DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.15.035
第25卷第15期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 15
1396 2003年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2003

综述

文章编号:1000-5404(2003)15-1396-03

α-病毒载体在基因治疗中的作用

The role of alpha virus in gene therapy

倪 兵 综述,吴玉章 审校 (第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

基因治疗是近10年来随着现代医学与分子生物学相结合而出现的,基因治疗的研究已迅速扩大到肿瘤、艾滋病、心血管病和神经系统疾病等。而且,基因载体(包括质粒、病毒和脂质体等)的研究也进展迅速,各种新型载体不断出现。近10年来,α-病毒的多个成员已经被作为表达载体,并被引入基因治疗领域,其中最常用的是森林病毒(Semliki forest virus, SFV)、Sindbis病毒(Sindbis virus, SIN)和委内瑞拉脑炎病毒(Venezuelan equine encephalitis virus, VEE)。除了原型病毒之外,其重组形式的病毒也相继出现。由于这些α-病毒载体具有制备迅速、简便,病毒滴度高,宿主范围广,胞浆中高RNA复制率和极高的外源基因表达水平等特点,因而近年来以α-病毒为载体的基因治疗越来越引起人们的重视。

1 α-病毒的分子生物学

α-病毒属于披膜病毒科,多通过昆虫传播感染鸟类和动物,也可通过蚊虫感染人类,表现为脑炎、心肌炎和皮疹等。其基因组+ssRNA长度为12 kb,5′端2/3的区域编码合成非结构蛋白(Nonstructural proteins, nsPs),它们是病毒RNA转录和基因组复制所必需的;3′端1/3区域编码合成结构蛋白。α-病毒的宿主范围广泛,可以在哺乳动物和昆虫体内的不同细胞中复制,其病毒感染吸附依赖于敏感细胞表面的受体。其基因组RNA(49S RNA)一方面可以作为mRNA翻译合成非结构蛋白(nsPs),另一方面又可以作为复制的模板合成负链RNA;反过来负链RNA又是新的病毒基因组RNA和26S亚基因组RNA合成的模板。在病毒基因组中(第746~1 225碱基之间)存在衣壳化信号,它和衣壳蛋白结合,从而选择性地对病毒基因组进行包装。

α-病毒已经发展成3种不同类型的载体:①复制缺陷型载体:通过将26S亚基因组RNA和nsPs RNA分割开来,将它们以cDNA的形式分别构成两个质粒(辅助质粒和表达质粒)。在nsPs cDNA下游插入外源基因,从而实现外源基因同nsPs基因同转录和同复制。利用nsPs的极高的RNA复制酶活性,实现外源基因的大量表达。但由于包装信号位于nsPs中,而结构蛋白基因又同非结构蛋白基因分离开,故最终形成的病毒颗粒中并不存在结构蛋白基因。新生成的病毒能够感染细胞1次,但不会进一步形成新的病毒颗粒。外源基因的表达虽然量大,但却是短暂的。②复制型载体:在全长基因组之外还含有第2个亚基因组启动子,感染细胞后会引起病毒的复制。③分层DNA载体(Layered DNA-vector):不含结构蛋白基因,但在复制子cDNA上游引入Ⅱ型RNA聚合酶盒以启动复制子cDNA的转录,然后复制子才能发挥自己的作用,带动外源基因的表达。

2 α-病毒载体的应用

2.1 在肿瘤细胞系和肿瘤动物模型中的作用

由于其广泛宿主范围,α-病毒能感染很多不同的肿瘤细胞系。如可以感染前列腺癌细胞,并表达高水平的β-gal。而且,重组病毒在感染的细胞中可以诱导明显的细胞凋亡[1]。另外,感染体外培养的前列腺组织也可诱导高水平的β-gal表达,并主要集中在小管上皮细胞中,提示它在治疗前列腺肿瘤中的良好前景。将IL-12的两亚基p35和p40同时克隆到SFV中,用此病毒注射到小鼠B16黑色素瘤中可以观察到显著的肿瘤消退和肿瘤血管形成受到抑制[2]。反复注射会加强此效果,且不会产生针对SFV的任何免疫反应。在裸鼠的人肺癌移植瘤内注射SFV载体也可产生类似的效果。很可能是SFV载体本身诱导了p53非依赖的细胞凋亡[3]。

2.2 制备靶向α-病毒载体

为了进一步提高α-病毒载体对肿瘤的免疫疗效,不得不考虑其广泛宿主性问题。最好的办法就是对α-病毒载体进行靶向设计。一个靶向方法是将蛋白A的IgG结合结构域引入α-病毒胞膜蛋白E2中。由于E2蛋白对病毒的感染性极其重要,因而,这样的修饰会改变嵌合病毒的宿主范围。如这种修饰过的病毒感染BHK细胞的能力下降10^5倍;而用针对特定细胞表面受体标志的单克隆抗体处理过的细胞,则可通过α-病毒上的蛋白A位点同结合于这些细胞上的IgG位点相互作用而通过受体介导的方式进入特定的宿主细胞。另一个靶向方法是在α-病毒胞膜蛋白基因中引入α-和β-hCG基因,缺少LH/CG受体的细胞将不会被感染,而绒毛膜癌细胞则显示出很高的感染率。还有一条方法是将α-病毒(如SIN)在体外转录成生物素化的基因组RNA,然后同链霉亲和素——蛋白A融合蛋白和单克隆抗体一起,在阳离子脂质体的介导下,以单克隆抗体剂量依赖的方式特异感染相应的靶细胞[4]。

2.3 应用RNA/DNA载体作为疫苗

目前,裸RNA载体和分层(Layered)DNA载体也已成功地应用于疫苗研究。将含流感NP基因的裸SFV RNA注射入小鼠股四头肌,产生了强烈的体液免疫反应。单次注射SFV-LacZ RNA能延长荷瘤鼠生存时间,还可以使小鼠产生对肿瘤的保护性效应。自复制型分层DNA载体可以诱导抗原特异的免疫反应,并且其用量仅为传统DNA载体的1 000倍以下。如仅用10 ng SIN-HSVgB质粒的单次剂量,就可诱导出针对单纯疱疹病毒

作者简介:倪 兵(1968-),男,湖北省黄梅县人,博士,副教授,主要从事肿瘤DNA疫苗方面的研究。电话:(023)68752236-614

收稿日期:2002-03-10;修回日期:2002-05-30

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

糖蛋白 B 的显著的免疫反应[5]。

2.4　从 SFV 载体产生逆转录病毒颗粒

α-病毒在基因治疗中的一个间接作用是利用 SFV 载体制备逆转录样颗粒。通过共转染分别来自位于 3 个不同 SFV 载体上的逆转录病毒 MMLV(Moloney murine leukemia virus)的 *gag-plo*, *env* 和 LTR-ψ$^+$-*neo*-LTR 质粒入 BHK 细胞, 可以制备出这种颗粒。所产生的这种胞外病毒样颗粒显示出较高的滴度, 并拥有逆转录酶活性。而且, 这种逆转录病毒包装技术可以使用含内含子的基因结构。这种方法的优点是简便、迅速, 不需要辅助载体, 从而非常有效地制备带两性或同向性胞膜的病毒。

另一条途径是利用 SFV 介导逆转录病毒 RNA 在胞浆内合成。逆转录病毒 RNA 克隆到 SFV 26S 亚基因组启动子下游, 然后全长嵌合 SFV-逆转录病毒 RNA 在体外转录, 再通过电穿孔法转入逆转录病毒包装细胞; 或通过先制备含全长逆转录病毒基因组的重组 SFV 颗粒, 再通过它感染包装细胞系而将逆转录病毒 RNA 送入。进入的 RNA 可以在 SFV 复制酶的帮助下得到大量扩增, 最后制备出高滴度完全功能的逆转录病毒。利用 α-病毒/逆转录病毒杂合载体系统, 可以制备含逆转录病毒载体序列的小基因(Minigene), 如用此杂合颗粒感染 Phoenix 逆转录病毒包装细胞系, 可在胞浆中产生含逆转录病毒载体序列的 IX 因子小基因。用此小基因转导 TE671 细胞, 可以使小基因稳定转移和表达 IX 因子[6]。

还有一种方法是 SFV 胞膜蛋白基因用 MuLV 的 *env* 基因取代, 则会产生包装成小病毒颗粒, 能特异感染带有 MuLV 受体的细胞。

3　载体研究进展

虽然 α-病毒在许多基因治疗上很有效, 但是还是有着诸多限制, 特别是宿主细胞的细胞毒性和表达的短暂性。为了解决这些问题, 现在已经构建了非细胞毒性的 SIN 和 SFV。SIN 载体的这种改良是在 nsP2 基因上的一个点突变(Pro726Ser), 从而获得非细胞毒性的表型。然而, 这种载体的 RNA 复制能力却大大下降, 并且这种表型只是针对一部分细胞系。通过对低毒性 SFV 株的分子分析, 发现 nsP2 基因上核定位信号(Nuclear localization signal, NLS)中的一个氨基酸残基(第 649 位)替换, 可以使 nsP2 蛋白滞留在胞浆中, 从而减少对宿主细胞 DNA 合成的危害。将这种突变(Arg649Asp)引入 SFV 表达系统中, 产生一个更低细胞毒表型。但相邻的一个氨基酸突变(Arg650Asp)和另一个 nsP2 上氨基酸残基突变(Ser259Pro)所生成的载体可以显著提高基因的表达, 并延长宿主细胞的存活时间。这种重组载体非细胞毒性表型适用于所有现已检测过的细胞(BHK、CHO、HeLa、HEK293 等)和海马神经元原代培养组织。它的滴度比传统载体低 10 倍, 但制备病毒的最适温度却降至 31 ℃。

为了延长表达时间, 将随机突变过的复制子(nsP1-4 基因)同 *neo* 基因一起转入 BHK 细胞, 然后用 G418 筛选出持续表达的抗性克隆。通过对这些克隆的分析发现, 这些突变均位于 SFV 或 SIN nsP2 上的点突变或缺失[7]。这些新型载体显示能在宿主细胞中持续复制, 因此在要求持续表达时, 将会非常有用。不管是用嘌呤霉素来筛选非细胞毒性的 SIN 突变株, 还是用 G418 来筛选各种持续复制的 SFV 和 SIN 突变株, 显示所有这些突变均位于 nsP2 基因上[7], 说明 nsP2 基因可能对宿主的细胞毒性和表达的持续性有重要作用。

为了能切实将 α-病毒载体系统应用到基因治疗中, 一个最使人感兴趣的领域是开发温度敏感型载体。严格的温度敏感型 SIN 载体显示只是在 29 ℃下培养才有高度的毒性凋亡, 而在 37 ℃时则没有这种特性。同样, 温度敏感型 SFV 载体也已开发出来。在 nsP2 中引入两个点突变, 产生了一个新型 SFV 载体, 它既没有细胞毒性, 又有温度敏感型表型, 还可以提高报告基因的表达[8]。

4　同其他病毒载体的比较

很多病毒载体已经被应用到基因治疗领域, 包括逆转录病毒和腺病毒等, 相比较而言, α-病毒是这个领域的一个新成员。

关于插入外源基因的能力, α-病毒要好于 lentivirus 和腺相关病毒, 后两者只能容纳 4 kb 长的片段, 而前者可容纳至少 7 kb 的片段, 这意味着可以克隆入多个基因。重组 α-病毒的制备非常简单而迅速, 在 2 d 之内, 就可产生 10^9 ~ 10^{10} /ml 滴度的病毒颗粒, 不需要进一步的纯化或离心。而逆转录病毒、lentivirus 和 AAV 相比起来, 则所花时间、精力都要大, 而且病毒的滴度要低得多。虽然腺病毒在临床实验中取得较好的治疗效果, 但机体针对病毒的免疫反应的问题却较突出。如注射高剂量的表达 HSV-tk 的腺病毒, 在大鼠和非人灵长类动物中均显示出脑膜炎症状[9]。AAV 载体也显示出对机体器官如关节的损害[10]。相比较而言, α-病毒载体则没有这些缺陷, 它可以反复注射而不会引起机体针对病毒自身的免疫反应。如, 连续注射 3 d(每天 1 次), 1 周后, 再重复此过程 1 次, 也不会产生针对病毒本身的免疫反应。但是, 目前版本的 α-病毒, 它的最大特点是其表达外源基因的短暂性, 这一特性, 在机体需要长期表达时是一个缺点, 但从免疫学的角度来看, 这也是一个优点, 因为短时间高强度刺激是符合免疫系统的要求的。而且, 其短暂性使得其整合入宿主细胞基因组的可能性更低。

5　结论与展望

如上所述, α-病毒适合于很多种基因治疗的应用。反复注射后不会引起对病毒本身的免疫反应是个可喜的结果。可以根据需要, 使用 α-病毒颗粒、裸 RNA 和 DNA 载体。应用 α-病毒载体产生逆转录样颗粒使这种载体的产生更方便。使用病毒载体做临床实验和药物开发, 无疑需要高度的生物安全性。这可以通过使用减毒 α-病毒株, 大多数情况下为复制缺陷型载体; 在作疫苗应用时, 还可使用裸 RNA 或 DNA 载体。在第二代 SFV 载体的辅助载体 p62 基因(E2 和 E3 蛋白基因的前体)中引入 3 个点突变, 可产生只能条件感染的重组颗粒。这种修饰阻止了重组 RNA 和辅助 RNA 在病毒包装细胞中通过同源重组而产生有复制能力的 SFV。为了进一步提高 SFV 载体的生物安全性, 现已将辅助载体再进一步分为两个质粒[11], 一个含病毒的衣壳蛋白的基因序列, 另一个含胞膜基因序列。然后在衣壳序列中引入一个突变(Ser219Ala), 这些处理的组合产生了极高生物安全性的载体, 从理论上说, 生成有复制能力的 SFV 的概率只有 4×10^{-17}。为了方便地在 GMP 条件下制备 α-病毒, 构建包装细胞系是必需的。现在已经构建出了能稳定表达 SIN 结构的 BHK 细胞, 可以用 SIN 和 SFV 转染或感染此细胞系以制备

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

重组α-病毒颗粒。但是,用此细胞系所产生的病毒滴度要比常规方法低至少一个数量级。这是一个将来必须解决的问题。

关键词:α-病毒;基因治疗;载体
中图法分类号:R373; R459.9 文献标识码:A

参考文献:

[1] Hardy P A, Mazzini M J, Schweitzer C, *et al*. Recombinant Semliki Forest virus infects and kills human prostate cancer cell lines and prostatic duct epithelial cells *ex vivo*[J]. Int J Mol Med, 2000, 5(3): 241—245.

[2] Asselin-Paturel C, Lassau N, Guinebretiere J M, *et al*. Transfer of the murine interleukin-12 gene *in vivo* by a Semliki Forest virus vector induces tumor regression through inhibition of tumor blood vessel formation monitored by Doppler ultrasonography[J]. Gene Ther, 1999, 6(4): 606—615.

[3] Murphy A M, Morris-Downes M M, Sheahan B J, *et al*. Inhibition of human lung carcinoma cell growth by apoptosis induction using Semliki Forest virus recombinant particles[J]. Gene Ther, 2000, 7(17): 1477—1482.

[4] Sawai K, Meruelo D. Cell-specific transfection of choriocarcinoma cells by using Sindbis virus hCG expressing chimeric vector[J]. Biochem Biophys Res Comm, 1998, 248(2): 315—323.

[5] Hariharan M J, Driver D A, Townsend K. *et al*. DNA immunization against herpes simplex virus: enhance efficacy using Sindbis virus-based vector[J]. J Virol, 1998, 72(2): 950—958.

[6] Wahlfors J J, Morgan R A. Production of minigene-containing retroviral vectors using an alphavirus/retrovirus hybrid vector system[J]. Hum Gene Ther, 1999, 10(7): 1197—1206.

[7] Perri S, Driver D A, Gardner J P, *et al*. Replicon vectors derived from Sindbis virus and Semliki Forest virus that established persistent replication in host cells[J]. J Virol, 2000, 74(20): 9802—9807.

[8] Lundstrom K. Alphavirus vectors: applications for DNA vaccine production and gene expression[J]. Intervirology, 2000, 43(4—6): 247—257.

[9] Driesse M J, Esandi M C, Kros J M, *et al*. Intra-CSF administered recombinant adenovirus causes an immune response-mediated toxicity[J]. Gene Ther, 2000, 7(16): 1401—1409.

[10] Goater J, Muller R, Kollias G, *et al*. Empirical advantages of adeno associated viral vectors *in vivo* gene therapy for arthritis[J]. J Rhematol, 2000, 27(4): 983—989.

[11] Smerdou C, Liljestrom P. Two-helper RNA system for production of recombinant Semliki Forest virus particles[J]. J Virol, 1999, 73(2): 1092—1098.

(编辑 王 红)

(上接1393页)

便常规镜检红细胞、白细胞阳性3例。

1.4 预后

17例入院后及时予以抗病毒、基础液体疗法及支持治疗,全部治愈出院。

2 讨论

肾综合征出血热是肾综合征出血热病毒感染所致。病毒直接损伤血管内皮细胞,抗原抗体复合物沉积于毛细血管壁,并有补体参与,使血管通透性增强导致血浆外渗,组织水肿,微循环障碍。其基本病理变化是全身各脏器和组织微血管内皮的严重损伤。因此,肾综合征出血热临床表现错综复杂,且近年来肾综合征出血热流行较广,非典型病例逐年增多,致使临床误诊频繁发生。据文献[2,3]报道肾综合征出血热误诊率高达40.6%~84.6%,随着医院级别的增高,其误诊率也增高[4]。误诊范围较广,误诊疾病达60余种之多[4]。通过对本组17例误诊病例分析,我们认为应从中吸取以下经验教训:①详细询问病史:肾综合征出血热是一种自然疫源性疾病,发病有其地域性及季节性。因此,流行病学资料是诊断的重要依据之一,其在临床工作中常被忽略。②认真细致查体:除"三红"外,本病的特异性体征是皮肤粘膜出血点,特别是软腭出血点,部分不典型病例仅见腋下出血点。若仔细查体,对诊断有重要意义。③全面分析临床资料:在临床诊断中,诊断思路要开阔,不应仅根据部分临床表现及在化验检查异常即片面地作出诊断。如本组中有9例因血谷丙转氨酶增高即诊断为病毒性肝炎;有2例因尿蛋白阳性、血尿素氮增高即诊断为肾炎;有1例因血小板减少、皮肤出血点即诊断为血小板减少性紫癜;有3例因腹痛、腹泻、脓血便、大便常规见红细胞及白细胞即诊断为急性菌痢等。

肾综合征出血热的治疗强调"三早一少",即早诊断、早休息、早治疗、少搬动患者[5]。因此,肾综合征出血热的早期诊断对其治疗及预后均有重要意义。临床上我们体会到在肾综合征出血热的早期诊断中应注意以下几点:①肾综合征出血热疫区或来自其疫区的病人,若出现类似"上感"症状,如发热、头痛、咽痛,同时伴咽部充血、软腭出血点,不能排除本病。②对有发热、恶心、呕吐等消化道症状的病人,若血谷丙转氨酶增高,但黄疸少或无,同时伴软腭出血点、血小板减少、尿蛋白阳性等,应提高警惕,与病毒性肝炎相鉴别。③疾病早期即出现发热、低血压、少尿或无尿,三期重叠的病人,应怀疑本病,尽早排除其它感染性休克。④以发热、腰痛为主诉的病人,实验室常规检查中除反复观察尿常规的动态变化及肾功能等有关检查外,还应注意有无血小板计数减少,血异型淋巴细胞。如有可疑应早期进行实验室特异性检测确诊。⑤急性感染性疾病的病人,经常规处理无好转,体温下降后,全身中毒症状反而加重者,应考虑本病的可能性。

关键词:肾综合征出血热;误诊
中图法分类号:R512.8 文献标识码:B

参考文献:

[1] 卫生部1987年2月4日(87)卫防字4号文颁发. 流行性出血热防治方案[J]. 中华传染病杂志, 1988, 6(3): 188—192.

[2] 于丹萍, 宋 干. 流行性出血热[M]. 第2版. 北京:人民卫生出版社, 1983. 289.

[3] 罗瑞德, 王心禾, 范家珍. 城市型流行性出血热(附13例分析)[J]. 临床内科杂志, 1984, 1(4): 32—31.

[4] 李振奇. 流行性出血热研究的进展及误诊现状[J]. 临床误诊误治, 1999, 12(3): 167—169.

[5] 李梦东. 实用传染病学[M]. 北京:人民卫生出版社, 1994. 156.

(编辑 郭建秀)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net