

腺相关病毒在肝脏移植应用的研究进展

邵升, 苏志雷

邵升, 哈尔滨医科大学附属二院肝胆外科 黑龙江省哈尔滨市 150086
苏志雷, 哈尔滨医科大学附属二院普外一科 黑龙江省哈尔滨市 150086
邵升, 1995年毕业于内蒙古医学院, 2002年哈尔滨医科大学博士毕业, 副教授, 主要从事肝脏移植免疫耐受诱导的研究。
通讯作者: 邵升, 150086, 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路246号, 哈尔滨医科大学附属二院肝胆外科. tai-sheng@tom.com
电话: 0451-86605356
收稿日期: 2005-12-29 接受日期: 2006-01-21

腺相关病毒(AAV)载体已成为当前基因治疗中最有潜力的病毒载体, 在肝移植面临的缺血再灌注损害、免疫排斥反应等问题的基因治疗中发挥其独特的优势。他安全, 无致病性, 低免疫原性, 高效转染肝脏并且目的基因长期表达。同时AAV用于肝移植基因治疗又涉及到一些问题, 如肝移植中不可避免的缺血再灌注损伤、AAV目的基因表达的峰值延迟现象以及AAV与肿瘤发生的关系等, 本文就以上问题进行综述。

关键词: 腺相关病毒; 肝移植; 基因治疗

邵升, 苏志雷. 腺相关病毒在肝脏移植应用的研究进展. 世界华人消化杂志 2006;14(22):2155-2158
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2155.asp>

0 引言

腺相关病毒载体(AAV)因其无致病性、宿主范围广、转染和表达效率高、目的基因长期表达等优点成为当前基因治疗中最有潜力的病毒载体, 在世界范围内的基因治疗研究中得到广泛应用, 并有若干项目已进入临床试验。在肝移植基因治疗中通过病毒载体对移植肝进行基因修饰, 以达到抑制免疫排斥反应、诱导免疫耐受的目的。以往的研究多集中于腺病毒(Ad)载体, 本文对AAV应用于肝移植基因治疗的优势、涉及的问题及发展前景作一综述。

1 AAV载体在肝移植基因治疗中的优势

1.1 安全性 AAV无致病性, 流行病学资料表明, 大多数人感染过野生型AAV。在美国, 约85%的

成年人血清中可以检测到AAV抗体。在20到30岁的人群中, 血清中AAV抗体阳性者, 德国约50%, 法国约63%, 巴西约55%, 日本约46%^[1]。迄今尚无证据表明AAV的感染与某种疾病的发生有关; 相反, 在某些情况下AAV的感染对于人们似乎是有益的, 如AAV感染可能对于宫颈癌的发生有保护作用^[2]。目前在基因治疗研究中常用的AAV载体均由人2型AAV改造而来, 他去除了大部分野生型AAV的基因组, 包括AAV的复制蛋白(rep)和外壳蛋白(cap)的基因组, 仅保留了反向末端重复序列(ITR), 进一步保证了载体的安全性。

AAV有低免疫原性, 单纯AAV感染仅引起机体轻微的免疫反应, 在AAV的临床试验中, 局部注射部位无或仅有微弱的炎症反应^[3]。Stilwell *et al*^[4]基于DNA微阵列的一项研究结果显示, 腺病毒感染肺成纤维细胞后, 可以诱导包括致病效果相关的免疫和应激反应的基因表达, 而重组和野生型AAV感染仅诱导一群抗增殖性基因与巨噬细胞抑制因子1(MIC1)等的基因表达。MIC1可能发挥抑制前炎症细胞因子产生的作用。

野生型AAV2型偏向于特异性地整合到人基因组19号染色体q臂的特定位置AAVS1, 从而避免了像其他病毒那样因随机整合而可能引起抑癌基因失活和原癌基因激活的危险。在构建重组AAV载体时, 通过保留rep基因以保留其定点整合的特性, 可以更好的加强AAV载体的安全性。

1.2 有效性 AAV载体宿主范围广, 可以转染分裂细胞和非分裂细胞。但对不同的细胞, AAV载体的转染效率存在差异; 对同一种细胞, 不同血清型的AAV载体转染效率也不尽相同。AAV的转染效率与细胞表面存在的受体有关, 该受体分为两类, 一类是主要受体, 另一类是辅助受体。对于AAV 2型而言, 硫酸乙酰肝素蛋白多糖是AAV 2型的主要受体, AAV通过主要受体结合于细胞表面; 1型成纤维细胞生长因子受体

■背景资料

腺相关病毒载体因其无致病性、宿主范围广、转染和表达效率高、目的基因长期表达等优点成为当前基因治疗中最有潜力的病毒载体, 本文对腺相关病毒载体在肝移植面临的缺血再灌注损害、免疫排斥反应等问题的基因治疗应用中的优势、涉及的问题及发展前景作一综述。

■研发前沿

腺相关病毒载体在肝移植基因治疗中的应用研究为肝移植的基因治疗的研究热点与前沿。

■应用要点

肝移植面临缺血再灌注损伤、免疫排斥反应等重大问题,通过基因治疗手段来解决这些问题的一大关键即载体的选择.腺相关病毒载体可望在肝移植基因治疗中发挥重要作用.

(FGFR1)和 $\alpha V\beta 5$ 整合素是AAV 2型的辅助受体,他协助病毒有效的进入细胞内部^[5-6].最近的研究表明,肝细胞生长因子受体c-met也是AAV 2型的一种辅助受体,他通过细胞内吞作用辅助AAV进入细胞质^[7].肝细胞表面受体的丰度决定了AAV对肝脏的转染效率,使其成为肝脏指向基因治疗的有效病毒载体^[8].

AAV载体介导的目的基因转移可以在宿主细胞内长期稳定的表达. Nakai *et al*^[9]研究表明, AAV载体转染小鼠肝脏后,外源性目的基因可以持续稳定的表达.但其发生整合的比率很小,而是通过形成首尾相接的环状高分子量多聚体以染色体外的形式存在. Yang *et al*^[10]构建rAAV-hcTLA-4Ig,并利用大鼠原位肝移植模型体外转导供肝,结果显示,受体血清中和移植物内的hcTLA-4Ig水平均在术后逐渐升高,在移植后8 wk左右达峰值,并维持较高水平180余天.

1.3 可行性 常规构建重组AAV需要共转染一个载体质粒和一个表达病毒复制和结构基因的包装质粒到Ad感染的培养细胞中.但这种方法有明显的局限性,如产量低、Ad辅助病毒污染等.伍志坚 *et al*^[11]用“一种病毒感染一株细胞”的生产策略,用一种能提供重组AAV复制和包装功能的重组I型单纯疱疹病毒(HSV-1),去感染载体细胞株,实现了重组AAV的大规模生产. Collaco *et al*^[12]构建了pSH3和pSH5两种辅助质粒,均可表达AAV的rep, cap基因和Ad E2A, VAI, E4基因.可以在没有Ad感染的情况下共转染到人293细胞中,使重组AAV载体产量提高80倍.在纯化上,吴小兵 *et al*^[13]用“氯仿处理-PEG/NaCl沉淀-氯仿抽提”的三步浓缩、纯化方法获得临床级的AAV. Auricchio *et al*^[14]利用AAV与肝素的高亲和性,采用单步圆柱纯化法(single-step column purification),不仅简化了操作步骤,而且得到了更纯、感染能力更强的AAV载体.随着人们对重组AAV生产策略及纯化方法的不断深入研究,AAV载体的快速、高效的大规模高滴度生产模式已经日趋成熟,为AAV载体的临床应用奠定了基础.

2 AAV用于肝移植基因治疗涉及的问题

2.1 缺血-再灌注损伤 AAV是一种偏向于潜伏感染的病毒,只在有辅助病毒(Ad或疱疹病毒等)共感染时发生增殖性感染.但用某些可损伤基因的因素如紫外线照射、各种化学致癌剂等处理某种类型的哺乳动物细胞,可使之在无辅助病

毒存在的情况下发生增殖性感染. Zhou *et al*^[15]体外实验研究表明,在亚致死剂量的紫外线诱导的AAV复制蛋白的表达,可以使细胞发生细胞凋亡样反应而迅速死亡.在肝脏移植中,存在不可避免的缺血-再灌注损伤以及随之而来的肝脏对损伤结构的修复.这种损伤-修复过程一方面可以提高AAV的转染效率,其原因可能是DNA损伤及随后引起的DNA修复可以促进AAV第二链的合成与AAV的转录^[10];另一方面,过度的损伤是否会增加AAV的细胞毒性,仍需进一步的研究.

2.2 峰值延迟 AAV转染细胞后目的基因可以长期表达,但目的基因表达达到高峰的时间约4-8 wk^[16].肝移植时,术后急性免疫排斥反应发生在术后约1 wk.这使得我们在供肝获取时转染目的基因,在术后约1 wk急性排斥反应高峰时,目的基因产物表达水平较低,不足以发挥作用.在大鼠同种异体原位肝移植中,单独应用rAAV-hCTLA-4Ig转染供肝不能使移植物长期存活,而在移植后3 d联合应用小剂量FK506,却能使移植肝长期存活^[17].我们课题组通过在移植前一段时间转染供体肝脏,以使目的基因表达峰值与急性排斥反应高峰重叠(资料待发表).

2.3 靶向性 在肝移植的基因治疗中,我们希望能靶向性的转染肝脏,使目的基因在肝脏局部高表达从而有助于提高基因治疗的有效性和安全性. AAV能转染分裂细胞和非分裂细胞,经肝动脉注射后,其主要集中于肝脏,但短期内在血清、其他组织、器官内也可以检测到AAV^[18]. AAV从第一次接触细胞到进入细胞核的时间大约只需15 min^[19],因此用AAV载体离体状态下转染供肝,并且经冷保存一段时间后,可以使AAV靶向性转染肝脏.

2.4 肿瘤发生 目前常用的重组AAV载体由于缺少rep基因,失去了定点整合的能力.这就使得理论上他可整合至细胞基因组的任意位置,有潜在的因随机插入而引起基因突变导致肿瘤发生的能力.

但在许多动物试验中,并没有发现任何对宿主细胞的毒性及肿瘤的发生.然而,在rAAV介导的小鼠溶酶体贮积病、黏多糖贮积症VII型(MPS VII)的基因治疗实验中,却出现了人们意料之外的结果.60例中有6例发生恶性肿瘤,其中5例肝细胞癌,2例血管肉瘤(其中1例同时有肝细胞癌和血管肉瘤)^[20].为明确该实验中小鼠的恶性肿瘤是否与rAAV载体有关, Donsante *et al*^[20]对发生

肿瘤的小鼠进行了深入的研究, 提出一些假说并进行了验证. 假说1: MPS VII小鼠模型有肿瘤发生倾向, 然而在其他应用MPS VII小鼠模型的实验中并没有出现肿瘤发生. 假说2: 插入基因突变, 可是通过检测发生肿瘤的细胞中rAAV的启动子/增强子DNA, 结果显示每个细胞中rAAV的拷贝数小于0.113, 有的样品甚至检测不出(<1个拷贝/1000个双倍体), 说明肿瘤不是由于插入突变而使转导细胞克隆增殖引起的, 但也不能排除rAAV与之的关系. 其他假说如: 少数细胞过度表达目的蛋白(GUBS)、转导对象是新生鼠、病毒载体制备中涉及的化学物质等, 在相应的对照实验中没有被证实. 没有证据表明肿瘤发生与rAAV插入基因突变有关, 肿瘤发生的真正原因仍需进一步研究.

Miller *et al*^[21]研究AAV载体在体外整合至HeLa细胞克隆的过程, 发现在其整合位点有染色体的缺失和重排. 因此认为, AAV载体通过末端删除整合于染色体的断端, 在某些情况下, 可以引起染色体重排, 这可能会同时影响转基因和细胞的基因表达. 但HeLa细胞是肿瘤细胞, 他的染色体组与人正常细胞相比有显著的差异. Miller *et al*^[22]通过进一步研究认为, AAV载体可以整合于染色体的断裂处, 而不是其本身引起染色体断裂, AAV感染后并不能增加人正常细胞的突变几率, 因此认为AAV载体可以应用于临床.

总之, AAV载体的特点, 使他在基因治疗领域得到广泛的应用, 已进入临床试验包括用于治疗帕金森氏综合症、血友病和肺的囊状纤维化等疾病. AAV载体用于动物肝移植的实验研究已取得很大进展, 随着移植免疫学的不断发展及基因治疗理论和实践的不断完善, 我们相信, AAV载体在临床肝移植基因治疗以减少急、慢性免疫排斥反应, 提高移植肝的存活时间等方面有广阔的应用前景.

3 参考文献

- 1 Erles K, Sebockova P, Schlehofer JR. Update on the prevalence of serum antibodies (IgG and IgM) to adeno-associated virus (AAV). *J Med Virol* 1999; 59: 406-411
- 2 Walz CM, Correa-Ochoa MM, Muller M, Schlehofer JR. Adenoassociated virus type 2-induced inhibition of the human papillomavirus type 18 promoter in transgenic mice. *Virology* 2002; 293: 172-181
- 3 Sarukhan A, Camugli S, Gjata B, von Boehmer H, Danos O, Jooss K. Successful interference

- with cellular immune responses to immunogenic proteins encoded by recombinant viral vectors. *J Virol* 2001; 75: 269-277
- 4 Stilwell JL, Samulski RJ. Role of viral vectors and virion shells in cellular gene expression. *Mol Ther* 2004; 9: 337-346
- 5 Summerford C, Bartlett JS, Samulski RJ. AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med* 1999; 5: 78-82
- 6 Qing K, Mah C, Hansen J, Zhou S, Dwarki V, Srivastava A. Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat Med* 1999; 5: 71-77
- 7 Kashiwakura Y, Tamayose K, Iwabuchi K, Hirai Y, Shimada T, Matsumoto K, Nakamura T, Watanabe M, Oshimi K, Daida H. Hepatocyte growth factor receptor is a coreceptor for adeno-associated virus type 2 infection. *J Virol* 2005; 79: 609-614
- 8 Xiao W, Berta SC, Lu MM, Moscioni AD, Tazelaar J, Wilson JM. Adeno-associated virus as a vector for liver-directed gene therapy. *J Virol* 1998; 72: 10222-10226
- 9 Nakai H, Yant SR, Storm TA, Fuess S, Meuse L, Kay MA. Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction *in vivo*. *J Virol* 2001; 75: 6969-6976
- 10 Yang ZF, Wu XB, Tsui TY, Hou YD, Luk JM, Fan ST. Recombinant adeno-associated virus vector: Is it ideal for gene delivery in liver transplantation? *Liver Transpl* 2003; 9: 411-420
- 11 伍志坚, 吴小兵, 曹晖, 董小岩, 王宏, 侯云德. 一种高效的重组腺伴随病毒载体生产系统. *中国科学(C辑)* 2001; 31: 423-430
- 12 Collaco RF, Cao X, Trempe JP. A helper virus-free packaging system for recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene* 1999; 238: 397-405
- 13 吴小兵, 董小岩, 伍志坚, 屈建国, 侯云德. 一种快速高效分离和纯化重组腺伴随病毒载体的方法. *科学通报* 2000; 45: 2071-2075
- 14 Auricchio A, O'Connor E, Hildinger M, Wilson JM. A single-step affinity column for purification of serotype-5 based adeno-associated viral vectors. *Mol Ther* 2001; 4: 372-374
- 15 Zhou C, Yang Q, Trempe JP. Enhancement of UV-induced cytotoxicity by the adeno-associated virus replication proteins. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1444: 371-383
- 16 Snyder RO, Miao C, Meuse L, Tubb J, Donahue BA, Lin HF, Stafford DW, Patel S, Thompson AR, Nichols T, Read MS, Bellinger DA, Brinkhous KM, Kay MA. Correction of hemophilia B in canine and murine models using recombinant adeno-associated viral vectors. *Nat Med* 1999; 5: 64-70
- 17 Yang Z, Wu X, Tsui TY, Hou Y, Luk JM, Fan ST. Long-term liver allograft survival induced by combined treatment with rAAV-hCTLA4lg gene transfer and low-dose FK506. *Transplantation* 2003; 75: 303-308
- 18 Tenenbaum L, Lehtonen E, Monahan PE. Evaluation of risks related to the use of adeno-associated virus-based vectors. *Curr Gene Ther* 2003; 3: 545-565
- 19 Seisenberger G, Ried MU, Endress T, Buning H, Hallek M, Brauchle C. Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an adeno-

■名词解释

腺相关病毒(AAV)是微小病毒科家族的成员之一. 这一家族成员是一类微小、无被膜及具有二十面体结构的病毒, 病毒颗粒的直径在20-26 nm之间, 含有大小在4.7-6 kb之间的线状单链DNA基因组, 属于依赖性病毒类. 他最初是在纯化的腺病毒液中发现的一种污染成分, 因而得名.

■同行评价

肝移植面临的缺血再灌注损害、免疫排斥反应等问题的基因治疗是目前研究的热点问题,而以重组病毒为载体的基因治疗因其独特的优势,尤其是AAV作为目前临床可以应用的病毒载体备受瞩目.作者以AAV在肝移植应用的优势及面临问题进行综述,具有一定的意义.

- 20 associated virus. *Science* 2001; 294: 1929-1932
- 20 Donsante A, Vogler C, Muzyczka N, Crawford JM, Barker J, Flotte T, Campbell-Thompson M, Daly T, Sands MS. Observed incidence of tumorigenesis in long-term rodent studies of rAAV vectors. *Gene Ther* 2001; 8: 1343-1346
- 21 Miller DG, Rutledge EA, Russell DW. Chromosomal effects of adeno-associated virus vector integration. *Nat Genet* 2002; 30: 147-148
- 22 Miller DG, Petek LM, Russell DW. Adeno-associated virus vectors integrate at chromosome breakage sites. *Nat Genet* 2004; 36: 767-773

电编 李琪 编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

2006上海中日早期胃肠肿瘤国际研讨会通告

本刊讯 由上海市胃肠肿瘤重点学科、日本早期胃癌检诊协会、上海交通大学瑞金医院消化肿瘤学科群共同主办“2006上海中日早期胃肠肿瘤国际研讨会”将于2006-11-09/11在上海召开。

1 会议内容

由日本及香港专家主讲: 功能性消化不良和早期胃癌的临床识别; 根除*H pylori*预防胃癌研究; 内镜诊断早期胃癌的深度及组织学类型; 早期胃癌EMR、ESD及外科手术治疗; 早期胃癌和大肠癌标本处理及病理检查规范及国际共识意见; 大肠锯齿状腺瘤、大肠癌及新生癌的诊断, 外科手术及综合治疗。

由中国专家主讲: 放大内镜诊断早期胃癌; 中国早期胃癌临床现状及前景; 胃肠肿瘤腹腔镜治疗; 大肠侧向生长型肿瘤诊治; 大肠癌早期诊断及筛查; 胶囊内镜、双气囊小肠镜及小肠超声内镜诊断小肠肿瘤及临床评估。

2 征文

征文内容包括胃癌、大肠癌、小肠肿瘤基础研究、流行病学调查, 早期胃肠癌诊断及治疗. 论文(电子版)按中华消化杂志格式书写附500字以内中文摘要, 欢迎网上投稿. 截止日期: 2006-08-10. 来稿寄至: 上海市瑞金二路197号上海瑞金医院消化科 汤美萍 (请注明2006胃肠肿瘤大会稿件), 邮政编码: 200025. 联系电话: 021-64370045-665246, E-mail: wuyunlin1951@163.com.

会议将授予国家继续教育 I 类学分8分.