

• 综 述 •

重组杆状病毒载体在基因治疗中的应用*

廖致红, 代小丽, 吴春风, 刘志华, 李丽敏, 徐 鹏 综述, 沈开元[△]审校
(广西壮族自治区柳州市人民医院检验科, 广西柳州 545006)

摘 要: 重组杆状病毒作为安全、可靠的基因治疗载体, 在神经性疾病、心血管疾病以及恶性肿瘤的基因治疗中具有重要的应用价值。随着分子生物学技术日趋成熟, 杆状病毒表达系统的研究使得该载体能够成功规避机体血液中的补体系统的清除。另外, 具有组织特异性的启动子也为实现各类重组病毒载体的靶向治疗发挥了重要的作用。该文对重组杆状病毒基因治疗载体的研究进行总结和阐述, 以期对构建 p53 基因重组杆状病毒基因治疗载体提供文献依据, 实现更安全、可靠、精准的基因治疗策略。

关键词: 杆状病毒; 基因治疗; 载体

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2020. 14. 023

中图法分类号: Q789

文章编号: 1673-4130(2020)14-1751-04

文献标识码: A

Application of recombinant baculovirus vector in gene therapy*

LIAO Zhihong, DAI Xiaoli, WU Chunfeng, LIU Zhihua, LI Limin, XU Peng, SHEN Kaiyuan[△]
(Department of Clinical Laboratory, Liuzhou Municipal People's
Hospital, Liuzhou, Guangxi 545006, China)

Abstract: Recombinant baculovirus as the safe and reliable gene treatment vector has an important application value in the gene therapy for neurological diseases, cardiovascular diseases and malignant tumors. With the maturity of molecular biology technology, the expression system of baculovirus enables the vector to successfully evade the elimination of complement system in blood. Otherwise, tissue-specific promoters also play an important role in targeted therapy of various recombinant viral vectors. This paper summarizes and expounds the research on recombinant baculovirus gene therapy vector, in order to provide the literature evidence for the construction of p53 gene recombinant baculovirus gene therapy vector and realize a safer, more reliable and more accurate gene therapy strategy.

Key words: baculovirus; gene therapy; vector

基因治疗指利用基因转移技术将外源正常基因导入靶细胞, 使外源基因的产物补偿基因缺陷或纠正基因异常, 从而治疗疾病的方法。外源基因导入靶细胞的方法有很多, 基因治疗载体的研究从反转录病毒、腺病毒、腺相关病毒等病毒载体发展到如今的人工染色体载体、细菌载体、杆状病毒等新的载体。但是实现外源基因长期稳定的表达、靶向性的表达还需进行更多的探索和研究^[1]。本文对近年来重组杆状病毒基因治疗载体的研究以及其在癌症基因治疗中的应用进行总结。

1 重组杆状病毒及其表达系统

杆状病毒是一种环状、闭合双链 DNA 病毒, 基因组大小为 80~160 kb^[2], 编码 90~180 个蛋白, 在已测序的杆状病毒中发现 31 个核心基因^[3]。根据包涵

体的形态和病毒诱导的细胞病理学特征, 杆状病毒分为核多角体病毒属(NPV)和颗粒病毒属(GV)^[4]。

重组杆状病毒表达系统是一种利用杆状病毒为载体, 在昆虫培养细胞或虫体中表达外源蛋白的真核表达系统。重组杆状病毒表达系统由转移载体、亲本病毒和重组介质 3 个部分组成, 重组病毒的构建过程如下: 将目的基因克隆到转移载体, 将载体与亲本病毒同时导入宿主细胞, 目的基因通过同源重组替换杆状病毒非必需片段形成重组病毒, 病毒在宿主细胞内大量复制时, 目的基因也得到表达^[2]。该技术是一项成熟、安全、经济、高效的蛋白质表达技术。

2 重组杆状病毒在癌症基因治疗中的应用

根据治疗基因进入癌细胞后的不同效应, 将重组杆状病毒介导的癌症基因治疗方法分为 3 种。第一

* 基金项目: 广西壮族自治区卫生健康委员会自筹经费科研课题(Z20170669)。

[△] 通信作者, E-mail: jy1301720@163.com。

本文引用格式: 廖致红, 代小丽, 吴春风, 等. 重组杆状病毒载体在基因治疗中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(14): 1751-1754.

种方法是治疗基因进入癌细胞能够加强机体对恶性增生癌细胞的免疫应答,并清除癌细胞。其方法就是利用重组杆状病毒将癌细胞特异性抗原导入机体,随后激活机体自身的 T 淋巴细胞的识别作用,进而清除癌细胞^[5]。有研究者利用动物模型,通过重组杆状病毒携带 CD40 配体和白细胞介素(IL)-15 基因治疗膀胱癌,发现两种基因的导入可以显著增加膀胱组织单核细胞,CD4⁺、CD8⁺ 和 $\gamma\delta$ T 淋巴细胞的浸润性,明显延长动物的生存期(治疗组>12 个月,对照组<2 个月),且端粒反转录酶基因在癌细胞和正常细胞中的表达差异有统计学意义($P<0.05$)^[6]。据此 KIM 等^[7]构建了包含端粒反转录酶基因的重组杆状病毒载体,并以高剂量接种被植入胶质瘤瘤体的小鼠,随后在实验组小鼠的体内观察到大量分泌干扰素(IFN)- γ 的 T 淋巴细胞,而且实验组小鼠自然杀伤(NK)细胞的活性也显著高于对照组小鼠。重组杆状病毒中载入 IFN- β 基因后转导 Lewis 肺癌(LL)细胞可导致体外恶性表型减少,抑制上皮-间质转化(EMT)相关蛋白的表达^[8]。美国食品药品监督管理局(FDA)在 2009 年批准的 Cervarix 疫苗也是利用重组杆状病毒表达系统生产的携带人乳头瘤病毒(HPV)16、18 型 L1 蛋白的病毒样颗粒^[9]。这些研究结果表明,重组杆状病毒能够携带病毒抗原蛋白或肿瘤特异性蛋白基因,并在哺乳动物细胞成功表达,激活机体自身的免疫系统来消灭病毒或清除癌细胞。

第二种是将“自杀基因”导入癌细胞,以此实现治疗癌症的目的。WANG 等^[10]利用神经胶质细胞特异性启动子在胶质瘤细胞中表达白喉毒素 A,联合胞内注射可以实现较高的治疗有效率(96%)。利用重组杆状病毒载体表达单纯疱疹病毒胸苷激酶,其可在抗疱疹病毒药物更昔洛韦存在的情况下,诱导恶性胶质瘤细胞死亡,从而达到治疗恶性胶质瘤的目的^[11]。

第三种方法是将正常基因导入癌细胞中,以此来纠正癌基因或修复抑癌基因,阻止癌细胞增殖,并诱导其死亡。2001 年 SONG 等^[12]运用重组杆状病毒携带人 p53 基因治疗骨肉瘤,重新导入 p53 基因的细胞对化疗药物更敏感,因此联合阿霉素,其治疗有效率(95%)显著高于单独使用阿霉素(55%),这种联合治疗方法为临床应用打下了良好的基础。随后一些组蛋白乙酰化酶抑制剂,例如丁酸钠、曲古抑菌素 A、丙戊酸等也被用作重组杆状病毒携带 p53 基因的联合治疗药物。另一种抑癌基因——正常上皮细胞特异性因子 1 也在重组杆状病毒表达系统的作用下显著抑制胃癌细胞的增殖,瘤内注射后有效率可达 42.3%^[13]。Apoptin 蛋白是一种能够诱导凋亡的蛋白,且特异性地存在于恶性增生的癌细胞中。将 Apoptin 基因连入杆状病毒载体后导入机体,只有癌细

胞发生凋亡,正常细胞并不受影响,且瘤内注射该重组载体能够显著缩小肝癌细胞的体积^[14]。Rta 蛋白是 EB 病毒由潜伏期转向裂解期的关键性调控因子,其与杆状病毒构成的重组杆状病毒能显著抑制鼻咽癌细胞的增殖^[15]。另外,将靶向的短发夹 RNA 利用重组杆状病毒导入癌细胞是另一种具有应用前景的基因治疗方法^[16]。

3 杆状病毒作为基因治疗载体的优势

作为基因治疗过程中运输治疗基因的工具,目前常用的转移基因的方法分为非病毒载体系统和病毒载体系统^[17]。非病毒载体系统具有毒性小、安全性高、外源基因长度不受限制的优点,但由于人体生理屏障和载体本身的特性,其较低的感染效率和更短的目的基因持续表达时间限制了临床应用。

临床基因治疗使用的病毒载体主要来源于反转录病毒(RV)、慢病毒、腺病毒、腺相关病毒等,但均具有明显的缺陷。相比而言,杆状病毒作为真核生物表达载体,其在携带治疗基因、表达外源蛋白方面的优势表现在以下几个方面:(1)杆状病毒具有很高的宿主特异性,专一寄生于无脊椎动物,对于人体来说,安全性高于上述病毒载体;(2)杆状病毒载体容量大,且多启动子技术可使载体能够同时表达多种蛋白^[18];(3)杆状病毒基因组中的 ph/p10 基因具有强启动子,可用于完成目的基因的高效转录^[19];(4)昆虫细胞可对外源蛋白进行翻译后修饰,保证了蛋白的生物活性^[20];(5)杆状病毒不会在哺乳动物细胞中复制,也不在这类细胞中增殖和扩散,故不会刺激哺乳动物产生强烈的免疫应答^[3]。基于上述优点,杆状病毒载体在基因治疗方面具有良好的应用前景。

4 重组杆状病毒在基因靶向治疗中面临的问题

重组杆状病毒携带的治疗基因在哺乳动物细胞中能否高效表达,是其临床应用面临的一项巨大挑战。杆状病毒不能在哺乳动物细胞中复制,但在某些哺乳动物细胞内,在活性的启动子控制下,外源目的基因能够被高效转录和稳定表达。这一特性为杆状病毒应用于哺乳动物创造了条件,HOFFMANN 等^[21]在 1995 年利用了重组 AcNPV 为载体,在 CMV 启动子作用下,使外源基因在肝细胞中得以表达。另外,重组杆状病毒载体的表面修饰也是提高外源基因作用效应的方法,将 RGD 肽与杆状病毒的囊膜糖蛋白 GP64 融合,可以大大提高载体的转导效率^[22]。同样,将水疱性口炎病毒膜蛋白 G 连入重组载体,也能在体内外试验中提高重组杆状病毒表达系统的转导效率^[23]。MÄKELÄ 等^[24]将 LyP-1、F3 以及 CGKRK 肿瘤靶多肽分别载入杆状病毒表达系统,导入人乳腺癌细胞和肝癌细胞后,发现这些经过表面修饰载体的效率高于未修饰载体的 2~5 倍。

另一限制重组杆状病毒体内转导效率的因素为该病毒对体内补体反应的耐受性。重组杆状病毒作为一个病毒载体,能够激活机体的补体系统,导致病毒不能发挥作用,且无法裂解癌细胞,这大大降低了该病毒的作用效果。为了规避体内补体反应,将人衰变加速因子与 GP64 蛋白融合,可使重组杆状病毒载体具有抗补体作用,并且不干扰病毒的复制^[25]。

除了上文提到的提高载体转导效率、规避补体系统反应等问题,重组杆状病毒对相应癌细胞的靶向性也是在投入临床使用之前必须解决的问题。寻求更多具有组织特异性表达的启动子和 microRNA 是推广这一技术的根本所在,这需要科研工作者付出更多的努力。

5 重组杆状病毒在基因治疗领域的应用前景

自人类于 20 世纪 80 年代利用杆状病毒表达系统表达人干扰素后,经过三十多年的发展,杆状病毒表达系统已经与大肠杆菌、酵母等表达系统齐名,广泛应用于基础研究、基因治疗、疫苗制备、单克隆抗体生产以及生物防治等多个领域。2004 年 4 月由我国自主研发的重组人 p53 腺病毒注射液获得国家食品药品监督管理局批准上市并正式应用于临床,这意味着利用基因治疗恶性肿瘤成为可能。重组杆状病毒为生物技术广泛应用的一种有力载体,尽管其在基因治疗过程中存在各种各样的问题,但是其具有的携带 DNA 容量大、可操作性好、可同时表达多个外源基因等优点,使其充当的基因传递系统这一角色具有不可替代的作用,今后将有更多有效的治疗基因会通过重组杆状病毒实现其临床应用。

参考文献

- [1] 曹明媚. 基因治疗载体的研究进展[J]. 国外医学(肿瘤学分册), 2004, 31(1): 22-26.
- [2] 吴燕, 陈克平. 杆状病毒表达系统的研究与应用进展[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2012, 19(3): 186-190.
- [3] 唐琦, 邱立鹏, 李东, 等. 杆状病毒表达载体的应用现状[J]. 微生物学通报, 2018, 45(2): 442-450.
- [4] 韦永龙, 李轶女, 张志芳, 等. 杆状病毒表达系统及其应用进展[J]. 生物技术通报, 2010, 26(10): 1-7.
- [5] WANG S, BALASUNDARAM G. Potential cancer gene therapy by baculoviral transduction[J]. Curr Gene Ther, 2010, 10(3): 214-225.
- [6] ANG W X, ZHAO Y, KWANG T, et al. Local immune stimulation by intravesical instillation of baculovirus to enable bladder cancer therapy[J]. Sci Rep, 2016, 6(8): 153-162.
- [7] KIM C H, YOON J S, SOHN H J, et al. Direct vaccination with pseudotype baculovirus expressing murine telomerase induces anti-tumor immunity comparable with RNA-electroporated dendritic cells in a murine glioma model[J]. Cancer Lett, 2007, 250(2): 276-283.
- [8] ALEXANDRA A, LYKHOVA, YURI I, et al. Suppression of proliferation, tumorigenicity and metastasis of lung cancer cells after their transduction by interferon-beta gene in baculovirus vector[J]. Cytokine, 2015, 71(2): 318-326.
- [9] 凌同, 余黎, 白慕群. 昆虫杆状病毒表达系统的研究进展与应用[J]. 微生物学免疫学进展, 2014, 42(2): 70-78.
- [10] WANG C Y, LI F, YANG Y, et al. Recombinant baculovirus containing the diphtheria toxin A gene for malignant glioma therapy[J]. Cancer Res, 2006, 66(11): 5798-5806.
- [11] BALANI P, BOULAIRE J Y. High mobility group box2 promoter-controlled suicide gene expression enables targeted glioblastoma treatment[J]. Mol Ther, 2009, 17(6): 1003-1011.
- [12] SONG S U, BOYCE F M. Combination treatment for osteosarcoma with baculoviral vector mediated gene therapy (p53) and chemotherapy (adriamycin) [J]. Exp Mol Med, 2001, 33(1): 46-53.
- [13] HUANG W, TIAN X L, WU Y L, et al. Suppression of gastric cancer growth by baculovirus vector-mediated transfer of normal epithelial cell specific-1 gene [J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(38): 5810-5815.
- [14] PAN Y, FANG L, FAN H, et al. Antitumor effects of a recombinant pseudotype baculovirus expressing Apoptin in vitro and in vivo[J]. Int J Cancer, 2010, 126(11): 2741-2751.
- [15] WANG L, SHAN L, YIN J. The activation of lytic replication of epstein-barr virus by baculovirus-mediated gene transduction[J]. Arch Viro, 2006, 151(10): 2047-2053.
- [16] NICHOLSON L J, PHILIPPE M, PAINE A J, et al. RNA interference mediated in human primary cells via recombinant baculoviral vectors[J]. Mol Ther J Am Soc Gene Ther, 2005, 11(4): 638-644.
- [17] 邵平, 汤诗杭, 林翔, 等. 肝癌靶向基因治疗载体研究进展[J]. 临床医药实践, 2015, 24(3): 211-214.
- [18] 高越, 张敬之. 临床基因治疗及其载体的研究进展[J]. 国际遗传学杂志, 2014, 37(3): 29-36.
- [19] 邓洪新, 魏于全. 肿瘤基因治疗的研究现状和展望[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2015, 22(2): 170-176.
- [20] 荣芮, 李婷婷, 张玉云, 等. 昆虫杆状病毒表达载体系统在疫苗研究中的应用进展[J]. 生物工程学报, 2019, 35(4): 577-588.
- [21] HOFMANN C, SANDIG V, JENNINGS G, et al. Efficient gene transfer into human by baculovirus vectors [J]. Proceed Nation Acad Sci United States Am, 1995, 92(22): 10099-10103.
- [22] MATILAINEN H, MÄKELÄ A R, RIIKONEN R, et al. RGD motifs on the surface of baculovirus enhance transduction of human lung carcinoma cells[J]. J Biotechnol, 2006, 125(1): 114-126.
- [23] TANI H, LIMN CK, YAP C C, et al. In vitro and in vivo

gene delivery by recombinant baculoviruses[J]. J Virol, 2003, 77(18): 9799-9808.

[24] MÄKELÄ A R, MATILAINEN H, WHITE D J, et al. Enhanced baculovirus-mediated transduction of human cancer cells by tumor-homing peptides[J]. J Virol, 2006, 80(13): 6603-6611.

[25] HÜSER A, RUDOLPH M, HOFMANN C. Incorporation of decay-accelerating factor into the baculovirus envelope generates complement-resistant gene transfer vectors[J]. Nature Biotechnol, 2001, 19(5): 451-455.

(收稿日期: 2019-11-03 修回日期: 2020-02-11)

• 综 述 •

外泌体在 HBV 感染相关性肝脏疾病中的研究进展*

王 路¹, 叶 莎¹, 史清海²综述, 伏建峰^{2△}审校

(1. 新疆维吾尔自治区巴州人民医院医学检验科, 新疆库尔勒 841000; 2. 新疆军区总医院临床检验诊断中心, 新疆乌鲁木齐 830000)

摘 要: 乙型肝炎病毒(HBV)感染是我国严重的公共卫生问题, HBV 感染相关性肝脏疾病威胁着人类的身心健康, 早期有效的诊断、治疗、监测尤为重要。越来越多的研究表明, 外泌体源性的微小 RNA(miRNA)、长链非编码 RNA(lncRNA)、蛋白质等参与了 HBV 感染所致肝炎、肝纤维化、肝细胞癌的发生、发展及转归, 有望成为 HBV 感染相关性肝脏疾病诊治、预后评估的潜在生物学标志物。

关键词: 外泌体; 乙型肝炎病毒; 肝脏疾病

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2020. 14. 024 **中图法分类号:** R446. 6

文章编号: 1673-4130(2020)14-1754-05 **文献标识码:** A

Research progress of exosomes in HBV infection-related liver diseases*

WANG Lu¹, YE Sha¹, SHI Qinghai², FU Jianfeng^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Bazhou People's Hospital, Kuerle, Xinjiang 841000, China; 2. Clinical Laboratory Diagnostic Center, General Hospital of Xinjiang Military Command, Urumqi, Xinjiang 830000, China)

Abstract: Hepatitis B virus (HBV) infection is a serious public health problem in China. HBV infection-related liver diseases threat the physical and mental health of the human. Early effective diagnosis, treatment and monitoring are particularly important. More and more studies have shown that exosome-derived miRNAs, lncRNAs and proteins have been involved in the occurrence, development and prognosis of hepatitis, liver fibrosis, and hepatocellular carcinoma caused by HBV infection, which is expected to be a potential biomarker for the diagnosis, treatment and prognosis evaluation of HBV infection-related liver diseases.

Key words: exosomes; hepatitis B virus; liver diseases

慢性乙型肝炎(CHB)是全球流行疾病, 约有 20 亿人曾感染过乙型肝炎病毒(HBV), 其中慢性感染者有 2.4 亿人^[1], 每年有约 65 万人死于 HBV 感染导致的肝脏疾病^[2]。在我国, 已确诊的 CHB 患者人数众多, 并且发病率呈逐年上升趋势^[3]。目前已证实, HBV 感染的慢性化是导致肝纤维化、肝细胞癌(HCC)发生的主要原因^[4]。近年来的多项研究显示, 外泌体源性的微小 RNA(miRNA)、长链非编码 RNA(lncRNA)、蛋白质等可能参与了 HBV 感染所致肝炎、肝纤维化、HCC 的发生、发展及转归, 可能是

HBV 传播、感染、致病的一种重要媒介^[5-6]。为理清外泌体参与 HBV 感染相关性肝脏疾病的发生、发展的机制, 本文就该问题综述如下。

1 外泌体

外泌体是一种直径为 30~100 nm 的磷脂双分子膜结构的细胞囊泡, 广泛存在于血液、羊水、尿液、腹水、脑脊液、母乳、精液及胆汁等体液中^[7-8]。外泌体可携带脂质、蛋白质、信使 RNA(mRNA)、miRNA、lncRNA, 甚至 DNA 等, 将生物信息传递给受体细胞, 在正常或疾病状态下发挥其生理及生物学作用^[9]。

* 基金项目: 新疆维吾尔自治区卫生健康青年医学科技人才专项科研项目(WYWY-202010)。

△ 通信作者, E-mail: dxpjf@163. com。

本文引用格式: 王路, 叶莎, 史清海, 等. 外泌体在 HBV 感染相关性肝脏疾病中的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(14): 1754-