维普资讯 http://www.cqvip.com

第13卷第2期 中国病毒学 Vol.13 No.2
1998年6月 VIROLOGICA SINICA Jun. 1998

# 用于基因治疗的病毒载体*

刘子夜 齐义鹏** 王业富
(武汉大学病毒研究所,武汉 430072)

# The Virus Vectors for Gene Therapy

Liu Ziye Qi Yipeng ** Wang Yefu
(*Institute of Virology, Wuhan University, Wuhan* 430072)

**关键词** 基因治疗,衍生载体,异向载体,重组病毒,表达
**Key words** Gene therapy, Derived vector, Xenovector, Recombinant virus, Expression

近几年来,基因治疗研究发展迅速,目的是将外源基因导入靶细胞,在体内产生疗效。早在1990年美国NIH的研究人员就将腺苷脱氢酶(adenosine deaminase, ADA)基因导入病人的淋巴细胞,改善了由于ADA基因缺损造成的免疫缺陷[1,2]。

基因治疗的基本策略包括:用正常基因置换突变基因恢复细胞的正常功能;导入外源基因并表达使靶细胞"自杀";导入外源基因并表达产生有利的整体反应;导入反义核酸直接封闭或破坏有害基因的表达等[1,3,4]。基因治疗所针对的人类疾病主要是遗传病(造成代谢障碍)、病毒病(如肝炎、AIDS等)和癌症。肿瘤的基因治疗是基因治疗研究的首要领域[4~6]。

基因导入的对象只限于体细胞,操作的方式可分为两大类:离体(*ex vivo*)导入,即将目的基因导入分离出来的造血干细胞和淋巴细胞,然后将转基因的细胞回输到体内[4,7];体内(*in vivo*)导入,即将目的基因直接导入机体内的靶细胞。体内导入涉及基因投送系统(delivery system),即介导外源基因的载体的研究[8],首先需要解决对细胞表面受体的靶向性问题,包括病毒介导[9]、脂质体或高分子聚合物介导[10~12]、基因枪-微粒轰击技术[4]等。有关转基因方式的研究已经成为基因治疗研究的新热点。

基因治疗与病毒学研究密切相关,或将病毒作为载体,或选用病毒调控元件构建目的基因的表达盒,或使用病毒来源的基因作为目的基因等。由于病毒表面结构蛋白对细胞膜受体的亲和能力,可以使外源基因以较高的效率导入细胞。携带目的基因的病毒载体通过反式互补或同源重组构建成重组病毒。病毒载体中通常重组了靶细胞允许的高效启动子,以驱动目的基因表达,但其感染过程在复制阶段流产,有的病毒载体可整合于宿主细胞染色体而获得目的基因的稳定表达。但是,复制性病毒(Replication Competent Virus, RCV)的复活和细胞染色体

收稿日期:1996-12-26,修回日期:1997-03-09
* 世界银行贷款项目资助课题
** 联系和负责作者

维普资讯 http://www.cqvip.com



在外源DNA整合时的未知变异是临床应用中的主要危险，这也是病毒载体研究的主要问题[9,13]。

## 1 逆转录病毒(Retrovirus, RV)衍生载体[9,14,15]

RV为单链RNA病毒，基因组长约10 kb。感染细胞后反转录为双链DNA，除HIV以外的RV均可整合于细胞染色体上。病毒的整合可能造成细胞染色体上原癌基因的表达，或者造成细胞肿瘤抑制因子基因的失活，从而导致细胞癌变。目前使用的RV载体来源于MoMLV。载体中只含有病毒基因组5′和3′两端的长末端重复(LTR)序列(包括启动子、增强子和整合必需的序列)和ψ信号(含有结构蛋白进行包装的结合序列和病毒外壳蛋白mRNA的剪切信号)。克隆有目的基因的病毒载体需要包装细胞才能成为成熟的病毒粒子，包装细胞的染色体上以前病毒形式整合有RV顺式缺陷的全部结构基因，可表达病毒结构蛋白并将载体DNA包装起来。另外，包装细胞染色体上整合的env基因是可选择的，如果整合MoMLV来源的env，则形成亲和鼠源细胞的嗜单向性(ecotropic)病毒，如ψ-2；如果整合人源病毒的env，则形成对人细胞有特异性的嗜双向性(amphotropic)病毒，这类细胞有PA317、ψ-crip等；改变env的结构可得到具有选择性嗜向的假型病毒(pseudotype virus)[16,17]。RV载体可高效转导复制状态细胞，适用于离体和体内途径的基因治疗，但是其应用是受限制的。复制性RV(RCR)可能来源于组建包装细胞时辅助病毒的污染，载体也可能与细胞染色体上整合的病毒片段重组，使复制能力复活。病毒基因组总是可以在靶细胞染色体上随机整合，即使有害的概率极低，但后果是未知的，这是此类载体的主要危险性。

## 2 腺病毒(Adenovirus, AdV)衍生载体[9,18]

AdV属于DNA肿瘤病毒，无囊膜结构，基因组为线状双链DNA，长约36 kb。分为早期和晚期两部分，早期基因E2产物是晚期基因表达的反式因子和病毒复制必需的因子，早期基因E1a、E1b产物还为其他早期基因表达所必需；晚期基因产物是病毒的结构蛋白。因此，E1区的缺损可造成病毒在复制阶段的流产。用于基因治疗的AdV是AdV-2和AdV-5，其转化细胞的能力相对较低。AdV衍生的基础载体是一个转移载体(如pAdE1CMV)，缺失了腺病毒的大部分基因，仅保留E1区、5′端反转末端重复(ITR)序列及其边界区，克隆外源基因的容量可达7～8 kb，并造成E1基因的插入失活。与野生型辅助病毒共转染细胞，在E1区发生同源重组，获得重组$E^-$AdV，这种病毒在普通细胞中不能复制形成病毒粒子。用于共转染的"包装细胞"(如293细胞)染色体上只整合了AdV左臂完整的E1区，E1a、E1b的表达产物为$E^-$AdV的复制提供反式因子。最近报道了另一种构建AdV表达载体的新方法，其主要改进是将AdV全基因组克隆到质粒上，并以该质粒转化的*E. coli*为受体菌；同样将外源基因表达盒克隆到含E1区的转移载体上，转化上述受体菌，E1区介导的同源重组在原核细胞中发生；提取重组的质粒DNA转染允许细胞，病毒粒子可复活成为表达外源基因的$E^-$AdV[19]。AdV有较广的敏感谱，并可以感染分裂状态的细胞；由于病毒无囊膜，其保证感染性的结构比较稳定。但是，由于AdV对靶细胞染色体不整合，其表达是短暂的；其他病毒特异性蛋白的同时表达，可造成机体的免疫应答，对病毒的重复使用是不利的。

## 3 腺联病毒(Adenovirus Associated Virus, AAV)衍生载体[9,20]

AAV在人群中普遍存在，但并不致病。该病毒的结构十分简单，核衣壳无囊膜，基因组为线状单链DNA，长约3 kb，只含有2个结构基因。AAV只有与辅助病毒AdV或痘病毒共感染

维普资讯 http://www.cqvip.com



才能在细胞中复制;在无辅助病毒时,AAV DNA可整合于宿主细胞19号染色体的特定区域。AAV基础载体仅含AAV的末端重复(TR)序列,共约145 bp,为AAV的复制和包装提供必要的顺式信号。外源基因表达盒置于两端的TR之间,容量限制在4.8 kb以内。完成重组AAV的构建为反式互补方式,但比RV复杂,需要携带AAV rep和cap两个基因的辅助载体共转染,同时还要有辅助病毒感染,重组了外源基因的AAV载体才能复制并得以包装。另外的研究将rep和cap克隆在AdV上,直接共转染,减少了一个辅助环节。重组AAV可整合感染非分裂状态的细胞,获得较稳定的长期表达。但是,即使在敏感宿主细胞中,要获得高滴度的重组AAV也是很困难的。

## 4 单纯疱疹病毒(Herpes Simplex Virus, HSV)衍生载体[13]

HSV为有囊膜的20面体,基因组为线状双链DNA,长152 kb,分为UL和US两个片段,由两对反转重复(IR)序列分隔。75个基因可分为极早期、早期和晚期三类。极早期、早期基因和晚期至少20种结构蛋白基因为必需基因,约占HSV基因组的一半;与HSV宿主范围、致病性、最适裂解循环等性质有关的一些基因为非必需基因。HSV基因组右端只有三个必需基因ICP-4、ICP-27和gD,在这些基因附近为非必需基因区,便于外源基因的置换插入,其容量可达45~50 kb。野生型HSV-1特异性亲和中枢神经系统(CNS)细胞,并进入裂解感染途径,即病毒复制并呈细胞毒性;HSV-1一般感染外周神经系统(PNS)细胞,并进入潜伏感染途径,但不在细胞染色体上整合,而是以串联体(concatemer)或环状分子形式存在。用于基因治疗的HSV重组载体应去除病毒的复制能力和神经毒性。研究表明,IE和ICP-4基因的缺失会影响病毒的细胞毒性,ICP-4⁻HSV-1只能在有互补功能的E5细胞中复制。有报道在HSV-1的ICP-4位相重组CMV极早期基因启动子驱动LacZ基因表达,该重组病毒可以在大脑细胞中潜伏,对神经元无毒性。将HSV作为转基因载体的另一种方法是所谓扩增子(amplicon)质粒的应用,该质粒上只含有HSV复制起始位点和包装序列("a"序列)[21]。将扩增子DNA与缺陷型HSV共转染允许细胞,可以得到有辅助病毒颗粒和质粒串联体颗粒的混合物。有研究证实,用扩增子介导可以安全地将外源基因导入神经元[22]。利用HSV衍生载体的基因治疗主要针对CNS和PNS疾病,但对于肿瘤的基因治疗也有前途,保留复制能力及毒性的病毒载体对动物脑部的肿瘤细胞是有效的。

## 5 昆虫杆状病毒(Insect Baculovirus, IBV)衍生载体[23,24]

IBV是昆虫的病原体,近十年来已成为一个热门的研究领域,研究将IBV作为基因工程载体、在昆虫细胞中实现外源基因的真核表达,以及将野生型或经基因改造的重组IBV用于害虫的生物防治。IBV研究通常以苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(*Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus, AcNPV)为代表种,其基因组为超螺旋环状双链DNA,长134 kb,AcNPV C6株已被测出DNA全序列[25];病毒粒子有囊膜,野生型病毒以多粒(multinucleocapsid)形式由多角体蛋白(polyhedrin, Ph)包埋,形成保护性结构——多角体(polyhedra)。极晚期表达的Ph对成熟病毒粒子是非必需的,有非常高的表达水平。重组病毒的构建一般采用同源重组法,即首先将外源基因克隆到AcNPV转移载体上的多角体蛋白基因启动子(Pph)下游;当重组转移载体与野生型AcNPV DNA共转染昆虫细胞时,多角体蛋白基因(ocu)边界序列可发生同源交换,而将外源基因定点整合到病毒基因组上,同时造成ocu失活,得到由Pph驱动外源基因表达的ouc⁻AcNPV。近几年发展的Bac-to-Bac系统利用原核转座子在大

维普资讯 http://www.cqvip.com



肠杆菌中构建重组病毒，第一步将外源基因克隆到一种转座子载体 pFastBacl 上，同样置于 Pph 下游、该载体上只具有 Pph 最必需的序列和 SV40 的 polyA 信号，在 Pph 5′端和 polyA 信号 3′端有两个转座子序列；然后将重组 pFastBacl 质粒转化一种特殊的受体菌，其中已存在含有 AcNPV 整个基因组的 Bacmid 载体（穿梭载体），并在辅助质粒的帮助下低拷贝复制，Bacmid 中的 AcNPV ocu 两侧已加上了转座子结合位点，可以接受 pFastBacl 上重组的外源基因表达盒的整合；提取重组的 Bacmid DNA 转化 Sf-9 细胞，即得到重组有外源基因的 ocu⁻AcNPV[26]。

IBV 的敏感宿主范围比较窄，在哺乳动物细胞中是否可能流产感染，还不能得出明确的否定结论。早期的研究发现，AcNPV 可以在一些哺乳动物细胞上吸附并进入细胞[27]；甚至发现 Pph 可以驱动报道基因在哺乳动物细胞中低水平表达[28,29]；还有研究表明，AcNPV 的另一个极晚期基因 p10 启动子，在哺乳动物细胞中可以被 AdV 来源的蛋白质反式激活驱动报道基因表达[30]。最近的两篇研究报告明确指出，将报道基因置于 CMV 极早期基因启动子或 RSV LTR 启动子驱动下，并将此表达盒插入 AcNPV ocu 位相，以转移载体同源重组方法构建重组病毒，介导报道基因在人原代肝癌细胞和肝癌细胞系 HepG2 细胞中表达，但直接在 Pph 下游克隆的报道基因不能表达。该研究认为，重组病毒通过肝细胞膜上的受体实现其内在化（internalization），并依赖于吞噬体酸化（acidification）过程，即在低 pH 条件下吞噬体膜与病毒膜融合而释放病毒粒子。在导入的整个重组 AcNPV DNA 中，报道基因重新被表达（de novo expression），IBV 介导的表达量高于磷酸钙、脂质体和 AdV 等方法。该研究认为，由于 AcNPV 在哺乳动物细胞中不复制、不整合、无非目的基因表达、无细胞毒、病毒有囊膜可将 DNA 高效导入细胞并对某些肝癌细胞有特殊的靶向性，因此，IBV 有潜力作为安全的基因投送系统，这种仅作为介导目的基因表达盒的“外壳”（shell）重组 IBV 称为异向载体（xenovector）[31,32]。

我们的研究证实，将 AcNPV 的 ocu（包括调控区）亚克隆到质粒上，并置于 CMV 极早期基因启动子下游，在 cos 细胞中检测到 Ph 的明显的抗原性，据此至少可以认为，ocu 的调控区在哺乳动物细胞中可以被识别。推测 IBV 与哺乳动物细胞可能并无严格的“物种屏障”（speciese barrier），某些基因可能被哺乳动物细胞允许的调控元件串联激活。因此我们认为，IBV 不论作为杀虫剂还是基因治疗载体，其安全性都有待进一步研究，但就目前的知识来评价，这两方面的研究都是可以成立的。

可用于基因治疗的病毒载体还有其他来源，如：痘苗病毒（vaccinia virus）作为外源基因表达载体早有大量研究，在其双链 DNA 192 kb 的基因组中存在多位置的非必需区，可供外源基因重组的容量为 20～40 kb，该病毒通常的研究目的是构建多价基因疫苗，用于肿瘤的基因治疗是有前途的，病毒本身具有安全性，但进行基因改造后未知因素随之产生，构建非复制型载体可能更为安全[33]。流感病毒（Influenza virus）的研究证实了体外重组核蛋白体（RNP）的感染性，有报道将 HIV-1 gp120 的抗原决定簇 12 肽编码序列重组于 HA 蛋白基因中，表达的 HA 嵌合蛋白的免疫血清与 gp120 产物存在免疫反应，该病毒载体的优越性在于它对特异性 IgA 粘液免疫的诱导[34]。仙台病毒（Sendai virus）的研究有待进一步深入，该病毒特有的细胞膜融合能力可使这种载体以较高的效率介导基因转移。Semliki 森林病毒（Semliki forest virus）可作为真核表达载体，也可作为基因治疗载体候选者。Sindbis 病毒（Sindbis virus）的研究日益增多，近来的研究表明，该病毒具有诱导细胞程序性死亡的能力及对神经细胞的特异嗜性。麻疹

维普资讯 http://www.cqvip.com



病毒(Measles virus)是较温和的致病性病毒,即使构建的病毒载体有复制能力,其安全性也不是主要问题。

在基因治疗研究中,所应用的各种病毒载体的共同优点就是高效率介导外源DNA向细胞的转移;某些病毒对肿瘤和某些组织的特异嗜性对基因转移的靶向性十分有利,在病毒核壳上嵌合异源肽段的假病毒则会提供另一些更有效的靶向作用。但是,安全性问题始终是病毒介导基因治疗临床应用的主要障碍,而IBV载体可以认为相对最安全,但它与哺乳动物细胞的关系可能也是最不清楚的。因此,要保证安全性只能以非病毒方式介导单纯的外源基因表达盒,向靶细胞导入的是质粒DNA,其中除了目的基因及其调控区外,只具有原核细胞允许的简单质粒结构[35]。当然,真核细胞允许的调控序列和目的基因本身多数来源于病毒,但其结构和功能是可以弄清的。这种方式对介导手段的效率要求较高,近来许多研究集中在这个方向上。这种方法被认为是基因治疗最为可取的方式,称为基因治疗学(Gene therapeutics)[36]。

## 参 考 文 献


1 Miller AD. Human gene therapy comes of age. Nature, 1992, 357:455~460

2 Anderson WF. Human gene therapy. Science, 1992, 256:808~813

3 Mulligan RC. The basic science of gene therapy Science, 1993, 260:926~932

4 Morgan RA, Anderson WF. Human gene therapy. Annu Rev Biochem, 1993, 62:191~217

5 Rosenberg SA. Gene therapy for cancer. J Am Med Assoc, 1992, 268:2416~2419

6 Friedmann T. Gene therapy of cancer through restoration of tumor-suppressor functions? Cancer, 1992, 70 (Suppl): 1810~1817

7 Grossman M, Raper SE, Engelhardt JF *et al*. Successful *ex vivo* gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. Nat Genet, 1994, 6:335~341

8 Zhu N, Liggitt D, Debs R *et al*. Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice. Science, 1993, 261:209~211

9 Smith AE. Viral vector in gene therapy. Annu Rev Microbiol, 1995, 49:807~838

10 Felgner PL, Ringold GM. Cationic liposome-mediated transfection. Nature, 1989, 337:387~388

11 Felgner PL, Kumar R, Tsai YJ *et al*. Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. J Biol Chem, 1994, 269:1~12

12 Furs S, Wu GY. Receptor-mediated targeted gene delivery using asialoglycoprotein-polylysine conjugates. In: Wolff JA ed. Gene therapeutics: methods and applications of direct gene transfer. Boston: Birkhauser, 1994

13 Glorioso JC, DeLuca NA, Fink DJ. Development and application of herpes simplex virus vectors for human gene therapy. Annu Rev Microbiol, 1995, 49:675~710

14 Miller AD, Rosman GJ. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. Biotechniques, 1989, 7:980~990

15 Huber BE, Richards CA, Krentsky TA. Retroviral-mediated gene therapy for the treatment of hepatocellular carcinoma: An innovative approach for cancer therapy. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88:8039~8043

16 Battini JL, Hard JM, Danos O. Receptor choice determinants in the envelope glycoproteins of amphotropic, xenotropic and polytropic murine leukemia viruses. J Virol, 1992, 66:1468~1475

17 Burns JC, Friedmann T, Yee JK *et al*. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90:8033~8037

18 Berkner KL. Expression of heterologous sequences in adenoviral vectors. Curr Top Microbiol Immunol, 1992, 158:39~66

维普资讯 http://www.cqvip.com



19 Chartier C, Gantzer DM, Mehtali M *et al*. Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli* J Virol, 1996, 70:4805～4810

20 Muzyczka N. Use of adeno-associated virus as a general transduction vetor for mammalian cells. Curr Top Microbiol Immunol, 1992, 158:97～129

21 Spaete RR, Frenkel N. The herpes simplex virus amplicon: a new eucaryotic defective-virus cloning-amplifying vector Cell, 1982, 30:295～304

22 Kaplitt MG, Kwong AD, Pfaff DW *et al*. Preproenkephalin promoter yields region-specific and long-term expression in adult brain after direct *in vivo* gene transfer via a defective herpes simplex virus vector. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91:8979～8983

23 Miller LK Baculoviruses as gene expression vectors. Annu Rev Microbiol, 1988, 42:177～199

24 O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA. Baculovirus expression vector: a laboratory manual. New York: W. H. Freeman and Company, 1992

25 Ayres MD, Howard SC, Possee RD *et al*. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. Virology, 1994, 202:586～605

26 Anderson D, Harris R, Luckow V *et al*. Rapid generation of recombinant baculovirus and expression of foreign genes using the Bac-to-Bac baculovirus expression system. Focus, 1995, 17:53～58

27 Groner A, Granados RR, Burand JP. Interaction of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus with two nonpermissive cell lines Intervirology, 1984, 21:203～209

28 Carbonell LF, Klowden MJ, Miller LK Baculovirus-mediated expression of bacterial genes in dipteran and mammalian cells. J Virol, 1985, 56:153～160

29 Carbonell LF, Miller LK. Baculovirus interaction with nontarget organisms: a virus-borne reporter gene is not expressed in two mammalian cell lines. Appl Environ Microbiol, 1987, 53:1412～1417

30 Knebel D, Doerfler W. Activation of an insect baculovirus promoter in mammalian cells by adenovirus function. Virus Res, 1987, 8:317～326

31 Hofmann C, Sandig V, Jennings G *et al*. Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors Proc Natl Sci USA, 1995, 92:10099～10103

32 Boyce FM, Bucher NLR. Baculovirus-medisted gene transfer into mammalian cells. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93:2348～2352

33 Miner JN, Hruby DE. Vaccinia virus: a versatile tool for molecular biologists. Tibtech, 1990, 8:20～25

34 Li S, Polonis V, Palese P *et al*. Chimeric Influenza virus induces neutralizing antibodies and cytotoxic T cells against human immunodeficiency virus type 1 J Virol, 1993, 67:6659～6666

35 Wolff JA, Malone RW, Acsadi G *et al* Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. Science, 1990, 247:1465～1468

36 Felgner PL, Rhodes G. Gene therapeutics. Nature, 1991, 349:351～352