

HIV-1 慢病毒载体的发展及其生物安全性

孙岩, 陈胜, 王蒙, 刘红林* (南京农业大学动物科技学院, 江苏南京 210095)

摘要 对 HIV-1 慢病毒载体的演变和发展做了较详细的介绍, 并对慢病毒载体在生物安全性上的改进进行了综述。

关键词 HIV-1; 慢病毒载体; 生物安全性

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)23-07115-02

Development and Biological Safety of Lentiviral Vector HIV-1

SUN Yan et al (College of Animal Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095)

Abstract As a new method of transgenic technology, HIV-1 lentiviral vector was recognized and applied by more and more people in many research fields. The changes and development of HIV-1 lentiviral vector were introduced. And the improvements of lentiviral vectors in biological safety were reviewed.

Key words HIV-1; Lentiviral vector; Biological safety

在众多转基因方法中, 慢病毒载体法特别是目前研究最为深入 HIV-1 型慢病毒载体法, 其有着其他转基因技术方法不可比拟的优势。这主要表现在 HIV-1 慢病毒载体具有容纳外源性目的基因的片段大, 可感染非分裂期细胞, 可在体内长期稳定整合, 较少发生基因沉默现象, 免疫反应小, 安全性较好等方面。近年来通过科学家不懈的努力, 使 HIV-1 慢病毒载体得到了极大的改进, 其生物安全性不断提高。

1 HIV-1 慢病毒载体的发展

早期构建的 HIV-1 慢病毒载体仅仅是将一个报告基因插入到了 env 基因中。由于生物安全性较差, 病毒滴度较低等原因, 只是被用来研究 HIV-1 病毒的生物特性, 而并未被考虑作为转基因的载体, 以及作为基因治疗的工具^[1-2]。

第 1 代慢病毒载体主要为三质粒系统, 即载体质粒、包装质粒和包膜质粒。以 Naldini^[3] 以及 Kafri^[4] 构建的三质粒系统为代表, 载体质粒携带目的基因和病毒的顺式元件。为了防止来自辅助质粒的 RNA 衣壳化, 将其 5' 端主要剪接供体位点和 gag 编码序列起始端之间的包装信号区 (E/Ψ region) 删除, 用 CMV 启动子代替了慢病毒 5' LTR, 而下游的启动子由 poly A 信号取代。另外, 删除了 env、vpu 基因的阅读框架, 但仍保留 rev 反应元件。包装质粒由 HIV-1 前病毒基因组作简单修改得到, 它负责产生反式作用因子、逆转录酶、整合酶以及内部基因表达元件等。该质粒编码野生型病毒的 5' 端、3' 端 LTR, 5' 端还有 gag 基因和 rev 基因反应元件 (RRE)。包膜质粒则引入了 VSV-G 基因表达包膜结构, 进一步降低了 HIV-1 载体恢复成具有复制能力反转录病毒的可能, 使感染宿主的范围几乎扩大到所有组织来源的细胞, 同时提高了载体颗粒的稳定性^[1, 5]。

第 2 代慢病毒载体系统是以自身失活 (SIN) 的慢病毒载体为代表^[6-7]。其删除了 3' LTR 的 U3 区, 在 HIV-1 载体逆转录后, 因其 5' LTR 缺乏 HIV-1 启动子及增强子序列, 即使存在所有的病毒蛋白也不能转录出 RNA, 因此该载体系统更加安全。包装质粒上的与病毒对细胞产生毒害作用相关的基因 (如 vif、vpr、vpu 和 nef 等基因) 被敲除。由于敲除

的调节基因与野生型 HIV-1 病毒的生活周期以及毒力密切相关, 所以这些载体即使发生多位点重组形成 RCR, 亲代病毒仍不具有致病性^[8]。

第 3 代慢病毒载体系统将目的基因诱导表达系统插入到了慢病毒载体内, 故第 3 代慢病毒载体又称可控性慢病毒载体。目前应用较多的是四环素-可诱导系统^[8-9]。改进后的第 3 代 HIV-1 来源的慢病毒载体还具有自身失活的特性, 它在原病毒载体的基础上删除了病毒 3' 端 LTR 上的 U3。在病毒基因整合到宿主基因组后, 病毒基因能够发生转录, 但病毒基因组不能被复制, 即使在发生病毒基因与宿主基因重组的情况下也不能被复制, 因此消除了产生活性病毒的可能性。另一个改进是在慢病毒载体质粒上进一步删去了 tat 基因, 大大降低因重组产生野生型病毒的可能性。此外, gag/pol 和 rev 编码序列被隔离, 分散在不同的质粒上, 这也降低了发生基因重组的可能性^[10]。

2 HIV-1 慢病毒载体的生物安全性

2.1 自身失活慢病毒载体 (SIN)

SIN 慢病毒载体去除了载体 3' 端长末端重复序列 (LTR) 中的 U3 区增强子和启动子序列, 这使得在逆转录过程中形成的子代载体 5' LTR 缺少增强子和启动子序列, 因而即使在所有病毒蛋白都存在的情况下也不能转录 RNA, 但是病毒的外源启动子仍然是有活性的, 所以能进行基因转录与表达。这种结构消除了病毒 LTR 中的启动子增强子序列对病毒载体中外源启动子指导转录的干扰作用以及减小了由 3' LTR 启动子指导的下游基因组中原癌基因的激活与转录作用的可能性, 一定程度上提高了载体的安全性^[6]。

2.2 包装系统的改造

为了减少病毒对细胞的毒害作用, 包装质粒上尽量减少原野生型病毒基因组所携带的有害基因, 因而在第 3 代 HIV-1 慢病毒载体中只保留了 gag、pol 和 rev 3 个病毒基因。包装质粒仅含 25% 的病毒基因组, 使其与载体质粒的同源性大大降低^[11]。将 gag/pol 和 rev 编码序列隔离分散在不同的质粒上, 也可降低因同源重组产生野生复制型病毒的可能性^[12]。慢病毒载体系统可以进一步分成 gag-蛋白酶、vpr-pol、rev、VSV-G 包膜蛋白和载体表达框这 5 个组成部分, 来进一步减少产生 RCV 的可能性。此外, 还有报道通过对包装结构内 gag-pol 密码子进行优化, 来减小它和转移载体的序列同源性, 从而减小载体和包装结构

作者简介 孙岩 (1981-), 男, 河北唐山人, 硕士研究生, 研究方向: 转基因动物。* 通讯作者。

收稿日期 2007-05-29

重组的可能性。这种优化的包装结构可以在不依赖 rev 的情况下允许 gag-pol 基因的高效表达,因而可从包装结构中去除 rev 和 RRE 序列,来进一步减少载体和包装结构重组的可能性。

2.3 加强慢病毒载体的靶向性和可控性 作为基因治疗的有力工具,慢病毒载体需要对其所感染的宿主细胞具有特异性,即确保目的治疗基因只能转入到特定的靶细胞中。目前,慢病毒载体的靶细胞特异性主要是通过两种途径实现的:一是使病毒颗粒与某种靶向分子或特异性抗体结合;二是改变病毒的包膜蛋白,使其对受体细胞的亲嗜性具有特异性^[9]。此外,通过将 Cre-loxP 系统以及四环素调节系统引入慢病毒载体,已使得人为调控目的外源基因表达的组织特异性、表达时间的特定性以及表达水平高低成为可能,这也间接地降低了慢病毒载体应用过程中的生物风险性。

3 展望

虽然慢病毒载体法进行的基因转移存在目的外源基因随机插入宿主基因组的问题,这为其应用带来了一定的风险性,但其自身同其他转基因技术相比所具有的众多优势是不容忽视的。相信随着对 HIV-1 慢病毒载体相关研究的不断深入,慢病毒载体的各种缺陷将会进一步得到弥补和完善,其生物安全性也将更加可靠。

参考文献

- [1] 罗望,张泓,许淼,等.慢病毒——基因转移的潜在新载体[J].江苏药学与临床研究,2006,14(6):366-371.
- [2] COLLINS K L,CHEN B K,KALAMS S A,et al.HIV-1 nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic lymphocytes[J].Nature,1998,391(6665):397-401.
- [3] NALDINI L,BLOMER U,GALLAY P,et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector[J]. Science,1996,272(5259):263-267.
- [4] KAFRI T,BLOMER U,PETERSON D A,et al. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors[J]. Nat Genet,1997,17:314-317.
- [5] 王鸿鹤.基因治疗中慢病毒载体的最新进展[J].国外医学输血及血液学分册,2002,25(5):401-404.
- [6] WAKUMA T,CUI Y,CHANG L J,et al. Self-inactivating lentivirus vectors with U3 and U5 modifications[J].Virol,1999,261:120-132.
- [7] MIYOSHI H,BLOMER U,TAKAHASHI M,et al.Development of self inactivating lentivirus vector[J]. Virol,1998,72:8150-8157.
- [8] DOUGHERTY J P,TEMIN H M.A promoterless retroviral vector indicates that there are sequences in U3 required for 3' RNA processing[J].Proc Natl Acad Sci USA,1987,84(5):1197-1201.
- [9] YU S F,VON RUDEN T,KANTOFF P W,et al.Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells[J].Proc. Natl Acad Sci USA,1986,83(10):3194-3198.
- [10] DULL T,ZUFFEREY R,KELLY M,et al.A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system [J].J Virol,1998,72(11):8463-8471.
- [11] DOUGLAS J L,LIN W Y,PANIS M L,et al.Efficient human immunodeficiency virus-based vector transduction of unstimulated human mobilized peripheral blood CD34⁺cells in the SCID-hu Thy/liv model of human T cells lymphopoiesis [J].Hum Gene Ther,2001,12:401-413.
- [12] VON SCHVEDLER U,KORNBLUTH R S,TROON D.The nuclear localization signal of the matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 allows the establishment of infection in macrophages and quiescent T lymphocytes[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1994,91:6992.
- [13] ORLINSKY K J,GU J,HOYT M,et al. Mutation in the Ty3 retrotransposon[J].Virol,1996,70:3440.