

# 腺病毒载体的特点及其在 HCV 研究中的应用

郝春秋,冯志华,聂青和

郝春秋,冯志华,聂青和,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心 陕西省西安市 710038  
项目负责人:郝春秋,710038,陕西省西安市,中国人民解放军第四军医大学唐都医院全军感染病诊疗中心.  
收稿日期:2002-10-25 接受日期:2002-11-16

## 摘要

由于腺病毒(adenovirus, Ad)载体在哺乳动物及其多种细胞上进行基因转移和蛋白表达的高效性,使其在基因疫苗及基因治疗的研究中受到人们的青睐,成为当前使用最多的病毒载体之一.为了克服其存在的不足并取得更满意的效果,人们在腺病毒载体的构建和改进方面做了大量的工作.本文谨就腺病毒分子生物学特点、腺病毒载体的优缺点、近年来腺病毒载体构建原理与方法的改进及其在HCV研究中的应用进展作一扼要综述.

郝春秋,冯志华,聂青和.腺病毒载体的特点及其在HCV研究中的应用.世界华人消化杂志 2003;11(6):803-805

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/803.asp>

## 0 引言

从理论上讲,利用病毒具有与细胞表面受体结合并将其基因组导入宿主细胞的特性,将控制病毒复制的基因及部分病毒复制非必需基因去除后,任何一种病毒都可发展成为基因表达或基因转移载体.但目前已开发的病毒载体中,以逆转录病毒载体和腺病毒载体最常用.由于逆转录病毒载体能将外源基因整合进靶细胞的基因组内,实现目的基因的长期稳定表达,因而主要用于*ex vivo*的基因研究<sup>[1-4]</sup>;但由于外源基因的插入有导致基因突变的危险,具有潜在的遗传毒性,不能满足*in vivo*基因治疗的需要.腺病毒载体利用病毒自身感染宿主细胞的特点,简便有效的将目的基因导入靶细胞,并使其有效表达.腺病毒为DNA病毒,极少发生插入突变,载体操作方便、宿主广泛、容易繁殖,并具有携带外源基因容量大、可表达接近翻译后成熟水平蛋白质等特点,已被广泛用于多种疾病的*in vivo*基因治疗<sup>[5-8]</sup>.

## 1 腺病毒的分子生物学

人类腺病毒属于线状双链DNA(dsDNA)病毒,无囊膜结构,其基因组与核心蛋白结合形成病毒子内核,蛋白质外壳是直径约80 nm的正二十面体,由252个颗粒组成,几何排列成240个非顶角六邻体和12个五邻体.在超过50种的腺病毒血清型中,人腺病毒2型(Ad2)及5型(Ad5)的研究最为深入,常用作基因转移的载体<sup>[9]</sup>.

腺病毒基因组长约36 kb,其两端各有一个100-165 nt LTR,含有复制起点和包装型号.腺病毒进入细胞核后仍保持线状结构,不与染色体发生整合.其基因组的复制分为早期和晚期两部分,在早期阶段至少有7个病毒启动子起始转录,产生30多种mRNA,其中E1a产物是主要的转录调控物,涉及到病毒和细胞基因的反式激活,对其他基因的转录有阻遏作用,是腺病毒复制所必需的基因;早期基因E<sub>2</sub>产物是晚期基因表达的反式因子和病毒复制必需的因子;晚期基因产物是病毒的结构蛋白<sup>[10-12]</sup>.在构建腺病毒载体时,通常将E1区基因切除,消除E1a产物对其他基因转录的阻遏作用,并使之变成复制缺陷型的载体.这种复制缺陷的重组腺病毒仍具有感染靶细胞的能力但不发生复制,因而不会直接造成靶细胞的损害.

## 2 腺病毒载体的构建

由于腺病毒基因组较大,不便直接进行分子克隆,故构建腺病毒载体时,将病毒基因组左端制成含E1区缺失的穿梭质粒(如pAd.CMV-Link.1),将目的基因插入其多克隆位点后再与含腺病毒基因组的重组质粒(如pJM17)共转染至293细胞内进行同源重组<sup>[13-16]</sup>.由于人类巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)的主要立即早期启动子(immediate early promoter, IEP)可以明显的提高腺病毒载体的基因表达水平<sup>[17,18]</sup>,所以在构建腺病毒穿梭质粒时,常把CMV IEP构建在插入的目的基因之前,用于提高插入基因的表达水平.人腺病毒本身的宿主范围不广,不符合作为腺病毒载体的要求,但当腺病毒与SV40病毒或其他猴病毒发生重组后,宿主范围的限制性得以克服<sup>[19,20]</sup>,能有效地转化非分裂细胞,并大量表达外源蛋白,在此猴病毒显然起了一种反式的辅助功能.在我们的实验中,包装腺病毒载体的穿梭质粒pAd.CMV-Link.1就是Ad5与SV40的杂合体.

在构建HCV结构基因腺病毒表达载体时,将HCV结构基因的不同片段定向克隆到以E1区缺失的腺病毒基因组左端部分制成的穿梭质粒pAd.CMV-Link.1中<sup>[21]</sup>.由于E1区基因为腺病毒复制所必需,E1区的缺损可造成病毒在复制阶段的流产,因此需要有转化了E1区基因的包装细胞即人胚肾293细胞提供反式补偿才能复制和扩增.包装腺病毒载体时,需将插入了目的基因的穿梭质粒与含腺病毒基因组的重组质粒pJM17共转染至转化了腺病毒E1区基因的包装细胞293内进行同源重组<sup>[14,15]</sup>.由于pJM17是包装信号( $\Psi$ )缺失的腺病毒基

基因组质粒, 他本身不能被包装成病毒<sup>[22]</sup>, 必须与含包装信号( $\Psi$ )的穿梭质粒 pAd.CMV-Link.1 重组后才能形成有感染性的病毒. 这表明, 要形成能持续复制传代的有感染性的腺病毒载体, 基因组重组质粒 pJM17、穿梭质粒 pAd.CMV-Link.1 和包装细胞 293 三者缺一不可. 因此, 在腺病毒载体包装时, 有重组病毒生成后形成的空斑就是含有目的基因的阳性空斑<sup>[23]</sup>.

### 3 腺病毒载体的优缺点

腺病毒载体法是基因治疗中最有前途的基因转移方法之一, 其在介导体内基因治疗方面所表现出的多方面的优势使得这一载体系统正在成为基因治疗领域中最具魅力的载体之一. 腺病毒的生物学特性已得到广泛的研究, 由于其含有一个中等大小的基因组(平均 36 kb), 适合于容纳较大片段基因, 与逆转录病毒载体相比, 腺病毒载体能有效地把外源基因转运到各种靶细胞和组织中. 腺病毒载体作为真核细胞基因转移载体有以下优点<sup>[24-26]</sup>: (1)制备简便: 腺病毒基因组的结构和功能研究的比较清楚, 载体容易构建和操作. (2)宿主范围广: 可转入分裂后的非分裂细胞中发挥作用, 也可以感染处于分裂状态的细胞. (3)感染性强: 可经不同途径进入不同组织(可以在肠道内繁殖, 也可以在呼吸道内繁殖). (4)包装容量大: 经改建的腺病毒基因部分缺失载体的克隆容量可达 10 kb<sup>[27]</sup>, 腺病毒基因完全缺失载体的克隆容量可高达 37 kb<sup>[28]</sup>. (5)病毒繁殖滴度高. (6)安全性好: 重组腺病毒在结构上比较稳定, 小鼠实验证明, 腺病毒 DNA 一般在染色体外存在, 无病毒基因整合的证据, 因而不会引起插入突变; 野生型 4、7 型腺病毒在成人只引起很轻的疾病, 在美军中用野生型 4、7 型腺病毒株作为口服活疫苗预防呼吸道感染免疫接种 30 a, 证明是安全可靠的; 目前无资料证明 4、7 型腺病毒感染与人类恶性肿瘤有关, 在人类的肿瘤细胞中未发现有腺病毒基因组的整合. 由于以上特点的存在, 使腺病毒载体成为继逆转录病毒载体后被广泛应用的载体系统, 尤其在 *in vivo* 基因治疗和研究方面更为突出.

腺病毒载体同样还存在着一些不足<sup>[29-31]</sup>, 为了克服这些不足, 人们不断对其进行着改良. 第一代腺病毒载体是由去除其基因组 E1 和 / 或 E3 区而获得的, 复制需在表达 E1 蛋白的 293 细胞中完成. 由于载体与 293 细胞间存在同源序列, 载体在 293 细胞中繁殖时通过重组可重新获得 E1 区, 出现复制型腺病毒(RCA), 使其可以合成腺病毒的早期和晚期蛋白, 激发宿主针对腺病毒的细胞和体液免疫, 使第一代腺病毒载体在体内的持续时间及再次应用受到限制. 为了减少 RCA 的产生, 进一步降低病毒自身蛋白的合成, 人们利用互补细胞系<sup>[32]</sup>(如 PER.C6, 能表达 E1 蛋白, 但与载体不存在同源序列)代替 293 细胞, 并制备了双缺失的第二代腺病毒载体<sup>[33]</sup>; 只保留复制和包装必需的顺式作用元件而去除了腺病毒载体中所有编码基因第三代腺病毒载

体<sup>[28]</sup>(即所谓“无肠”, gutless). 这些改良的载体可避免 RCA 的产生, 大大降低宿主对病毒的免疫反应, 利于载体的长期应用.

### 4 腺病毒载体在 HCV 研究中的应用

目前, 表达 HCV 基因的腺病毒载体已广泛应用于 HCV 的分子生物学、发病机制、疫苗研制及 HCV 所致的肝硬化和肝细胞肝癌等方面的研究. 腺病毒表达载体是一种很好的 HCV 抗原表达载体<sup>[34]</sup>, 用其免疫小鼠后可以产生有效的针对 HCV 的细胞免疫和体液免疫<sup>[35]</sup>, 尤其是其表达的 HCV 结构抗原 CE1 或 CE1E2 可以刺激机体产生有效的 CTL 效应, 且这种 CTL 效应可持续 100 d 以上<sup>[36]</sup>. 有人利用携带 HCV 结构和非结构基因的腺病毒载体进行免疫诱导, 确定了几个人 HLA-A<sub>2</sub> 限制的 HCV CTL 表位<sup>[37]</sup>和几个小鼠 H-2<sup>d</sup> 限制的 HCV CTL 表位<sup>[36]</sup>, 这对设计和研制抗 HCV 治疗性疫苗具有重要意义. 有人分别利用表达 HCV C-E1 和 HCV C-E2 蛋白的腺病毒表达载体感染树突状细胞(dendritic cells, DC), 证实了 HCV C-E1 和 C-E2 蛋白的表达均可导致树突状细胞抗原呈递功能的降低, 从而引起抗 HCV 的 T 细胞免疫功能缺陷, 导致 HCV 的持续感染<sup>[38,39]</sup>; 但也有人利用该载体进行研究得出了不同的观点, 认为 HCV C 及 C-E1 蛋白的表达并不影响宿主清除肝细胞 HCV 感染的能力<sup>[40]</sup>. 此外, 还有人利用表达 HCV C 蛋白的腺病毒表达载体证实了 C 蛋白的表达可影响细胞的生存能力和细胞膜的通透性<sup>[41]</sup>; C 蛋白的表达在丙型肝炎患者肝细胞的恶变过程中起一定作用<sup>[42]</sup>; 也有人认为 HCV 保守的 C 蛋白在 HCV 疫苗的研制中具有重要作用<sup>[43]</sup>.

诸多的研究表明, 腺病毒载体是一种很好的基因转移和表达载体, 有较好的发展潜力.

### 5 参考文献

- Gysin R, Wergedal JE, Sheng MH, Kasukawa Y, Miyakoshi N, Chen ST, Peng H, Lau KH, Mohan S, Baylink DJ. Ex vivo gene therapy with stromal cells transduced with a retroviral vector containing the BMP4 gene completely heals critical size calvarial defect in rats. *Gene Ther* 2002;9:991-999
- Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, Bouneaud C, Hue C, De Villartay JP, Thrasher AJ, Wulffraat N, Sorensen R, Dupuis-Girod S, Fischer A, Davies EG, Kuis W, Leiva L, Cavazzana-Calvo M. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med* 2002;346:1185-1193
- Musgrave DS, Pruchnic R, Bosch P, Ziran BH, Whalen J, Huard J. Human skeletal muscle cells in ex vivo gene therapy to deliver bone morphogenetic protein-2. *J Bone Joint Surg Br* 2002;84:120-127
- Lynch CM. Gene therapy for hemophilia. *Curr Opin Mol Ther* 1999;1:493-499
- Zhao J, Pettigrew GJ, Thomas J, Vandenberg JI, Delriviere L, Bolton EM, Carmichael A, Martin JL, Marber MS, Lever AM. Lentiviral vectors for delivery of genes into neonatal and adult ventricular cardiac myocytes in vitro and in vivo. *Basic Res Cardiol* 2002;97:348-358
- Mizuguchi H, Koizumi N, Hosono T, Ishii-Watabe A, Uchida E, Utoguchi N, Watanabe Y, Hayakawa T. CAR- or alphav integrin-binding ablated adenovirus vectors, but not fiber

- modified vectors containing RGD peptide, do not change the systemic gene transfer properties in mice. *Gene Ther* 2002;9:769-776
- 7 Havenga MJ, Lemckert AA, Ophorst OJ, van Meijer M, Germeraad WT, Grimbergen J, van Den Doel MA, Vogels R, van Deutekom J, Janson AA, de Bruijn JD, Uytdehaag F, Quax PH, Logtenberg T, Mehtali M, Bout A. Exploiting the natural diversity in adenovirus tropism for therapy and prevention of disease. *J Virol* 2002;76:4612-4620
  - 8 Wang G, Berk AJ. In Vivo association of adenovirus large E1A protein with the human mediator complex in adenovirus-infected and  $\gamma$ -Transformed cells. *J Virol* 2002;76:9186-9193
  - 9 Sandig V, Youil R, Bett AJ, Franlin LL, Oshima M, Maione D, Wang F, Metzker ML, Savino R, Caskey CT. Optimization of the helper-dependent adenovirus system for production and potency in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:1002-1007
  - 10 Stevens JL, Cantin GT, Wang G, Shevchenko A, Shevchenko A, Berk AJ. Transcription control by E1A and MAP kinase pathway via Sur2 mediator subunit. *Science* 2002;296: 755-758
  - 11 Nada S, Trempe JP. Characterization of adeno-associated virus rep protein inhibition of adenovirus E2a gene expression. *Virology* 2002;293:345-355
  - 12 Jing XJ, Kalman-Maltese V, Cao X, Yang Q, Trempe JP. Inhibition of adenovirus cytotoxicity, replication, and E2a gene expression by adeno-associated virus. *Virology* 2001;91:140-151
  - 13 Chen Q, Wang JZ, Liu H, Wu Y, Fan M. Construction and characterization of recombinant adenoviruses expressing biologically active human brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Xuebao* 2000;32:121-125
  - 14 Kee C, Sohn S, Hwang JM. Stromelysin gene transfer into cultured human trabecular cells and rat trabecular meshwork in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:2856-2860
  - 15 Liu Q, Lu Z, Zhang W, Yan J. Construction and identification of recombinant adenovirus vector containing the hVEGF165 gene. *J Tongji Med Univ* 2000;20:186-189
  - 16 Ishii H, Yoshida M, Hajjar KA, Yasukochi Y, Numano F. Construction of recombinant adenoviral vector of annexin II. *Ann N Y Acad Sci* 2000;902:311-314
  - 17 Sanchez TA, Habib I, Leland Booth J, Evetts SM, Metcalf JP. Zinc finger and carboxyl regions of adenovirus E1A 13S CR3 are important for transactivation of the cytomegalovirus major immediate early promoter by adenovirus. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23:670-677
  - 18 Habib NA, Hodgson HJ, Lemoine N, Pignatelli M. A phase I/II study of hepatic artery infusion with wtp53-CMV-Ad in metastatic malignant liver tumours. *Hum Gene Ther* 1999;10:2019-2034
  - 19 Xu ZL, Mizuguchi H, Ishii-Watabe A, Uchida E, Mayumi T, Hayakawa T. Strength evaluation of transcriptional regulatory elements for transgene expression by adenovirus vector. *J Control Release* 2002;81:155-163
  - 20 Johnson MA, Pooley C, Lowenthal JW. Delivery of avian cytokines by adenovirus vectors. *Dev Comp Immunol* 2000; 24:343-354
  - 21 Hao CQ, Zhou YX, Feng ZH, Li JG, Jia ZS, Wang PZ. Construction, identification and expression of framework plasmid pAd.HCV-C of adenovirus expression vector of HCV C. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2001;9:635-639
  - 22 Zhou HS, Zhao T, Rao XM, Beaudet AL. Production of helper-dependent adenovirus vector relies on helper virus structure and complementing. *J Gene Med* 2002;4:498-509
  - 23 Davis AR, Wivel NA, Palladino JL, Tao L, Wilson JM. Construction of adenoviral vectors. *Mol Biotechnol* 2001;18:63-70
  - 24 Pandori M, Hobson D, Sano T. Adenovirus-microbead conjugates possess enhanced infectivity: a new strategy for localized gene delivery. *Virology* 2002;299:204-212
  - 25 Nasz I, Adam E. Recombinant adenovirus vectors for gene therapy and clinical trials. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2001; 48:323-348
  - 26 Adam E, Nasz I. Adenovirus vectors and their clinical application in gene therapy. *Orv Hetil* 2001;142:2061-2070
  - 27 Benihoud K, Yeh P, Perricaudet M. Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol* 1999;10:440-447
  - 28 Morsy MA, Gu M, Motzel S, Zhao J, Lin J, Su Q, Allen H, Franlin L, Parks RJ, Graham FL, Kochanek S, Bett AJ, Caskey CT. An adenoviral vector deleted for all viral coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:7866-7871
  - 29 Gelse K, Jiang QJ, Aigner T, Ritter T, Wagner K, Poschl E, von der Mark K, Schneider H. Fibroblast-mediated delivery of growth factor complementary DNA into mouse joints induces chondrogenesis but avoids the disadvantages of direct viral gene transfer. *Arthritis Rheum* 2001;44:1943-1953
  - 30 Sellers KW, Katovich MJ, Gelband CH, Raizada MK. Gene therapy to control hypertension: current studies and future perspectives. *Am J Med Sci* 2001;322:1-6
  - 31 Rasmussen UB, Benchaibi M, Meyer V, Schlesinger Y, Schughart K. Novel human gene transfer vectors: evaluation of wild-type and recombinant animal adenoviruses in human-derived cells. *Hum Gene Ther* 1999;10:2587-2599
  - 32 Fallaux FJ, Bout A, van der Velde I, van den Wollenberg DJ, Hehir KM, Keegan J, Auger C, Cramer SJ, van Ormondt H, van der Eb AJ, Valerio D, Hoeben RC. New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther* 1998;9:1909-1917
  - 33 Hu H, Serra D, Amalfitano A. Persistence of an [E1-, polymerase-] adenovirus vector despite transduction of a neoantigen into immune-competent mice. *Hum Gene Ther* 1999;10:355-364
  - 34 Seong YR, Lee CH, Im DS. Characterization of the structural proteins of hepatitis C virus expressed by an adenovirus recombinant. *Virus Res* 1998;55:177-185
  - 35 Seong YR, Choi S, Lim JS, Lee CH, Lee CK, Im DS. Immunogenicity of the E1E2 proteins of hepatitis C virus expressed by recombinant adenoviruses. *Vaccine* 2001;19:2955-2964
  - 36 Bruna-Romero O, Lasarte JJ, Wilkinson G, Grace K, Clarke B, Borrás-Cuesta F, Prieto J. Induction of cytotoxic T-cell response against hepatitis C virus structural antigens using a defective recombinant adenovirus. *Hepatology* 1997;25:470-477
  - 37 Urbani S, Uggeri J, Matsuura Y, Miyamura T, Penna A, Boni C, Ferrari C. Identification of immunodominant hepatitis C virus (HCV)-specific cytotoxic T-cell epitopes by stimulation with endogenously synthesized HCV antigens. *Hepatology* 2001;33:1533-1543
  - 38 Sarobe P, Lasarte JJ, Casares N, Lopez-Diaz de Cerio A, Baixeras E, Labarga P, Garcia N, Borrás-Cuesta F, Prieto J. Abnormal priming of CD4(+) T cells by dendritic cells expressing hepatitis C virus core and E1 proteins. *J Virol* 2002; 76:5062-5070
  - 39 Hiasa Y, Horiike N, Akbar SM, Saito I, Miyamura T, Matsuura Y, Onji M. Low stimulatory capacity of lymphoid dendritic cells expressing hepatitis C virus genes. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;249:90-95
  - 40 Sun J, Bodola F, Fan X, Irshad H, Soong L, Lemon SM, Chan TS. Hepatitis C virus core and envelope proteins do not suppress the host's ability to clear a hepatic viral infection. *J Virol* 2001;75:11992-11998
  - 41 Kalkeri G, Khalap N, Akhter S, Garry RF, Fermin CD, Dash S. Hepatitis C viral proteins affect cell viability and membrane permeability. *Exp Mol Pathol* 2001;71:194-208
  - 42 Dubourdeau M, Miyamura T, Matsuura Y, Alric L, Pipy B, Rousseau D. Infection of HepG2 cells with recombinant adenovirus encoding the HCV core protein induces p21(WAF1) down-regulation - effect of transforming growth factor beta. *J Hepatol* 2002;37:486
  - 43 Liu ZX, Nishida H, He JW, Lai MM, Feng N, Dennert G. Hepatitis C virus genotype 1b core protein does not exert immunomodulatory effects on virus-induced cellular immunity. *J Virol* 2002;76:990-997