

基于 EBNA1 和 oriP 的载体在基因治疗中的应用研究进展 Progress of EBNA1/oriP-based Plasmid Applied in Gene Therapy

何 婕, 张智清*

HE Jie and ZHANG Zhi-Qing*

中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 北京 100052

Institute of Viral Disease Control and Prevention, China CDC, Beijing 100052, China

摘 要 非病毒载体用于基因治疗的主要问题是导入靶细胞的效率较低, 目的基因表达水平低, 疗效持续时间也较短。EBNA1 和 oriP 元件使引入该元件的质粒在真核细胞内保持为游离体、转运入核、转录增强。质粒携带的目的基因能够获得较高的转染效率, 高水平、持续的表达。基于 EBNA1/oriP 的质粒在肿瘤、单基因缺陷先天性疾病、TNF 相关的炎症疾病的基因治疗中显示了良好的应用前景。EBNA1/oriP 元件用于构建人工染色体, 携带目的基因的调控序列, 可望实现可调控的基因治疗。

关键词 基因治疗, EBNA1/oriP, 非病毒载体

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)03-0507-04

Abstract The nonviral gene delivery systems are usually not very effective in transferring gene into target cells, and the intensity and duration of the gene expression is very poor. The EBNA1/oriP maintain EBNA1/oriP-based plasmids as episome, contribute to nuclear transport of the plasmid and transcriptional up-regulation of target gene. The EBNA1/oriP based plasmid enhances the transfection rate as well as magnitude and longevity of gene expression. This article reviews recent preclinical gene therapy studies with the EBV plasmid vectors conducted against various diseases. For gene therapy against malignancies, the EBNA1/oriP based plasmid encoding the HSV1-TK suicide gene was combined with a cationic polymer to transfer into HCC cell line. The expression level of TK gene was 100- to 1000-fold higher than the conventional plasmid. The sensitivity of HCC to ganciclovir (GCV) elevated several hundred-fold. The EBNA1/oriP based plasmid equipped with tumor specific promoter, such as CEA promoter, enabled targeted killing of CEA-positive tumor cell. Transfection of EBNA1/oriP based plasmid carrying IL-12 and IL-18 gene either locally, or systemically, induced therapeutic antitumor immune responses including augmentation of the cytotoxic T lymphocyte and natural killer activities and growth retardation of tumors. For gene therapy of congenital diseases and chronic diseases, the EBNA1/oriP based plasmid encoding the adenosine deaminase gene was transferred into human hematopoietic progenitor cells. The ADA activity was elevated 1.5-to 2-fold. Intracardiomuscular transfer of the EBNA1/oriP based plasmid encoding the β -AR gene may be useful for the treatment of severe heart failure. Human tumor necrosis factor α (hTNF α) is one of the most important inflammatory cytokines. It has been implicated in many autoimmune and inflammatory diseases. sTNFR can efficiently neutralize the bioactivities of hTNF α . In primary study we cloned the chimeric protein sTNFR II-IgG Fc and expect to use it in the gene therapy of the inflammatory disease relative to TNF. In summary, The EBNA1/oriP based plasmid shows advantage in gene therapy of cancer, congenital and inflammatory diseases. Moreover, the EBNA1/oriP element may greatly contribute to the engineering of a human artificial chromosome, the ultimate device for controllable gene therapy.

Key words gene therapy, EBNA1/oriP, nonviral vector

Received: December 17, 2004; Accepted: January 24, 2005.

* Corresponding author. Tel: 86-10-63581380; E-mail: zhangzq@public3.bta.net.cn

基因治疗是将目的基因通过载体导入体内,使目的基因在体内表达而治疗疾病,包括纠正机体自身基因结构或功能上的错乱,阻止病变的进展,杀灭病变细胞,或抑制病原体遗传物质的复制等。

基因导入系统是基因治疗的核心部分,可分为病毒载体系统和非病毒载体系统,目前以病毒载体系统应用最为广泛,如逆转录病毒载体,腺病毒载体、腺病毒伴随病毒载体、单纯疱疹病毒载体等,均是通过删除野生型病毒基因组上的非必需序列或部分必需序列,使外源基因能够插入到病毒基因组中,并包装为可以感染宿主细胞的重组病毒,感染宿主后就将外源基因导入宿主,并在宿主中表达。病毒载体的基因导入效率高,但是一个病毒系统通常由两个或两个以上成分组成,比较复杂,有时重组病毒和辅助病毒的分离较困难,含有辅助病毒的重组样品应用于临床可能导致病毒感染。病毒载体免疫原性高,易引起不必要的免疫反应。非病毒载体包括各种真核细胞表达质粒载体及其与各种脂质体形成的复合物,免疫原性较小,操作也简单,但是通常将基因导入靶细胞的效率较低,同时外源 DNA 进入胞内后,如果不能定位在核内将很快被核酸酶降解。普通的真核表达载体很难获得有效的表达,疗效持续时间也较短。优化的方法包括用电脉冲、基因枪等方法提高基因的导入效率,用偶联靶向基因或富含赖氨酸和精氨酸的核定位信号序列使质粒富集于胞核中。

某些病毒感染宿主时,能逃逸免疫建立长期的潜伏感染,以潜伏感染和病毒复制有关元件构建的质粒在基因导入效率和基因表达持效期方面均有提高,如基于 EBV 的 EBNA1/oriP 元件的真核表达质粒载体。

1 EBNA1/oriP 质粒的结构和特点

EBNA1 和 oriP 是 EB 病毒中与复制和保持病毒基因组游离性有关的重要基因元件。EBNA1 为 EB 病毒核抗原 1 的基因,编码一个磷酸化的核蛋白,蛋白的 C 端为一个二聚化的 DNA 结合区,EBNA1 同源二聚化与 DNA 上的特异序列结合。OriP 含有双对称(dyad symmetry DS)和成簇的重复序列(the family of repeats FR)。这些序列均包含与 EBNA1 结合的多个同源序列,DS 区含有约共 120bp 的四个 EBNA1 结合位点,FR 区包含有大约 20 个串联重复的 30bp 序列。当 EBNA1 与这些序列结合后,使病毒的基因组以稳定的游离体形式存在,并使病毒基因组依赖宿主复制的方式复制。其复制与宿主细胞染色体复制的前 S 期同步,一个细胞周期只复制一次。游离体在分裂过程中,通过 EBNA1 以非共价的方式与宿主染色体结合,保证了分裂时游离体进行正确的分离^[1]。除与复制有关外,EBNA1 还有利于游离基因组的核转移,核定位信号位于 EBNA1 蛋白的中部,其作用与转运蛋白 karyopherin2 相关^[2]。EBNA1 也能与 RNA 结合,对基因表达进行转录后调节^[3]。此外,EBNA1 介导 EB 病毒对宿主的免疫逃逸^[4]。OriP 序列的 FR 区是依赖于 EBNA1 的转录增强子^[5]。

鉴于 EBNA1/oriP 的特点,Yate 在 1985 年首次将这两个基因元件引入质粒。具有 EBNA1/oriP 的质粒转染入靶细胞后不整合,可以长期稳定存在,不会造成宿主的突变^[6]。同时,由于它的转运入核、转录增强、免疫逃逸等功能,使质粒携带的目的基因能够获得较高的转染效率,高水平、持续的表达。因此,基于 EBNA1/oriP 的质粒是非病毒型基因治疗载体中比较理想的一个,在多个基因治疗方案中,显示了良好的应用前景。

2 EBNA1/oriP 质粒在多种疾病的基因治疗中的应用

2.1 EBNA1/oriP 质粒在肿瘤基因治疗中的应用

有很多方案适用于肿瘤的基因治疗,导入自杀基因是其中方案之一。比如用基于 EBNA1/oriP 的表达质粒携带 HSV1-TK 基因,与脂质体或其他阳离子聚合物结合,转染人肝癌(HCC)细胞。在细胞内 TK 基因的表达水平比应用普通表达质粒的对照高 100~1000 倍。对 SCID 鼠的 Ewing's 肿瘤模型的治疗表明,导入 TK 基因后,肿瘤对抗瘤药物 GCV 的敏感性提高^[7],保证肿瘤靶向性对于自杀性基因治疗十分重要。如果正常细胞被杀伤将会给病人造成潜在的副作用。通常在逆转录病毒载体和腺病毒载体中装配肿瘤特异性基因元件而实现靶向性,包括肿瘤特异的启动子,如 AFP(甲胎蛋白)启动子和 CEA(癌胚抗原)启动子。这样,基因仅在肿瘤细胞中表达。这种组织特异性是在转录阶段,而非基因转导阶段发生。由于非病毒载体的转染效率极低,通常都采用较强的启动子来弥补低转染率的不足。肿瘤特异性启动子和增强子都不强,因而在非病毒载体中的应用受到限制。对 EBNA1/oriP 质粒的研究表明,在 EBNA1 表达盒的上游插入 CEA 启动子,在目的基因处插入一个普通的 SR 启动子,能使目的基因在 CEA 阳性细胞内获得强表达,而不在 CEA 阴性细胞内表达。同时,如果 EBNA1 上游插入 SR 启动子,而目的基因处插入 CEA 启动子则不出现组织特异性,如果同时都换作 CEA 启动子,则不能获得足够的目的基因表达^[8]。因此,EBNA1/oriP 质粒是可靶向性治疗的非病毒载体。同时,对众多伴有 EB 病毒感染的肿瘤,由于该肿瘤细胞组成性表达 EBNA1,因此,也适用于 EBNA1/oriP 质粒进行靶向治疗。

自杀基因治疗对于原发瘤是有效的,但是对于根除转移瘤却不是很有效。因为自杀基因不能转送到每一个远端的有癌变的器官。免疫基因治疗能够诱导系统性免疫反应来根除肿瘤,常用的免疫治疗基因有 IL-12、IL-18、IL-4、IL-7、IL-10、IFN β 、IFN γ 等。用电转染的方法将携带 IL-12 的 EBNA1/oriP 质粒和普通表达质粒分别导入患黑素瘤的鼠体内,EBNA1/oriP 质粒组的 IL-12 表达水平比普通质粒组高 20 倍,并显著抑制肿瘤的生长。共转染 IL-18 时,治疗的效果还可以提高。在细胞因子治疗后,NK 和 CTL 的活性上升,还能够引起特异和非特异抗肿瘤免疫反应。重复治疗能使动物的生存期延长^[9]。全身性的细胞因子体内转染也可以用于肿

瘤治疗,高压下向小鼠尾静脉注射 20 μ g 的携带 IL-10 的质粒 DNA 溶液,目的基因在肝获得高表达,其次在心、肺、肾、脾均有表达。应用这种方法,EBNA1/oriP 质粒的表达强度和持久性强于普通质粒。注射后 35d,两种质粒的表达水平有 100 倍的差异^[10]。

应用 EBNA1/oriP 质粒携带其它治疗基因进行肿瘤的基因治疗也有很多报道。Wang 等应用 EBNA1/oriP 质粒进行了肿瘤的抗血管生成基因治疗。在裸鼠植人人黑素瘤细胞系,使其形成移植瘤。瘤内注射脂质体包被的带有成纤维细胞生长因子(FGF)受体基因或反义 FGF cDNA 的 EBNA1/oriP 质粒。结果治疗组抑制了瘤内的血管生成,消除了植入的肿瘤^[11]。

Fas-L 基因表达导致 Fas 三聚化,通过 TNFR 通路,激活一系列的信号分子,使 Fas 阳性的细胞进入程序性死亡。在前列腺癌和宫颈癌细胞中转入携带 Fas-L 基因的 EBNA1/oriP 质粒,可使肿瘤细胞快速进入程序性死亡。对移植瘤动物模型进行的实验表明:Fas 阳性细胞被清除的同时,其近旁的 Fas 阴性细胞没有受到影响^[12],治疗的特异性在肿瘤治疗中具有一定的优势。

2.2 EBNA1/oriP 质粒在治疗单基因缺陷先天性疾病中的应用

一些单基因缺陷的先天性疾病有较好的基因治疗靶点,但是普通的非病毒载体的转染效率低,表达产物不足以纠正和改善疾病的症状。这类疾病通常使用能够有效导入目的基因的反转录病毒和腺相关病毒来治疗。EBNA1/oriP 质粒提高的转染效率和表达水平使之可以应用到这个领域,扩展了非病毒载体的应用范围。目前已在腺苷脱氨酶缺乏症(ADA)的治疗中进行了研究。在体外将编码 ADA 基因的 EBNA1/oriP 质粒电转入人的造血干细胞,ADA 酶分析表明酶活性升高 1.5~2 倍^[13]。

肌营养不良(DMD)是一种伴随有肌纤维的进行性破坏和降解的先天性神经肌肉疾病,在营养障碍基因的点突变造成肌营养不良的鼠模型的骨骼肌中,直接注射带有野生型营养障碍基因 cDNA 的 EBNA1/oriP 质粒,十周后,骨骼肌免疫组织化学分析表现为营养障碍基因阳性^[14]。

慢性心衰是由于心肌细胞中的 β -肾上腺素受体(β -AR)表达下调,导致了心肌对儿茶酚胺反应性降低,减弱了心肌的收缩力。将编码 β -AR 基因的 EBNA1/oriP 质粒注射入发生心衰的仓鼠左心室心肌细胞中,治疗后以超声波心动描记仪测试,心脏的收缩体积升高 1.5 倍^[15]。这些探索表明 EBNA1/oriP 质粒有望用于治疗单基因缺陷的先天性疾病。

3 EBNA1/oriP 质粒应用于 TNF 相关炎症疾病的研究

人肿瘤坏死因子(hTNF α)是一种多功能性细胞因子,具有广泛的生物学活性,在炎症反应、免疫调节、抗肿瘤、微生物与寄生虫感染方面起重要作用,在人细胞因子免疫调节网络中起中枢调节作用^[16]。hTNF α 的生物学活性是通过细胞

表面相应的受体来实现的,hTNF α 和 hTNF β 有两个相同的受体:P55 和 P75 受体,广泛分布于体内大多数细胞的表面。hTNF α 与膜表面受体(mTNFR)结合以后,经过复杂的信号传递,诱导一系列细胞内变化,引起相应的生理与病理反应^[17]。TNF/TNFR 系统与人类的许多重大疾病密切相关,目前已知与 hTNF α 有关的疾病包括:自身免疫疾病,恶液质,脓毒性休克综合征,类风湿性关节炎,脑性疟疾,弥漫性血管内凝血,糖尿病,移植排斥反应等。因此,抑制 hTNF α 的生物学活性在临床上具有重要的意义^[18]。实验表明,只有两个或两个以上的受体联合形成聚合体才能有效介导 hTNF α 的生物学活性,单个受体对 hTNF α 的信号传递和中和 hTNF α 的活性很弱。

TNF 受体的胞外区可以游离形成可溶性肿瘤坏死因子受体(sTNFR),sTNFR 能与 hTNF α 结合,又不介导信号传递,因此可以用来与膜上受体竞争性结合 hTNF α ,抑制 hTNF α 的生物学活性,据此我们在前期的研究中将 sTNFR II 与 IgG Fc 分子通过一个柔性连接肽偶联,构建一个 IgG 样的嵌合分子 sTNFR II-IgG Fc,人为地将 sTNFR II 二聚化,并在真、原核系统中进行了表达与纯化。在 L929 细胞上测定结果表明表达的培养上清和纯化的嵌合蛋白对 TNF 均具有中和活性,能够抑制 TNF 对 L929 细胞的细胞毒活性^[19]。由于可溶性肿瘤坏死因子受体对 TNF 相关炎症疾病的治疗往往是长期的。因此如果能利用 EBNA1/oriP 质粒的特性将 sTNFR II-IgG Fc 导入体内,并获得较稳定和持久的表达,就可以拮抗 TNF 的作用,治疗 TNF 相关炎症疾病。根据这个设想,我们将嵌合分子 sTNFR II-IgG Fc 的编码序列克隆到 EBNA1/oriP 质粒载体上,体外试验结果表明,在转染细胞的培养上清中能够检测到 sTNFR II-IgG Fc 的表达。目前正对炎症疾病的动物模型进行体内的治疗研究。

4 EBNA1/oriP 元件在基因治疗中的应用前景——实现可调控性治疗

目前基因治疗中的关键问题是基因导入后在体内的可调控性或可诱导性。理想的可调控性是模拟人体内基因本身的调控形式,并使其具有组织特异性。显然只克隆一个基因的 cDNA 是不能达到精确的调控的。需要克隆一个基因在基因组中的完整序列,包括内含子和上下游调控序列,才能实现可控表达。一个基因的完整序列很大,通常达几十到上百个 kb,一般的质粒和病毒的包装能力很难达到。普通质粒导入细胞后要整合到宿主基因,如果不能定点整合,导入的基因就不能正确地表达。对 EBNA1/oriP 的进一步研究发现,高达 660kb 的环状 EBNA1/oriP 分子,保持为稳定的游离体^[20]。另外,原用于基因组测序的 BAC、YAC 具有足够大的包装容量。一些研究者开始将两者相结合,通过同源重组将普通 BAC、YAC 修改成稳定、游离的环状,并且已经成功地导入到鼠细胞中进行了表达^[21]。有的研究者通过多次同源重组使得 BAC、YAC 不仅带有 EBNA1/oriP 片段,还带上了筛选标记和报告基因。如 G418 抗性基因,绿色荧光蛋白、荧光

素酶等报告基因^[22,23]。我们可以期望,这些改良后稳定而易用的载体将会应用到各种基因治疗方案中,实现可调控的基因治疗。

EBNA1/oriP 已经用于肿瘤、先天疾病、炎性疾病等几乎所有现在可以进行基因治疗的疾病。同时还可适用于脂质体及其它多聚体、高压注射、电脉冲等非病毒载体常用的基因导入方案,是一个理想的非病毒基因治疗载体。EB 病毒的这两个基因元件在基因治疗中的广泛和成功的应用也提示我们在众多的病毒中还会有相似功能的基因元件。在早期的研究中,已发现 BK 病毒的 ori 和它的大 T 抗原、BPV 的 E 区都具有相似的功能^[24,25],基于 BPV 的载体还曾被用于在哺乳动物细胞中表达人生长激素和鼠的前胰岛素原。随着病毒学研究的深入,还会有更多更好用的病毒基因元件被发现和应用到基因治疗载体中。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Ambinder RF, Mullen MA, Chang YN *et al*. Functional domains of Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA1. *J Virol*, 1991, **65**: 1466 - 1478
- [2] Fischer N, Kremmer E, Lartscham G *et al*. Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 forms a complex with the nuclear transporter karyopherin alpha2. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 3999 - 4005
- [3] Snudden DK, Hearing J, Smith PR *et al*. EBNA-1, The major nuclear antigen of Epstein-Barr virus, resembles 'RGG' RNA binding protein. *EMBO J*, 1994, **13**: 4840 - 4847
- [4] Yin Y, Manoury B, Fahraeus R. Self-inhibition of synthesis and antigen presentation by Epstein-Barr virus-encoded EBNA1. *Science*, 2003, **5**(5638): 1371 - 1374
- [5] Gahn TA, Sugden B. An EBNA-1 dependent enhancer acts from a distance of 10 kilobase pairs to increase expression of the Epstein-Barr virus LMP gene. *J Virol*, 1995, **69**: 2633 - 2636
- [6] Yates JL, Warren N, Sugden B *et al*. Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature*, 1985, **6**(6005): 812 - 815
- [7] Harada Y, Iwai M, Tanaka S *et al*. Highly efficient suicide gene expression in hepatocellular carcinoma cells by Epstein-Barr virus-based plasmid vectors combined with polyamidoamine dendreimer. *Cancer Gene Ther*, 2000, **7**: 27 - 36
- [8] Tannka S, Iwai M, Harada Y *et al*. Targeted killing of carcinoembryonic antigen (CEA)-producing cholangiocarcinoma cells by polyamidoamine dendreimer-mediated transfer of an Epstein-Barr virus (EBV)-based plasmid vector carrying the CEA promoter. *Cancer Gene Ther*, 2000, **7**: 1241 - 1250
- [9] Kishida T, Asada H, Satoh E *et al*. *In vivo* electroporation-mediated transfer of interleukin-12 and interleukin-18 genes induces significant antitumor effects against melanoma in mice. *Gene Ther*, 2001, **8**: 1234 - 1240
- [10] Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection on animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther*, 1999, **6**: 1258 - 1266
- [11] Wang Y, Becker D. Antisense targeting of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor-1 in human melanomas blocks intratumoral angiogenesis and tumor growth. *Nat Med*, 1997, **3**(8): 887 - 893
- [12] Satoh E, Osawa M, Tomiyasu K *et al*. Efficient gene transduction by Epstein-Barr-virus-based vectors coupled with cationic liposome and HAJ-liposome. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **238**: 795 - 799
- [13] Anderson WF, Blaese RM, Culver K. The ADA human gene therapy clinical protocol: Points to consider response with clinical protocol. *Hum Gene Ther*, 1990, **1**: 331 - 362
- [14] Tsukamoto H, Wells D, Brown S *et al*. Enhanced expression of recombinant dystrophin following intramuscular injection of Epstein-Barr virus (EBV)-based mini-chromosome vectors in mdx mice. *Gene Ther*, 1999, **6**(7): 1331 - 1335
- [15] Tomiyasu K, Oda Y, Nomura M *et al*. Direct intracardiac transfer of beta2-adrenergic receptor gene argments cardiac output in cardiomyopathic hamsters. *Gene Ther*, 2000, **7**: 2087 - 2093
- [16] Chen G, Goeddel DV. TNF Pathway. Science's STKE(Connections Map, as seen May 2002), http://stke.sciencemag.org/cgi/cm/CMP_7107
- [17] Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship. *Micros Res*, 2000, **50**(3): 184 - 195
- [18] Feldmann M, Maini RN. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annu Rev Immunol*, 2001, **19**: 163 - 196
- [19] Xu CX(徐春晓), Yao LH(姚立红), Zu D(祖东) *et al*. Cloning, expression and bio-activity assay of chimeric fusion protein sTNFR II-IgG Fc. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2002, **18**(2): 178 - 181
- [20] Simpson K, McGuigan A, Huxley C. Stable episomal maintenance of yeast artificial chromosomes in human cells. *Mol Cell Biol*, 1996, **16**(9): 5117 - 5126
- [21] Huertas D, Howe S, McGuigan A *et al*. Expression of the human CFTR gene from episomal oriP-EBNA1-YACs in mouse cells. *Hum Mol Genet*, 2000, **9**(4): 617 - 629
- [22] Magin-Lachmann C, Kotzamanis GD, Aiuto L *et al*. Retrofitting BACs with G418 resistance, luciferase, and oriP and EBNA-1 - new vectors for *in vitro* and *in vivo* delivery. *BMC Biotechnol*, 2003, **3** [Epub ahead of print]
- [23] Michael Orford, Mikhail Nefedov, Jim Vadolas *et al*. Engineering EGFP reporter constructs into a 200kb human beta-globin BAC clone using GET recombination. *Nucleic Acids Research*, 2000, **28**(18): e84
- [24] De Benedetti A, Rhoads RE. A novel BK virus-based episomal vector for expression of foreign genes in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 1991, **19**: 1925 - 1931
- [25] Ohe Y, Zhao D, Saijo N *et al*. Construction of a novel bovine papillomavirus vector without detectable transforming activity suitable for gene transfer. *Hum Gene Ther*, 1995, **6**: 325 - 333