHA 诱导的淋巴细胞  $\gamma$ -INF 分泌的抑制作用.图8 rAAV2/1-GFP 转染后大鼠肝脏移植 GFP 表达情况( $\times 240$ ). A: 4 wk; B: 24 wk.

得到了携带有 hIL-10 基因的 rAAV2/1 载体纯品. 其中, rep2-cap1 指来源于 AAV2 的 rep 和来源于 AAV1 的 cap 基因. 由于含有来自 AAV2 的 rep 基因, 该辅助病毒 (rHSV/r2c1) 可以识别并包装来自 AAV2 的 ITR, 得到的重组 AAV 载体 ITR 来自 AAV2, 而外壳来自 AAV1. 采用这种方式制备的 AAV2/1 杂合载体具有野生型 AAV1 的感染特性<sup>[6]</sup>. 在病毒包装过程中, 可以继续携带各种治疗基因和标记基因的 AAV2 载体细胞株, 从而大大简化了 AAV 载体“换壳”的过程; 另外, 使用研究较清楚且经过临床检验了安全性的 AAV2 的 ITR, 可以避免使用其他血清型的 ITR 可能带来的风险, 且在人体临床基因治疗时可能避免已存在的抗 AAV2 抗体产生的干扰. 我们将所构建的 rAAV2/1-hIL-10 杂合载体系统通过供肝离体灌洗保存的方法进行 hIL-10 的基因转移, 检测到 hIL-10 在大鼠肝移植及血清中表达从移植后 7 d 开始, 2 mo 时表

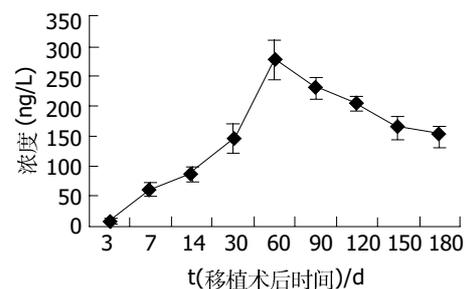


图10 移植术后不同时间点血清中 IL-10 浓度.

达量最高, 直至6 mo 仍有较高表达水平. 此结果与 Yang *et al*<sup>[23, 31]</sup>的报道类似.

本研究首次构建了 rAAV2/1-hIL-10 杂合载体系统, 利用该载体系统进行基因转移, 成功在大鼠移植供肝中稳定表达 hIL-10 基因并产生功能蛋白. 为 IL-10 在肝移植中生物学作用机制及临床应用的深入研究奠定基础.

#### 4 参考文献

- Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacol Rev* 2003;55:241-269
- Kim HJ, Hart J, Knatz N, Hall MW, Wewers MD. Janus kinase 3 down-regulates lipopolysaccharide-induced IL-1 beta-converting enzyme activation by autocrine IL-10. *J Immunol* 2004; 172:4948-4955
- Berlato C, Cassatella MA, Kinjyo I, Gatto L, Yoshimura A, Bazzoni F. Involvement of suppressor of cytokine signaling-3 as a mediator of the inhibitory effects of IL-10 on lipopolysaccharide-induced macrophage activation. *J Immunol* 2002;168:6404-6411
- Hong YS, Laks H, Cui G, Chong T, Sen L. Localized immunosuppression in the cardiac allograft induced by a new liposome-mediated IL-10 gene therapy. *J Heart Lung Transplant* 2002;21:1188-1200
- Oshima K, Sen L, Cui G, Tung T, Sacks BM, Arellano-Kruse A, Laks H. Localized interleukin-10 gene transfer induces apoptosis of alloreactive T cells via FAS/FASL pathway, improves function, and prolongs survival of cardiac allograft. *Transplantation* 2002;73:1019-1026
- Sarukhan A, Camugli S, Gjata B, von Boehmer H, Danos O, Jooss K. Successful interference with cellular immune responses to immunogenic proteins encoded by recombinant viral vectors. *J Virol* 2001;75:269-277
- Manning WC, Zhou S, Bland MP, Escobedo JA, Dwarki V. Transient immunosuppression allows transgene expression following readministration of adeno-associated viral vectors. *Hum Gene Ther* 1998;9:477-485
- Daly TM. Overview of adeno-associated viral vectors. *Methods Mol Biol* 2004;246:157-165
- Yamano S, Scott DE, Huang LY, Mikolajczyk M, Pillemer SR, Chiorini JA, Golding B, Baum BJ. Protection from experimental endotoxemia by a recombinant adeno-associated virus encoding interleukin 10. *J Gene Med* 2001;3:450-457
- Yamano S, Huang LY, Ding C, Chiorini JA, Goldsmith CM, Wellner RB, Golding B, Kotin RM, Scott DE, Baum BJ. Recombinant adeno-associated virus serotype 2 vectors mediate stable interleukin 10 secretion from salivary glands into the bloodstream. *Hum Gene Ther* 2002;13:287-298
- Apparailly F, Millet V, Noel D, Jacquet C, Sany J, Jorgensen C. Tetracycline-inducible interleukin-10 gene transfer mediated by an adeno-associated virus: application to experimental arthritis. *Hum Gene Ther* 2002;13:1179-1188
- Kok MR, Yamano S, Lodde BM, Wang J, Couwenhoven RI, Yakar S, Voutetakis A, Leroith D, Schmidt M, Afione S, Pillemer SR, Tsutsui MT, Tak PP, Chiorini JA, Baum BJ. Local adeno-associated virus-mediated interleukin 10 gene transfer has disease-modifying effects in a murine model of Sjogren's syndrome. *Hum Gene Ther* 2003;14:1605-1618
- During MJ, Xu R, Young D, Kaplitt MG, Sherwin RS, Leone P. Peroral gene therapy of lactose intolerance using an adeno-associated virus vector. *Nat Med* 1998;4:1131-1135
- Greelish JP, Su LT, Lankford EB, Burkman JM, Chen H, Konig SK, Mercier IM, Desjardins PR, Mitchell MA, Zheng XG, Leferovich J, Gao GP, Balice-Gordon RJ, Wilson JM, Stedman HH. Stable restoration of the sarcoglycan complex in dystrophic muscle perfused with histamine and a recombinant adeno-associated viral vector. *Nat Med* 1999;5:439-443
- During MJ, Symes CW, Lawlor PA, Lin J, Dunning J, Fitzsimons HL, Poulsen D, Leone P, Xu R, Dicker BL, Lipski J, Young D. An oral vaccine against NMDAR1 with efficacy in experimental stroke and epilepsy. *Science* 2000;287:1453-1460
- Lee HC, Kim SJ, Kim KS, Shin HC, Yoon JW. Remission in models of type 1 diabetes by gene therapy using a single-chain insulin analogue. *Nature* 2000;408:483-488
- Mastakov MY, Baer K, Xu R, Fitzsimons H, During MJ. Combined injection of rAAV with mannitol enhances gene expression in the rat brain. *Mol Ther* 2001;3:225-232
- Kay MA, Manno CS, Ragni MV, Larson PJ, Couto LB, McClelland A, Glader B, Chew AJ, Tai SJ, Herzog RW, Arruda V, Johnson F, Scallan C, Skarsgard E, Flake AW, High KA. Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector. *Nat Genet* 2000;24:257-261
- Herzog RW, Yang EY, Couto LB, Hagstrom JN, Elwell D, Fields PA, Burton M, Bellingier DA, Read MS, Brinkhous KM, Podsakoff GM, Nichols TC, Kurtzman GJ, High KA. Long-term correction of canine hemophilia B by gene transfer of blood coagulation factor IX mediated by adeno-associated viral vector. *Nat Med* 1999;5:56-63
- Hauck B, Xiao W. Characterization of tissue tropism determinants of adeno-associated virus type 1. *J Virol* 2003;77: 2768-2774
- Arruda VR, Schuettrumpf J, Herzog RW, Nichols TC, Robinson N, Lotfi Y, Mingozzi F, Xiao W, Couto LB, High KA. Safety and efficacy of factor IX gene transfer to skeletal muscle in murine and canine hemophilia B models by adeno-associated viral vector serotype 1. *Blood* 2004;103:85-92
- Wang C, Wang CM, Clark KR, Sferra TJ. Recombinant AAV serotype 1 transduction efficiency and tropism in the murine brain. *Gene Ther* 2003;10:1528-1534
- Yang ZF, Wu XB, Tsui TY, Hou YD, Luk JM, Fan ST. Recombinant adeno-associated virus vector: Is it ideal for gene delivery in liver transplantation? *Liver Transpl* 2003;9:411-420
- Tsui TY, Wu X, Lau CK, Ho DW, Xu T, Siu YT, Fan ST. Prevention of chronic deterioration of heart allograft by recombinant adeno-associated virus-mediated heme oxygenase-1 gene transfer. *Circulation* 2003;107:2623-2629
- Lu HZ, Chen L, Wang HW, Wu ZJ, Wu XB, Wang XF, Wang HL, Lu DR, Qiu XF, Xue JL. Gene therapy for hemophilia B mediated by recombinant adeno-associated viral vector with hFIXR338A, a high catalytic mutation of human coagulation factor IX. *Science China* 2001;44:585-592
- Wu ZJ, Wu XB, Wang H, Lu B, Dong XY, Hou YD. hEPO transfer and expression by a recombinant adeno-associated virus vector. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao* 2002; 34:176-180
- 吴小兵, 董小岩, 伍志坚, 屈建国, 侯云德. 一种快速高效分离和纯化重组腺伴随病毒载体的方法. *科学通报* 2000;45:2071-2075
- Snyder RO, Im DS, Ni T, Xiao X, Samulski RJ, Muzyczka N. Features of the adeno-associated virus origin involved in substrate recognition by the viral Rep protein. *J Virol* 1993;67: 6096-6104
- Kamada N, Calne RY. Orthotopic liver transplantation in the rat. Technique using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage. *Transplantation* 1979;28:47-50
- Kozak M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 1986;44:283-292
- Daly TM. AAV-mediated gene transfer to the liver. *Methods Mol Biol* 2004;246:195-159