

论意义.

参 考 文 献

- 1 Cadena D L, Gill G N. *FASEB J*, 1992; **6**: 2332
- 2 Hu P, Margolis B, Schlessinger J. *Bioassays*, 1993; **15**: 179
- 3 Boguski M S, McCormic F. *Nature*, 1993; **366**: 643
- 4 Schlessinger J. *TIBS*, 1993; **18**: 273
- 5 Koch C A, Anderson D, Moran M F *et al.* *Mol Cell Biol*, 1991; **11**: 1607
- 6 Wu Y, Han M. *Genes Dev*, 1994; **8**: 147
- 7 Sturgill T W, Ray L B, Erikson E *et al.* *Nature*, 1988; **334**: 715
- 8 Anderson N G, Maller J L, Touks N K *et al.* *Nature*, 1990; **343**: 651
- 9 Seger R, Ahn N G, Posada J *et al.* *J Biol Chem*, 1992; **267**: 14373
- 10 Tsuda L, Inoue Y H, Yao M A *et al.* *Cell*, 1993; **72**: 407
- 11 Davis R J. *J Biol Chem*, 1993; **268**: 14553
- 12 Ihle J N, Witthuhn B A, Qulle F W *et al.* *TIBS*, 1994; **19**: 222
- 13 Ziemiecki A, Harpur A G, Wilks A F. *Trends Cell Biol*, 1994; **4**: 207
- 14 Silvennoinen O, Witthuhn B A, Quell F W *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; **90** (10): 3414
- 15 Stahl N, Boulton T G, Farruggella T *et al.* *Science*, 1994; **263**: 92
- 16 Pearse R N, Feinman R, Shuai K *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; **90** (10): 4314
- 17 Schinder C, Shuai K, Prezioso V R *et al.* *Science*, 1992; **257**: 809

18 Zhong Z, Wen Z, Darnell J E J. *Science*, 1994; **264**: 95

Two Key Signal Transduction Pathways of Growth Factors and Cytokines. Liu Yongxue, He Fuchu, Wu Zuze (Wu Chutse) (*Beijing Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China*).

Abstract The Ras and JAKs-STATs signaling pathways after growth factors and cytokines activating their receptors respectively are briefly reviewed. The signal transduction of most growth factors' receptors with intrinsic tyrosine kinase activities is achieved through Ras protein pathway. Otherwise, members of JAKs and STATs superfamilies mediate the signaling process of cytokines' receptors lacking intrinsic tyrosine kinase activities. Studies on the signal transduction of growth factors and cytokines are becoming the important subjects in researches of life sciences.

Key words growth factor, cytokine, receptor, signal transduction

腺病毒载体及其在基因治疗研究中的应用

姜传仓 范乐明

(南京医科大学动脉粥样硬化研究中心, 南京 210029)

摘要 腺病毒载体在基因治疗研究中初露锋芒, 引起关注. 文章就腺病毒基因组的基本结构、腺病毒载体的类型及构建、重组腺病毒在基因治疗研究中的应用及其主要优、缺点等方面进行了较为全面的综述.

关键词 腺病毒, 基因治疗, 表达载体

自 1990 年美国科学家在世界上首次成功地实施了基因治疗以来, 基因治疗技术得到了长足发展, 人们构建了一系列高效的转基因载体, 腺病毒载体就是新近发展起来的一种病毒

载体, 以其简便、高效、安全等显著特点而日益受到人们的青睐.

收稿日期: 1995-01-25, 修回日期: 1995-06-26

1 腺病毒载体

腺病毒 (adenovirus, Ad) 是一群无包膜病毒, 病毒颗粒呈二十面体对称, 直径 70~90 nm, 含有 14 个蛋白. 病毒基因组为线性双链 DNA 分子, 长 36 kb. 目前已分类的人腺病毒有 6 个亚属, 43 个血清型, 其中常用来构建载体的腺病毒主要是 C 亚属的 2 型腺病毒 (adenovirus type 2, Ad2) 和 5 型腺病毒 (adenovirus type 5, Ad5)^[1,2].

腺病毒基因组基本结构如图 1 所示. 病毒基因组由非结构性早期基因 (early genes; 包括 E1~E4)、编码结构要素的晚期基因 (late genes; L1~L5, IVa2) 和聚合酶 III 转录物 (VA) 组成. 每个早期基因都有自己的启动子, 而晚期基因则公用一个主要晚期启动子 (major late promoter, MLP). 基因组的两端是逆向末端重复序列 (inverted terminal repeats, ITR), 含有复制及基因组包装成毒粒的顺式作用要素^[2,3].

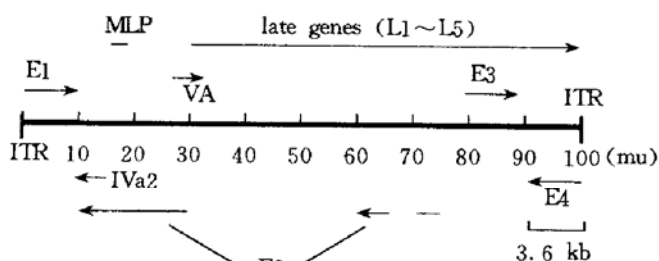


图 1 腺病毒基因组的基本结构示意图

腺病毒载体的构建始于 80 年代初期, 但较为理想的表达载体是在 80 年代后期及以后构建成的^[4,5].

1.1 E1 区表达载体

人腺病毒 E1 位于基因组 1.0~10.6 基因图单位 (map unit, mu), 包括 E1a 和 E1b, 其基因本身的上游含有多个增强子, 在病毒 DNA 一进入核内, 很早就被激活. E1a 基因产物能反式激活其他基因 (E1b、E2、E3 和 L1) 以及某些细胞基因的转录, 也能刺激共转染到哺乳动物细胞内的细胞基因的转录^[1,6].

毒粒能包装的最大 DNA 约为野生型基因组的 105%, 即除自身基因组外尚可包装约 2 kb 的外源 DNA. 为了增加 E1 区载体的插入容量, 常将 E1 去除约有 3 kb, 这样就可以接受 5 kb 的插入片段. 然而, 这种 E1 区载体是一种复制缺陷病毒, 只能在 293 细胞中增殖. 293 细胞是一种由 Ad5 DNA 转化的人胚肾细胞, 含有腺病毒基因组的左末端, 可提供 E1 区载体所需要的 E1 基因产物^[2].

由 E1 区表达载体构建重组病毒的原理如图 2 所示. 首先需要含有病毒基因组左末端、适当缺失部分 E1 序列和克隆外源基因的限制性内切酶位点的质粒, 图 2 中所示例子为 pXCX2, 该质粒是将 Ad5 基因组左端 16% 部分去除 1.9~9.3 mu 的部分序列后克隆到 pBR322 中, 含有一个插入外源基因的 Xba I 克隆位点. 质粒插入外源 DNA 后, 与来源于 dl309 的毒粒 DNA 共转染到 293 细胞中, dl309 系 Ad5 的突变体, 仅在 3.7 mu 处含有一个 Xba I 酶切位点, 并被切除左端, 以消除或至少降低亲本病毒 DNA 的感染性. 体内重组使克隆的病毒序列和插入基因被拯救 (rescue) 到 dl309 基因组的左端^[2].

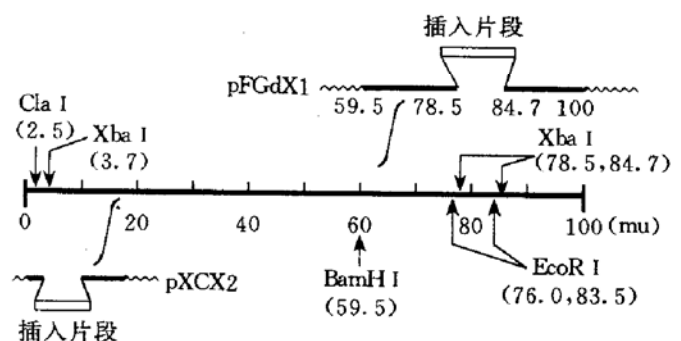


图 2 腺病毒载体构建示意图

1.2 E3 区表达载体

E3 位于基因组 76~86 mu, 为病毒的非必需区, 缺失大部分或全部 E3, 腺病毒仍能在培养细胞中复制. 故常在此区去除 1.9 kb 的 Xba I 酶切片段以增加载体的插入容量, 所得载体可接受约 4 kb 的外源 DNA, 并可在通常用来繁殖腺病毒的任何细胞株 (如 HeLa 或 KB

细胞) 中复制^[1,2].

由 E3 区表达载体构建重组病毒的原理基本上与 E1 区载体相同(图 2 上方), 先构建一个包括 E3 侧翼区的质粒, 如图 2 中的 pFGdX I, 该质粒含有基因组右端 40% 部分(从 59.5 mu 到 100 mu 区段), 并去除了部分 E3 序列, 含有一个克隆用 Xba I 酶切位点. 再将外源 DNA 插入到克隆位点上, 然后与腺病毒基因组 0~76 mu 的 EcoR I 酶切大片段共转染, 在细胞内即可发生重组, 通过挑选空斑, 获得重组体.

在上述载体中, 外源基因的表达通常都是由插入部位的相应启动子(E1a 或 E3 启动子)驱动的, 但也可由其他启动子驱动, 此时往往先组建一个外源基因表达单位, 在外源基因的上游是真核强启动子, 如巨细胞病毒(CMV)启动子、腺病毒 MLP 等. 在外源基因的下游常有 SV40 加 polyA 尾信号, 有的表达单位还含有促进翻译的腺病毒三重先导序列. 最后, 将完整的外源基因表达单位组建到相应的腺病毒载体中^[5,6]. 此外, 为了增加载体的插入容量, 可同时去除基因组 E1 和 E3 部分序列, 从而插入更大(约 7 kb)的外源基因片段^[2].

上述构建重组腺病毒载体的方法常有感染性亲本病毒背景. 为此, Graham 小组^[6]发展了另一种方法. 他们首先构建了质粒 pJM17, 该质粒由环化的 dl309 基因组组成, 在 3.7 mu 处插入一个 4.3 kb 的 pBRX 质粒. 由于 pJM17 比能包装进腺病毒衣壳中的最大 DNA 还大约 2 kb, 故不产生感染性病毒. 不过, pJM17 与含有 Ad5 左端的质粒共转染时, 能通过同源重组有效地产生感染性病毒. 利用这一技术, 可将许多外源基因插入到 E1 区, 从而得到含有外源基因的重组腺病毒. 利用相似的方法他们又构建了另一个质粒 pFG173, 后者在 E3 附近有致死性突变, 用以筛选与跨越基因组该部分的病毒 DNA 的重组. 上述两种质粒均不需要用内切酶消化即可获得体内重组. 这种方法的优越性在于感染性亲本背景为零(用 pFG173)或很低(用 pJM17), 而且, 一旦构建成适当的质粒, 病毒 DNA 的纯化和酶切均可避免^[2].

2 重组腺病毒载体与基因治疗研究

腺病毒载体虽尚未真正应用于临床, 但确已在多种基因治疗的基础性研究中显露锋芒. 例如, Rosenfeld 等^[7]构建了含有人 $\alpha 1$ 抗胰蛋白酶($\alpha 1$ -antitrypsin, $\alpha 1$ AT)基因的重组腺病毒(Ad- $\alpha 1$ AT), 能够在 CHO 细胞和 HeLa 细胞指导人 $\alpha 1$ AT 的合成. 动物实验表明, 棉鼠气管滴注 Ad- $\alpha 1$ AT 2 d 后, 即可在肺部发现人 $\alpha 1$ AT 转录物, 人 $\alpha 1$ AT 蛋白的表达至少持续 1 周, 并且分泌的人 $\alpha 1$ AT 具有生物活性. 他们又用同样的方法构建成含有人囊性纤维化跨膜传导调节因子(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR) cDNA 的重组腺病毒 Ad-CFTR^[8], 用以感染上皮细胞能表达人 CFTR mRNA 和蛋白, 并可纠正 cAMP 介导的 Cl 渗透缺陷. 将 Ad-CFTR 导入棉鼠气管内 2 d 后, 在肺上皮即有人 CFTR 基因表达, 可持续 6 周. 用抗人 CFTR 的抗体在感染后 11~14 d 可检测到人 CFTR 蛋白.

已知肌糖原磷酸化酶可被 AMP 强有力地激活, 而其肝同工酶则不能被激活. Gomez-Foix 等^[9]构建了含有肌糖原磷酸化酶 cDNA 的重组腺病毒, 感染培养的肝细胞 6 d 后, 受 AMP 激活的糖原磷酸化酶活性增加 46 倍, 赋予肝细胞针对效应物的糖原水解反应的能力, 提示可以对糖原蓄积疾病进行基因治疗.

血友病 B 系由凝血因子 IX 基因突变所致. Kay 等^[10]构建了含有犬因子 IX 的重组腺病毒载体, 直接灌流到血友病 B 狗的门脉系统, 血浆因子 IX 的浓度从 0 升至正常狗血浆水平的 300%, 疾病得到完全改善. 尽管几天后血浆因子 IX 的浓度开始下降, 但因子 IX 的治疗浓度水平持续 1~2 个月.

Chen 等^[11]报道, 裸鼠大脑定向注射 1×10^4 C₆ 神经胶质瘤细胞做肿瘤造型, 8 d 后, 将 3×10^8 携带单纯疱疹病毒胸苷激酶基因的重组腺病毒(ADV/RSV-tk)颗粒注射到肿瘤中, 然后小鼠用 9-(1, 3-二羟-2-丙氧甲基)鸟嘌呤(ganciclovir)治疗 6 d, 肿瘤种植 20 d 后比较

肿瘤的大小. 治疗组肿瘤的平均截面积为对照组的 1/23, 肿瘤体积缩小到 1/500.

Denefle 等^[12]报道, 将人载脂蛋白 (apo-lipoprotein, apo) A-1 基因重组到腺病毒载体中, 一次性小鼠静注 10^{10} pfu 重组病毒, 导致小鼠血浆中人 apoA-1 浓度显著升高, 转基因表达持续数周.

Herz 和 Gerard^[13]构建了含有人低密度脂蛋白受体 (low density lipoprotein receptor, LDLR) 基因的重组腺病毒载体 (AdCMV-LDLR), 感染受体缺陷 CHO (ldlA7) 细胞, 可恢复细胞的 LDLR 功能. 正常小鼠静注 AdCMV-LDLR 4 d 后, 肝中 LDLR 表达显著增加, 血浆胆固醇浓度显著降低, ^{125}I -LDL 清除率较对照组增加 10 倍. 经 LDLR 免疫荧光或半乳糖苷酶染色分析, 估计 90% 的肝实质细胞表达腺病毒转移的基因. Ishibashi 等^[14]亦构建了含有鼠 LDLR cDNA 的重组腺病毒, 给 LDLR^{-/-}小鼠注射 4 d 后, 肝脏表达高水平的完整 LDLR, ^{125}I -VLDL 清除率明显高于对照组, 血浆中 IDL/LDL 异常峰 (系 LDLR 缺陷所致) 消失, 血浆脂蛋白恢复正常.

3 展 望

与其他病毒载体不同, 腺病毒载体具有许多独特的优点: a. 腺病毒粒子相对稳定, 就目前常用载体的血清型而言, 病毒基因组重排频率低, 外源基因插入片段在病毒连续复制几个周期后一般仍保持不变. 腺病毒基因组相对易于用重组 DNA 技术操作, 并且在受纳细胞内能高效复制. b. 安全性较好. 在人类的肿瘤细胞中尚未发现有腺病毒的整合, 未发现其与人类恶性肿瘤的发生有直接的联系. 此外, Ad4 和 Ad7 活疫苗在美国使用已有 20 余年, 证明是安全的. c. 腺病毒基因组较大 (36 kb), 插入大片段外源基因的潜力大, 理论上, 除最末端序列 (复制必需) 和接近左端的序列 (包装必需) 外, 绝大部分基因组 (约 35 kb) 均能被外源基因所取代. 目前构建的载体其外源 DNA 插入容量可达 7.5 kb. d. 腺病毒宿主细胞较为

广泛, 除了可在肠道和呼吸道繁殖以外, 还可感染肝细胞、血管内皮细胞、血管平滑肌细胞、神经胶质瘤细胞等多种人体细胞, 尤其重要的是, 腺病毒感染对于受体细胞是否处于活跃的分裂期要求不严格, 具备向许多分化的体细胞转移基因的潜力. e. 细胞及动物实验表明, 腺病毒载体很容易将外源基因直接转移到靶细胞中, 并使其在细胞内有效表达成活性蛋白^[1~3, 13, 15, 16].

上述腺病毒载体的诸多优点决定了腺病毒载体在基因治疗领域中具有广阔的应用前景. 许多遗传性疾病, 如家族性高胆固醇血症、血友病 B、AT 缺乏症等均可望在不久的将来能用重组腺病毒载体进行基因治疗. 此外, 一些获得性疾病, 如癌症或感染性疾病, 也可望通过转基因得到间接的治疗, 将细胞因子基因转入肿瘤细胞以刺激宿主对肿瘤细胞的免疫反应就是这样的例子^[7~14, 16].

然而, 将重组腺病毒载体广泛应用于临床还存在一些问题需要慎重考虑或解决: 第一, 尽管目前构建的载体多数是复制缺陷型的, 对人比较安全, 但仍存在一个潜在的危险性, 即宿主细胞通过提供反式 Ela 功能以克服复制缺陷, 或者是, 同时发生的野生型腺病毒感染有可能通过互补作用或重组事件导致重组腺病毒复制^[8]. 腺病毒在复制周期中可表达大量具有不良生物活性的产物, 可使宿主细胞蛋白合成终止, 具有特异性的细胞毒作用. 此外, 转导细胞中大量病毒蛋白的表达尚可诱导针对该细胞的强烈免疫反应. 第二, 对产生非宿主的外源蛋白的转基因后果应有充分了解, 控制免疫反应的方法有待发展. 例如, 正常人 LDL 受体在原先该受体阴性患者肝细胞的表达, 有可能产生针对这种新抗原的强烈免疫反应, 甚至是细胞内的外源蛋白也可能引发有害的免疫反应^[16]. 第三, 重组腺病毒载体转移的外源基因能否在体内长期表达尚不清楚. 理论上, 缺陷病毒基因组不能复制, 加上又不易整合到宿主基因组中, 转基因的表达难以持久. 另一方面, 确实注意到, 鸟氨酸氨甲酰基转移酶缺失动物

被注射重组腺病毒后,酶活性持续表达 1 a^[14]. 第四,重组腺病毒载体应能特异性地针对和进入特异的组织或器官,并且一旦到达目的细胞,应能安全地整合到染色体的非关键位点上,或者与试图替代的缺陷基因发生同源重组.载体的针对性受病毒嗜性(tropism)的限制,腺病毒是通过受体途径感染宿主细胞的,在某些类型的细胞(如分化的肌细胞)因不具有腺病毒受体,故载体不易将基因转移到这类细胞中去^[17].第五,导入基因应有对血液或细胞代谢物的生理变化起反应的能力,将转基因产物维持在正常的生理浓度水平.例如,在糖尿病的基因治疗中,血糖浓度的升降应可被经基因工程适当处理的胰岛素基因所感知和反应^[3].

参 考 文 献

- 1 侯云德.分子病毒学,第1版.北京:学苑出版社,1990: 151~180
- 2 Graham F L, Prevec L. In: Murray E J ed. Methods in molecular biology. New York: The Human Press Inc, 1991; 7: 109~128
- 3 Morgan R A. Annu Rev Biochem, 1993; 62: 191
- 4 Haj-Ahmad Y, Graham F L. J Virol, 1986; 57: 267
- 5 Dewar R L, Natarajan V, Vasudevachari M B *et al.* J Virol, 1989; 63: 129
- 6 McGrory W J, Bautista D S, Graham F L. Virology, 1988; 163: 614
- 7 Rosenfeld M A, Siegfried W, Yoshimura K *et al.* Science, 1991; 252: 431
- 8 Rosenfeld M A, Yoshimura K, Trapnell B C *et al.* Cell, 1992; 68: 143
- 9 Gomez-Foix A M, Coats W S, Baque S *et al.* J Biol

Chem, 1992; 267: 25129

- 10 Kay M A, Landen C N, Rothenberg S R *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1994; 91: 2353
- 11 Chen S-H, Shine H D, Goodman J C *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1994; 91: 3054
- 12 Deneffe P P. Atherosclerosis, 1994; 109: 178
- 13 Herz J, Gerard R D. Proc Natl Acad Sci USA, 1993; 90: 2812
- 14 Ishibashi S, Brown M S, Goldstein J L *et al.* J Clin Invest, 1993; 92: 883
- 15 Hedrick C C. Atherosclerosis, 1994; 109: 105
- 16 Miller A D. Nature, 1992; 357: 455
- 17 Michael S I, Curiel D T. Gene Therapy, 1994; 1: 223

Adenovirus Vectors and Their Applications in the Studies of Gene Therapy. Jiang Chuancang, Fan Leming (*Atherosclerosis Research Center, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China*).

Abstract The adenovirus vectors have begun to show importance in the researches of gene therapy, and have therefore attracted the attention of public. A fuller description is given on the basic structure of adenovirus genome, the classification and the construction of the adenovirus vectors, the applications of the recombinant adenovirus, as well as their advantages and disadvantages in use of gene therapy.

Key words adenovirus, gene therapy, expressional vector

自由基与细胞凋亡

惠宏襄 赵小宁¹⁾ 金明 王成济 莫简¹⁾

(第四军医大学生物化学教研室, 西安 710032)

摘要 细胞凋亡是指细胞在生理和病理情况下的一种死亡模式,广泛涉及到肿瘤、衰老和退行性病变等一系列疾病.最近有实验表明自由基与细胞凋亡有密切的关系.凋亡细胞内活性氧自由基(ROS)生成

¹⁾第四军医大学化学教研室. 收稿日期: 1994-12-17, 修回日期: 1995-05-08