

## 腺相关病毒载体及其在基因治疗中的应用

李晨<sup>1,2</sup>综述,安云庆<sup>2</sup>审校

[关键词] 腺相关病毒;基因治疗;综述

中图分类号:R394.8 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2006)01-0051-02

[本文著录格式] 李晨,安云庆.腺相关病毒载体及其在基因治疗中的应用[J].中国康复理论与实践,2006,12(1):51-52.

### 1 腺相关病毒的生物学特性

腺相关病毒(adenovirus associated virus, AAV)属微小病毒科,病毒颗粒直径约 20~26 nm,20 面体,无包膜,其病毒基因组 DNA 为单链,线形。AAV 属于依赖性病毒,最初被疑为腺病毒培养过程中的污染成分,后来发现它常定居于人类呼吸道和胃肠道,且能够在哺乳动物细胞中长期潜伏存在。

### 2 AAV 载体的结构和功能

AAV 基因组 DNA 长 4680 bp,两端各有一结构完全相同的反向末端重复序列(inverted terminal repeats, ITRs),长 145 bp,其中外侧 125 个核苷酸配对折叠成 T-型发夹样的回文结构。ITRs 包含 AAV 病毒复制、整合、拯救和包装所必需的全部顺式作用元件<sup>[1]</sup>。最近研究表明,ITRs 还具有比较弱的促进 mRNA 转录的活性<sup>[2]</sup>。两端的 ITRs 之间为两个开放式阅读框架,含 Rep 基因与 Cap 基因,分别编码与 AAV 复制相关的 Rep 蛋白和包装成完整病毒所需的衣壳蛋白(Cap 蛋白)<sup>[1]</sup>。

Rep 基因含有 p5 和 p19 两个启动子。其中 p5 启动基因编码产生 Rep78 和 Rep68 蛋白;p19 启动基因编码产生 Rep52 和 Rep40 蛋白。Rep52 和 Rep40 蛋白羧基末端氨基酸序列分别与 Rep78 和 Rep68 蛋白相同。上述 4 种非结构 Rep 蛋白是一种位点特异性的 DNA 结合蛋白,具有切口酶和解螺旋酶活性,可调控自身 mRNA 的转录,在病毒 DNA 整合、复制、包装中起重要作用。Rep78 和 Rep68 蛋白能与 ITRs 中的特定序列(5'-GCTCGCTCGCTC-3')结合(当 ITRs 自我折叠时可加强这种结合作用),与 AAV 基因的正负调控有关。Rep78 和 Rep68 蛋白还具有 ATP 酶和解螺旋酶的功能,当它们与 ITRs 结合后,可通过对 5'-T/TGG 的识别在第 124 位核苷酸处特异性切割 DNA。在没有辅助病毒和刺激因素存在条件下,Rep78 和 Rep68 蛋白只有微量表达;在辅助病毒和刺激因素存在条件下,Rep78 和 Rep68 蛋白的表达增加,这对 AAV 病毒从整合状态的拯救、AAV 基因的表达、AAV DNA 的复制和位点特异性的整合都是必需的。Rep52 和 Rep40 蛋白参与病毒的装配,不参与病毒双链 DNA 合成。

Cap 基因含有 p40 启动子,编码衣壳蛋白。p40 启动基因转录形成约 2.6 kb 和 2.3 kb mRNA,拼接后分别编码分子量分别为 87.73 和 61 kDa 的 VP1、VP2 和 VP3 结构蛋白,3 种结构蛋白在成熟病毒颗粒中的比例约为 1:1:10。在没有 VP1 存在条件下,VP2 和 VP3 就可以包装子代单链 DNA,但此种形

式的病毒颗粒感染性较低。目前认为 VP1 对病毒颗粒的稳定性或感染性具有重要作用;VP2 在病毒样空颗粒的装配中起重要作用;VP3 与 VP1 或 VP2 共同完成核定位。

### 3 基因治疗中影响 AAV 载体转染效率的因素

目的基因的转染效率是评价基因治疗载体重要指标,也是改进载体的主要方向。影响 AAV 载体转染效率的因素有以下几个方面:

**3.1 易感细胞表面病毒受体类型及其丰度** 各种血清型 AAV 载体主要区别是衣壳蛋白不同,因此对不同的组织和细胞的转染效率存在差异。如 AAV2 进入细胞的过程是由基础受体(硫酸肝素蛋白多糖受体)和辅助受体[包括 I 型成纤维细胞生长因子受体(FGFR1)<sup>[3]</sup>和整合素  $\alpha V\beta 5$ <sup>[4]</sup>]介导产生。AAV5 主要通过细胞表面 N 端富含硅酸的受体结合进入细胞;AAV4 则通过细胞表面 O 端富含硅酸的受体结合进入细胞。其他血清型 AAV 受体的研究报道目前尚未见到。AAV2 载体对多种组织细胞(如表面具有硫酸肝素蛋白多糖受体的肌肉、视网膜、肝脏、神经元细胞等)具有较好的转导效率;呼吸道纤毛上皮细胞相对缺少硫酸肝素蛋白多糖受体,故 AAV2 载体在肺组织中转导效率相对较低。研究发现,在小鼠肝脏和肌肉中感染效率由高到低的顺序为:AAV1 > 5 > 3 > 2 > 4<sup>[5]</sup>。目前正致力于新型 AAV 载体的研制,即用 AAV1 的 Cap 蛋白包装 AAV2 的 ITR 及全部或部分 Rep 蛋白组成杂合 AAV 载体。该种新型载体转染效率高,所携带的外源基因凝血因子 IX 和 AAT 的表达量可提高数百倍。

**3.2 病毒 DNA 对细胞核传输和 DNA 第二链的合成** AAV 虽能感染多种哺乳类细胞,但在缺乏辅助病毒或其他辅助因子情况下,由其介导的外源基因表达水平低下。这主要是因为 AAV 病毒基因组为单链 DNA(ssDNA),进入细胞后必须变成双链 DNA 才能完成对外源基因的转录和翻译。Qing 等发现,在哺乳类细胞中存在一种单链 DNA 结合蛋白(SSD-BP,属于 FKBP 家族),该种蛋白能与 AAV ITR 序列中的 D 序列特异性结合,阻止病毒 DNA 第二链的合成<sup>[6]</sup>。有些细胞如 K562 细胞、CD34<sup>+</sup> 的原代造血干细胞,SSD-BP 去磷酸化水平较低,病毒 DNA 第二链的合成减少,转染效率低下;而肝、脑、心、肺、肾及骨骼肌中细胞 SSD-BP 去磷酸化水平较高,病毒 DNA 第二链的合成增加,所以重组 AAV(rAAV)对这些器官的转染效果较好。最近研究发现,细胞内的人表皮生长因子受体蛋白酪氨酸激酶能促进 SSD-BP 磷酸化,抑制此酶能增加 AAV 的转染效率<sup>[7]</sup>。腺病毒作为辅助病毒,其中 E1 基因、E4 或 E6 基因表达可显著增加 rAAV 的转染效率;用羟基脲 etoposil 等化学试剂以及射线、热休克等处理损伤靶细胞 DNA,也可提高 rAAV 的

作者单位:1.北京博爱医院院感科,北京市 100068;2.首都医科大学免疫学系,北京市 100054。作者简介:李晨(1973-),女,河南信阳市人,硕士,主管检验师,主要研究方向:抗感染免疫。

转染效率,其机制可能与细胞内具有转录活性的 rAAV 双链 DNA 合成增加有关。

#### 4 AAV 载体在体内外基因治疗试验中的应用

AAV 因为具备如下特性,在基因治疗研究中引人注目:①人群感染率高(80%~90%),但无致病性,且免疫反应轻微;②可定点整合,并能以较稳定的形式存在;③宿主范围广泛,包括分裂期和非分裂期的多种细胞;④携带的外源基因长期持续稳定表达,并可调控;⑤具有较好的热稳定性和抗酸性(pH 3.0~9.0)以及抗有机溶剂处理的特点,便于储存<sup>[8]</sup>。近年来,rAAV 已广泛用于肝脏、肺脏、脑、肌肉、视网膜及血液系统等多种器官的遗传性疾病、心血管疾病和自身免疫性疾病等的研究,所用的动物模型包括小鼠、大鼠、豚鼠、兔、狗、猪、恒河猴、非洲绿猴及狒狒等。目前在美国以 rAAV2 作为载体采用基因治疗的两种疾病(血友病 B 和囊性纤维化),已进入早期的临床试验阶段。

血友病 B 是最适合用 AAV 载体进行基因治疗的疾病之一,rAAV 载体介导凝血因子 IX(FIX)在小鼠和狗血友病 B 模型中得到了有效表达,并取得明显的疗效。美国目前用 AAV2/hFIX 基因治疗血友病 B 采用了两个临床方案:①采用剂量递增式肌肉注射 AAV2/hFIX:受试患者 8 例,其中 1 例患者接受最低剂量 AAV2/hFIX( $2 \times 10^{11}$  particles/kg)治疗后,血液中 FIX 水平达到 1%~2%,在外源性 FIX 使用次数或剂量减少的情况下,患者临床出血症状减轻长达 40 个月,肌肉免疫组化证实 FIX 在注射部位慢肌纤维中得到表达。②采用剂量递增式肝动脉注射 AAV2/hFIX:受试患者 4 例,其中 2 例患者接受了最低剂量 AAV2/hFIX( $2 \times 10^{11}$  particles/kg)治疗后,虽无副作用产生,但 FIX 水平没有明显升高;另 2 例患者接受中等剂量 AAV2/hFIX( $1 \times 10^{12}$  particles/kg)治疗后,其中 1 例患者 2~3 周后血液中 FIX 水平升至 10%~12%。

囊性纤维化(cystic fibrosis, CF)是由于囊性纤维化跨膜传导调节蛋白(CFTR)基因突变造成的。动物实验表明,携带野生型 CFTR 基因的 rAAV 能有效转染呼吸道上皮细胞,并使 CFTR 得到有效表达。目前在美国采用 AAV2/CFTR 治疗囊性纤维化已经完成一期临床试验和二期临床试验<sup>[9-11]</sup>。一期试验:通过鼻黏膜、上颌窦和肺(支气管灌注和气溶胶吸入)转染

AAV2/CFTR 目的基因,结果证实:AAV2 作为载体没有任何毒性,目的基因转染效率高。二期试验:通过上颌窦和肺(气溶胶吸入)转染 AAV2/CFTR 目的基因,设安慰剂作为对照,双盲实验证实,经气溶胶吸入途径可减轻肺部炎症反应,改善肺功能,与对照组相比有显著的统计学意义。但此种效果只能持续 30 d,可能与反复吸入气溶胶,导致抗 AAV2 衣壳蛋白抗体产生有关。

随着重组 AAV 载体的不断改进,AAV 介导的基因转移系统有望用于多种人类疾病的基因治疗,在临床上有更加广阔的应用前景。

#### [参考文献]

- [1] Flotte TR. Gene therapy progress and prospects: Recombinant adenovirus-associated virus (rAAV) vectors[J]. Gene Ther, 2004, 11: 805-810.
- [2] Haberman RP, McCown TJ, Samulski RJ. Novel transcriptional regulatory signals in the adenovirus-associated virus terminal repeat A/D junction element[J]. J Virol, 2000, 74: 8732-8739.
- [3] Qing K, Mah C, Hansen J, et al. Human fibroblast growth factor receptor 1 is a coreceptor for infection by adenovirus-associated virus 2[J]. Nat Med, 1999, 5: 71-77.
- [4] Summerford C, Bartlett JS, Samulski RJ.  $\alpha V\beta 5$  integrin: a coreceptor for adenovirus-associated virus type 2 infection[J]. Nat Med, 1999, 5(1): 78-82.
- [5] Chao MD, Christopher EW. AAV vectors for hemophilia B gene therapy[J]. Medicine, 2004, 5: 305-313.
- [6] Qing K, Mah C, Hansen J, et al. Adenovirus-associated virus type 2-mediated gene transfer: role of cellular FKBP52 protein in transgene expression[J]. J Virol, 2001, 75: 8968-8976.
- [7] Mah C, Qing KY, Hansen J. Gene transfer with adenovirus-associated virus 2 vectors: the growth factor receptor connection[J]. Gene Ther, 1999, 3: 57-65.
- [8] Srivastava A. Delivery system for gene therapy: adenovirus-associated virus 2[J]. Stem Cell Biol Gene Ther, 1998, 257-285.
- [9] Flotte TR. Phase I trial of intranasal and endobronchial administration of a recombinant adenovirus-associated virus serotype 2 (rAAV2)-CFTR vector in adult cystic fibrosis patients: a twopart clinical study[J]. Hum Gene Ther, 2003, 14: 1079-1088.
- [10] Wagner JA. A phase II, double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial of tgAAVCF using maxillary sinus delivery in patients with cystic fibrosis with antrostomies[J]. Hum Gene Ther, 2002, 13: 1349-1359.
- [11] Aitken ML. A phase I study of aerosolized administration of tgAAVCF to cystic fibrosis subjects with mild lung disease[J]. Hum Gene Ther, 2001, 12: 1907-1916.

(收稿日期:2005-10-18)