

反转录病毒基因治疗的安全性问题

王宏伟 薛京伦 综述

复旦大学遗传所 上海 200433

以反转录病毒为载体转移目的基因是体细胞基因治疗的一种手段。该方法感染率高,可使宿主细胞有效地表达外源基因产物⁽¹⁾。由于存在产生新病毒或致癌的风险,使人们对此方法存有戒心。80年M. Cline用单纯疱疹病毒(HSV)的TK基因和正常人 β -珠蛋白基因转入两个严重地中海贫血患者的骨髓细胞并经静脉注入体内,进行长期观察。他的首次基因治疗试验受到美国国立卫生研究院(NIH)的公开谴责和处分⁽²⁾。此后,反转录病毒基因治疗的安全性问题得到了广泛研究,本文将近年来有关工作综述如下,以使大家对此有个全面了解。

1. 反转录病毒介导的基因转移

反转录病毒为RNA病毒,其感染颗粒为外壳蛋白包装的两条RNA链。当其进入细胞后, RNA链在其本身编码的反转录酶的作用下反转录成双链环状DNA分子,并随机整合到宿主细胞基因组中成为前病毒。前病毒基因可表达合成外壳蛋白,与转录的RNA包装成完整的病毒颗粒分泌出细胞外,构成一个生活周期⁽³⁾。

反转录病毒有两类基因,一是反式作用基因,包括gag(编码病毒核心蛋白)、pol(编码病毒所需酶类)及env(编码外膜糖蛋白);另一类是顺式作用基因顺序,包括两端长末端重复顺序(LTR)、5' -LTR下游一段病毒包装所必需的顺序(ψ)及剪接供体位点(sd)和剪接受体位点(sa)、负链DNA转录引物结合位点(PBS)和正链DNA转录引物结合位点(PPT)以及与整合有关的att顺序等。其中LTR内含有增强子、启动子及3'加

polyA位点^(3,4)。LTR由U3、R和U5三部分组成,当复制成RNA时,5'端成为RU5,3'端成为U3R。这点对构建载体很重要,因为如果在3' -LTR的U3中插入一个片段或切除一部分碱基,经过一个生活周期后可转移到5' -LTR,从而对反转录病毒载体的表达或复制产生影响⁽⁵⁾。

反转录病毒通过基因工程的方法去除反式作用基因(gag, pol, env),代之外源基因即为反转录病毒载体。经包装成病毒颗粒后再感染靶细胞,使外源基因随病毒的整合而插入宿主细胞基因组中得到稳定持久的表达。此即反转录病毒基因转移的原理。

2. 反转录病毒载体构建的安全性考虑

反转录病毒载体为复制缺陷型,虽可与完整的复制型病毒共感染而得以复制,但复制型病毒的存在会给病人带来极大危害⁽⁶⁾。为此Temin设想构建这样一种辅助病毒,它具有完整的gag、pol和env基因的编码和调控顺序,但又缺失一部分包装必需的顺式作用顺序。这样与病毒载体共转染一个宿主细胞后,只有病毒载体可被包装。他们构建了两个病毒,第一个切除 ψ 和sd顺序,病毒mRNA不能正常剪切,只能合成gag和pol蛋白;第二个病毒则将 ψ 、sd及gag、pol基因全部切除,只合成env蛋白。这两种缺陷病毒与pSV₂-neo共转染一株狗的细胞, G₄₁₈选择抗性克隆,再用southern blot筛选同时含两个缺陷病毒DNA的克隆。用病毒载体SNV-TK转染这些克隆,便可得到10⁵ CFU/ml的病毒载体颗粒,而无任何具感染性的辅助病毒。该细胞即称之为“包装细胞”。与此同时,麻省理

工学院 Mulligan 等将剪除了包装信号顺序 ψ 区 350 个 bp 的莫罗尼氏白血病毒 (Mo-MLV) 的前病毒 DNA 片段插入质粒, 并以此转染 NIH-3T3 细胞, 使其稳定整合在该细胞基因组上, 得到了更简便实用的 ψ -2 包装细胞株。

这些设计并未最终解决问题, 载体的包装顺序 ψ 可通过重组转移给 ψ 辅助病毒。如 PA 12 包装细胞株, 一个单重组便可恢复其复制功能⁽⁷⁾。为此, Miller 等设计了新的包装细胞株 PA317, 它携带的 Mo-MLV 基因组除缺失 ψ 顺序外还剪除了 5' 和 3' 端 LTR 中部分顺序。这样至少需要两次以上重组才能恢复复制功能。进一步又设计了 LNL6 载体, 该载体在 gag 基因起始密码处有一终止密码 (TAG)。因为发生重组时, 这段区域可能随 ψ 转移, 这种处理可使重组病毒不能翻译病毒复制所必需的 gag 和 pol 蛋白。此外, 将 5' 端 Mo-MLV 顺序用相应的莫罗尼鼠肉瘤病毒 (MO-MSV) 顺序取代, 也可降低重组发生的频率。目前 PA317/LNL6 已被使用在转导 Neo^R 的 TIL 基因转移方案中⁽⁸⁾。

更进一步, 可把 gag 和 pol 基因放到一个 ψ 质粒中, env 基因放到另一个 ψ 质粒中, 这样至少需三次重组才能产生复制病毒。如 Mulligan 等构建的 ψ CRIP 和 ψ CRE, 便是将两套分别带有 pol 突变和 env 突变的 ψ 病毒基因顺序整合到同一 NIH-3T3 细胞构成的包装细胞株⁽⁹⁾。

可见, 最安全的转移系统应该是: 反转录病毒载体带有尽可能少的病毒基因顺序, 仅包括载体的转录、包装和整合的顺式顺序, 即 R-U5-attR-PBS- ψ -PPT-attL-R 顺序; 而辅助细胞 DNA 上则只带有反转录病毒的编码顺序 (gag, pol, env), 这样可避免由于同源重组而产生复制型病毒⁽⁴⁾。

3. 反转录病毒载体插入的安全性考虑

安全的基因转移系统避免了复制病毒的

产生, 但仍未消除人们对基因治疗的担忧。

3. 1 病毒载体随机插入的安全性问题

3. 1. 1 使正常基因功能丧失。

反转录病毒载体通常随机插入宿主基因组中, 并优先插入转录活性区域。如果整合发生在必需基因的控制或编码顺序上, 便导致该基因失活。特别是该基因在细胞中只有一个功能性拷贝时可引起细胞死亡。然而绝大多数基因组均包含两个功能性拷贝, 故反转录病毒插入而致细胞死亡是很少发生的⁽⁶⁾。

3. 1. 2 激活原癌基因。

反转录病毒载体如整合在某个原癌基因近旁, 有可能激活原癌基因而使细胞生长失去正常调节, 导致肿瘤发生。这种整合的几率与被感染细胞数量、每个细胞中发生整合的数目、原癌基因的数量及反转录病毒载体的激活顺序有关。是否发生癌变, 还要看细胞改变的数量。现已知一个野生型反转录病毒插入激活一个原癌基因是不足以致癌的, 何况插入激活还存在着细胞专一性 (反转录病毒在易感性宿主细胞中易促发肿瘤)。目前使用的反转录病毒载体是从 Mo-MLV 中得到的, 决定其感染专一性的主要是 LTR 的 U3 区域, 该区域发生改变, 则病毒专一性随之改变。为避免载体中存在潜在病毒激活顺序, 一般将载体中 U3 顺序除去。总之, 反转录病毒载体的插入不一定就导致肿瘤, 还要看病毒载体或宿主细胞的基因顺序, 且只限于在一种或几种细胞类型中发生^(4,6)。

3. 1. 3 插入肿瘤抑制基因 (TSG)

TSG 在许多肿瘤发生中起重要作用, 其断裂的几率很高。接受治疗的细胞中每 $10^3 \sim 10^6$ 个中就有一个可能发生 TSG 断裂。要多少这样的细胞才可导致肿瘤还很难估计。如每个二倍体基因组中平均只有一个载体插入则 TSG 及其拷贝断裂的机会就大大减少了。尽管未曾看到由 TSG 断裂导致的肿瘤形成, 但从理论上讲有此可能。

3. 2 同源或非同源重组的安全性问题

3. 2. 1 同源重组的可能性。

在构建载体时, 由于尽可能使载体与辅助细胞基因组以及与宿主基因组之间没有同源顺序, 故要形成完全的复制病毒只有通过非同源重组。

3. 2. 2 非同源重组的可能性。

最安全的载体只包含 R-U5-attR-PBS-ψ-PBT-attI-R 部分, 它只占完整的复制病毒基因顺序的不到 10%。要形成完全的复制病毒, 转化细胞基因组中必须具有其余的顺序⁽⁴⁾。在小鼠基因组中已发现一些感染性内源病毒, 人体中情况还不清楚。即使存在合适的内源顺序, 二者之间的同源性也需在 $10^{-4} \sim 10^{-2}$ 之间时才可发生非同源重组。否则, 非同源重组的可能性是极低的。最近有人发现人体基因组中也有一些内源性反转录病毒顺序⁽⁶⁾, 与鼠白血病病毒之间有一定同源性, 但与反转录病毒载体 Mo-MLV 的 LTR 和一小部分 gag 顺序却几乎毫无同源性。人体内源反转录病毒顺序包含许多突变, 虽可转录却无功能, 且与 Mo-MLV 在增强子、启动子及 tRNA 结合位点上存在区别, 而阻止了复制病毒的形成。

可以设想, 即使重组形成复制型反转录病毒, 由于带有插入基因在大小上受到包装的限制, 不可能将完整的病毒顺序装进一个病毒体内。这样这些重组体依然是复制缺陷型, 对病人没有损害。

3. 3 内源病毒顺序的安全问题

内源反转录病毒顺序转录的 RNA 链有可能被包装到病毒体中⁽¹⁰⁾, 再通过感染插入受体细胞基因组形成原病毒。这些序列插入有三种后果: ① 插入突变: 使正常基因失活, 或由于原癌基因的激活及抑制基因断裂而致癌。② 表达一些基因产物, 是否导致病态还不清楚。③ 与病毒载体顺序或人体内源顺序重组形成新的复制病毒。据知 VL30 与反转录病毒顺序可发生重组, 但其带有缺

陷, 包装粒子只限于细胞内, 即使分泌出也无感染性⁽¹¹⁾。

3. 4 载体突变的问题

在载体制备中, 由于高速度复制, 载体会发生突变。绝大多数情况下, 这些突变将使载体或其携带的基因失活, 对病人并无危险, 只是降低疗效而已。有些突变也有可能使载体中保留的控制序列激活原癌基因或使被转化细胞产生对组织有毒性的物质, 但其几率是极其低的。

4. 风险问题

尽管科学家做了种种努力, 使反转录病毒基因治疗的风险在理论上降到最低, 但活体试验中风险依然存在。建立适当的动物模型可解决一些问题, 但并不完全反映人体治疗中的情况。何况有些疾病在动物模型中并不存在, 基因治疗的效果及安全性最终要通过临床试验来证实, 因此建立恰当的风险估算模型是必要的。

人们考虑风险大小常常不是按照事故发生的频率, 而是其严重程度。如 86 年夏, 由于惧怕恐怖分子, 美国人到欧洲及中东旅游的人减少了一半。然而 85 年受恐怖分子伤害的只有 23 人, 而同一年死于车祸的美国人却有 43,500 人⁽⁴⁾。可见人们常低估那些常见的风险, 而高估那些不常发生的风险。为此科学家们有责任多进行介绍和宣传, 使更多的人对基因治疗有个全面了解。

评估基因治疗的安全性, 需要选择一个恰当的风险对照模型。如肾脏移植和小儿癌症的化疗, 虽然有可能使患者致癌, 但几乎没人关心其安全性, 因为患者本身已生命垂危。同样, 对于严重危及生命、而现有手段又无法根治的疾病, 通过风险估算也可进行体细胞基因治疗的尝试⁽¹²⁾。

5. 临床治疗的安全措施

除以上方面, 临床治疗也要尽可能保护

病人安全。如检验方面要设计灵敏的检测手段,防止载体制备液或转化细胞中混有传染性病毒、外源性病原体 and 毒素。目前使用的 S⁺/L⁻法对检查完全复制型病毒是很敏感的,但如存在极为甚少的复制病毒也会出现误差。目前最敏感的检测手段是先使病毒在 NIH-3T3 细胞中扩增,然后用 S⁺/L⁻方法检测复制病毒、此称 3T3 放大或推广性 S⁺/L⁻检测法,比单纯 S⁺/L⁻法敏感度增加近 10 倍⁽⁶⁾。另一方法是用受检液转导一个易受感染的靶细胞(如 NIH-3T3),然后 PCR 法检测转化细胞中是否存在辅助病毒 DNA,该方法可从 100,000 个转化细胞中测出一个含辅助病毒 DNA 的细胞。病原体及毒素的检测使用常规方法即可⁽¹³⁾。为确保安全,包装细胞株、载体及转化细胞应分别检测。

此外,对接受治疗的患者应加强管理,跟踪观察,利用现有的各种手段进行综合预防。如果基因治疗无效应坚持常规治疗,防止意外情况发生,确保不危及他人及社会。从目前已进行的所有临床试验看,尚未发生意外情况^(6,12)。

结束语

自科学家首次提出体细胞基因治疗的设想至今已二十多年了。其间随着对人类疾病分子机制的深入理解及有效的基因转移技术的发展,基因治疗已从梦想进入现实⁽¹⁴⁾。安全问题与效益相比已不再成为临床试验的拦路石,世界各地已纷纷开展了基因标记和基因治疗的初步尝试⁽¹⁾。尽管长期的安全问题仍需重视,但经过大量临床研究后,基因治疗必将作为一种有力的治疗手段进入社会,造福人类⁽¹⁴⁾。

参考文献

1. Anderson, W. F. Human gene therapy. *Science* 1992; 256: 808.
2. Joyce, C. Americans plan gene therapy on people. *New Sci* 1988; 119: 24.
3. 叶昕, 吴旻. 逆转录病毒载体及其应用. *国外医学分子生物学分册* 1990; 12 (1): 19.
4. Temin, H. M. Safety considerations in somatic gene therapy of human disease with retrovirus vectors. *Hum Gene Ther* 1990; 1: 111.
5. Yu, S. F. et al. Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. *PNAS* 1986; 83: 3194.
6. Cornetta, K. et al. Safety issues related to retroviral-mediated gene transfer in humans. *Hum Gene Ther* 1991; 2: 5.
7. Miller, A. D. Retrovirus packaging cells. *Hum Gene Ther* 1990; 1: 5.
8. Rosenberg, S. A. et al. Gene transfer into humans-immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *New Engl J Med* 1990; 323: 570.
9. 舒红兵. 包装细胞系及其在基因治疗研究中的应用. *国外医学分子生物学分册* 1990; 12 (1): 15.
10. Hatzoglou, M. et al. Efficient packaging of a specific VL30 retroelement by ψ 2 cells which produce MoMLV recombinant retroviruses. *Hum Gene Ther* 1990; 1: 385.
11. Scadden, D. T. et al. Human cells infected with retrovirus vectors acquire and endogenous murine provirus. *J Virol* 1990; 64: 424.
12. Ledley, F. D. Clinical considerations in the design of protocols for somatic gene therapy. *Hum Gene Ther* 1991; 2: 77.
13. Morgan, R. et al. Applications of the polymerase chain reaction in retroviral-mediated gene transfer and the analysis of gene-marked human TIL cells. *Hum Gene Ther* 1990; 1: 135.
14. Miller, A. D. Human gene therapy comes of age. *Nature* 1992; 357: 455.
17. Yamasaki H, et al. Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1990; 11: 1051-1058.

(上接第 48 页)

gap junctional intercellular communication in induction and maintenance of transformed foci in BALB/C 3T3 cells. *Cancer Res* 1988; 48: 3409-3495.