

# 不同血清型腺相关病毒对小鼠膝关节软骨细胞感染效率的比较研究

胡家铭<sup>1,2</sup>, 陈权<sup>1,2</sup>, 周金依<sup>1,2</sup>, 吴锦婷<sup>1,2</sup>, 余欢<sup>1,2,3</sup>, 付方达<sup>1,2,3</sup>, 阮红峰<sup>1,3,4,5</sup>, 肖鲁伟<sup>1,2,3,4</sup>, 吴承亮<sup>1,2,3,4</sup>, 童培建<sup>1,2,3</sup>

(1. 浙江中医药大学附属第一医院 浙江省中医院, 浙江 杭州 310006; 2. 浙江中医药大学第一临床医学院, 浙江 杭州 310006; 3. 浙江中医药大学附属第一医院骨伤研究所, 浙江 杭州 310006; 4. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053; 5. 上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032)

**【摘要】 目的:**比较不同血清型腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)对小鼠膝关节软骨细胞的感染效率,寻找理想的膝关节软骨细胞基因编辑工具。**方法:**选取 4 周龄 C57BL/6 雄鼠 45 只,体重(14.3±0.2) g,根据右侧膝关节腔注射试剂(6 μl)的不同分为以下 9 组,每组 5 只。对照组(生理盐水),维 2 组(维真生物 AAV2,滴度为 1×10<sup>13</sup> vg/ml),维 5 组(维真生物 AAV5,滴度为 1×10<sup>13</sup> vg/ml),维 6 组(维真生物 AAV6,滴度为 1×10<sup>13</sup> vg/ml),维 7 组(维真生物 AAV7,滴度为 1×10<sup>13</sup> vg/ml),维 8 组(维真生物 AAV8,滴度为 1×10<sup>13</sup> vg/ml),维 9 组(维真生物 AAV9,滴度为 1×10<sup>13</sup> vg/ml),汉 DJ 组(汉恒生物 AAV2-DJ,滴度为 1×10<sup>12</sup> vg/ml),汉 5 组(汉恒生物 AAV5,滴度为 1×10<sup>12</sup> vg/ml)。所有病毒过表达绿色荧光蛋白(GFP)。在注射 30 d 后取膝关节,于体视显微镜下大体观察软骨损伤情况后,做 10 μm 冰冻切片,采用荧光显微镜观察膝关节软骨和半月板绿色荧光分布情况。**结果:**体视显微镜观察结果表明,本研究采取的膝关节腔注射方法对小鼠软骨无明显损伤。组织切片的荧光观察显示,经不同血清型 AAV 注射后的小鼠膝关节软骨细胞均发出较强的绿色荧光,荧光强度分析中以维 2 组和维 7 组软骨和半月板的荧光强度最高,平均光密度值分别为 0.077±0.020 和 0.061±0.022,上述 2 组与其他各组间比较差异有统计学意义。**结论:**通过在体膝关节腔注射 AAV 可成功感染小鼠膝关节软骨细胞,AAV2 和 AAV7 对膝关节软骨组织感染效率高且特异性较强,该方法可作为膝关节软骨细胞基因编辑的有效工具。

**【关键词】** 腺病毒; 血清; 膝关节; 软骨细胞; 感染

中图分类号:R681.3

DOI:10.3969/j.issn.1003-0034.2019.08.015

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



**Comparative study on infection rate of different adeno-associated virus for knee joint cartilage in mice** HU Jia-ming, CHEN Quan, ZHOU Jin-yi, WU Jin-ting, YU Huan, FU Fang-da, RUAN Hong-feng\*, XIAO Lu-wei, WU Cheng-Liang, and TONG Pei-jian. \*The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Zhejiang Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310006, Zhejiang, China

**ABSTRACT Objective:**To explore infection rate of different adeno-associated virus (AAV) on knee joint cartilage in mice and to find a good gene editing tool for mice chondrocytes of knee joint. **Methods:**Forty-five 4-week-old SPF C57BL/6 weighed (14.3±0.2) g were selected. According to different injections (6 μl) for right knee joint, mice were divided into 9 different groups, 5 mice in each group. The groups were such as following: control group (normal saline), Vigene 2 group (AAV2 from vigene biosciences, titer for 1×10<sup>13</sup> vg/ml), Vigene 5 group (AAV5 from vigene biosciences, titer for 1×10<sup>13</sup> vg/ml), Vigene 6 group (AAV6 from vigene biosciences, titer for 1×10<sup>13</sup> vg/ml), Vigene 7 group (AAV7 from vigene biosciences, titer for 1×10<sup>13</sup> vg/ml), Vigene 8 group (AAV8 from vigene biosciences, titer for 1×10<sup>13</sup> vg/ml), Vigene 9 group (AAV9 from vigene biosciences, titer for 1×10<sup>13</sup> vg/ml), Hanbio DJ group (AAV2-DJ from Hanbio, titer for 1×10<sup>12</sup> vg/ml), Hanbio 5 group (AAV5 from Hanbio, titer for 1×10<sup>12</sup> vg/ml). All AAVs were over-expressed green fluorescent protein (GFP). Knee joint specimens were taken and observed injury of cartilage under stereomicroscope at 30 days after injection, then 10 μm thick frozen sections

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81804121, 81573994, 81273770);国家博士后基金面上项目(编号:2018M632154);浙江省自然科学基金(编号:LY19H270006, LQ17H270005, LY15H270012);浙江省中医药卫生科技计划项目(编号:2017ZB026);浙江省大学生科技创新活动计划(新苗人才计划)项目(编号:2018R410030);浙江省医学会临床科研基金项目(编号:2017ZYC-A23)

Fund program:Supported by National Natural Science Foundation (No. 81804121, 81573994, 81273770)

通讯作者:阮红峰 E-mail:rhf@zcmu.edu.cn

Corresponding author:RUAN Hong-feng E-mail:rhf@zcmu.edu.cn

were prepared. Distribution of green fluorescent protein of meniscus and cartilage of knee joint was observed under fluorescence microscope. **Results:** Stereomicroscope observation indicated that no obvious lesion was observed in knee joint cartilage of mice after intra-articular injection of AAV. According to frozen sections of knee joints, strong green fluorescence was observed in knee joint cartilage in all AAV experimental groups. Compared with other groups, significantly stronger green fluorescence were observed both in AAV2 and AAV7 groups, whose average fluorescence density was  $0.077 \pm 0.020$  and  $0.061 \pm 0.022$ . There were significant differences between two groups and other groups. **Conclusion:** AAV could infect chondrocyte of knee joint in vivo by injecting into knee joint cavity. Higher infection efficiency of AAV2 and AAV7 on knee joint cartilage were observed. Local injection of AAV into knee joint cavity could be used as an effective tool for gene editing of knee joint chondrocyte.

**KEYWORDS** Adenoviruses; Serum; Knee joint; Chondrocytes; Injection

膝关节骨性关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是四肢关节中最常见的骨关节炎<sup>[1]</sup>。KOA 病理变化最初发生于关节软骨,可见局灶性、侵蚀性软骨破坏,而关节软骨破坏发生发展的分子机制仍未阐明。如果能在 KOA 早期病变部位关节软骨细胞进行特异性基因编辑,则能更为特异地阐明目的基因在 KOA 病理过程中所发挥的作用。腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)属于微小病毒科,已有研究利用 AAV 感染的方式将外源基因导入动物组织中,具有安全性高、免疫原性低、宿主范围广、过表达稳定等优点,已广泛应用于整体动物基础研究<sup>[2]</sup>。由于 AAV 分多种血清型,对不同的组织和细胞的感染效率也存在差异。本研究通过将不同血清型 AAV 注射到小鼠右侧膝关节腔,观察不同血清型 AAV 对小鼠关节软骨细胞感染的效率,从而筛选出能高效感染小鼠膝关节软骨细胞的血清型,为在体进行关节软骨的基因编辑提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验药物及主要试剂

维真生物 AAV2 (病毒滴度为  $1 \times 10^{13}$  vg/ml), AAV5 (病毒滴度为  $1 \times 10^{13}$  vg/ml), AAV6 (病毒滴度为  $1 \times 10^{13}$  vg/ml), AAV7 (病毒滴度为  $1 \times 10^{13}$  vg/ml), AAV8 (病毒滴度为  $1 \times 10^{13}$  vg/ml), AAV9 (病毒滴度为  $1 \times 10^{13}$  vg/ml) 等购于山东维真生物科技有限公司;汉恒生物 AAV2-DJ (病毒滴度为  $1 \times 10^{12}$  vg/ml), AAV5 (病毒滴度为  $1 \times 10^{12}$  vg/ml) 购于汉恒生物科技有限公司。所有病毒过表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP); OCT 包埋剂购于上海睿铂赛生物科技有限公司 (Tissue-Tek, 118 ml, 货号为 4583);其他相关试剂均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。

### 1.2 实验仪器

Hamilton 微量注射器及配套针头 (北京英伟达科技有限公司提供,型号分别为 1701 RN 和 7803-04);冰冻切片机(赛默飞公司提供,型号为 Thermo Scientific Microm HM525);体视显微镜和荧光正置

生物显微镜(蔡司公司提供,型号分别为 Zeiss stemi 2000 c 和 Zeiss Axio Scope A1)。

### 1.3 实验动物与分组

选取 4 周龄 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠 45 只,体重 ( $14.3 \pm 0.2$ ) g, 购于浙江中医药大学动物实验中心[生产许可证 SCXK(沪)2017-0005]。所有动物提前购入,适应性饲养 7 d, 室温  $21 \sim 23$  °C, 相对湿度维持在 30%~40%, 喂常规颗粒饲料及饮用水。根据右侧膝关节腔注射的不同试剂分为:对照组(生理盐水), 维 2 组(维真生物 AAV2 病毒), 维 5 组(维真生物 AAV5 病毒), 维 6 组(维真生物 AAV6 病毒), 维 7 组(维真生物 AAV7 病毒), 维 8 组(维真生物 AAV8 病毒), 维 9 组(维真生物 AAV9 病毒), 汉 DJ 组(汉恒生物 AAV2-DJ 病毒), 汉 5 组(汉恒生物 AAV5 病毒), 每组各 5 只。

### 1.4 实验方法

**1.4.1 膝关节腔注射方法** 抓握固定小鼠, 右侧膝关节备皮。75%乙醇消毒后, 握紧小鼠右下肢, 屈曲 60°, 取微量注射器于髌骨下方腱外缘进针, 稍向内下穿过关节囊后即感到有落空感, 此时不再进针, 缓慢注射, 注射 6  $\mu$ l 试剂后静置 10 s, 旋转拔出注射器, 用 75%乙醇消毒注射位置。

**1.4.2 标本制作方法** AAV 膝关节腔注射 30 d 后, 用颈椎脱臼法处死, 取膝关节组织样本, 体视显微镜下进行大体观察后, 置于 4%多聚甲醛中固定 24 h, 中性脱钙液脱钙 14 d, 10%~30%蔗糖溶液中梯度脱水直至组织沉淀到试管底部。OCT 包埋剂包埋后, 于  $-80$  °C 冰箱冷冻, 再沿矢状面将膝关节组织行 10  $\mu$ m 厚切片。

### 1.5 观察项目与方法

**1.5.1 AAV 感染软骨细胞的观察** 各种血清型的 AAV 均过表达 GFP, 成功感染的细胞将表达 GFP, 蓝色荧光激发后 GFP 表达位置会出现绿色荧光。将不同处理组小鼠膝关节的冰冻切片置于荧光显微镜下, 观察膝关节软骨细胞绿色荧光的表达情况, 并进行拍照。

**1.5.2 软骨细胞 AAV 感染强度的分析** 利用 Image-J 软件,截取上述各组拍照获得的软骨和半月板作为兴趣区,将荧光图片转化为灰度图片,利用软件计算每幅图片的平均光密度值。

**1.6 统计学处理**

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,定量资料采用均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),以 SNK-q 检验进行组间的两两比较。以  $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 膝关节腔注射对膝关节软骨的影响**

在膝关节注射后立即取小鼠膝关节标本,在体视显微镜下大体观察表明:关节内无积液及粘连,滑膜组织无明显充血水肿。全膝关节软骨表面色泽良好,完整光滑,未观察到戳痕;半月板表面光滑、透明,有光泽,弹性可,无裂隙、溃疡及破损,轮廓清晰。剥离半月板后,暴露胫骨平台,胫骨平台完好,表面平整、有光泽、无裂纹和骨赘等改变;股骨髁结构完整且表面软骨光滑;股骨滑车沟较深且表面软骨光滑。见图 1。

**2.2 AAV 干预膝关节软骨细胞的 GFP 表达情况**

膝关节组织冰冻切片荧光观察结果表明,AAV 注射后的小鼠膝关节软骨形态良好,轮廓清晰,无不平整和破损。观察膝关节软骨和半月板(白色箭头)发现,对照组未见到绿色荧光,各 AAV 干预组软骨和半月板均可见绿色荧光,在软骨和半月板的表层 GFP 表达最强,但各组 GFP 整体强度表达有明显不同。软骨下骨有非异性荧光(白色箭状所指),但对关节软骨 AAV 感染无影响。见图 2。

**2.3 膝关节软骨细胞的 GFP 荧光统计结果**

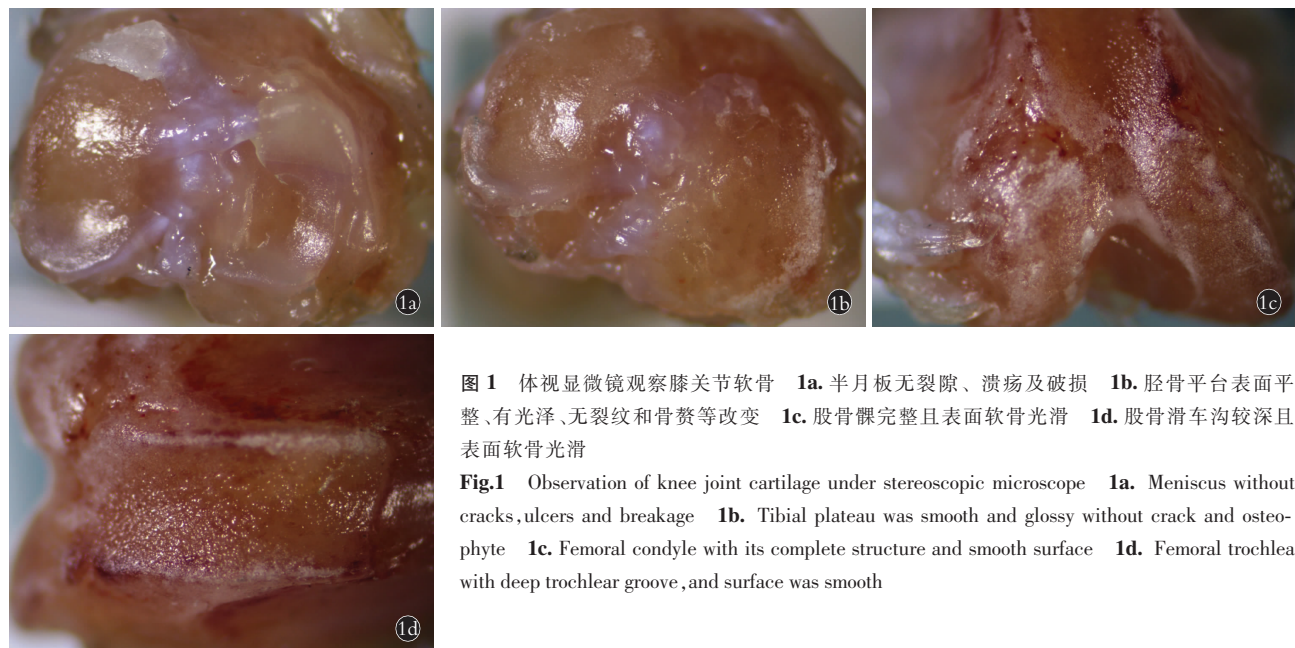
比较各组平均光密度值,结果发现 9 组荧光平均光密度比较差异有统计学意义( $P<0.05$ ),其中维 2 组和维 7 组平均光密度值比其他各组高 2~3 倍左右( $P<0.05$ )。见表 1。

**表 1 膝关节软骨 GFP 荧光平均光密度值( $\bar{x}\pm s$ )**  
**Tab.1 Average GFP density in cartilage of knee joint( $\bar{x}\pm s$ )**

组别	鼠数(只)	平均光密度值
对照组	5	0.000±0.000 <sup>1b1</sup>
维 2 组	5	0.077±0.020 <sup>2</sup>
维 5 组	5	0.031±0.003 <sup>2b3</sup>
维 6 组	5	0.023±0.004 <sup>3b4</sup>
维 7 组	5	0.061±0.022 <sup>4</sup>
维 8 组	5	0.027±0.007 <sup>5b5</sup>
维 9 组	5	0.017±0.004 <sup>6b6</sup>
汉 DJ 组	5	0.015±0.002 <sup>7b7</sup>
汉 5 组	5	0.016±0.002 <sup>8b8</sup>

注:单因素方差分析,  $F=26.642, P<0.05$ ; 与维 2 组比较: <sup>1</sup> $q=16.487, P<0.05$ ; <sup>2</sup> $q=9.849, P<0.05$ ; <sup>3</sup> $q=11.562, P<0.05$ ; <sup>4</sup> $q=3.426, P<0.05$ ; <sup>5</sup> $q=10.706, P<0.05$ ; <sup>6</sup> $q=12.847, P<0.05$ ; <sup>7</sup> $q=13.275, P<0.05$ ; <sup>8</sup> $q=13.061, P<0.05$ ; 与维 7 组比较: <sup>b1</sup> $q=13.061, P<0.05$ ; <sup>b2</sup> $q=3.426, P<0.05$ ; <sup>b3</sup> $q=6.423, P<0.05$ ; <sup>b4</sup> $q=8.136, P<0.05$ ; <sup>b5</sup> $q=7.280, P<0.05$ ; <sup>b6</sup> $q=9.421, P<0.05$ ; <sup>b7</sup> $q=9.849, P<0.05$ ; <sup>b8</sup> $q=9.635, P<0.05$

Note: One-way ANOVA,  $F=26.642, P<0.05$ ; Compared with vigene 2 group: <sup>1</sup> $q=16.487, P<0.05$ ; <sup>2</sup> $q=9.849, P<0.05$ ; <sup>3</sup> $q=11.562, P<0.05$ ; <sup>4</sup> $q=3.426, P<0.05$ ; <sup>5</sup> $q=10.706, P<0.05$ ; <sup>6</sup> $q=12.847, P<0.05$ ; <sup>7</sup> $q=13.275, P<0.05$ ; <sup>8</sup> $q=13.061, P<0.05$ ; Compared with vigene 7 group: <sup>b1</sup> $q=13.061, P<0.05$ ; <sup>b2</sup> $q=3.426, P<0.05$ ; <sup>b3</sup> $q=6.423, P<0.05$ ; <sup>b4</sup> $q=8.136, P<0.05$ ; <sup>b5</sup> $q=7.280, P<0.05$ ; <sup>b6</sup> $q=9.421, P<0.05$ ; <sup>b7</sup> $q=9.849, P<0.05$ ; <sup>b8</sup> $q=9.635, P<0.05$



**图 1 体视显微镜观察膝关节软骨** 1a.半月板无裂隙、溃疡及破损 1b.胫骨平台表面平整、有光泽、无裂纹和骨赘等改变 1c.股骨髁完整且表面软骨光滑 1d.股骨滑车沟较深且表面软骨光滑  
**Fig.1 Observation of knee joint cartilage under stereoscopic microscope** 1a. Meniscus without cracks, ulcers and breakage 1b. Tibial plateau was smooth and glossy without crack and osteophyte 1c. Femoral condyle with its complete structure and smooth surface 1d. Femoral trochlea with deep trochlear groove, and surface was smooth



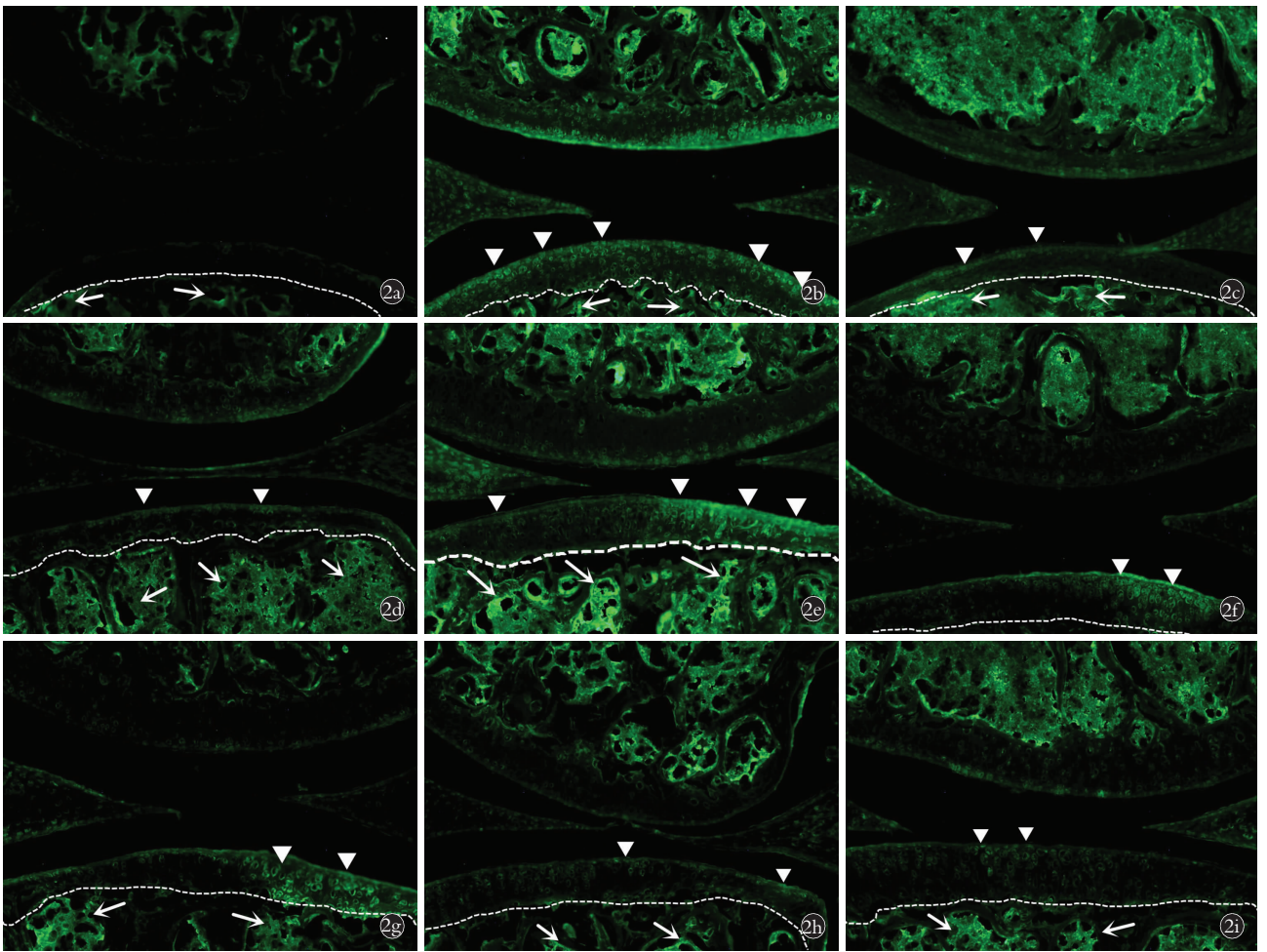


图 2 膝关节冰冻切片荧光照片(×100),白色箭头指示软骨细胞 GFP 表达阳性区域,白色箭状物指示软骨下骨非特异性荧光区域,白色虚线上下侧分别是软骨区域和软骨下骨区域 2a. 对照组软骨 GFP 阴性 2b. 维 2 组软骨 GFP 强阳性 2c. 维 5 组软骨和半月板均有荧光 2d. 维 6 组软骨和半月板均有荧光 2e. 维 7 组软骨和半月板均有较强荧光 2f. 维 8 组软骨和半月板均有荧光 2g. 维 9 组软骨和半月板均有荧光 2h. 汉 DJ 组软骨和半月板均有较弱荧光 2i. 汉 5 组软骨和半月板均有较弱荧光

Fig.2 Frozen section fluorescence photograph of knee joint (×100),the white arrowhead indicated positive GFP expression area of chondrocytes,white arrow indicated non-specific fluorescence area of subchondral bone, and dotted white line indicated that cartilage area (upper side) and subchondral bone area (lower side) 2a. Control group showed GFP was negative 2b. Vigene 2 group showed GFP was strong positive 2c. Vigene 5 group showed fluorescence in cartilage and meniscus 2d. Vigene 6 group showed fluorescence in cartilage and meniscus 2e. Vigene 7 group showed strong fluorescence in cartilage and meniscus 2f. Vigene 8 group showed fluorescence in cartilage and meniscus 2g. Vigene 9 group showed fluorescence in cartilage and meniscus 2h. Hanbio DJ group showed weak fluorescence in cartilage and meniscus 2i. Hanbio 5 group showed weak fluorescence in cartilage and meniscus

### 3 讨论

#### 3.1 膝关节腔注射介导基因编辑具有分子机制研究和临床基因治疗的双重潜力

膝关节腔注射是一种较为成熟的技术。在临床上膝关节腔注射被证明是治疗 KOA 的有效途径<sup>[3]</sup>,同时广泛应用于 KOA 的机制研究中,包括 KOA 的造模及给药等过程<sup>[4]</sup>。目前尚没有一种药物可以逆转 KOA 的发病进程,其中一个非常重要的原因是 KOA 发病机制尚未明确<sup>[5]</sup>。研究表明,KOA 的早期发病和多条信号通路异常表达有关,而且通路之间的相互作用仍然不清楚<sup>[6]</sup>。为精确地阐明各个

通路及其关键蛋白在 KOA 发生、发展中的作用及角色,安全有效的基因编辑方法是相关研究所亟需的手段。通过膝关节腔内注射进行基因编辑无须分离体细胞,在体感染操作方便;而且膝关节腔的血供不丰富,使得膝关节腔内注射进行基因编辑具有良好靶向性和安全性。本实验经膝关节腔注射方式将 AAV 输送到靶细胞,大体解剖观察发现膝关节各软骨面均完好,冰冻切片下组织形态完整,无骨关节炎相关的病理表现,同时软骨组织 GFP 持续表达。这为下一步通过膝关节腔注射 AAV 来进行基因编辑提供了良好的干预途径。

AAV 属于依赖病毒属,细小病毒亚科,是一类自然缺陷的单链 DNA 病毒。野生型 AAV 基因组约 4.7 kb, 含有 rep 和 cap 基因以及两端的 ITR 序列。虽然人类对 AAV 易感,但临床还并未发现与 AAV 相关的疾病。同时,重组 AAV(rAAV)基因组序列上去除了大部分的野生型 AAV 基因组元件,进一步提高了其使用的安全性。研究认为,AAV 作为一种理想的基因载体,利用病毒对细胞的感染能力,将携带的外源基因转移到分裂期和非分裂期的细胞中,使体内原位组织持续表达目的基因,对比其他可选择的、低效率的基因传递方式(例如非病毒、腺病毒和逆转录病毒等方式)来说,通过 AAV 进行基因传递来治疗人类 OA 等退行性疾病有更强大的优势<sup>[7-8]</sup>。本实验采用的 rAAV,不包含任何野生型病毒及辅助病毒,对宿主细胞的免疫反应得以降低,从而有利于宿主细胞进行基因传递。同时,小鼠正常饮食和活动,关节活动正常,关节形态完好,未见有明显异常。因此,利用 AAV 进行基因治疗、基因过表达、基因沉默在分子机制研究和临床基因治疗中具有潜在的应用价值。

### 3.2 AAV2 和 AAV7 是感染膝关节软骨的理想血清型

成功的 AAV 转导需要病毒 cap 蛋白与细胞表面受体结合、受体介导病毒的内吞、内含体逃逸、入核后脱壳和基因组释放、第 2 链合成和转录等多个精细步骤。不同的 cap 蛋白包装出不同血清型的 AAV,也决定了其不同的组织特异性,其中 cap 蛋白和受体的交互作用决定着转导的部位和细胞类型<sup>[9]</sup>。cap 蛋白在与细胞结合、内化及在靶细胞内运输中起着重要作用<sup>[10]</sup>。细胞表面多糖是 AAV 的主要受体,是与 cap 蛋白相互作用的靶位点,对 AAV 的运输和亲和性有调控作用<sup>[11]</sup>。其中,AAV1 和 AAV6 对人体和小鼠大多数细胞有良好的感染能力<sup>[12]</sup>。2 型与 3 型也有广泛的应用<sup>[13]</sup>。AAV5 适用于肺部的研究,AAV9 可通过血脑屏障而经常应用于脑和中枢神经的研究<sup>[14]</sup>。AAV8 对肝脏有着很强的感染效率等<sup>[15]</sup>。但何种血清型 AAV 对膝关节软骨组织的组织亲和性较好还未明确。Watson 等<sup>[16]</sup>通过将 AAV2.5 介导 IL1 受体激动剂(IL-1Ra),过表达应用于马的前肢关节,超过 6 个月还能在关节中持续稳定地看到 IL-1Ra 的表达,AAV2 型被用于感染人的软骨细胞也取得类似的良好效果<sup>[17]</sup>。与上述结果类似,本实验中将滴度相近且都过表达 GFP 的不同血清型 AAV 分别感染膝关节软骨细胞,在 AAV 干预 1 个月后的 GFP 荧光检测表明,各个 AAV 干预组均成功感染膝关节软骨和半月板组织,但各组 GFP 荧光

强度差异很大,提示了感染效率即组织亲和性上有差异。进一步通过对软骨和半月板 GFP 荧光进行光密度定量统计发现,与其他各组相比,维 2 组和维 7 组荧光强度最强,表明 AAV2 和 AAV7 对膝关节软骨组织亲和性最好,可作为对膝关节软骨组织进行基因编辑的理想血清型。

综上所述,不同的血清型 AAV 对于不同的器官不同的细胞类型有着不同的亲和能力,这为研究不同疾病中不同的组织基因修饰提供了方便性和可选性。AAV 在体内能长期高效稳定的表达,在动物身上的应用已经非常的成熟,临床上在血友病、乙型肝炎、杜氏肌营养不良症等许多疾病研究也处于 I 期与 II 期研究中。本研究使用膝关节腔注射方法将不同血清型 AAV 顺利注入到小鼠膝关节腔,成功感染小鼠膝关节的软骨细胞并筛选出了效率较高的血清型 AAV2 型和 AAV7 型,为后续在体膝关节软骨基因编辑提供了坚实的实验基础。

#### 参考文献

- [1] Lawrence RC, Felson DT, Helmick CG, et al. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II [J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(1): 26-35.
- [2] 赵丽琴, 席斌, 彭华松. 腺相关病毒(AAV)载体研究进展[J]. 生物技术进展, 2012, 2(2): 110-115.  
ZHAO LQ, XI B, PENG HS. Advances on research of adeno-associated virus vectors [J]. *Sheng Wu Ji Shu Jin Zhan*, 2012, 2(2): 110-115. Chinese.
- [3] 刘成龙, 郭亭, 赵建宁. 关节腔内用药治疗膝关节骨关节炎的探讨[J]. 中国骨伤, 2012, 25(10): 877-879.  
LIU CL, GUO T, ZHAO JN. Investigation of articular cavity medicating for treatment of knee osteoarthritis [J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2012, 25(10): 877-879. Chinese with abstract in English.
- [4] 马玉峰, 祁印泽, 王庆甫, 等. 关节内注射药物建立骨性关节炎动物模型研究进展[J]. 中国骨伤, 2015, 28(1): 90-95.  
MA YF, QI YZ, WANG QF, et al. Progress on establishment of animal model of osteoarthritis by intra articular injection [J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2015, 28(1): 90-95. Chinese with abstract in English.
- [5] 翟云, 高根德, 徐守宇. 膝关节骨关节炎的基础研究进展[J]. 中国骨伤, 2012, 25(1): 83-87.  
QU Y, GAO GD, XU SY. Basic research progress of knee osteoarthritis [J]. *Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma*, 2012, 25(1): 83-87. Chinese.
- [6] Boehme KA, Rolauffs B. Onset and progression of human osteoarthritis-can growth factors, inflammatory cytokines, or differential miRNA expression concomitantly induce proliferation, ECM degradation, and inflammation in articular cartilage [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(8): E2282.
- [7] Hastie E, Samulski RJ. Adeno-associated virus at 50: a golden anniversary of discovery, research, and gene therapy success—a personal perspective [J]. *Hum Gene Ther*, 2015, 26(5): 257-265.
- [8] Weimer A, Madry H, Venkatesan JK, et al. Benefits of recombi-

- nant adeno-associated virus (rAAV)-mediated insulinlike growth factor I (IGF- I ) overexpression for the long-term reconstruction of human osteoarthritic cartilage by modulation of the IGF- I axis [J]. *Mol Med*, 2012, 18: 346-358.
- [9] Murlidharan G, Samulski RJ, Asokan A. Biology of adeno-associated viral vectors in the central nervous system [J]. *Front Mol Neurosci*, 2014, 7: 76.
- [10] Van Vliet KM, Blouin V, Brument N, et al. The role of the adeno-associated virus capsid in gene transfer [J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 437: 51-91.
- [11] Huang LY, Halder S, Agbandje-McKenna M. Parvovirus glycan interactions [J]. *Curr Opin Virol*, 2014, 7: 108-118.
- [12] Aschauer DF, Kreuz S, Rumpel S. Analysis of transduction efficiency, tropism and axonal transport of AAV serotypes 1, 2, 5, 6, 8 and 9 in the mouse brain [J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e76310.
- [13] Jiang L, Frederick JM, Baehr W. RNA interference gene therapy in dominant retinitis pigmentosa and cone-rod dystrophy mouse models caused by GCAP1 mutations [J]. *Front Mol Neurosci*, 2014, 7: 25.
- [14] Dayton RD, Wang DB, Klein RL. The advent of AAV9 expands applications for brain and spinal cord gene delivery [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2012, 12(6): 757-766.
- [15] Jacobs F, Wang L. Adeno-associated viral vectors for correction of inborn errors of metabolism: progressing towards clinical application [J]. *Curr Pharm Des*, 2011, 17(24): 2500-2515.
- [16] Watson Levings RS, Smith AD, Broome TA, et al. Self-complementary adeno-associated virus-mediated interleukin-1 receptor antagonist gene delivery for the treatment of osteoarthritis: test of efficacy in an equine model [J]. *Hum Gene Ther Clin Dev*, 2018, 29(2): 101-112.
- [17] Rey-Rico A, Venkatesan JK, Schmitt G, et al. Effective remodeling of human osteoarthritic cartilage by sox9 gene transfer and overexpression upon delivery of rAAV vectors in polymeric micelles [J]. *Mol Pharm*, 2018, 15(7): 2816-2826.

(收稿日期: 2018-12-26 本文编辑: 李宜)

## · 经验交流 ·

## 固定平台单髁置换术治疗膝关节内侧骨性关节炎

曾智敏, 陶崑, 凌晶, 黄哲宇, 狄正林

(宁波市第六医院关节外科, 浙江 宁波 315040)

**【摘要】** 目的: 探讨采用固定平台假体膝关节单髁置换术治疗膝关节内侧单间室骨性关节炎的早期临床疗效。方法: 自 2015 年 1 月至 2017 年 12 月, 采用固定平台单髁置换术治疗 62 例膝关节内侧单间室骨性关节炎患者, 其中男 19 例, 女 43 例; 年龄 47~83(65.3±8.2) 岁; 病程 5~72(19.4±14.3) 个月。观察术后并发症情况, 并采用 VAS 评分评价疼痛缓解程度, HSS 膝关节评分评价临床疗效。结果: 62 例患者均获得随访, 时间 4~40(19.9±10.2) 个月。所有患者切口愈合良好, 无须术后输血, 住院时间 2~10(3.5±1.6) d。术后未发生脱位、感染、松动或假体周围骨折等并发症, 1 例患者术后 1 个月并发胫后静脉血栓。HSS 评分由术前的 69.9±7.2 提高至末次随访时的 90.1±7.4; 其中优 51 例, 良 9 例, 可 2 例; VAS 评分由术前的 3.8±0.9 降至末次随访时的 1.1±0.9。结论: 固定平台单髁关节置换术治疗膝关节内侧单间室骨性关节炎术后住院时间短, 并发症低, 可以获得较好的早期临床疗效。

**【关键词】** 关节成形术, 置换; 骨关节炎, 膝; 骨折固定术

中图分类号: R684.3

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2019.04.016

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



**Fixed-bearing unicompartmental knee arthroplasty for medial compartmental knee osteoarthritis** ZENG Zhi-min, TAO Kun, LING Jing, HUANG Zhe-yu, and DI Zheng-lin. Department of Joint Surgery, Ningbo No.6 Hospital, Ningbo 315040, Zhejiang, China

**ABSTRACT Objective:** To evaluate short-term clinical results of fixed-bearing unicompartmental knee arthroplasty (UKA) for patients with medial compartmental knee osteoarthritis. **Methods:** From January 2015 to December 2017, 62 patients with medial compartmental knee osteoarthritis were treated by fixed-bearing UKA. Among them, including 19 males and 43 females, aged from 47 to 83 years old with an average of (65.3±8.2) years old. The courses of disease ranged from 5 to 72 months with an average of (19.4±14.3) months. Postoperative complications were observed, VAS score was used to observe degree of

通讯作者: 曾智敏 E-mail: zhimin001@sina.com

Corresponding author: ZENG Zhi-min E-mail: zhimin001@sina.com