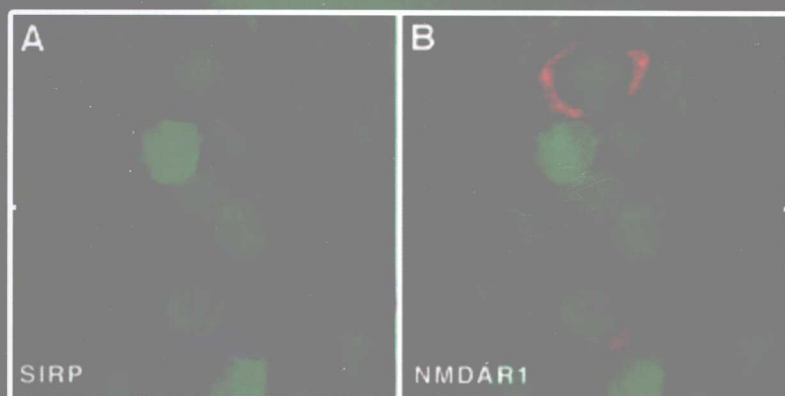


分子基因药理学

Molecular Gene Medicine

主编 许瑞安
陈 凌
肖卫东



北京大学医学出版社
北京大学出版社

分子基因药物学

主 编：许瑞安 陈 凌 肖卫东

北京大学医学出版社
北 京 大 学 出 版 社

图书在版编目 (CIP) 数据

分子基因药理学/许瑞安, 陈凌, 肖卫东主编. —北京:
北京大学医学出版社, 2008

ISBN 978-7-81071-968-1

I. 分… II. ①许…②陈…③肖… III. 基因—分子生物学: 药理学 IV. R915

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 169654 号

分子基因药理学

主 编: 许瑞安 陈 凌 肖卫东

出版发行: 北京大学医学出版社 (电话: 010-82802230)

地 址: (100083) 北京市海淀区学院路 38 号 北京大学医学部院内

网 址: <http://www.pumpress.com.cn>

E - mail: booksale@bjmu.edu.cn

印 刷: 北京佳信达艺术印刷有限公司

经 销: 新华书店

责任编辑: 安 林 责任校对: 金彤文 责任印制: 张京生

开 本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 43 插页: 1 字数: 1094 千字

版 次: 2008 年 1 月第 1 版 2008 年 1 月第 1 次印刷 印数: 1—2500 册

书 号: ISBN 978-7-81071-968-1

定 价: 138.00 元

版权所有 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

简介

许瑞安博士：



原籍福建晋江，教育部分子药物工程研究中心主任，教授、博士生导师，华侨大学分子药物学研究所所长、国际癌细胞与基因疗法学会常务理事，新西兰食品研究院专业委员、国家 863、“十五”、“十一五”肺癌临床前基因疗法首席科学家，国家 863、“十五”肝癌临床前基因疗法课题组副组长，北京协和医学院荣誉教授、中国海洋大学海洋药物客座教授。《中国药理学报》编委、常务理事，《中国临床药理学与治疗学》编委、顾问。从事分子药物学，分子药理学、分子医学、生物技术和细胞工程研究。为口服基因疗法主要奠基人和开拓者之一。1983 年录取教育部公派出国留学，1989 年获得 Otago 大学博士。先后在新西兰、加拿大、美国，中国香港从事科研与教学。其部分研究工作发表于 Nature Medicine, Cancer Research, Science, Molecular Therapy, Hepatology, PNAS 等国际学术刊物。2007 年入选美国 Marquis 科学与工程版 Who's who。

陈凌博士：



原籍福建晋江，中国科学院广州生物医药与健康研究院首任院长、研究员。中国科技大学医药生物技术系系主任，教授。2006 年国家杰出青年科学基金（外籍）获得者。1984 年毕业于上海医科大学，考取留美生物化学与分子生物学（CUSBEA）项目赴美留学。1991 年获美国印第安那大学生化与分子生物博士学位。1992—1994 年在美国哈佛大学医学院从事博士后研究。先后在哈佛大学医学院、美国 Dana—Farber 癌症研究所、Merck、Lexicon Genetics 从事研究。研究工作涉及生物医药领域的前沿领域，包括癌症、艾滋病及其他病毒类疾病的发病机制和疫苗研究，研究成果发表于 Nature, Journal of Clinical Investigation, Cancer Research, Journal of Virology, Vaccine 等国际学术刊物，并有十多项国际发明专利。是默克研究实验室艾滋病疫苗的主要发明人，该疫苗被视为最有望成功的艾滋病疫苗并进入人体试验阶段。2004 年 4 月回国筹建中国科学院广州生物医药与健康研究院。目前已发展为一支有 200 多名科研人员，100 多名研究生，具有 6 大研究中心，20 个研究室的国家级科技队伍。

肖卫东博士：



原籍湖南衡阳，中国科学技术大学硕士、美国北卡大学博士、1996—1999 年美国宾州大学医学院博士后。自 1999 年起为美国宾州大学医学院助理教授，副教授，教育部分子药物工程研究中心、华侨大学分子药物学研究所兼职教授。为 AAV I 型病毒的发现者。国际知名的病毒载体和基因工程专家。研究成果发表于 PNAS, Journal of Virology, Hepatology, Molecular Therapy, Blood 等国际学术刊物。拥有多项美国发明专利。

献辞

经缀千重秀 博扬四季春

谨以此书敬献予文革“老三届”，这一历史的称谓和身世无疑地赋予其生命之途乖蹇与深沉！作为漂淌过文革大串联和世界大串联 41 年后的幸存者，心存涕零 73 级工农兵大学生施并章、陈敬聪、曾棠棣、蔡水银、王守纯、罗旋、朱明、白志健等始终如一，哪怕是间歇性的或曾经有过的一丝呐喊与扶持而鼓励我前行！

许瑞安

2007-7-15

中国历史文化名村晋江福全

ruianxu@yahoo.com

导 言

随着人类对生命本质的深入理解以及分子生物学技术和细胞工程技术的迅猛发展与巨大突破,分子药理学、分子医学、分子药理学,分子病理学、分子免疫学、分子毒理学等崭新的学科应运而生,把医学科学引入了一个广阔而美好的发展空间。人体分子基因药物治疗实质上是一种以预防和治疗人体疾病为目的,以基因工程和/或细胞工程技术为手段,籍以改变人体细胞中遗传物质为基础的生物医学治疗,通过将人正常基因或有治疗作用的基因采用不同的方式导入人体靶细胞,或者以基因为模板生产有治疗功效的蛋白产品,用以纠正基因的缺陷或者发挥治疗作用,从而达到治疗疾病目的。以基因治疗和干细胞研究为代表的分子基因药理学这一新兴学科,已经成为医学研究领域的热门学科,其诞生使医学研究由传统的针对基因异常导致的各种症状转变为直接针对疾病的根源——异常基因本身,是医学理念的重大突破,为攻克人类重大疾病带来了希望。

基因分子药理学与现代科学最有活力的其他分子生物学学科一样,取得了令人振奋的飞速发展,迅速增长的文献意味着一个崭新的学科的诞生和知识更新的迅猛。基因治疗的设想可以追溯到 20 世纪 60 年代。早在 1966 年,Joshua Lederberg 和 Edward Tatum 即提出了在基因水平上纠正机体疾病或缺陷的设想,并指出了基因治疗的基本原则。此后,在广泛的实践基础上,基因治疗得到了蓬勃的发展。1977 年,Michael Wigler 和 Richard Axel 成功地将 TK 基因导入哺乳动物细胞,使基因治疗向前迈进了一大步。1979 年,French Anderson 则首次利用显微注射基因转导技术纠正了小鼠细胞的遗传缺陷获得成功。20 世纪 80 年代开始基因治疗有了长足进步。1980 年,美国加州大学洛杉矶分校(UCLA)的 Martin Cline 教授将重组 DNA 导入两个患血液遗传病的病人(意大利和以色列),但是由于这一实验事先未经学校同意,也未经 NIH 批准,受到社会舆论的抨击。在这之后不久,权威性的基因治疗伦理分析报告“Gene Therapy in Human Beings: When Is It Ethical to Begin?”发表。1982 年,美国国会发表了首个关于人类遗传工程的官方分析。1983 年,多个研究小组成功的利用逆转录病毒将目的基因导入细胞。第一次体内基因转导的实验发表于 1985 年,Eli Gilboa 和 Anderson 利用逆转录病毒载体 N2 携带示踪基因导入小鼠。1989 年,美国 NIH 正式批准国立癌症研究所(NCI)和 Rosenberg 等进行 5 例示踪基因的人体转移试验。1989 年 5 月 22 日,5 名进行性转移的黑色素瘤患者接受了这项试验。

20 世纪 90 年代是基因治疗的辉煌年代。1990 年 11 月,美国 NIH 的 Blease, Culver 和 Anderson 进行了首例人体基因治疗临床试验。他们利用逆转录病毒将 ADA 基因转移到 T 淋巴细胞中,再回输因腺苷酸脱氨酶突变而引起的复合性免疫缺陷症(ADA 缺陷症)的姐妹,这一方法取得了巨大成功,患者免疫力明显提高。自此以后,基因治疗呈现出迅猛发展的态势。1992 年,Jim Wilson 利用转染有逆转录病毒(携带 LDLr cDNA)的肝实质细胞静脉灌注家族性血胆固醇过多的患者,开创了靶向内部器官基因治疗的先河。同年,Gary Nabel 利用 DNA/脂质体复合物直接注入 HLA-B7 肿瘤,首次将非病毒载体应用于临床基因

治疗。腺病毒载体、AAV 载体介导的第一次临床治疗则分别发表于 1993 和 1995 年。1996 年，美国基因治疗协会成立，并于 1998 年在西雅图召开第一次年会。2000 年，Alain Fischer 利用逆转录病毒载体携带 γ C 基因感染造血干细胞，然后将干细胞回输体内治疗患有 SCID-X1 病症的儿童获得成功，这是第一例利用基因治疗治愈患者的报道。同年，基因治疗在肿瘤、心血管、遗传病上均获得成功。2004 年，第一个基因药物“今又生”在中国上市，它是利用腺病毒携带 p53 基因治疗 p53 缺陷的肿瘤。这也是目前世界上唯一上市的基因药物。

到 2007 年 1 月，世界范围各国批准的基因治疗临床实验项目数已经达到 1283 项。处于 I 期临床有 787 项，I/II 期有 256 项，II 期为 198 项，II/III 期为 13 项，III 期为 19 项。在载体方面，以腺病毒应用最多，有 324 项，占 25%；其次为逆转录病毒，有 299 项，占 23%；其他依次为裸露/质粒、脂质体、牛痘病毒、痘病毒、腺相关病毒、疱疹病毒，分别有 102、90、86、47、43 项；其他类型的基因治疗共 89 项。选用的治疗基因以抗原最多，有 263 项，其次为各类细胞因子，有 245 项，其他依次为抑癌基因（154）、生长因子（104）、自杀基因（102）、缺陷基因（102）、受体（61），另外还包括标记基因、复制抑制因子、siRNA、寡核苷酸等共 251 项。针对的疾病绝大多数为肿瘤（854），依次为心血管疾病（117）、单基因疾病（108）、感染性疾病（83）、神经性疾病（17）、口腔疾病（12），其他总和为 92 项。开展的基因治疗项目数量以美国居首（838），其次为英国（150）、德国（74）、瑞士（42）、法国（20）、比利时（19）、澳大利亚（17）、加拿大（17）、日本（16）、意大利（15）、荷兰（13）、中国（8）。在时间上，以 1999 年开展的项目最多，达到 116 项，近年来则有赶超之势，2005 年和 2006 年批准的基因治疗临床项目分别为 98 和 97 项。

然而，基因治疗仍然是一门年轻的学科，它的发展必然经历了“乐观-怀疑-挑战”的过程。1999 年发生了首例基因治疗的死亡案例。严峻的临床实验结果警示着和激励着研究人员必须面对比人类初期预想更为复杂和纷繁的分子药物和基因治疗的安全性和有效性。近年来随着对分子药物研究不断深化，大量研究集中于改进其安全性和有效性，对于携带基因的载体的品种多样性，细胞特异靶向性，功能的专一性，目的基因表达的稳定性，治疗基因表达的可控性，蛋白产品的释放方式，给药途径的采用，免疫问题的祛除与克服，以及要求目的基因表达及其产物释放的时效性，即以分钟计算而不是以小时计算进而满足体内新陈代谢的生理需要等等皆取得了长足的进展。大规模载体的制备工艺，载体的检测技术，细胞工程，基因改造工程技术日臻成熟。

与此同时，基因治疗和分子药物的概念和内容也在不断地发展和充实，使其理论与技术越来越能切实贴近临床应用。目前，分子药物治疗中不仅可导入正常基因以纠正遗传性疾病的基因缺陷，也可导入特定的 DNA、RNA 片段以封闭或抑制特定基因的表达，如出现了利用反义技术和 RNA 干扰（RNAi）技术治疗肿瘤或病毒感染等疾病。尤其是 RNAi 技术，不仅可以作为一种研究手段，而且将会是一种非常有力的基因治疗策略。而新近发现的微小 RNA（miRNA）不但可能成为癌症、心血管等重大疾病的早期标识物，而且必将成为研究疾病机理并最终战胜疾病的天赐良药。

最近在分子药物学里，与基因治疗的进展交相辉映成趣，干细胞无疑是新近医学研究领域又一令人振奋的亮点。随着胚胎干细胞、成体干细胞、肿瘤干细胞的分离鉴定技术以及

胞内信号通道、自我更新及分化机理的不断发展和更新，基因治疗和干细胞技术的结合为解决体外组织、器官重建、高效获取各种分化细胞以及从肿瘤源头遏制癌症发展等医学难题带来了新希望的曙光，为生物医药研究开启了一扇崭新的大门。基因治疗具有传统疗法所不具有的独特优势，包括持续给药、靶向性给药等，但是如何尽最大可能发挥基因治疗的优势是摆在众多科学研究者面前的一项任务。越来越多的研究发现多基因联合治疗或者多手段联合治疗具有协同增效作用。因此如何选择合适的基因，或者将基因治疗与化疗、放疗等疗法有机地结合不仅能够降低传统疗法的毒性，更重要的是其具有协同增效的作用。因此，在大力发展基因治疗的同时也不该完全摒弃传统疗法，如何使基因治疗与传统疗法最有效地结合以达到更好的治疗效果是今后基因治疗研究领域的另一个发展方向。

本书深入浅出地介绍了现代基因分子药理学的基本知识范畴与主要科学技术成就，在力求反映本门学科最新进展的基础上，兼顾知识性和创新性。本书系统地介绍基因分子药理学、基因分子医学工程技术的研究方法、特点、用途。本书侧重地介绍 21 世纪的最新基因分子药理学、基因分子医学工程技术的研究方法、思路、成就、现状、存在问题及其在临床医学，尤其那些在传统医学上得不到根治疾病上的应用，以及该学科发展方向的前瞻。本书可作为生命科学高年级学生、研究生学习的入门；为从事医学、农学、生命科学领域的科研、教学的工作人员了解与掌握最先进的基因分子药理学技术提供一个新的平台，将有助于研究人员在课题设计和课题评估时的启示与借鉴。并作为他们在实验操作方面的参考。

许瑞安 分子药物教育部工程研究中心

ruianxu@hqu.edu.cn

陈 凌 中国科学院广州生物医学与健康研究院

chen_ling@gibh.ac.cn

肖卫东 美国宾州大学医学院

wxiao@mail.med.upenn.edu

目 录

作者简介:

许瑞安、陈凌、肖卫东

献辞	许瑞安
导言	许瑞安、陈凌、肖卫东
1 基因药物的构建与制备	王晋慧 ¹ 、徐韬 ² 、曲光 ^{1*} 1
2 基因表达的调控系统	叶学海 ¹ 、徐韬 ² 、支炎 ¹ 42
3 分子药物传递途径及纳米颗粒肠道吸收	许瑞安 ^{1, 2*} 、王峰 ^{1, 2} 、马旭 ^{3, 4} 68
4 适体分子药理学	林俊生 ^{1, 2*} 、许瑞安 ^{2, 3} 91
5 基因药物安全性和免疫性	钟理 ¹ 、李艳君 ^{2*} 、Roland W. Herzog ¹ 106
6 血友病诊断与分子治疗	陈陵霞、陆晖 137
7 帕金森病的分子疗法与前瞻	罗嘉 ^{1, 2*} 、许瑞安 ^{2, 3} 175
8 乙型肝炎的分子治疗	李华 ^{1, 2} 、许瑞安 ^{1, 2*} 206
9 丙型肝炎病毒分子病毒学	王弋、刘兆贵、张健存*、彭涛* 246
10 肝硬化分子治疗	李欣燕 ¹ 、吕颖慧 ^{2, 3} 、许瑞安 ^{2, 3*} 272
11 SARS 的分子治疗	钟南山、郑则广 302
12 HIV 的基因疗法	马鑫、陈小平、陈凌* 321
13 糖尿病基因药物的研发	刘青 ^{1, 2} 、蔡士杰 ³ 、许瑞安 ^{1, 2*} 346
14 颌颌面骨缺损现代医学修复	刁勇、许瑞安* 391
15 肺癌发生机理与分子治疗	王启钊 ^{1, 2} 、刀勇 ^{1, 2} 、许瑞安 ^{1, 2*} 433
16 肝癌的新型治疗方法	孙学英 ^{1, 2} 、王启钊 ^{1, 3} 、许瑞安 ^{1, 3*} 526
17 结肠癌的分子药物治疗	吕颖慧 ^{1, 2} 、王启钊 ^{1, 2} 、许瑞安 ^{1, 2*} 566
18 干细胞与肿瘤干细胞	王启钊、吕颖慧、许瑞安* 628

1 基因药物的构建与制备

王晋慧¹ 徐韬² 曲光^{1*}

QU@email.chop.edu

¹美国宾州大学医学院

²分子药物教育部工程研究中心, 福建泉州 邮编 362021

目 录

1.1	概述	2
1.2	逆转录病毒载体	3
1.2.1	逆转录病毒及其生活周期.....	3
1.2.2	逆转录病毒载体的构建.....	5
1.2.3	慢病毒载体的构建.....	9
1.2.4	逆转录病毒载体及慢病毒载体的生产和纯化方法	12
1.2.5	逆转录病毒载体及慢病毒载体的应用及前景	14
1.3	腺病毒载体.....	17
1.3.1	腺病毒的结构和生活周期	17
1.3.2	腺病毒载体的构建	19
1.3.3	腺病毒载体的生产和纯化方法	23
1.3.4	腺病毒载体的应用及前景	24
1.4	腺相关病毒载体.....	26
1.4.1	腺相关病毒的结构和生活周期	26
1.4.2	腺相关病毒载体的构建	28
1.4.3	腺相关病毒载体的生产和纯化方法	31
1.4.4	腺相关病毒载体的应用及前景	32
1.5	其他病毒载体.....	33
1.5.1	单纯疱疹病毒载体	34
1.5.2	痘苗病毒载体	34
1.5.3	辛培斯病毒载体	34
1.5.4	泡沫病毒载体	34
1.6	嵌合病毒载体.....	35

1.6.1 单纯疱疹病毒/腺相关病毒嵌合载体.....	35
1.6.2 腺病毒/腺相关病毒嵌合载体.....	35
1.6.3 单纯疱疹病毒/EBV 嵌合载体	35
1.6.4 腺病毒/逆转录病毒嵌合载体.....	35
1.7 非病毒载体.....	36
1.8 载体的靶向基因导入.....	38
参考文献	40

1.1 概述

20 世纪 70 年代, 美国科学家首次提出可以通过向人体导入外源 DNA 来治疗疾病的设想, 从而产生了基因药物的概念和基因治疗这一人类药物开发的新领域。经历了几十年的研发, 基因药物已经从实验室研究发展进入了临床试验和应用阶段。与此同时, 基因治疗研究的范围也得到了扩大和发展, 从最初导入一个正常的基因到人体的靶器官, 通过基因表达来治疗遗传性疾病的设想发展到现今用 DNA 或者 RNA 来治疗遗传性疾病, 后天获得性疾病, 生产抗体, 生产疫苗等多方面的医疗和药物开发, 研究范围非常广泛。虽然现阶段多数基因治疗的研究仍然处于早期的探索阶段, 但是, 全世界已有上千例基因治疗的研究进入了人体临床实验, 涉及的疾病类型不仅有先天遗传性疾病, 如血友病, 也有许多人类高危高发性疾病, 如癌症、艾滋病、帕金森症等。世界第一例基因药物也已在我国研发成功并应用于多种肿瘤的治疗。可以期盼基因药物会不断得到更广泛的开发并造福于人类。

区别于其他传统药物, 基因药物依赖于用载体将外源基因或核酸片段导入人体细胞内, 使目的基因在靶细胞中表达, 发挥生物学效应, 达到治疗目的。如何针对不同的疾病和靶器官(靶细胞)选择合适的载体; 根据治疗需要设计构建基因表达的功能片段来控制基因产物的适量表达; 选用有效的给药途径都会直接影响到基因药物开发的成败。可见基因药物较一般传统药物更为复杂。它的构建与制备涉及分子生物学、生物化学、病毒学以及生产工艺等多个领域和学科。而且, 针对不同疾病所设计的基因药物, 从载体选择到功能片段的构建都会非常不同。要想全面具体地论述每一种基因药物的构建与制备将是一件非常困难的事情, 因此本章将仅对目前应用较为广泛的载体, 根据现有文献, 对基因药物的构建与制备做一个一般性的概述, 以供参考。

目前基因药物研发中应用的载体分可为两类: 病毒载体和非病毒载体。病毒载体是将自然界存在的病毒用分子生物学的手段加以改造, 去除掉部分或全部病毒基因, 将治疗基因及基因表达所需要的功能片段克隆到病毒基因组中, 再经过在细胞内包装而产生重组病毒。而非病毒载体则是载有治疗基因及其相关功能片段的 DNA, 如质粒, 或包埋有此种 DNA 的脂质体。病毒类载体一般具有对宿主细胞高效转染特点, 因此是目前较为高效的基因传递载体。许多不同类型的病毒, 如逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、单纯疱疹病毒、痘苗病毒等, 已先后被开发成了基因治疗载体, 而每种病毒对不同宿主细胞的感染效率、途径及其在

细胞内的存在及存在状态都非常不同,这些特质决定了在设计基因药物时,病毒类载体具有很高的选择性。目前多数基因研究采用了病毒类载体。但同时值得指出的是,虽然经过了重组改建,多数病毒载体还是具有较高的免疫原性及相关的毒性副作用,而非病毒类载体无论是质粒 DNA 还是 DNA-脂质体复合体,虽然其免疫原性及相关的毒副作用较低,但其体内转染效率则普遍很低。可见这两类载体各自有其优点和局限性,而这些载体系统的固有特性在一定程度上限制了其在特定基因治疗中的应用。

基因治疗成功的关键是能将治疗基因有效地导入靶组织(靶细胞),并使产物的表达达到应有的治疗水平。而不同的疾病,对于导入基因的表达量和持续时间的要求不同,因此,必须根据治疗的需要选择最佳的载体和构建合适的基因表达系统。以利用腺苷脱氨酶(ADA)治疗联合免疫缺陷症(SCID)为例,由于 SCID 是基因缺陷型疾病,而靶细胞又是不断分裂代谢的细胞,要达到长期治疗的效果,转基因就必须整合到细胞基因组中才不会在细胞分裂的过程中丢失。因此,研究者选用了能将 DNA 整合到细胞基因组的逆转录病毒为载体以实现长期的基因表达。而血友病,虽然也是基因缺陷型疾病,但由于肝细胞代谢周期较长,研究者选用了转染效率高而大部分转基因以非整合状态存在的重组腺相关病毒载体,以降低插入突变的风险。而我国研发的“今又生”,则选择了免疫原性很高的腺病毒载体,对癌症采取了通过表达抑癌基因抑制肿瘤生长及促进癌细胞凋亡、病毒载体转染刺激人体免疫系统以增加对癌细胞的识别的综合治疗途径。另一方面,可以在基因功能片段设计上利用启动强度不同的启动子,或利用组织特异性的启动子或增强子来控制基因的表达,如上皮细胞特异的 *flt-1* 启动子、神经胶质瘤细胞特异的 GFAP 启动子等。有关这些基因治疗载体的构建以及靶向策略,我们会在随后详述。

基因药物的制备涉及载体的生物合成(biosynthesis),纯化以及相关的定性和定量分析。为了满足基因治疗的临床研究和将来基因药物市场化的需求,近年来基因药物的制备及生产方法也开始向工业化、大规模的生产与纯化方向发展。对每种不同的基因载体,都发展出了许多不同的生产和制备方法,利用这些新方法制备的基因载体在产量、规模、纯度、生物活性及药用安全等各方面都得到了显著的提高,使得基因药物的开发更接近可能。在后续的小节中,我们也将结合特定的载体,对其常用的生产制备方法加以叙述和讨论,并提供一些较为成熟的方法,以供研究者制备载体时参考。

1.2 逆转录病毒载体

1.2.1 逆转录病毒及其生活周期

逆转录病毒为 RNA 病毒,其遗传信息存录在 RNA 上。病毒感染细胞后, RNA 基因组在病毒颗粒中携带的逆转录酶的作用下逆转录为双链 DNA(因此被称为逆转录病毒),然后将这段逆转录的 DNA 插入细胞基因组中,病毒基因组再由细胞的转录机构(machinery)经由转录(transcription)、翻译(translation)产生病毒的 RNA 和蛋白质。逆转录病毒科下有 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 、慢病毒(Lentivirus)及泡沫病毒(Spumavirus)共七属。成熟的逆转录病毒为球形,大小约为 100nm(70~110nm,有时至 200nm),外面为一层具有表面突起

的脂蛋白外壳，外壳内有一个二十面体的核蛋白衣（capsid），核蛋白衣内有一螺旋结构的核糖核蛋白（图 1-1）。病毒颗粒在蔗糖密度梯度中的密度为 1.16~1.18 g/ml。逆转录病毒颗粒对热、去污剂和甲醛很敏感。

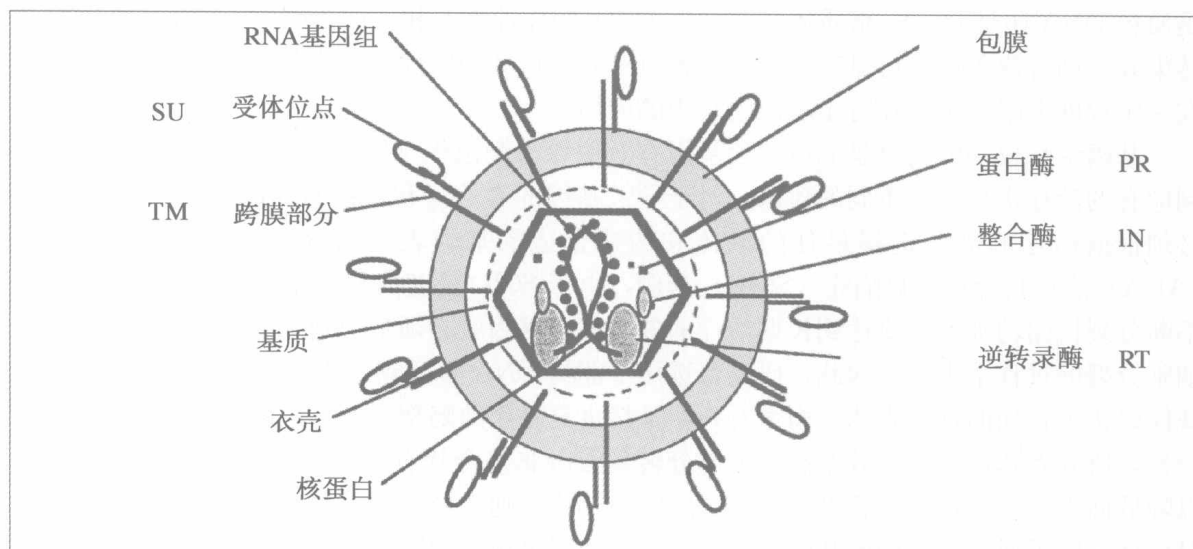


图 1-1 逆转录病毒的结构示意图

逆转录病毒基因组是由线性的正向单链 RNA 组成的同源二聚体，每条单体 RNA 长度为 7~13kb，因此一个病毒颗粒为功能双倍体。二聚体是由两条 RNA 5' 末端的二聚体链接结构（dimer linkage structure）相互作用形成的。RNA 基因组是由宿主的转录机制产生的，具有很多正常 mRNA 的结构和功能。在 5' 末端有通常 m⁷G5' ppp5' Gmp 帽子结构，在 3' 末端有约 200bp 的 poly (A) 序列。除编码病毒蛋白外，这种 RNA 基因组还有许多顺式序列（如图 1-2），在病毒的生活周期中也发挥着重要作用。这些序列包括在 RNA 基因组的末端 R (repeated) 序列，R 序列在基因组中有两个，一个处于 5' 帽子下游，另一个处于 poly (A) 尾巴上游。在 5' R 序列的下游有另外一个 U5 序列，是 5' 特有的，U5 含有整合必须的 att 位点。U5 序列下游是 pbs (primer binding site) 位点，是宿主 tRNA 结合以及负链 DNA 合成的起始位点。pbs 下游是病毒颗粒包装的信号 Psi 位点。Psi 下游是病毒蛋白的编码序列，至少包含三种基因，分别是 gag、pol 和 env，其中 gag 基因编码病毒的核心蛋白，pol 基因编码病毒复制所需的酶类，env 基因编码病毒的包膜糖蛋白。基因下游是一个短的 ppt (polypurine tract)，包含至少 9 个 A 和 G，是正链 DNA 合成的起始位点。ppt 下游是 3' 末端特有的 U3 序列，此序列包含许多病毒基因表达的顺式作用元件和另外一个 DNA 整合必须的 att 位点。R, U5, U3, pbs 和 ppt 序列在逆转录中发挥着重要作用。这些序列的长度在不同的逆转录病毒中有所不同（表 1-1）。

逆转录病毒的生活周期可以用图 1-3 来概括。病毒的外壳蛋白和细胞表面的特定受体结合后，病毒的脂蛋白外壳与细胞膜融合，使病毒进入细胞。在细胞浆中脱壳，其 RNA 基因组在逆转录酶的作用下合成线性双链 DNA，DNA 经转运进入细胞核并整合到基因组中，形成前病毒（provirus）。随后，在宿主细胞的转录机制下，转录成病毒 RNA，经剪切后病

毒 RNA 被转运到细胞质中，翻译产生病毒包装的蛋白质。这些病毒蛋白转运到细胞膜上，包装病毒 RNA 基因组，从细胞膜脱离成病毒颗粒，并释放到细胞外。这些病毒颗粒经过蛋白酶作用，将包装在颗粒中的病毒蛋白剪接，形成成熟的病毒颗粒（图 1-3）。在病毒的整体生活周期中，由 RNA 逆转录成 DNA，再由 DNA 转录成 RNA。如图 1-4 所示，在由 RNA 逆转录为 DNA 的过程中，U5 和 U3 序列在 5' 和 3' 末端被复制，和 R 序列一起形成了长末端重复（LTR，long terminal repeat）。在 DNA 整合过程中，这个 LTR 被一起整合到基因组中。当 DNA 转录为 RNA 时，转录从 5' 端 R 序列开始到 3' 端 R 序列结束，形成完整的病毒 RNA 基因组，并被包装进病毒颗粒。

表 1-1 不同逆转录病毒中 U3，R，U5 的长度

病毒（样本）	U3	R	U5
Alpharetrovirus (ALV)	150~250	18~21	80
Betaretrovirus (MMTV)	1200	15	120
Gammaretrovirus (MLV)	150	60	75
Deltaretrovirus (HTLV)	250~350	120~240	100~200
Lentivirus (HIV-1)	450	100	60~80
Spumavirus (HFV)	800	200	150

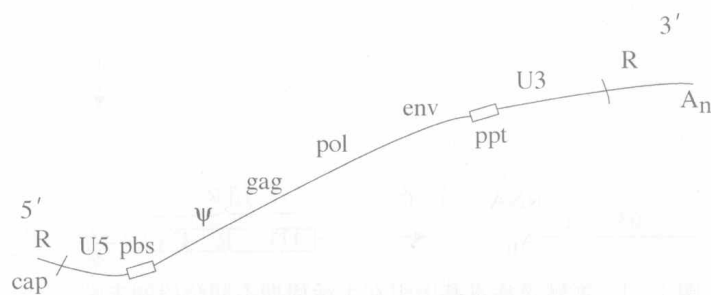


图 1-2 逆转录病毒的 RNA 基因组结构

由 5' 到 3' 序列包括 5' 帽子（cap）；
R，5' 和 3' 末端的重复序列；U5，5' 末端特有序列；pbs，primer binding site 和负链 DNA 合成起点； ψ ，病毒包装信号；gag，pol，env 基因；ppt，polypurine tract 和正链 DNA 合成起点；U3，3' 末端特有序列；第二个 R 序列拷贝；3' poly（A）序列。

1.2.2 逆转录病毒载体的构建

逆转录病毒选择性地感染分裂细胞，并将病毒基因组整合到宿主细胞 DNA 上，长期存在。Anderson 和他的研究小组于 1990 基因治疗的临床实验就是采用了逆转录病毒载体（Blaese et al.，1995）。首先他们将患者骨髓中的 T 细胞分离出来，用逆转录病毒载体将治疗基因腺苷脱氨酶（ADA）转导入分离出来的 T 细胞中，然后再将此 T 细胞回输到两例由

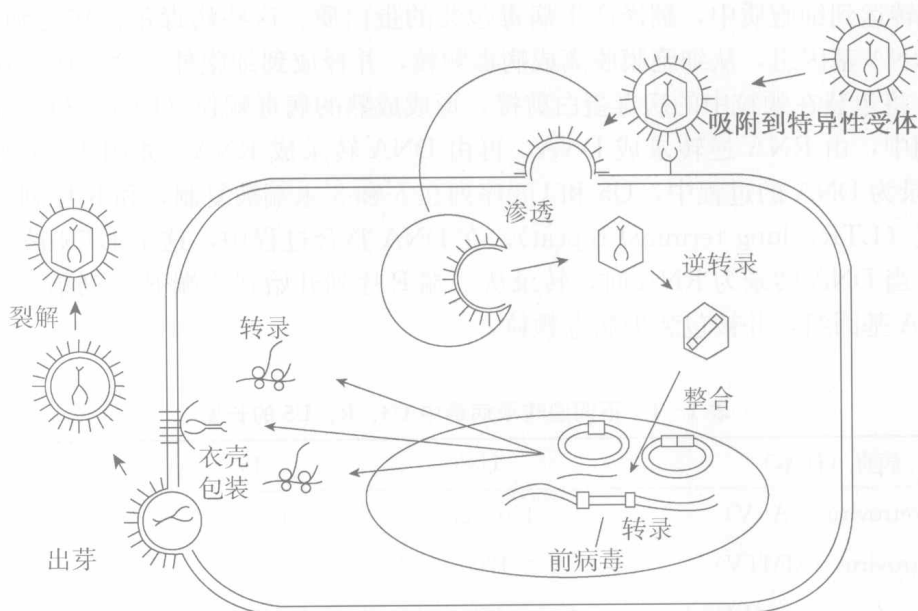


图 1-3 逆转录病毒生活周期示意图

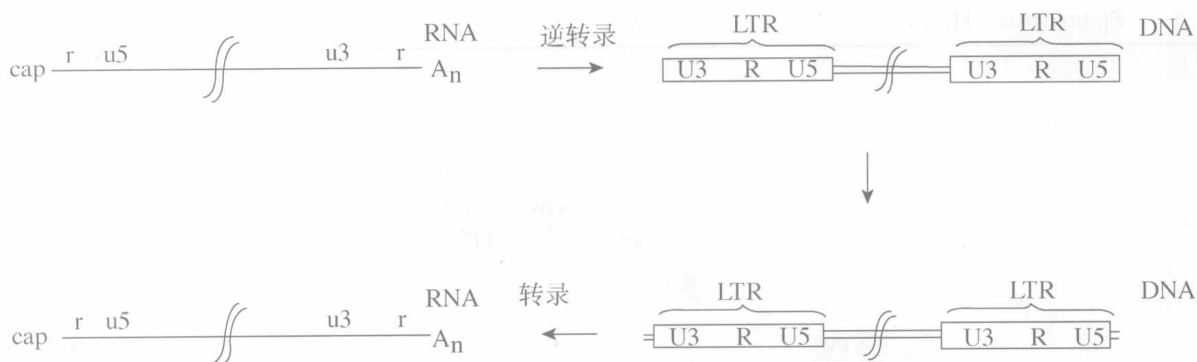


图 1-4 逆转录病毒基因组在生活周期不同阶段的末端结构

于该酶缺失导致的联合免疫缺陷症 (SCID) 患者骨髓中。这两例接受治疗的患者存活至今, 而且细胞中仍可以检测到转基因的存在。目前利用的逆转录病毒多由小鼠白血病病毒 (MuLV) 改造而来, 它属于 γ 逆转录病毒属。

根据逆转录病毒的基因组结构及生活周期, 在构建基因治疗载体时, 通常以其双链 DNA 中间体作为载体设计的构架。出于安全性考虑, 所有编码病毒蛋白的病毒基因应全部从载体中除去, 而代以欲转移的外源基因及基因表达的相关功能片段, 在载体基因组中只保留病毒包装所需的顺式 (cis) 功能片段, 这样, 重组后的基因载体经转染进入靶细胞后, 将不会复制产生新的病毒, 也不表达任何病毒蛋白, 而只表达治疗基因。

图 1-5 简述了逆转录病毒载体构建的基本要件及逆转录病毒载体的生活周期。载体质粒 (图 1-5B) 应包括 DNA 5' 末端的长末端重复序列 (LTR), 运输 RNA 结合位点 (primer transfer RNA binding site, PBS), 包装信号 (packaging signal, ψ), 部分 5' 端的 gag 基因

序列治疗基因及其功能片，PPT 以及 3'末端的长末端重复序列（LTR）。病毒载体的这些功能片段， ψ 序列装载着病毒颗粒包装 RNA 的识别信号，而研究证明，5'端的 gag 序列能大大增加病毒载体的滴度（50~200 倍），而载体基因中的 5'端及 3'端的长末端重复序列（LTR），运输 RNA 结合位点，包装信号 ψ 以及 PPT 提供了逆转录，载体插入宿主 DNA 所需的顺式功能。将载体质粒转染到包装细胞中，在细胞转录系统的作用下，载体质粒 DNA 被转录成载体 RNA（图 51-C）。在这个转录过程中，由于 5'端的 U3 区含有转录所需的启动子和增强子，而 poly A 则是紧接着 3'端的 R 序列，因此，转录出的载体 RNA 不含有 5'端的 U3 及 3'端的 U5。细胞中表达的病毒包装蛋白包装载体 RNA，形成前病毒载体颗粒，并释放到细胞外，再经过蛋白酶的剪切加工，形成成熟的病毒载体颗粒。当病毒载体颗粒被重新用来感染靶细胞，具有治疗功能的基因就被转导到细胞中。释放到细胞中的载体 RNA 由逆转录酶的作用，产生载体 DNA，而 5'端的 U3 和 3'端的 U5 被再度产生出来（见逆转录病毒生活周期）。载体 DNA 将整合到宿主染色体中，形成前病毒（图 1-5D），而前病毒既可以通过细胞常规的转录途径，生产 RNA，表达治疗基因。值得指出的是，在构建逆转录病毒载体时，治疗基因片段不应含有 poly A 信号，否则，在转录成载体 RNA 时，会丢掉 3'端的 PPT、U3、R 以及 poly A 的整个区域。

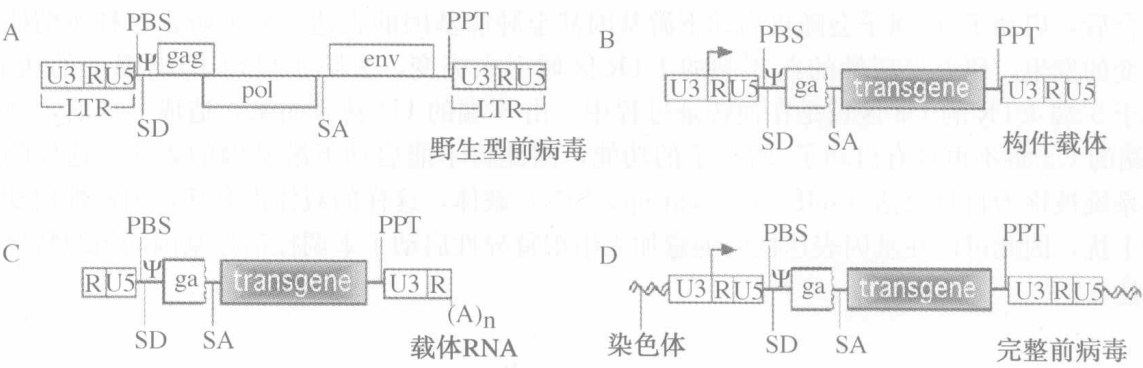


图 1-5 逆转录病毒载体的构建及其生活周期

A. 逆转录病毒的前病毒。B. 逆转录病毒载体。目的基因代替去除的病毒基因。其中，为了增强包装效率，gag 基因的一小部分被保留。C. 逆转录病毒载体整合到宿主基因组中，并由 5'长末端重复 U3 区的启动子/增强子区域起始转录。D. 转录的病毒 RNA 基因组在包装细胞中包装到病毒颗粒内。

病毒包装蛋白则由另外一个质粒，即辅助质粒反式（trans）提供。这可以通过两种途径来实现：一种是在转染包装细胞时，同时转入一个辅助质粒来表达这些蛋白，另一种途径是建立一个包装细胞系，稳定表达这些病毒基因质粒，以提供这些蛋白。

现今的逆转录病毒载体在宿主范围，药用安全性以及载体滴度上比起早期的载体都有很大的提高，这要归功于研究者对生产病毒所需的载体质粒，辅助质粒，病毒组装细胞（系）的不断研究与完善。

在宿主范围方面，早期的辅助质粒由于采用了 MuLV 的包膜蛋白 env 作为病毒的外壳蛋白，所产生的载体只能介导感染含有其特定包膜蛋白受体的细胞，如小鼠细胞，宿主范围

很窄。为了扩展其宿主范围，后来将辅助质粒上的 MuLV 包膜蛋白基因替换为 amphotropic viruses 的包膜蛋白基因，这样包装出来的逆转录病毒含有 MuLV 的 gag 和 pol, amphotropic viruses (e. g., 4070A) 的 env, 载体可以感染小鼠和人的细胞。

早期制备的逆转录病毒载体中经常含有具有复制能力的重组病毒，是药用安全上的一大隐忧。这种病毒是在载体的生产过程中由载体质粒和辅助质粒经过重组产生的。在早期的病毒包装系统中，辅助质粒和载体质粒仍然有很多同源区。早期的辅助质粒（图 1-6B）基本上只去除了野生病毒的基因组（图 1-6A）中的病毒包装信号（ ψ ），当共转染到包装细胞中时，很容易发生重组产生野生型病毒。因此，后来对辅助质粒进行了一系列改进。首先将 3' 端的 LTR 和 ppt 位点删除，代之以 SV40 的 poly (A)，这样即使有辅助质粒 RNA 被包装进病毒颗粒，因其 RNA 基因组缺乏正链 DNA 的合成起始位点 ppt，也将无法被逆转录成双链 DNA；此外，5' 端 LTR 的末端整合必需的顺式元件 att 也被去除，这样就可以避免含有辅助质粒的重组病毒整合到宿主基因组中。为彻底消除辅助质粒和载体质粒之间的同源性，后期的病毒包装系统更采用了两个辅助质粒，一个含有 gag 和 pol 基因，另外一个含有 env 基因（图 1-6C）。这样不仅极大地减少了病毒重组发生的几率，还可以更方便地改造 env，从而进一步扩展重组病毒的宿主范围。逆转录病毒载体使用中的另一个安全问题是来源于载体基因组整合到细胞基因组的过程，由于载体 5' 端 LTR 的 U3 区域含有启动子/增强子，当整合后，启动子/增强子会随机启动下游基因甚至肿瘤基因的表达。为了防止这种所谓插入突变的发生，研究者巧妙的在 3' 端的 LTR 区域引入突变，去除了启动子/增强子的功能。由于 5' 端 LTR 的 U3 区域是在逆转录过程中，由 3' 端的 U3 转录而来，造成突变后，载体 5' 端的 U3 将不再具有启动子/增强子的功能，因此将不能启动下游基因的表达。这样的载体系统被称为自身灭活（self-inactivating, SIN）载体，这样的载体没有病毒内源性启动子的干扰，因此可以在基因表达框内随意加入组织特异性启动子来调控治疗基因的组织特异性表达。

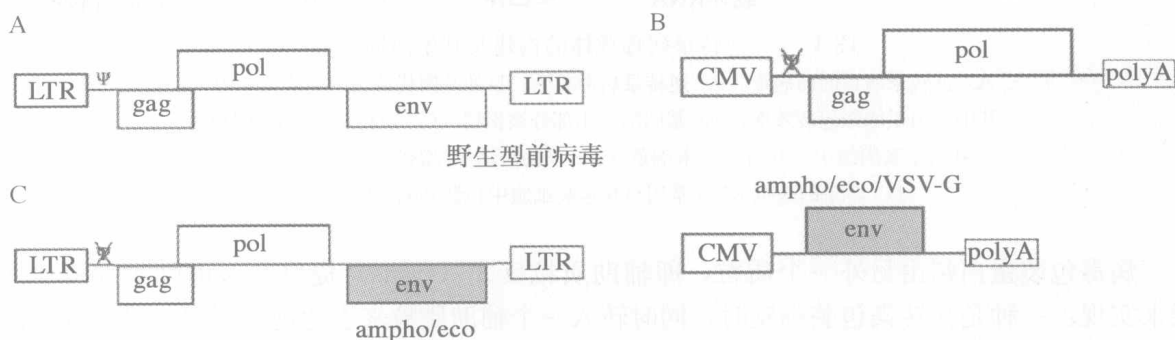


图 1-6 逆转录病毒的辅助质粒

- A. 野生型逆转录病毒示意图。B. 第一代包装策略所用的包装质粒，去除了包装信号，并把原来的 env 替换为 amphotropic env (amph) 从而增宽了宿主范围。
C. 双包装载体策略。可以将 gag/pol 和 env 放到不同的包装质粒上共转染。

对于逆转录病毒载体滴度的提高主要得益于下述两个方面：一是在辅助质粒 5' 端用巨细胞病毒 (CMV) 的早期启动子/增强子代替了 LTR 的 U3 区（图 1-6C），这样形成了