

腺病毒载体有效性和安全性的改进^{*}

刘雪丰 张连峰 王丽华¹⁾ 蔡有余

(中国医学科学院实验动物研究所, 北京 100021)
(中国协和医科大学)

摘要 论述了如何改进腺病毒载体以提高其有效性和安全性。腺病毒载体是将基因转移到体内多种不同细胞的有效运载工具。第一代腺病毒载体已证明在基因治疗中有很好的前途, 虽然它在有效性和安全性方面还存在不足之处, 但这些局限正在被逐步克服。

关键词 腺病毒载体, 安全性, 有效性

学科分类号 Q782

在目前的研究中使用的是第一代腺病毒载体, 它由于删除了与病毒复制有密切关系的早一区 (early region 1, E1), 而失去了复制能力, E1 区删除的腺病毒可在 293 细胞中生长。293 细胞系是用腺病毒基因组 E1 区转化的人胚肾细胞, 是反式提供腺病毒复制所必需的 E1 蛋白。E3 区是病毒生长非必需的, 所以可以从 E1 缺陷的载体中删除以便容纳大的插入片段。现在的载体在 E1 和 E3 区均有删除, 最大可容纳 8.3 kb 的外源 DNA^[1,3]。

第一代腺病毒载体已证明在基因治疗中有很好的前途, 但在有效性和安全性方面还存在一些不足之处, 如基因表达时间短暂 (< 3 周)^[4]和在基因转移器官中有炎症反应等。这是因为 Ad 载体能表达病毒蛋白, 引起感染细胞的毁灭和未感染细胞的逐渐繁殖, Ad 载体在应用上的这些限制正在被逐步克服。本文就这一方面的进展做一综述。

1 有效性和安全性

1.1 有效性

一个载体转移目的基因的有效性要从转染率、目的基因表达持续的时间和表达水平三方面来评价。腺病毒载体的转染率在多数情况下较逆转录病毒载体高。其原因是: a. 腺病毒载体的宿主范围广, 分裂与不分裂的细胞均能感染; b. 腺病毒载体是以受体介导的内吞作

用进入细胞, 并具有有效的逃避细胞囊泡系统捕获的特异机制; c. 其 DNA 定位于核内, 转进去的基因都能有效地高水平表达。

腺病毒的感染宿主广泛, 决定了载体对所转染的细胞种类缺乏特异性, 如眼内注射后, 阳性细胞除了视网膜色素细胞外还有神经节细胞^[5]。腺病毒基因组不能整合到宿主细胞基因组中, 而是以附加体的形式存在, 不随细胞的分裂而复制, 所以不能像逆转录病毒载体那样长时间地表达外源基因, 是典型的一过性表达 (transient expression)。但腺病毒载体的这一特性对免疫基因治疗来说是有利的, 在免疫基因治疗中转移细胞因子基因时, 用腺病毒为载体将不导致像能整合的载体那样使用后对免疫系统缠绵甚久的刺激^[6]。

1.2 安全性

腺病毒载体的安全性要从以下三个方面进行评价: a. 对感染细胞的影响, 如细胞转化及其他病理作用; b. 是否能产生有复制能力的腺病毒; c. 对宿主有无不良影响。细胞毒作用小和不整合, 再加上 E1 区删除的载体是复制缺陷型的, 使腺病毒载体使用起来比较安

^{*} 卫生部基金资助项目 (94-1-050)。

¹⁾ 中国医学科学院中国协和医科大学肿瘤研究所, 分子肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021。

收稿日期: 1997-04-14, 修回日期: 1997-07-17

全。但现用的复制缺陷型腺病毒载体仍有不安全因素, 包括产生有复制能力的腺病毒和由于病毒基因表达引起宿主的免疫系统对感染细胞的破坏性免疫应答等^[7, 8]。

重组腺病毒载体可能与体内已感染的野生型腺病毒基因之间发生重组, 而产生有复制能力的重组腺病毒^[8, 9]。虽然这种互补作用是有限的, 载体与野生型病毒之间的互相作用可反式提供 E1 区功能, 使病毒的结构基因启动而表达^[10]。这两种情况均可引起 CTL 介导的对受体细胞的清除, 而且形成免疫记忆, 阻碍了进一步治疗。腺病毒载体的这一缺陷对肿瘤的基因治疗是有利的, 尤其是在病毒介导的酶前体药物治疗方案中。因为高水平的基因表达可在杀死肿瘤细胞后迅速消退, 从而减少外源基因可能产生的副作用。然而, 在基因替换治疗中, 通常需要所转染的基因长期表达, 腺病毒载体的这一特点就成了致命的弱点。

2 提高有效性和安全性的途径

腺病毒载体的这些缺陷正在被逐步克服, 人们主要做了以下几方面的尝试:

2.1 构建免疫原性较小的载体

E1 删除的腺病毒基因组表达的病毒蛋白做为外来抗原存在, 往往导致 CTL 的产生。这种 CTL 可以攻击和破坏受到该重组腺病毒载体感染的宿主细胞。在几个体外系统中观察到, 即使是已删除了 E1 基因的腺病毒仍可复制并表达一些蛋白质, 这与 E1 删除的腺病毒载体没有完全丧失复制能力的假说一致^[4]。这些观察提示, 通过进一步削弱重组腺病毒表达病毒蛋白的能力, 可提高转基因表达的稳定性, 并且因而降低了 CTL 介导的对病毒感染细胞的排斥程度。

2.1.1 失活第一代腺病毒载体的 E2a 区的功能: E2a 基因编码一个 DNA 结合蛋白 (DNA binding protein, DBP), 是腺病毒复制不可缺少的。人们发现 E1 缺失的腺病毒载体转染细胞 (非 293 细胞) 后, 仍有足够的 E2a 和低水平晚期蛋白的合成。在 E1 区缺失的腺病毒载

体的 E2a 区引入温度敏感型突变 (temperature sensitive mutation, ts mutation), 在非允许温度下, 即使 E1 表达, 该病毒也不能表达晚期基因产物。第二代腺病毒载体感染小鼠肝脏后, 其炎症反应既迟又弱, 转基因至少能表达 70 d^[4, 11]。

2.1.2 构建 E1+ E4 联合缺陷的载体: E4 编码 7 种蛋白, 其功能涉及晚期蛋白的合成、病毒 DNA 的复制, 以及关闭宿主细胞蛋白质的合成等。其中开放阅读框 3 或 6 (ORF3 或 ORF6) 的产物主要参与晚期病毒基因表达调节。E4 的 ORF3 或 ORF6 缺失, 将导致晚期蛋白表达减少, 从而降低机体对感染细胞的免疫损害。Yeh 等^[10]将 Ad5 E4 区远侧的 ORF6 + ORF7 片段克隆到小鼠乳腺病毒长末端重复序列的控制下 (该启动子可被地塞米松诱导), 并将该表达单位转染进 293 细胞。转染后的细胞称为 IGRP2, 它既可表达腺病毒的 E1 蛋白, 又可表达 E4 区 ORF6 和 ORF7 所编码的蛋白, 也就是说可以反式互补 E1 和 E4 功能。该细胞系允许 E1 或/和 E4 病毒蚀斑的形成。

2.1.3 在第一代腺病毒载体中插入一个 gp19k 蛋白的组成性表达装置, 使 E1 缺失腺病毒载体能组成性表达 gp19k 蛋白。 gp19k 蛋白是 Ad5 E3 区编码的一种蛋白质, 它可与宿主细胞 MHC I 类抗原结合, 使 MHC I 类抗原不再有合适的末端糖基来结合其他抗体, 从而减少了宿主细胞表面 MHC I 类抗原的水平, 降低了 CTL 对感染细胞的杀伤活性。Lee 等^[11]在 E1-、E3-Ad 载体中插入一个 gp19k 蛋白表达装置, 并用此载体携带 lacZ 基因到 DBA 小鼠体内, 结果表明, 机体针对转染细胞的 CTL 细胞活性大大降低, 外源基因的表达时间延长。

2.1.4 构建删除了基因组中所有开放阅读框架的新型重组腺病毒 (称为 Δ rAd)。这一重组载体仅含必要的顺式元件 (也就是 ITR 和邻近的包装信号序列)。在 E1 区缺陷的辅助病毒存在的情况下, 在 293 细胞中繁殖。Fisher 等^[12]已构建了一个表达人类囊性纤维化跨膜

传导调节因子 (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR) 的 ΔrAd , 并用于转导来自 CF 病人的气管上皮细胞, 但尚需进一步纯化 (以除去辅助病毒) 方可用于临床。

2.2 诱导机体的免疫抑制和免疫耐受

为了降低机体对重组腺病毒感染细胞的破坏性免疫应答, 有些研究者独辟蹊径, 从降低机体的免疫力入手来解决这一问题。

腺病毒感染机体细胞后, 机体中首先产生的是前炎症细胞因子 (pro-inflammatory cytokine) 和 IL-1 (interleukin-1)。其中 IL-1 可促进 T 细胞增殖, 有抗病毒作用。所以 Coy 等假设抑制 IL-1 可能阻止由腺病毒引起的炎症。他们使用了含有人类 IL-1 受体拮抗蛋白 (IL-1ra) 的 cDNA 腺病毒 AdRSVIL-1ra, 将其滴注在 DBA/J 小鼠气管内, 结果表明, 在肺中高水平表达 IL-1ra 并不能预防腺病毒介导的炎症反应^[13]。虽然这一尝试是失败的, 但思路却是独特的。在此之后, Dematteo 等^[14]又将腺病毒感染后的胰岛细胞接种到动物胸腺 (这样可使胸腺中的 T 细胞在发育早期就与胰岛细胞所表达的腺病毒蛋白质抗原相遇, 使对该抗原特异的 T 细胞灭活, 即“流产”。从而使机体对病毒蛋白抗原产生免疫耐受), 然后通过静脉注射, 用重组腺病毒感染肝脏来试验动物的反应性。结果表明, 这种方法减弱了抗病毒的 CTL 细胞的应答, 并延长了肝细胞中转基因表达的期限。

2.3 将 DNA 携带到腺病毒外

腺病毒的感染、内化和对细胞囊泡系统的逃避功能均来自衣壳蛋白, 病毒基因组的完整性并不是一个必不可少的条件。所以可采取一些步骤灭活病毒基因, 而不改变腺病毒感染细胞的功能, 然后把灭活后的腺病毒通过多聚赖氨酸 (polylysine) 与质粒连接, 然后再加上一个有组织特异性的配体形成 Ad ligand-polylysine-DNA complex, 最后用这一复合物感染靶细胞。这样既不影响转染效率, 又避免了由于病毒 DNA 的表达而引起的免疫应答,

还解决了组织特异性问题^[9]。这一想法是基因治疗的载体系统的一个突破, 它在基因治疗的应用上一定会大有作为的。

综上所述, 第一代腺病毒载体在应用中虽然在有效性和安全性方面还存在问题, 但经发展和完善后, 它会有极大的生命力。随着腺病毒载体的开发应用, 人类疾病基因治疗在深度和广度上都会上一个新的台阶。

参 考 文 献

- 1 Graham E L, Prevec L. Methods for construction of adenovirus vector. *Molecular Biotechnology*, 1995, **3** (3): 207~ 220
- 2 Graham F L, Smmiley J, Russel W C *et al.* Characteristics of a human cell line transferred by DNA from human adenovirus type5. *J Gen Virol*, 1977, **36** (1): 59~ 72
- 3 Bett A J, Haddara W, Prevec L *et al.* An efficient and flexible system for construction of adenovirus vector with insertion or deletion in early region 1 and 3. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (19): 8802~ 8806
- 4 Engelhardt J F, Ye X, Doranz B *et al.* Ablation of E2a in recombinant adenovirus improve transgene persistence and decrease inflammatory response in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (13): 6196~ 6200
- 5 Jomary C, Piper T A, Dickson G. Adenovirus-mediated gene transfer to murine retinal cell *in vitro* and *in vivo*. *FEBS Letters*, 1994, **347** (2~ 3): 117~ 122
- 6 Addison C, Brociak T, Palston R *et al.* Intratumoural injection of an adenovirus expressing interleukin 2 induce regression and immunity in murine breast cancer model. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (18): 8522~ 8526
- 7 Yang Y P, Nunes F A, Perenci K *et al.* Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (10): 4407 ~ 4441
- 8 Curiel D. High efficiency gene transfer mediated by adenovirus-polylysine-DNA complex. *Annal New York Academy of Science*, 1994, **716** (5): 36~ 56
- 9 Immler J L, Bout A H, Dreyer D Q *et al.* Trans complementation of E1-deleted adenovirus: a new vector to reduce the possibility of codissemination of wild-type and recombinant adenoviruses. *Human Gene Therapy*, 1995, **6** (6): 711~ 721
- 10 Yeh P, Dedieu J F, Orsini C *et al.* Efficient double trans complementation of adenovirus E1 and E4 regions from 293-derived cell line expressing a minimal E4 functional unit. *Journal of Virology*, 1996, **70** (1): 559~ 565
- 11 Lee M G, Abina M A, Haddade H *et al.* The constitutive expression of the immunomodulatory gp19k protein in E1-E3-adenoviral vector strongly reduce the host cytotoxic T cell response against the vector. *Gene Therapy*, 1995, **2** (4): 256~ 262

- 12 Fisher K J, Choi H, Burda J *et al.* Recombinant adenovirus deleted of all viral genes for gene therapy of cystic fibrosis. *Virology*, 1996, **217** (4): 11~ 22
- 13 McCoy R D, Davidson B L, Roessler B J *et al.* Expression of human interleukin-1 receptor antagonist in mouse lungs using a recombinant adenovirus: effects on vector induced inflammation. *Gene Therapy*, 1995, **2** (4): 437~ 442
- 14 Dmatteo R P, Raper S E, Ahu M *et al.* Gene transfer to thymus a means of abrogating the immune response to recombinant adenovirus. *Annals of surgery*, 1995, **222** (3): 229~ 242

The Improvements of Adenovirus Vectors in Efficacy and Safety. LIU Xue-feng, ZHANG Liang-feng, WANG Li-hua, CAI You-yu (*Institute of Laboratory Animal Science, Peking Union Medical College & Chinese*

Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China).

Abstract Adenoviruses are efficient gene transfer vectors for variety of cell types *in vivo*. The first-generation recombinant adenoviruses that lack E1 sequences have shown tremendous promise in animal and human models of gene therapy. Having some limitations at aspect of efficacy and safety, the adenovirus vectors are being gradually improved to resolve these problems. The developments of construction of adenovirus vectors in increasing the efficacy and safety was described.

Key words adenovirus vector, safety, efficacy

MAR 结合蛋白

周丛照 钱信果 李振刚*

(中国科学技术大学生物系, 合肥 230027)

摘要 MAR (matrix association regions) 是真核基因组的 DNA 序列中可特异性地与核基质紧密结合的区域. MAR 通过特异性地与一些 MAR 结合蛋白相互作用, 在真核基因的复制和表达调控以及染色体的包装构建等方面发挥重要作用. MAR 结合蛋白主要包括一些构成染色质或核基质的结构蛋白 (如组蛋白 H₁、拓扑异构酶 I 和 II、HMG I/Y、Lamin B₁、Matrin 等) 以及一些组织特异性表达的蛋白 (如 SATB₁、骨钙蛋白基因启动子结合因子等). 根据它们与核基质的关系将 MAR 结合蛋白分为三类: 核基质富含组分、核基质稀有组分以及非核基质组分, 对其与 MAR 的相互作用进行了比较和分析.

关键词 MAR, 核基质, MAR 结合蛋白

学科分类号 Q71, Q75

在真核生物的细胞核中广泛存在一种三维网架结构, 主要由非组蛋白的纤维蛋白和高分子质量的 RNA 组成, 这就是所谓的核基质 (nuclear matrix). MAR (matrix association regions) 是真核基因组的 DNA 序列中能特异性地与核基质紧密结合的区域, 一般长约 300 ~ 1 000 bp, 主要由 A-box、T-box、ATATTT (T) 序列以及与果蝇拓扑异构酶 II 位点相近的同义序列等特征序列组成. MAR 通过将染

色质锚定在核基质上而使染色质 DNA 形成拓扑学限制性的 DNA 环 (loop). 每个 DNA 环既是一个转录单位, 也是一个复制单位和染色体包装单位, MAR 位于这些基本单位的交界处, 邻接于一些调控元件. 由于其高 A+T 含量 (70% 左右) 和 oligo (dA) 序列, MAR 易

收稿日期: 1997-04-21, 修回日期: 1997-09-03

* 通讯联系人.