

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.17.006
文章编号: 1005-8982 (2023) 17-0030-07

实验研究·论著

靶向敲减KLF4基因的重组腺相关病毒载体的构建及其在肺动脉高压动物模型中的应用*

罗志梅¹, 刘虹延², 孙得胜¹

(遵义医科大学附属医院 1.呼吸与危重症医学科, 2.中医科, 贵州 遵义 563003)

摘要: **目的** 构建靶向敲减KLF4基因的重组腺相关病毒载体, 并应用于肺血管疾病, 为后期研究肺血管KLF4基因敲减在肺动脉高压大鼠中的作用及相关分子机制奠定基础。**方法** 根据大鼠KLF4基因序列, 设计针对大鼠特异性的siRNA序列, 以pHBAAV-U6-MCS-CMV-EGFP作为空白载体, 通过酶切技术构建带有GFP荧光标记的KLF4干扰腺病毒载体pHBAAV-r-KLF4 shRNA-GFP, 行测序分析, 并进行病毒扩增、纯化及滴度测定。本研究对长时间(3个月)接触香烟烟雾的大鼠进行气道注入AAV1-KLF4-shRNA的干预治疗, 观察大鼠右心室收缩压、平均右心室压等血流动力学指标改变。**结果** 经测序检测显示, 大鼠AAV1-KLF4-shRNA腺相关病毒载体构建成功。健康对照组、生理盐水模型组、对照病毒模型组、治疗干预组的右心室收缩压和平均右心室压比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 对长时间接触香烟烟雾的肺动脉高压模型大鼠应用AAV1-KLF4-shRNA腺相关病毒载体, 能有效改善右心室收缩压和平均右心室压, 该载体在相关疾病动物模型中应用有效, 为后期顺利开展AAV1-KLF4-shRNA在肺动脉高压中的预防和治疗作用, 以及相关分子机制的深入研究提供基础条件。

关键词: 肺动脉高压; KLF4; 腺相关病毒; 载体; 基因敲减

中图分类号: R563.9

文献标识码: A

Construction and identification of recombinant adeno-associated virus vector targeting KLF4 gene*

Luo Zhi-mei¹, Liu Hong-yan², Sun De-sheng¹

(1. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, 2. Department of Traditional Chinese Medicine, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563003, China)

Abstract: Objective The recombinant adeno-associated virus vector with KLF4 gene knockdown was constructed and applied to pulmonary vascular diseases, which laid a foundation for the later study of the role and related molecular mechanism of pulmonary vascular KLF4 gene knockdown in rat pulmonary hypertension. **Methods** According to the sequence of the rat KLF4 gene, a rat-specific siRNA sequence was designed. Using pHBAAV-U6-MCS-CMV-EGFP as the blank vector, the GFP labeled KLF4 interference adenovirus vector pHBAAV-r-KLF4 shRNA-GFP was constructed by enzyme digestion. The virus was amplified, purified, and titrated. We injected AAV1-KLF4-shRNA into the airway of rats exposed to cigarette smoke for 3 months, and observed the changes in hemodynamic indexes such as right ventricular systolic pressure and mean right ventricular pressure. **Results** The AAV1-KLF4-shRNA adeno-associated virus vector was constructed successfully. The application of adeno-associated virus vector in pulmonary hypertension rats modeled by cigarette smoke can effectively ameliorate

收稿日期: 2022-11-25

* 基金项目: 国家自然科学基金(No: 81960016, No: 82260014); 遵义医科大学博士科研启动基金项目[No: 院字(2018)04号]
[通信作者] 孙得胜, E-mail: desheng_sun@yeah.net

hemodynamic indexes such as right ventricular systolic pressure and mean right ventricular pressure ($P < 0.05$).

Conclusion AAV1-KLF4-shRNA adeno-associated virus vector can be successfully constructed, which plays an important role in the treatment of pulmonary hypertension animal model in the study.

Keywords: hypertension, pulmonary; KLF4; adeno-associated virus; vector; gene knockdown

基因治疗是借助载体把特定的基因序列导入靶细胞,通过对某种基因进行敲减或者过表达,发挥其相应的功能,达到对相关疾病进行治疗的目的。重组腺相关病毒(recombinant adeno-associated virus, rAAV)因其能够长时间稳定表达、对机体无致病性、良好的安全性等优点,渐渐被更多的研究人员青睐,已成为当前基因治疗研究领域中最热门的载体之一^[1]。

腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)分为多个不同的血清型,不同分型的 AAV 对其相应的特定组织有特殊的亲嗜作用,如 AAV1 对血管组织有特殊的亲嗜特性。如果以 AAV1 作为载体,联合气道内给药方式,有望构建肺血管基因干预模型。因为在这种情况下,经气道输入的药物会主要分布于肺部血管,复制肺血管疾病模型的效果远远优于传统的使用慢病毒载体或全身基因敲除方法及经血管注药等给药方式。

肺动脉高压的特点是肺动脉及右心室收缩压升高,常常引起右心功能不全,预后较差,还往往存在肺远端小血管的重塑^[2-5]。本课题组前期实验显示,转录因子 KLF4 可能在肺动脉高压的起病中扮演重要角色。肺动脉高压模型组发生肺血管重塑的肺动脉中的 KLF4 表达明显升高,与此同时,标志肺动脉平滑肌细胞增殖水平的增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)也明显增多。体外研究还发现, KLF4 通过调节 AKT 的磷酸化影响肺动脉平滑肌细胞的增殖和迁移^[6]。而沉默 KLF4 基因,能够有效地阻止肺动脉平滑肌细胞的失控性增殖和迁移,所以进一步探讨敲减肺血管中的 KLF4,并检测相应指标,观察其能否有效地缓解肺动脉高压势在必行。

本研究拟将已验证有效的 KLF4 小干扰链与 AAV1 病毒载体结合,构建沉默 KLF4 基因的重组腺相关病毒载体,进一步扩增、包装病毒载体,并在长时间(3 个月)香烟烟雾刺激诱导的肺动脉高压动物模型中使用,为后期 KLF4 基因敲减在大鼠肺动脉高压中的预防和治疗作用,以及相关分子机制的深入

研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料与动物

1.1.1 实验材料 载体 pHBAAV-U6-MCS-CMV-EGFP(上海汉恒科技公司),大肠杆菌菌株 DH5 α (上海汉恒科技公司),限制性内切酶(上海 Thermo 公司),T4 连接酶(上海 Fermentas 公司),凝胶回收试剂盒(上海捷瑞生物公司),琼脂糖/粉(上海生工生物工程股份有限公司),DNA ladder(江苏康润生物科技有限公司),KLF4 的小干扰序列(武汉聚能生物公司),胎牛血清(上海 Gibco 公司),胰蛋白酶(上海 Thermo 公司),质粒 DNA 大量抽提试剂盒(北京 Tiangen 公司),腺相关病毒纯化试剂盒(上海 Biomiga 公司),Lipofiter™(上海汉恒生物科技有限公司),Benonase(上海 Sigma 公司),真核转染试剂(上海汉恒科技公司),DNase I(上海 Fermentas 公司),原代大鼠肺动脉平滑肌细胞(广州吉尼欧生物公司),AAV-293 细胞(上海汉恒科技公司),PowerLab 生物数据采集分析系统(澳大利亚 ADInstruments 公司),香烟烟雾暴露动物染毒系统(本研究团队自主研发,专利号:ZL201820234399.3)。

1.1.2 实验动物 36 只 SPF 级成年雄性 SD 大鼠,8 周龄,体重 185 ~ 225 g,购自湖北实验动物研究中心[实验动物生产许可证号:SCXK(鄂)2015-0018]。模型复制、测压等动物实验操作均在华中科技大学附属同济医院实验动物中心进行[实验动物使用许可证号:SYXK(鄂)2021-0057]。本研究由华中科技大学附属同济医院动物实验伦理委员会批准。

1.2 实验方法

1.2.1 确定 siRNA 序列 根据本课题组前期研究结果^[6],设计针对大鼠 KLF4 基因特异性的 siRNA 序列,基于 siRNA 序列(GenBank Acc. NM_053713.1)进行 KLF4 shRNA 的设计,并采用 ELBASHIR 等^[7]报道的方法进行筛选,得到沉默效果理想的 siRNA 序列 5'-CACCCACACTTGTGACTAT-3'。本研究选用的阴性对照序列为 5'-TTCTCCGAACGTGTCACGTAA-3'。

1.2.2 通过酶切技术构建病毒载体 以 pHBAAV-U6-MCS-CMV-EGFP 作为空白载体, 通过酶切技术构建带有 GFP 荧光标记的 KLF4 干扰腺病毒载体 pHBAAV-r-KLF4 shRNA-GFP。具体方法: 根据之前实验中筛选的有效靶点合成相关引物, 然后进一步退火形成双链片段, 用 EcoRI、BamHI 酶切载体通过琼脂糖凝胶电泳检测产物, 在凝胶切下目标载体条以回收凝胶, 把 siRNA 目的序列插入 U6 启动子之后来调控其表达, 得到连接的产物, 将其转化到大肠杆菌 dh5a 的感受态细胞中, 并把克隆进行测序及比对^[8]。

1.2.3 载体测序鉴定 转化后的 KLF4-shRNA 平板挑菌, 37 °C 250 r/min 摇菌 14 h, 对细菌溶液进行测序, 并通过 DNA 测序进行验证。

1.2.4 载体包装、扩增及纯化 重组质粒 pHBAAV-r-KLF4 shRNA-GFP、包装质粒 pAAV-RC 及辅助质粒 pHelper 共转染 AAV-293 细胞, 得到表达 EGFP 和 KLF4-shRNA 的 AAV1。对构建的辅助质粒及载体进一步提取, 浓度超过 1 g/L, A260/280 在 1.7~1.8 可用于病毒包装。将用于包装的细胞株 AAV-293 细胞以 DMEM + 10% FBS, 37 °C, 5% CO₂, 相对湿度 95% 的条件培养。重组病毒颗粒的纯化参照文献[9]的方法进行。

1.2.5 载体滴度测定 通过 PCR 检测确定包装好的病毒载体的滴度。通过检测病毒基因组中 rAAV 载体的基因组拷贝数来测定 rAAV 的病毒颗粒数, 滴度单位用 v.g./mL 来表示。参照标准品来描绘标准曲线, 计算 AAV 病毒滴度。

1.2.6 动物模型复制及治疗干预 采用随机数字表法将 36 只 SD 大鼠随机分为对照组(6 只)和香烟烟雾刺激组(30 只)。置于本课题组自行研制的香烟烟雾染毒箱系统内, 参考本课题组之前的方法

进行香烟烟雾刺激^[10], 香烟烟雾刺激复制模型 3 个月, 将香烟烟雾刺激组 27 只大鼠(前段实验中接受烟雾刺激的大鼠死亡 3 只)随机分为生理盐水模型组、对照病毒模型组(AAV1-control vector)、治疗干预组(AAV1-KLF4-shRNA)组, 每组 9 只。治疗干预组和对照病毒模型组分别经气道给药 125 μL/只、100 μL/只。继续按前述香烟烟雾刺激方法复制模型 1 个月。健康对照组大鼠不做任何处理。

1.2.7 右心导管法检测血流动力学指标 大鼠腹腔注射 2% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉。进入麻醉状态后, 把大鼠固定在手术台上, 小心暴露气管后, 进行气管内插管, 把气管内导管与小动物呼吸机连接。潮气量为 2 mL/100 g, 呼吸频率设为 70 次/min, 呼吸比为 1:1。采用右心导管法检测血流动力学指标, 具体方法: 切开大鼠的颈部皮肤, 分离大鼠颈静脉, 结扎静脉远端, 在静脉的近心端剪一楔形口, 随之顺势将内置有导丝的测量管插入(导管末端连接探测仪), 并轻轻地向前推进, 后经锁骨下静脉进入右心房, 然后缓慢进入右心室, 此时可见导管内有血液回流, 立即退出导丝, 观察波形并调整导管方向, 待波形呈典型右心室压力波形并稳定后记录, 最后以 PowerLab 软件分析右心室收缩压和平均右心室压。

1.3 统计学方法

数据分析采用 Graph Pad Prism 8.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 比较用方差分析, 进一步两两比较用 LSD-t 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 序列

与对照病毒载体 siRNA 相对应的 shRNA 序列见表 1; KLF4-shRNA 序列见表 2。

表 1 与对照病毒载体 siRNA 相对应的 shRNA 序列

基因	shRNA 序列
Top Strand	AATTCGTTCTCCGAACGTGTCACGTAATCAAGAGATTACGTGACACGTTCCGAGAATTTTTTG
Bottom Strand	GATCAAAAAAATCTCCGAACGTGTCACGTAATCTCTTGAATTACGTGACACGTTCCGAGAACC

表 2 与对照病毒载体 siRNA 相对应的 KLF4-shRNA 序列

基因	KLF4-shRNA 序列
Top Strand	AATTCGCACCCACACTTGTGACTATTTCAAGAGAATAGTCACAAGTGTGGGTGTTTTT
Bottom Strand	GATCAAAAAACACCCACACTTGTGACTATTTCTTTGAAATAGTCACAAGTGTGGGTGCC

2.2 KLF4-shRNA 测序结果

KLF4-shRNA 测序结果(下划线为目的序列)。

CGGTGAGATTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTT
GTGGAAGGACGAAACACCCGGTCCGCAGAATTCGCAC
CCACACTTGTGACTATTTCAAGAGAATAGTCACAAGT
GTGGGTGTTTTTGATCCATTAGCGCGCCGCGTGGAT
AACCGTATTACCGCCATGCATTAGTTATTAATAGTAA
TCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGG
AGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGC
TGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTC
AATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGG
GACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGG
TAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATA
TGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTA
AATGGCCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTT
ATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTA

GTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGT
ACATCAATGGGCGTGATAGCGGTTTGACTCACGGG
GATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAG
TTTGTTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAA
TGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGC
GGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGA
GCTGGTTTGTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGCCACC
ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTG
GTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTA AAC
GGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGC
GATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCT
GCACCACCGGCAAGCTGCCCCGTGCCCTGGCCCCACCC
TCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCCTCAG
CCGCTACCCCGACCA

对插入片段与测序结果比对, 结果证实所选送测序的重组载体碱基序列完全正确, 位于测序图中 62 ~ 120 位(59 个碱基)(见图 1)。

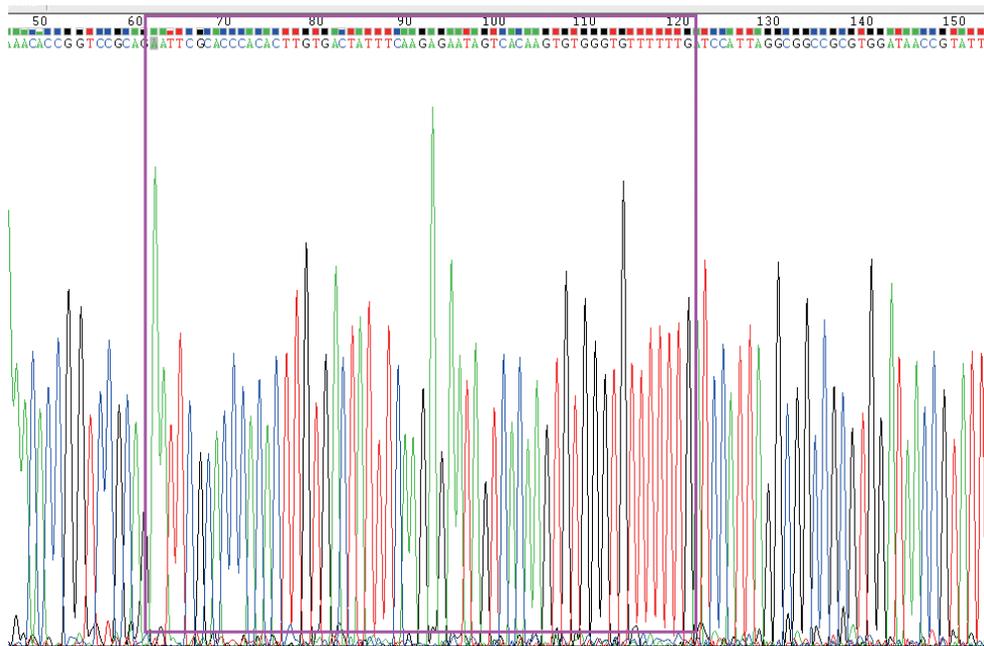


图 1 KLF4-shRNA 测序结果

2.3 拷贝数的对数对 AAV 标准品的 Ct 的影响

根据实时荧光定量 PCR 结果绘制标准曲线, 以每组 AAV 标准品的 Ct (average) 为纵坐标 Y, 取其对应的拷贝数的对数为横坐标 X, 计算出标准曲线的函数公式及 R 方值。R²=0.9909。见图 2。

2.4 病毒载体滴度计算公式

通过比对标准曲线计算病毒基因组拷贝数, 将待测 AAV 样品 Ct 均值代入公式中测定结果:

$$\text{HBAAV2/1-r-KLF4 shRNA1-GFP 滴度} = 107.48 \times 40\,000 = 1.2 \times 10^{12} \text{ v.g./mL}$$

$$\text{对照病毒 HBAAV2/1-GFP 滴度} = 107.58 \times 40\,000 = 1.5 \times 10^{12} \text{ v.g./mL}$$

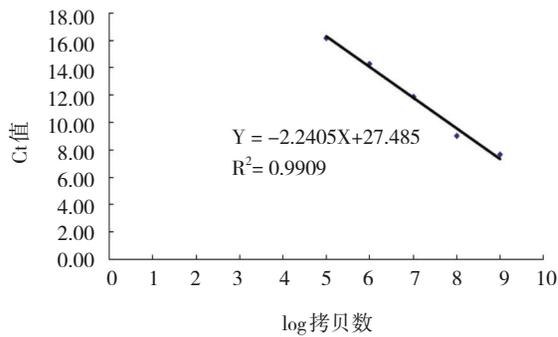


图2 根据实时荧光定量PCR结果绘制的标准曲线

2.5 各组大鼠右心室收缩压和平均右心室压的比较

给予香烟刺激的3组大鼠明显倦怠、少动。将熏烟的大鼠再次分组后的1个月期间,生理盐水模型组和对照病毒模型组分别死亡2只大鼠,治疗干预组有1只死亡。健康对照组、生理盐水模型组、对照病毒模型组、治疗干预组的右心室收缩压和平均右心室压比较,经方差分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。进一步两两比较结果:生理盐水模型组和对照病毒模型组大鼠的右心室收缩压和平均右心室压较健康对照组升高($P < 0.05$);治疗干预组的右心室收缩压和平均右心室压较生理盐水模型组和对照病毒模型组降低($P < 0.05$)。见表3。

表3 4组大鼠右心室收缩压和平均右心室压的比较
(mmHg, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	右心室收缩压	平均右心室压
健康对照组	6	20.0 ± 2.7	14.6 ± 4.7
生理盐水模型组	7	40.1 ± 8.5 ^{①②}	24.4 ± 4.5 ^{①②}
对照病毒模型组	7	44.9 ± 10.7 ^{①②}	23.7 ± 5.8 ^{①②}
治疗干预组	8	25.9 ± 5.2	13.5 ± 2.8
F值		17.570	9.381
P值		0.029	0.000

注:①与健康对照组比较, $P < 0.05$;②与治疗干预组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

作为一种常见的肺血管疾病,肺动脉高压目前尚无效果好、副作用小的理想药物,口服药或者静脉用药因药物需要进入血液循环,常常伴随其他脏器的副作用,引起不良反应。而呼吸科常用的雾化吸入等局部气道给药方式,虽然只主要作用于肺脏局部,但常常药物只是沉积于气管和

肺泡组织,不容易有效作用于肺部血管。近年来研究发现,1型腺相关病毒(AAV1)对血管有特殊的亲嗜性,以AAV1为载体携带特定基因,经气道注药,可以靶向作用于肺血管^[11-12]。

本研究构建了一种带有GFP荧光标记的靶向沉默KLF4基因的重组腺相关病毒rAAV1-KLF4-shRNA,将其转染到大鼠肺动脉中,结合本课题组既往研究证实在KLF4基因敲除的大鼠肺动脉高压明显改善^[6],本研究中转染KLF4干扰腺病毒载体的动物模型血流动力学明显改善,进一步证明了转染KLF4干扰腺病毒载体对改善香烟烟雾诱导的大鼠肺动脉高压有效果,从侧面进一步说明病毒载体构建成功。因为AAV1对血管组织具有特殊的亲和力,而且本研究采用了经气管给药的操作,所以rAAV1-KLF4-shRNA在肺血管中能够稳定地发挥作用。

本研究把空载体经EcoRI和BamHI酶切,接着将siRNA目的序列插入到U6启动子,调控其表达,此病毒载体含有CMV启动子调控的增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)基因表达;而GFP的表达受CMV启动子调节,通过观测GFP的表达,可以判断相关病毒载体在体内的转导效率。测序检测的结果表明,本研究获得的载体序列是正确的。

实时荧光定量PCR是一种在DNA扩增反应中,在每个PCR循环后使用荧光化学物测量产物量的实验检测手段。PCR扩增的过程中,掺入荧光染料,然后经染料发出的信号实时检测PCR的过程。由于在扩增的指数阶段,模板Ct值和该模板的初始拷贝数之间呈线性关系,所以成为定量的依据。本研究通过SYBRGreen I法来检测AAV基因组的含量,并最终计算出所制备的AAV的具体滴度。

本研究中利用了AAV1对血管组织有特殊的亲嗜特性这一特点,联合气道内给药的用药方式,进行治疗干预。首先,实验结果显示,生理盐水模型组和对照病毒模型组大鼠的右心室收缩压和平均右心室压均比健康对照组升高,按肺动脉高压动物模型的研究惯例^[5, 13],可认为肺动脉高压模型复制成功。同时,治疗干预组的右心室收缩压和平均右心室压较生理盐水模型组和对照病毒模型组降低,提示AAV1-KLF4-shRNA治疗干预有

效, 表明这种靶向敲减 KLF4 基因的重组腺相关病毒载体可以在肺动脉高压动物模型的治疗中发挥作用。

AAV 因着具有免疫原性低、表达时间长、有组织选择性、亲和特性等优点, 近些年越来越多地被用作基因治疗的载体, 已经成为当前最有前景的基因治疗工具之一^[14-23]。AAV 整合到宿主的基因组中的概率很低^[24], 与腺病毒、慢病毒等广泛应用于基因治疗的其他常用病毒载体相比, AAV 几乎不会引起炎症反应, 对人体无致病性^[17, 25]。迄今为止, 尚未发现 AAV 与人类的疾病有关。基于上述优点, AAV 在近几年也逐渐被用于临床患者的基因治疗^[26], 包括首例以 AAV1 为病毒载体的基因治疗^[27]。

综上所述, 本研究成功构建了靶向敲减 KLF4 基因的重组腺相关病毒载体, 并证实其在相关疾病动物模型中应用有效, 为后期顺利开展有关 AAV1-KLF4-shRNA 在肺动脉高压中的预防和治疗作用及相关分子机制的深入研究提供了基础条件。

参 考 文 献 :

- [1] YAMAZAKI Y, HIRAI Y, MIYAKE K, et al. Targeted gene transfer into ependymal cells through intraventricular injection of AAV1 vector and long-term enzyme replacement via the CSF[J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 5506.
- [2] 施浩然, 李小林, 朱静, 等. 水飞蓟素对肺动脉高压大鼠心室重构的作用研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36(11): 1481-1483.
- [3] 苗少一, 郭迪, 杨闪闪, 等. 替米沙坦对野百合碱诱导大鼠肺动脉高压的影响及机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(10): 1-5.
- [4] LAI Y C, POTOKA K C, CHAMPION H C, et al. Pulmonary arterial hypertension: the clinical syndrome[J]. *Circ Res*, 2014, 115(1): 115-130.
- [5] NIE X W, TAN J X, DAI Y A, et al. CCL5 deficiency rescues pulmonary vascular dysfunction, and reverses pulmonary hypertension via caveolin-1-dependent BMPR2 activation[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 116: 41-56.
- [6] SUN D S, LI Q H, DING D D, et al. Role of Krüppel-like factor 4 in cigarette smoke-induced pulmonary vascular remodeling[J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(2): 581-591.
- [7] ELBASHIR S M, HARBORTH J, LENDECKEL W, et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells[J]. *Nature*, 2001, 411(6836): 494-498.
- [8] 杨简, 范致星, 杨俊, 等. 大鼠 miR-24 腺病毒载体构建和鉴定[J]. *中国老年学杂志*, 2017, 37(17): 4175-4176.
- [9] PASSINI M A, WOLFE J H. Widespread gene delivery and structure-specific patterns of expression in the brain after intraventricular injections of neonatal mice with an adeno-associated virus vector[J]. *J Virol*, 2001, 75(24): 12382-12392.
- [10] 孙得胜, 刘虹延, 刘先胜, 等. 香烟烟雾刺激诱导肺动脉高压动物模型的构建[J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41(1): 138-141.
- [11] HADRI L, KRATLIAN R G, BENARD L, et al. Therapeutic efficacy of AAV1. SERCA2a in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension[J]. *Circulation*, 2013, 128(5): 512-523.
- [12] AGUERO J, ISHIKAWA K, HADRI L, et al. Intratracheal gene delivery of SERCA2a ameliorates chronic post-capillary pulmonary hypertension: a large animal model[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2016, 67(17): 2032-2046.
- [13] HASHIMOTO-KATAOKA T, HOSEN N, SONOBE T, et al. Interleukin-6/interleukin-21 signaling axis is critical in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(20): E2677-E2686.
- [14] HAJJAR R J, ZSEBO K, DECKELBAUM L, et al. Design of a phase 1/2 trial of intracoronary administration of AAV1/SERCA2a in patients with heart failure[J]. *J Card Fail*, 2008, 14(5): 355-367.
- [15] HERZOG R W. Immune responses to AAV capsid: are mice not humans after all?[J]. *Mol Ther*, 2007, 15(4): 649-650.
- [16] JASKI B E, JESSUP M L, MANCINI D M, et al. Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease (CUPID Trial), a first-in-human phase 1/2 clinical trial[J]. *J Card Fail*, 2009, 15(3): 171-181.
- [17] JESSUP M, GREENBERG B, MANCINI D, et al. Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease (CUPID): a phase 2 trial of intracoronary gene therapy of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in patients with advanced heart failure[J]. *Circulation*, 2011, 124(3): 304-313.
- [18] KAPLITT M G, FEIGIN A, TANG C K, et al. Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial[J]. *Lancet*, 2007, 369(9579): 2097-2105.
- [19] LV F J, QIU Y H, ZHANG Y X, et al. Adeno-associated virus-mediated anti-DR5 chimeric antibody expression suppresses human tumor growth in nude mice[J]. *Cancer Lett*, 2011, 302(2): 119-127.
- [20] NAKAI H, FUESS S, STORM T A, et al. Unrestricted hepatocyte transduction with adeno-associated virus serotype 8 vectors in mice[J]. *J Virol*, 2005, 79(1): 214-224.
- [21] NIEMEYER G P, HERZOG R W, MOUNT J, et al. Long-term correction of inhibitor-prone hemophilia B dogs treated with liver-directed AAV2-mediated factor IX gene therapy[J]. *Blood*, 2009, 113(4): 797-806.
- [22] SARKAR R, TETREAUULT R, GAO G P, et al. Total correction of hemophilia A mice with canine FVIII using an AAV 8 serotype[J]. *Blood*, 2004, 103(4): 1253-1260.

- [23] SIMONELLI F, MAGUIRE A M, TESTA F, et al. Gene therapy for Leber's congenital amaurosis is safe and effective through 1.5 years after vector administration[J]. *Mol Ther*, 2010, 18(3): 643-650.
- [24] HAJJAR R J. Potential of gene therapy as a treatment for heart failure[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(1): 53-61.
- [25] ZSEBO K, YAROSHINSKY A, RUDY J J, et al. Long-term effects of AAV1/SERCA2a gene transfer in patients with severe heart failure: analysis of recurrent cardiovascular events and mortality[J]. *Circ Res*, 2014, 114(1): 101-108.
- [26] KAUFMANN K B, BÜNING H, GALY A, et al. Gene therapy on the move[J]. *EMBO Mol Med*, 2013, 5(11): 1642-1661.
- [27] GAUDET D, MÉTHOT J, DÉRY S, et al. Efficacy and long-term safety of alipogene tiparvovec (AAV1-LPLS447X) gene therapy for lipoprotein lipase deficiency: an open-label trial[J]. *Gene Ther*, 2013, 20(4): 361-369.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 罗志梅, 刘虹延, 孙得胜. 靶向敲减 KLF4 基因的重组腺相关病毒载体的构建及其在肺动脉高压动物模型中的应用[J]. *中国现代医学杂志*, 2023, 33(17): 30-36.

Cite this article as: LUO Z M, LIU H Y, SUN D S. Construction and identification of recombinant adeno-associated virus vector targeting KLF4 gene[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2023, 33(17): 30-36.