

Caspase-3 在丙型肝炎基因治疗中的研究进展

毛山山 综述 冯德云 审校
(中南大学基础医学院病理系, 长沙 410013)

[摘要] 丙型肝炎是常见的传染病,目前尚缺乏特异性的治疗方法,而特异性的基因治疗策略可能是一种理想的方案。该方案利用 HCV 表达的核心蛋白特异性激活 2'-5'寡核苷酸合成酶(2'-5'OAS)启动子,进而激活重组 caspase-3 导致 HCV 感染的肝细胞凋亡,达到特异性治疗丙型肝炎的目的。

[关键词] 细胞凋亡; caspase-3; 丙型肝炎; 基因治疗

[中图分类号] R512.63 [文献标识码] A [文章编号] 1673-2588(2008)03-0243-04

Advance in role of caspase-3 in the gene therapy of hepatitis C

MAO Shan-shan, FENG De-yun

(Department of Pathology, Basic Medical College, Central South University, Changsha 410013, China)

[Abstract] Hepatitis C is a usual infection disease, so far we still have not specific treatments for it, while a new specific gene therapy strategy may be an ideal program. This program was that the promoter of the human 2'-5'-oligoadenylate synthetase gene which could be specific activated by hepatitis C virus core protein activated recombination caspase-3 in order to induce apoptosis of the HCV-infected hepatic cells.

[Key words] apoptosis; caspase-3; hepatitis C virus; gene therapy

[Int J Pathol Clin Med, 2008,28(3):0243-04]

世界卫生组织统计,全世界约有 3% 的人感染丙型肝炎病毒(HCV),约 1.7 亿的慢性 HCV 携带者有发展成肝硬化和肝细胞癌(HCC)的危险^[1]。丙型肝炎的防治是目前面临的一项重大问题,由于 HCV 极易发生变异,至今尚无理想的抗 HCV 药物和疫苗。感染细胞内的 HCV 难以清除,成为丙型肝炎迁移不愈和复发的病毒来源。目前对丙型肝炎的治疗主要采用 α 干扰素或长效干扰素加利巴韦林,但应答率不高于 60%,且停药后可复发,对感染细胞内的 HCV 作用有限^[2,4]。故研发一种特异有效治疗慢性丙型肝炎的方法极为重要,基因治疗有可能成为一种理想的方案。

1 HCV 的特性

HCV 是黄病毒家族成员之一,基因组为单

链正义 RNA,长约 9.6 kb。HCV 基因包括 5'非编码区(5' non-coding region, 5' NCR)、结构区、非结构区和 3'非编码区(3' non-coding region, 3' NCR)4 部分。结构区编码核心蛋白、包膜蛋白 E1 和 E2、疏水多肽 P7;非结构编码非结构蛋白 NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A 和 NS5B; 3' NCR 由可变区、多聚嘧啶区及高度保守的 98 个核苷酸末端构成。世界各地分离的 HCV RNA 中以 C 区最保守, E 基因核苷酸同源性较低,尤其是 E2 区变异性最大,含有两个高度可变区(HVR1, HVR2)。其中由 C 区编码的核心蛋白已被证实可通过多种途径抑制感染肝细胞的凋亡,可能是导致 HCV 病毒持续感染和肝细胞癌发生的重要原因^[5-8]。

收稿日期:2007-10-08 修回日期:2008-03-26

作者简介:毛山山(1982-),女,湖南涟源人,硕士研究生,主要从事肝脏病理的研究。

基金项目:国家自然科学基金资助(30671846) This work was supported by National Science Foundation of China (30671846).

2 机体对抗 HCV 感染的机制

机体对抗 HCV 感染主要依赖于细胞免疫。病毒特异性细胞毒 T 淋巴细胞 (cytotoxicity t lymphocyte, CTL) 在其中发挥重要作用, 它可以通过两种方式导致细胞凋亡, 一是 CTL 细胞通过 T 细胞抗原受体 (TCR) 和主要组织相容性复合体 (MHC) 限制性辨认感染的肝细胞表面表达的病毒相关蛋白, 活化的 CTL 细胞表面表达 Fas L (CD95), Fas L 与感染肝细胞表面的 Fas 结合活化 caspase-8, 活化的 caspase-

8 直接激活下游的 caspase-9, 3, 6, 7 诱导凋亡或是促使凋亡前体分子 Bid 的分裂, 让线粒体中的细胞色素 C (Cyt-C) 释放到细胞浆中, 与 Apaf-1 结合形成复合物后再激活下游的 caspase-9 引发级联反应诱导凋亡; 二是活化的 CTL 细胞释放颗粒酶 B (granzyme B) 和穿孔素 (perforin), 前者在后者作用下通过膜孔进入细胞内, 活化 caspase-9, 3, 6, 7, 诱导细胞凋亡 (图 1)^[9]。

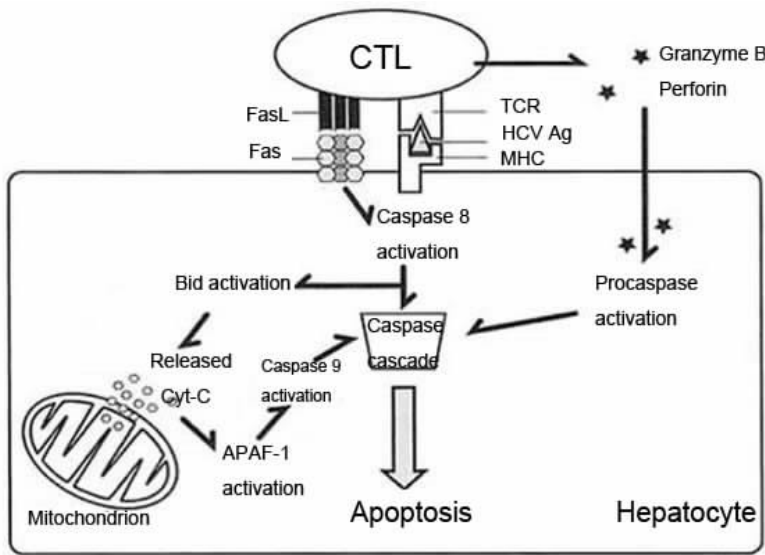


图 1 凋亡信号级联

Fig. 1 Apoptotic signal cascade

3 利用细胞凋亡策略治疗疾病

利用细胞凋亡策略治疗肿瘤的研究获得了令人鼓舞的结果。Komata 等^[10]设计一个人端粒酶逆转录酶基因 (hTERT) 启动子载体系统重组 caspase-6, 可特异性地诱导 hTERT 阳性的神经胶质瘤细胞凋亡, 而 hTERT 阴性的纤维细胞则不能诱导其凋亡。Yang 等^[11]利用 hTERT 启动子介导的重组 caspase-3 系统能特异性地诱导具有端粒酶活性的癌细胞凋亡。Xie 等^[12]在前列腺癌的治疗中, 运用位于小鼠 probasin 基因的一个前列腺特异性的结合位点 ARR (2) PB 和 caspase-9 联合作用, 可有效地进行前列腺癌的治疗; 而 Shariat 等^[13]使用一种无毒性的脂质体载体渗透的化学诱导二聚体 (chemical inducers of dimerization, CID) 来调控导入 caspase-1 和 caspase-3 的载体 Adv, 由于 CID 对肿瘤细胞的亲和性, 使这

一系统能定位在肿瘤组织并产生快速的细胞凋亡。

Hsu 等^[14]构建了表达 BID 前体分子的重组腺病毒载体, 其表达的 BID 含有 HCV NS3/NS4A 蛋白酶特异性切割位点, 通过 HCV 表达的 NS3/NS4A 蛋白酶酶切后, 可激活线粒体途径下游的凋亡分子, 触发 HCV 感染的肝细胞凋亡。

4 Caspase-3 在丙型肝炎细胞凋亡治疗中的地位

近年来在对凋亡发生机制的研究中, 逐渐阐明了细胞凋亡的信号通路及通路中的分子, 其中最重要的是 caspase 家族, 它是细胞凋亡过程中最关键的分子群, 是哺乳动物细胞中凋亡信号转导和处于基因调控下的细胞凋亡过程中的重要功能执行分子^[15]。Caspase 属于半胱氨酸蛋白酶, 已发现 caspase 家族至少含 12 个成员, 凋亡过程中至少有两类 caspase 参与: 起始 caspase-2, 8, 9, 10 和执行

caspase-3,6,7^[15]。Caspase-3 作为细胞凋亡中重要的诱导和下游执行的中心分子,可被其他 caspase 激活,参与细胞染色质的凝聚和核酸酶的激活,促使细胞发生不可逆的凋亡,在诱导细胞凋亡时具有独特的优势^[15-17]。在 HCV 的清除机制中,不管是通过 CTL 表面表达的 CD95 配体介导,还是由颗粒酶 B 和穿孔素介导的细胞凋亡均需要 caspase-3 的参与,故 caspase-3 可能是利用细胞凋亡特异性治疗丙型肝炎的一种理想的分子。

5 利用 caspase-3 介导细胞凋亡进行丙型肝炎基因治疗需要解决的关键问题

慢性 HCV 感染者肝脏内病毒感染的肝细胞不到肝细胞总数的 10%,而特异性诱导只针对有病毒感染的肝细胞,不影响无病毒感染的肝细胞,因此有可能成为治疗丙型肝炎的新策略。鉴于 caspase-3 在诱导细胞凋亡中的独特优势,可利用其作为丙型肝炎特异性基因治疗的理想分子。但该策略需要解决的关键问题有:(1)治疗中的靶向性问题,即导入的外源基因只进入肝细胞;(2)导入基因的特异性表达,即导入的 caspase-3 只有在 HCV 感染的肝细胞中表达和激活;(3)由于哺乳动物细胞中 caspase-3 缺乏自身活化的能力,在活细胞中表达的 caspase-3 不能直接诱导细胞凋亡,并且 caspase-3 的活性常受到凋亡抑制基因如 Bcl-2 的调节,如何使 caspase-3 具有自身活化能力;(4)如何提高基因导入的效率及靶基因的表达水平。

Hsu 等^[14]构建表达 BID 前体分子的重组腺病毒载体,其表达的 BID 含有 HCV NS3/NS4A 蛋白酶特异性切割位点,通过 HCV 表达的 NS3/NS4A 蛋白酶酶切后,即可激活线粒体途径下游的凋亡分子,触发细胞凋亡,该策略使只有 HCV 感染并表达 NS3/NS4A 的肝细胞发生凋亡,以解决基因治疗的特异性问题。但表达 HCVNS3/NS4A 蛋白的基因位于 HCV 基因的可变区,不同基因型的 HCV 表达的 HCVNS3/NS4A 蛋白存在差异,不能保证该系统对各种基因型的 HCV 治疗均有效。Naganuma 等^[18]研究发现,在肝细胞系中 HCV 核心蛋白能特异性地与报告基因中的 2'-5'寡核苷酸合成酶(2'-5'OAS)启动子结合并激活,即使 HCV 核心蛋白有少数氨基酸的变异亦不会影响其与 2'-5'寡核苷酸合成酶启动子的结合和激活效率。最近他们还发现核心蛋白亦能激活含有干扰素相关刺激反应元件(IFN-stimu-

lated response element, ISRE)的启动子,但其对 OAS 启动子作用更强些^[19],此外核心蛋白和 NS5B 对激活 OAS 启动子有协同作用^[20],由于 HCV 核心蛋白基因比较保守,如果利用 2'-5'寡核苷酸合成酶启动子来调控 caspase-3 的表达,有可能解决基因治疗的特异性问题。

表达载体导入的靶向性保证导入体内的载体只分布于肝脏,但提高转染效率亦是基因治疗的关键问题之一。研究发现^[21],无唾液酸糖蛋白受体(ASGP-R)是存在于哺乳动物肝细胞的肝窦面细胞膜上的一类跨膜糖蛋白,能特异性地与带有末端半乳糖残基或 N-乙酰半乳糖胺残基的配体结合,并通过胞饮作用进入细胞内。但 ASGP-R 对配体的识别和结合与配体的大小有关^[22];半乳糖化的新糖白蛋白(NGA)能与 ASGP-R 特异性结合,且直径小,具有肝靶向药物载体的良好特性。Mukai 等^[23]报道用¹¹¹In 和¹²⁵I 标记的 NGA 静脉注射后能迅速积聚于肝实质细胞,是目前理想的肝靶向治疗载体。

在哺乳动物细胞中,caspase-3 缺乏自身活化的能力,在活细胞中表达的 caspase-3 不能直接诱导细胞凋亡,并常受凋亡抑制基因的调节。最近,有人通过基因重组的方法把处于 caspase-3 中的大亚单位下游的小亚单位基因移位至上游构建成在体内能直接诱导细胞凋亡的 caspase-3 重组体^[24]。重组活化的 caspase-3 与野生型 caspase-3 比较,除了在体内外具有自身活化和被上游分子活化的能力外,还可以抵抗大多数的 caspase 抑制剂和凋亡抑制基因的作用,而且它在细胞中能够以较低的浓度诱导细胞发生不可逆的凋亡。因此,这种重组活化的 caspase-3 分子在以诱导凋亡为目标的基因治疗策略中有非常好的应用潜能^[24-25]。

6 应用 OAS 启动子介导的重组 caspase-3 系统治疗丙型肝炎的前景

基于目前的研究进展,如果利用 HCV 表达的核心蛋白与 2'-5'寡核苷酸合成酶基因启动子特异性结合,启动下游基因表达的特性,使重组活化的 caspase-3 基因处于 2'-5'寡核苷酸合成酶基因启动子调控下,则可构建一个 HCV 特异性 caspase-3 治疗系统。在此系统中,由于 HCV 表达的核心蛋白与 2'-5'寡核苷酸合成酶基因启动子结合的特异性,结合重组活化的 caspase-3 在诱导细胞凋亡作用时高效、普遍性的优势,有望发展成一种特异性强、应用

前景好的丙型肝炎基因治疗新策略。

参 考 文 献

- [1] Blight KJ, Kolykhalov AA, Rice CM. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture[J]. *Science*, 2000, 290(5498): 1972-1974.
- [2] Zein CO, Zein NN. Advances in therapy for hepatitis C infection [J]. *Microbes Infect*, 2002, 4(12):1237-1246.
- [3] Di Bisceglie AM, Hoofnagle JH. Optimal therapy of hepatitis C [J]. *Hepatology*, 2002, 36(5 Suppl 1):S121-127.
- [4] Chander G, Sulkowski MS, Jenckes MW, et al. Treatment of chronic hepatitis C: a systematic review[J]. *Hepatology*, 2002, 36(5 Suppl 1):S135-144.
- [5] Nguyen H, Sankaran S, Dandekar S. Hepatitis C virus core protein induces expression of genes regulating immune evasion and anti-apoptosis in hepatocytes[J]. *Virology*, 2006, 354(1):58-68.
- [6] Hara Y, Hino K, Okuda M, et al. Hepatitis C virus core protein inhibits deoxycholic acid-mediated apoptosis despite generating mitochondrial reactive oxygen species[J]. *J Gastroenterol*, 2006, 41(3):257-268.
- [7] Saito K, Meyer K, Warner R, et al. Hepatitis C virus core protein inhibits tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis by a protective effect involving cellular FLICE inhibitory protein[J]. *J Virol*, 2006, 80(9):4372-4376.
- [8] Li B, Feng DY, Cheng RX, et al. The effects of hepatitis C virus core protein on biological behaviors of human hepatocytes [J]. *Natl Med J China*, 2005, 85(18):1243-1248.
- [9] Kanto T, Hayashi N. Immunopathogenesis of hepatitis C virus infection: multifaceted strategies subverting innate and adaptive immunity[J]. *Intern Med*, 2006, 45(4):183-191.
- [10] Komata T, Kondo Y, Kanzawa T, et al. Treatment of malignant glioma with the transfer of constitutively active caspase-6 using the human telomerase catalytic subunit human telomerase reversetranscriptase gene promoter[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(15):5796-5802.
- [11] Yang LF, Zhao Y, Zeng L, et al. hTERT/re-caspase-3 system induce apoptosis in hTERT-positive cancer cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2006, 5(11):1546-1553.
- [12] Xie X, Zhou X, Liu Y, et al. Adenovirus-mediated tissue-targeted expression of a caspase-9-based artificial death switch for the treatment of prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(18):6795-6804.
- [13] Shariat SF, Desai S, Song W, et al. Adenovirus-mediated transfer of inducible caspase: a novel "death switch" gene therapeutic approach to prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(6):2562-2571.
- [14] Hsu EC, Hsi B, Hirota-Tsuchihara M, et al. Modified apoptotic molecule (BID) reduces hepatitis C virus infection in mice with chimeric human livers[J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(5):519-525
- [15] Thorberry NA, Lazebnik Y. caspases: enemies within [J]. *Science*, 1998, 281(5381):1312-1316.
- [16] Yamabe K, Shimizu S, Ito T, et al. Cancer gene therapy using a pro-apoptotic gene, caspase-3 [J]. *Gene Ther*, 1999, 6(12): 1952-1959.
- [17] Friedrich K, Wieder T, Von HC, et al. Overexpression of caspase-3 restores sensitivity for drug-induced apoptosis in breast cancer cell lines with acquired drug resistance [J]. *Oncogene*, 2001, 20(22):2449-2460.
- [18] Naganuma A, Nozaki A, Tanaka T, et al. Activation of the interferon-inducible 2'-5'-oligoadenylate synthetase gene by hepatitis C virus core protein[J]. *J Virol*, 2000, 74(18):8744-8750.
- [19] Dansako H, Naka K, Ikeda M, et al. Hepatitis C virus proteins exhibit conflicting effects on the interferon system in human hepatocyte cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 336(2): 458-468 .
- [20] Dansako H, Naganuma A, Nakamura T, et al. Differential activation of interferon-inducible genes by hepatitis C virus core protein mediated by the interferon stimulated response element[J]. *Virus Res*, 2003, 97(1):17-30.
- [21] Wu J, Nantz MH, Zern MA. Targeting hepatocytes for drug and gene delivery: emerging novel approaches and applications [J]. *Front Biosci*, 2002, 7:d717-725.
- [22] Rensen PC, Sliedregt LA, Ferns M, et al. Determination of the upper size limit for uptake and processing of ligands by the asialoglycoprotein receptor on hepatocytes in vitro and in vivo[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(40):37577-37584.
- [23] Mukai T, Arano Y, Nishida K, et al. Species difference in radioactivity elimination from liver parenchymal cells after injection of radiolabeled proteins[J]. *Nucl Med Biol*, 1999, 26(3):281-289.
- [24] Srinivasula SM, Ahmad M, MacFarlane M, et al. Generation of constitutively active recombinant caspases-3 and -6 by rearrangement of their subunits[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(17):10107-10111.
- [25] Cam L, Boucquoy A, Coulomb-L'hermine A, et al. Gene transfer of constitutively active caspase-3 induces apoptosis in a human hepatoma cell line[J]. *J Gene Med*, 2005, 7(1):30-38.