

杆状病毒作为基因治疗载体的研究进展*

梁昌镛 胡志红 陈新文**

(中国科学院武汉病毒研究所, 无脊椎动物病毒学联合开放实验室, 武汉 430071)

摘要 杆状病毒是昆虫专一性的病原病毒。近来的研究表明杆状病毒能进入哺乳动物细胞, 但病毒自身不能在哺乳动物细胞中复制, 感染也不引起细胞病变。另外, 已经证明杆状病毒能在体外或体内高效地转导许多类型哺乳动物细胞, 并且能得到固定表达细胞系, 显示了杆状病毒作为基因治疗载体有着良好的应用前景。综述了该领域的最新研究进展并探讨了其发展趋势。

关键词 杆状病毒, 基因治疗, 基因治疗载体, 转导

学科分类号 Q819

基因治疗是通过 *ex vivo* 或 *in vivo* 的方式将功能遗传物质导入细胞从而治疗遗传疾病或后天性疾病的方法^[1]。基因治疗的核心技术之一是获得安全高效的基因转移载体。迄今为止, 一些哺乳动物病毒如腺病毒、腺联病毒、疱疹病毒和逆转录病毒作为基因治疗载体已用于临床试验^[1]。然而, 这些系统还存在某些缺陷。随着杆状病毒作为载体, 在体外和体内转导哺乳动物细胞并获得目的蛋白的高效表达, 杆状病毒日益显示了其作为非复制型载体在基因治疗中的应用前景, 开辟了杆状病毒应用研究的新领域。

1 杆状病毒在体外(*in vitro*)介导的基因表达

1.1 介导外源基因表达的启动子

研究表明杆状病毒载体能有效地将基因导入哺乳动物细胞, 但是目的基因必需在哺乳动物启动子的启动下表达。Hofmann 等^[2]首次报道了用苜蓿银纹夜蛾核多角体病毒 (AcMNPV) 作为载体, 在巨细胞病毒 (CMV) 极早期基因 *ie1* 启动子的启动下, 外源基因在肝细胞中的成功表达。但是杆状病毒多角体蛋白基因启动子启动的相同序列在肝细胞中却不能表达。Shoji 等^[3]利用 CAG 强启动子 (含 CMV 的 *ie* 增强子及鸡 β -肌动蛋白启动子以及兔 β -珠蛋白 polyA 信号组成) 控制丙肝病毒的核心蛋白 (C) 及包膜蛋白 (E1、E2) 的编码区获得了多聚蛋白在 HeLa 细胞的高效表达。该研究同时显示, CAG 启动子的转录活性比单一的 CMV 启动子的转录活性更强大^[3]。

1.2 杆状病毒可转导的哺乳动物细胞及侵入机制

首先报道的杆状病毒敏感的哺乳动物细胞为肝细胞, 如人肝细胞、鼠肝细胞, 兔肝细胞^[2]以及

人肝癌细胞系 HepG2 和 Huh-7^[2,4]。另外还发现重组杆状病毒能够在非肝细胞中表达外源 DNA, 如人宫颈癌细胞系 HeLa、人胚肾细胞系 293、中国仓鼠卵巢细胞系 CHO、叙利亚仓鼠肾细胞系 BHK、非洲绿猴肾细胞系 CV-1^[4]等。但是在不同来源的哺乳动物细胞中, 重组病毒的转导效率和表达效率是不同的。例如含有 CMV 启动子控制的绿色荧光蛋白 (GFP) 基因的重组杆状病毒, 在不同哺乳动物细胞系中, 其转导效率和表达效率存在着明显的差异^[4]。

杆状病毒对不同的哺乳动物细胞具有不同的转导效率, 推测在不同细胞的细胞膜上可能存在一种特殊的受体, 该受体的结构和丰度在不同动物来源的细胞上可能存在差异^[2], 但尚无足够的实验证据。杆状病毒侵入哺乳动物细胞的机理尚不清楚, 有实验表明氯奎能阻止病毒的入侵^[2], 由此得出一种假说认为杆状病毒侵入哺乳动物细胞是一种内吞的途径。

我们亦利用所构建的重组杆状病毒, 成功地转导了 BHK 等多种哺乳动物细胞系, 并获得报告基因的表达式 (梁昌镛等, 待发表)。

1.3 提高转导效率和表达效率的方法

水疱口膜炎病毒 (VSV) 膜融合蛋白 G 蛋白是一种穿膜糖蛋白, 它能介导病毒基因组从哺乳动物细胞内吞体中逃出。Barsoum 等^[5]将 VSV 的 G 蛋白基因插入 AcMNPV 基因组构建成一个假型病毒, 实验表明 VSV G 蛋白的存在提高了假型杆

* 国家自然科学基金资助项目 (30070034, 30025003) 和中国科学院知识创新工程方向性项目 (ksx2-sw-302)。

** 通讯联系人。

Tel: 027-87641106, E-mail: chenxw@pentium.whiov.ac.cn

收稿日期: 2002-05-10, 接受日期: 2002-06-12

状病毒在某些细胞系中的转导效率。

一些报道证实杆状病毒介导的目的 DNA 的表达水平,除了与所用启动子及所用的细胞有关外还受到其他外界因子的调控^[4,6]。例如,在带有 GFP 基因的重组杆状病毒转导细胞过程中添加丁酸盐,发现转导的细胞数量大大增加。丁酸盐是一种组蛋白去乙酰酶抑制因子,它能诱导染色体的超乙酰化,从而导致沉默基因的诱导表达^[7]。

1.4 稳定细胞系的构建及基因的长效表达

Condreay 等^[4]已经证明杆状病毒可以用来获得组成性表达目的基因的细胞系,而且他们还发现有一个大于 12 kb 的病毒基因组片段一直存在于固定转化的 CHO 细胞系的核中。进一步的研究表明,杆状病毒基因组的一些小的不连续片段(5~18 kb)通过不规则重组,以单一拷贝元件的形式整合到细胞染色体上^[8]。腺联病毒(AAV)能将自身基因组定点整合到人 19 号染色体。Palombo 等^[9]将一个由哺乳动物启动子调控的表达框,与 AAV 基因组负责位点特异整合的关键元件连在一起克隆到杆状病毒。利用此杆状病毒,他们克隆到表达框已经整合到 19 号染色体特异位点的稳定表达细胞系。

Fipaldini 等^[10]报道了利用重组病毒作为载体运转大 DNA 片段的长效表达现象。含有丙型肝炎病毒(HCV)基因组 9.5 kb 全长 cDNA 的杆状病毒,成功地在肝细胞系中表达了 HCV 聚合蛋白,而且聚合蛋白能被正确切割,重要的是外源基因的表达时间长达一个多月。

1.5 杆状病毒在体外研究中的应用

杆状病毒还可用于体外测定新药和抗病毒复合物的效果。如重组杆状病毒系统已成功用于检测乙型肝炎病毒(HBV) cDNA 在 HepG2 细胞中的表达,并用于测定抗病毒复合物的效果^[11]。Song 等^[12]首次尝试了将杆状病毒发展成 p53 缺陷型癌细胞的细胞杀伤载体的可行性。体外实验表明 P53 与抗肿瘤药物共同作用对癌细胞的杀死率,比 P53 和抗肿瘤药物各自单独地使用要高^[12]。这表明杆状病毒介导的基因转移与化疗的联合方案,为某些肿瘤的治疗提供了一条新的途径。

2 杆状病毒在体内(in vivo)介导基因表达

2.1 杆状病毒在体内转导的阻碍因素

Sandig 等^[13]研究了重组杆状病毒作为肝脏基因转移载体的有效性。他们利用全部或部分融合的

方法以及将重组病毒直接注射进肝实质的方法进行实验,但均未取得成功。实验发现在肝中补体系统是杆状病毒感染的主要抑制因素。

Hofman 等^[14]证实了杆状病毒在人血液中能激活经典的 C 级联途径。将杆状病毒直接注射到缺失 C5 成分的小鼠肝实质中,结果观察到杆状病毒的转导^[15]。这进一步说明补体系统是杆状病毒感染的主要抑制因素。

2.2 克服体内转导阻碍的措施

为了克服病毒被免疫中和,一种 *ex vivo* 的人肝病治疗方案应运而生。该方法是先将肝细胞从肝脏中取出,在体外培养,并用杆状病毒转导目的基因进入肝细胞,然后将转导后的肝细胞重新植入肝脏。利用这种方法可观察到杆状病毒在肝组织中介导的基因转移^[13]。

为了克服补体的中和作用,Huser 等^[16]将人的衰变加速因子(DAF)表达在病毒囊膜表面,从而获得了能抗补体系统的重组杆状病毒。另外,有实验表明直接注射到鼠四头肌的 VSV-G 杆状病毒有一部分不被补体系统中和^[17]。这些结果表明,使用合适的遗传策略可以克服补体系统对杆状病毒转导的抑制。

2.3 杆状病毒在体内的应用

Sarkis 等^[6]评价了杆状病毒在体内和体外对神经细胞的转导效率。他们直接将带有报告基因的杆状病毒注射进小鼠和大鼠的脑中,一周以后观察到了报告基因的表达。令人惊奇的是杆状病毒并没有被鼠的补体系统所中和。

Pieroni 等^[17]将杆状病毒注射到骨骼肌中来检测基因的转移效率。一个假型的 VSV-G 杆状病毒载体首次在体外显示能转导肌细胞系。该病毒注射到不同鼠种的后四头肌中,可以检测到报告基因的表达。另外,还发现在某些鼠种中报告基因表达了 35~178 天。这表明杆状病毒介导长效的基因表达可以在体内得到实现。这将有利于将杆状病毒开成长期、高效的体内转基因载体。我们亦正在开展重组杆状病毒在哺乳动物体内介导基因转移的相关研究。

3 结 语

杆状病毒是一类以节肢动物为唯一宿主的病毒,杆状病毒对哺乳动物是高度安全的。重组杆状病毒作为基因转移载体应用于哺乳动物细胞已经得到广泛的证实。杆状病毒通过一种尚未阐明的侵入

机制, 使其成为一个能对许多哺乳动物细胞系进行高效转移的载体. 在不同的细胞系中基因的表达受细胞内遗传外因子的调控. 杆状病毒具有可插入大片段, 容易得到高滴度的病毒粒子和无细胞毒性等优点. 许多经过遗传修饰的病毒还具有高转导效率和较广泛的宿主范围的优点. 该病毒载体能成功地用于体外的治疗研究和 *ex vivo* 的治疗研究, 并且还可开发成一个安全、高效的体内基因治疗载体. 最近几年来, 杆状病毒在小鼠和大鼠肝、骨骼肌和中枢神经系统的基因转移中取得成功, 这表明杆状病毒载体在基因治疗中具有巨大的应用价值.

参 考 文 献

- 1 顾健人, 曹雪涛. 基因治疗. 北京: 科学出版社, 2001. 2~ 22
Gu J R, Cao X T. Gene Therapy. Beijing: Science Press, 2001. 2 ~ 22
- 2 Hofmann C, Sandig V, Jennings G, *et al.* Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92** (22): 10099~ 10103
- 3 Shoji I, Aizaki H, Tani H, *et al.* Efficient gene transfer into various mammalian cells, including non-hepatic cells, by baculovirus vectors. *J Gen Virol*, 1997, **78** (Pt 10): 2657~ 2664
- 4 Condreay J P, Witherpoon S M, Clay W C, *et al.* Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (1): 127~ 132
- 5 Barsoum J, Brow R, McKee M, *et al.* Efficient transduction of mammalian cells by a recombinant baculovirus having the vesicular stomatitis virus G glycoprotein. *Hum Gene Ther*, 1997, **8** (17): 2011~ 2018
- 6 Sarkis C, Serguera C, Petres S *et al.* Efficient transduction of neural cells *in vitro* and *in vivo* by a baculovirus-driven vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (26): 14638~ 14643
- 7 Kruh J. Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. *Mol Cell Biochem*, 1982, **42** (2): 65~ 82
- 8 Merrihew R V, Clay W C, Condreay J P, *et al.* Chromosomal integration of transduced recombinant baculovirus DNA in mammalian cells. *J Virol*, 2001, **75** (2): 903~ 909
- 9 Palombo F, Monciotti A, Recchia A, *et al.* Site-specific integration in mammalian cells mediated by a new hybrid baculovirus-adenovirus-associated virus vector. *J Virol*, 1998, **72** (6): 5025~ 5034
- 10 Fipaldini C, Bellei B, La M N. Expression of hepatitis C virus cDNA in human hepatoma cell line mediated by a hybrid baculovirus-HCV vector. *Virology*, 1999, **255** (2): 302~ 311
- 11 Delaney W E, Lsom H C. Hepatitis B virus replication in human HepG2 cells mediated by hepatitis B virus recombinant baculovirus. *Hepatology*, 1998, **28** (4): 1134~ 1146
- 12 Song S U, Boyce F M. Combination treatment for osteosarcoma with baculoviral vector mediated gene therapy (p53) and chemotherapy (adriamycin). *Exp Mol Med*, 2001, **33** (1): 46~ 53
- 13 Sandig V, Hofmann C, Steinert S, *et al.* Gene transfer into hepatocytes and human liver tissue by baculovirus vectors. *Hum Gene Ther*, 1996, **7** (16): 1937~ 1945
- 14 Hofmann C, Strauss M. Baculovirus-mediated gene transfer in the presence of human serum or blood facilitated by inhibition of the complement system. *Gene Ther*, 1998, **5** (4): 531~ 536
- 15 Hofmann C, Lehnert W, Strauss M. The baculovirus system for gene delivery into hepatocytes. *Gene Ther Mol Biol*, 1998, **1** (4): 231~ 239
- 16 Huser A, Rudolph M, Hofmann C. Incorporation of decay-accelerating factor into the baculovirus envelope generates complement-resistant gene transfer vectors. *Nature Biotechnol*, 2001, **19** (5): 451~ 455
- 17 Pieroni L, Maione D, La Monica N. *In vivo* gene transfer in mouse skeletal muscle mediated by baculovirus vectors. *Hum Gene Ther*, 2001, **12** (8): 871~ 881

The Development of Baculoviruses as Novel Gene Therapy Vectors*

LIANG Chang-Yong, HU Zhi-Hong, CHEN Xin-Wen**

(Joint-laboratory of Invertebrate Virology, Wuhan Institute of Virology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

Abstract Baculoviruses are host specific for insects. The recent researches indicated that baculoviruses could entry into different mammalian cells, but do not replicate. The baculoviruses have been successfully used to deliver foreign DNA into mammalian cells *in vitro* and *in vivo* and efficiently mediated the expression of interest genes. These results indicated that baculovirus could be developed as potential gene therapy vectors. The recent development and prospects on using baculoviruses as target gene delivered vectors in gene therapy is reviewed.

Key words baculovirus, gene therapy, gene therapy vector, transduction

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30070034, 30025003) and The Chinese Academy of Sciences Knowledge Innovation Programs (ksx2-sw-302).

** Corresponding author. Tel: 86-27-87641106, E-mail: chenxw@pentium.whiov.ac.cn

Received: May 10, 2002 Accepted: June 12, 2002