

# 杆状病毒介导的基因传递逃避补体攻击的措施

万婧 周向阳\* 周秀锦 邵宏宏

(舟山出入境检验检疫局 浙江 舟山 316000)

**摘要:** 血清补体系统是杆状病毒介导基因传递过程中的主要抑制因素。概述逃避补体攻击的有效措施: 选择免疫赦免组织作为杆状病毒介导基因传递的靶标, 例如眼睛、脑和睾丸; 体外转导也能有效地逃避补体的攻击; 利用补体的药理抑制剂或者对杆状病毒载体进行加工修饰, 例如聚合物包被、假型化和展示补体抑制剂等, 可以消除杆状病毒对补体的敏感性。有效地逃避补体攻击有助于杆状病毒广泛应用于基因治疗。

**关键词:** 杆状病毒, AcMNPV, 补体, 基因传递

## The measures of avoiding complement attack in Baculovirus-mediated gene delivery

WAN Jing ZHOU Xiang-Yang\* ZHOU Xiu-Jin SHAO Hong-Hong

(Zhoushan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhoushan, Zhejiang 316000, China)

**Abstract:** Serum complement system is the significant barrier to the development of baculovirus vectors for therapeutic gene delivery. This paper gave a review to the efforts taken to avoid complement attack. Selecting the immunoprivileged tissues as target for baculovirus-mediated gene delivery, such as eye, brain and testis. *ex vivo* transduction is a widely used approach to exclude the complement attack. Using of pharmacological inhibitors of complement as well as surface engineering of the baculoviral vectors through the use of synthetic polymers, pseudotyping or display of complement inhibitors can inhibit complement attack efficiently. This will significantly increase the possibility of using baculovirus vectors for thera-

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(No. Y3110396)

\*通讯作者: Tel: 86-580-2821082; 信箱: zxy@zs.ziq.gov.cn

收稿日期: 2011-10-27; 接受日期: 2011-12-19

peutic applications.

**Keywords:** Baculoviruses, AcMNPV, Complement, Gene delivery

目前使用昆虫杆状病毒作为基因传递的载体用于基因治疗受到了广泛关注,其中研究最为深入的是苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(*Autographa californica multiple nucleopolyhedrovirus*, AcMNPV)<sup>[1]</sup>。杆状病毒基因组较大且可操作性好,可以容纳多个基因或较大的基因,而且杆状病毒在哺乳动物细胞中不能复制,并对哺乳动物细胞有较高的转导效率,使得杆状病毒成为基因治疗的潜在载体。杆状病毒虽然能够在体外对多种细胞系实现有效的基因转导和表达,但其介导的体内基因转导却很少有成功的例子,这其中抑制杆状病毒介导的基因传递效率的主要因素是血清补体系统<sup>[2]</sup>。

补体是构成宿主先天性免疫的重要组成部分,并在先天性免疫和适应性免疫之间起着一定的联系作用。补体可通过经典、替代和凝集素 3 条既独立又交叉的途径激活<sup>[3]</sup>。补体蛋白 C1q 可结合 IgG 或 IgM 分子的 Fc 区激活补体的经典途径。补体的 C3 蛋白自发地水解为 C3a 和 C3b, C3b 暴露出具有反应性的硫酯键,与病原表面的氨基和糖基进行共价结合从而引发补体的替代途径。当血清中存在的甘露糖结合凝集素(Mannan-binding lectin, MBL)或纤维蛋白胶凝素(Ficolin)与细菌或病毒表面的甘露糖残基结合后,激活 MBL-相关丝氨酸蛋白酶,进而激活凝集素途径。在所有途径中,补体蛋白水解引起一连串级联放大的连锁反应,导致溶膜复合物(Membrane attack complex, MAC)的形成而引起膜穿孔<sup>[3]</sup>。

补体系统的级联激活受表面结合调节因子和可溶调节因子的严格控制,以免发生不适当的补体激活,导致宿主自身细胞受到损伤。表面结合调节因子包括补体受体 1 (Complement receptor 1,

CR1)和补体促衰变因子(Decay accelerating factor, DAF),它们是引起 C3b 和 C4b 快速降解的辅因子,能阻止溶膜复合物的形成<sup>[3-4]</sup>。可溶调节因子如 C4b-结合蛋白(C4BP)、H 因子、FHL-1 等,其中 H 因子和 FHL-1 是替代途径中的特异性调节因子,而 C4BP 是经典途径中的调节因子<sup>[5]</sup>。补体调节因子含有多个拷贝的短序列重复结构(Short consensus repeats, SCRs)。许多哺乳动物病毒利用补体调节因子陷阱来逃避补体的攻击。而且一些病毒产生的可溶蛋白与宿主的补体调节因子的结构和功能极为相似,例如正痘病毒和牛痘病毒<sup>[6]</sup>。

利用可溶的补体抑制剂 sCR1 能抑制人体血清对杆状病毒的灭活,使人们认为杆状病毒通过经典途径引起补体激活<sup>[2]</sup>。然而有研究表明,抑制补体激活的经典途径和凝集素途径仅仅提高了杆状病毒 30%的存活率,将所有途径全部中和可以达到 100%的存活率,而且杆状病毒在缺少了 C1q 蛋白的病人血液中的存活率仅有 25%<sup>[7]</sup>。最近有研究人员利用体外血液循环系统进一步阐明了补体激活的机制,表明杆状病毒粒子可以与 IgM 和 C3b 结合<sup>[8]</sup>。上述结果表明替代途径和经典途径同时在杆状病毒失活过程中起作用。在此结合国内外研究进展,概述了杆状病毒逃避补体攻击的多种策略,使杆状病毒能够有效地介导基因传递而达到基因治疗的目的。

## 1 免疫赦免位点作为基因传递的靶标

体内存在一些称作免疫赦免的位点,例如眼睛、脑和睾丸,这些位点不能针对抗原产生适应性激活和先天性免疫反应<sup>[9]</sup>。

### 1.1 眼睛

对角膜和眼前房的免疫赦免已有数十年的研

究, 认为其可以避免眼睛发炎而造成组织受损或视力下降。眼睛中存在补体激活的替代途径和经典途径, 但却受到多种补体调节因子, 例如, DAF、MCP、CD59、I 因子和 H 因子的严格控制, 另外血眼屏障也限制了眼睛先天免疫系统的激活<sup>[10]</sup>。

已有许多利用杆状病毒载体高效转导眼睛的报道。Haeseleer 等首先利用表达 GFP 的杆状病毒通过玻璃体内注射和视网膜下注射小鼠眼睛, 阐明了传递方法之间转导模式的差异<sup>[11]</sup>。视网膜下注射杆状病毒限制了视网膜色素上皮细胞的转导, 而玻璃体内注射杆状病毒导致基因在角膜内皮、晶状体、视网膜色素上皮细胞和视网膜内表达。相似的研究证明, 将杆状病毒通过玻璃体内注射兔眼后, 视网膜色素上皮细胞、视网膜和光感受器细胞能够得到有效的转导<sup>[12]</sup>。另外有研究利用玻璃体内注射杆状病毒到大鼠眼睛, 从内皮和神经元特异性的启动子来阐明转基因表达的特异性<sup>[13-14]</sup>。这些结果表明杆状病毒介导的基因传递可能在治疗眼部疾病方面具有广泛的用途。

## 1.2 脑

由于血脑屏障、缺少淋巴流和免疫调节特性的居留细胞导致中枢神经系统的免疫赦免。研究表明免疫赦免仅限于软细胞组织, 而不包括脑室、脉络丛、脑脊膜和脑室周围器官<sup>[15]</sup>。

许多研究利用杆状病毒作为载体将基因传递到脑组织。Sarkis 等证明纹状体注射杆状病毒后, 能够转导大鼠和小鼠的神经系统的细胞, 而且注射补体 C3 蛋白抑制剂——眼镜蛇毒因子的小鼠与对照组之间杆状病毒介导的基因传递无明显差异, 因此该研究也首次证明了脑对杆状病毒转导的免疫赦免<sup>[16]</sup>。利用 3 个不同的立体定位图谱: 一个接近侧脑室前角, 一个是软细胞组织的内部和纹状体, 进一步分析了杆状病毒介导的转导在

小鼠脑内的偏爱性, 结果表明对脉络丛上皮细胞和微脉管内皮细胞具有较强的偏爱性, 而纹状体注射导致注射位点仅仅有很少的转导细胞, 而且杆状病毒并未引起显著的小神经胶质反应和临床生化影响<sup>[17]</sup>。利用脑室内注射水泡性口膜炎病毒 G 蛋白胞外域(Vesicular stomatitis virus G protein ectodomain, VSV-G)假型化的杆状病毒后, 发现侧脑室的上皮细胞、大脑导水管和蛛网膜的上皮细胞都能够检测到转基因的大量表达<sup>[18]</sup>。研究人员用 VSV-G 修饰的杆状病毒直接转导鼠脑皮层后发现该假病毒对血液补体有很大的抗性<sup>[19]</sup>。

Boulaire 等对大鼠的脑、人的星状细胞和神经元细胞注射杆状病毒后, 描述了宿主的反应, 其中针对杆状病毒的转导, 星状细胞特异性的激活补体系统, 选择神经元特异性的启动子可能避免转导星状细胞, 而补体激活到何种程度才能影响体内转基因的水平以及持续表达的能力还有待进一步论证<sup>[20]</sup>。这些结果为临床治疗脑部疾病提供了光明的前景。

## 1.3 睾丸

血睾屏障物理性的将血管和输精管分开, 使得睾丸也是一个免疫赦免组织<sup>[21]</sup>。目前利用杆状病毒将基因传递到小鼠睾丸组织的研究报告仅有两例: Tani 等通过输精管传送表达 GFP 的杆状病毒, 发现基部的细胞和塞尔托利细胞有转基因的表达<sup>[19]</sup>; 而 Park 等将杆状病毒注射到白膜, 使得外部的输精管细胞有高水平的转基因的表达<sup>[22]</sup>。在研究中未检测到精母细胞和精细胞的转导, 表明了杆状病毒可以被用来介导基因传递到睾丸组织, 而且没有种系传播的风险。

## 2 体外转导

为提高基因传递效率, 亦可人工创造免疫赦免条件。研究人员将杆状病毒注射到兔颈动脉处的硅橡胶环内, 避免了杆状病毒与血液补体的接

触,使得外膜细胞内转基因的表达水平明显高于腺病毒介导的基因表达水平<sup>[23]</sup>。体外转导是隔绝补体的有效措施,首次理论论证的结果表明在肝灌注模型处能检测到转基因的表达。研究报道可以利用杆状病毒将基因高效地传递到关节软骨细胞,这个过程需要骨形态发生蛋白-2 (Bone morphogenetic protein-2, BMP-2)的表达和旋转生物反应器培养基,证明杆状病毒可以在软骨和骨组织加工方面作为潜在的载体。将这种方式的软骨细胞加工应用到兔体时,可以在膝盖骨的凹槽处修复软骨缺陷<sup>[24]</sup>。

Hu 等首次证明了杆状病毒可以有效地转导人的间充质干细胞(Mesenchymal stem cells, MSCs)以及起源于 MSCs 的脂肪形成细胞的前体、软骨形成细胞的前体和成骨细胞的前体<sup>[25]</sup>。研究人员利用携带 BMP-2 的杆状病毒转导 MSCs 引起成骨细胞的分化,移植到裸鼠背部的皮下组织可导致异位骨的形成<sup>[26]</sup>;而且在免疫兔体中利用表达 BMP-2 和 VEGF 的杆状病毒转导同种异系的 MSCs 时,可以增加股骨的部分骨缺陷的愈合<sup>[27]</sup>。

已经证明杆状病毒载体也可以将基因高效地传递到人的胚胎干细胞。大量的研究工作证实杆状病毒的转导并不影响基因组的稳定性以及胚胎干细胞的多功能性。利用杆状病毒转导起源于人的胚胎干细胞的神经细胞有助于神经系统的移植,为治疗广谱的神经疾病提供了可能性<sup>[28]</sup>。最近,杆状病毒转导的 MSC 细胞被用来将自杀基因——胸苷激酶传递到异种移植肿瘤<sup>[29]</sup>。这些结果表明了利用杆状病毒作为体外治疗载体的巨大潜在可能性。

### 3 补体的药理抑制剂

利用补体的药理抑制剂灭活补体,可以避免杆状病毒的失活。利用补体 C3 蛋白抑制剂——眼

镜蛇毒因子处理血清后,再进行基因转导能够抑制补体对杆状病毒的灭活作用。进一步研究证明,利用能结合 C3b 和 C4b 的可溶性补体抑制剂 sCR1 处理人血清时,杆状病毒的存活率呈现剂量依赖性<sup>[2]</sup>。Tani 等利用补体 B 和 C1 蛋白的抑制剂 FUT-175,也能恢复杆状病毒的体内基因转导活性<sup>[19]</sup>。

到目前为止,利用补体的药理抑制剂进行体内研究的报道仅有两例。Sarkis 等通过纹状体注射杆状病毒后,再用眼镜蛇毒因子预处理,结果发现预处理的小鼠和对照组之间无明显差异,揭示了脑的免疫赦免足以保护载体免受失活<sup>[16]</sup>。2005 年,研究人员对小鼠的门静脉注射高滴度的杆状病毒,通过服用 sCR1 的处理组和对照组来证明体内补体激活的重要意义<sup>[7]</sup>。结果发现对照组的小鼠全部死亡,而处理组小鼠的 2/3 存活且存在较低水平的转基因表达,进一步实验证明降低病毒的剂量可以降低免疫反应的激活。而且两组小鼠的肝组织学揭示了肝坏死和出血区域可能与补体系统的激活有关。当对小鼠注射高滴度的杆状病毒时,其肝出血和死亡是否是由于血液凝固引起的有待进一步研究论证。这些研究结果说明进一步寻找合适的补体抑制剂对于降低免疫反应具有重要意义,也突出了未来临床治疗上剂量选择的重要性。

Georgopoulos 等在人的体外血液循环系统中评估了两种补体抑制剂的效果: C3 裂解的抑制剂和 C5a 受体拮抗物 (C5a receptor antagonist, C5aRA)<sup>[8]</sup>。两种抑制剂均能引起细胞炎症因子释放的减少,与 C3 裂解的抑制剂相反, C5aRA 却不能拯救杆状病毒的失活,表明在 MAC 的形成过程中 C5b 较 C5a 起了更重要的作用。此外,在体外血液循环系统中注射病毒和 C3 裂解的抑制剂后,发现血液细胞中的补体激活级联反应明显降低。注射杆状病毒可引起肉眼可见的血块凝固,

加入抑制剂后可完全抑制血块的形成。由此可见, C3 裂解的抑制剂可以有效地抑制补体激活、炎症因子的释放和血块的凝固, 这些特性使其有望成为临床应用杆状病毒的有效抑制剂。

## 4 杆状病毒的表面加工

通过遗传和化学方式加工杆状病毒也可以在基因传递的过程中避免补体的攻击<sup>[30-31]</sup>。可以对杆状病毒粒子表面进行加工, 例如当病毒粒子从昆虫细胞膜出芽时, 可以将过表达的跨膜蛋白组合到病毒粒子的表面。同样的, 可以将感兴趣的多肽或蛋白以融合蛋白的形式展示于病毒粒子的囊膜上。通常将这种技术称作杆状病毒展示技术, 这个真核展示平台在药物开发、疫苗和基因传递方面具有广泛的应用<sup>[32]</sup>。将杆状病毒的囊膜糖蛋白 GP64 作为融合伴侣是目前应用最为广泛的表面加工技术<sup>[33]</sup>。GP64 是病毒结合和进入细胞必不可少的蛋白, 也是依赖低 pH 从核内体中脱去核衣壳, 以及随后从昆虫细胞中出芽不可或缺的蛋白。为了避免由于 GP64 的修饰而可能导致病毒感染力下降问题的出现, 研究人员也在探寻其他的表面展示技术, VSV-G 即是其中一种<sup>[30]</sup>。已有研究证明, 对病毒粒子进行化学修饰也是一种有效的表面加工技术<sup>[34]</sup>。

### 4.1 聚合物包被

聚合物能保护载体免受血液补体的识别, 这种方法也被应用到杆状病毒上。杆状病毒表面带有负电荷, 因此可以用带正电荷的聚乙烯亚胺 (Polyethylenimine, PEI) 包被病毒粒子, 这种包被依赖于病毒粒子和聚合物之间的静电相互作用<sup>[31]</sup>。在 50% 的人血清中 PEI 可以使 10% 的载体免受补体的破坏, 而在小鼠血清中可以达到 100%。在感染复数为 100, 不超过 0.2 nmol PEI/10<sup>6</sup> 病毒粒子的比率时, 转导杆状病毒不会引起细胞毒素的副作用。研究报道, PEI 包被的杆状病毒在肝和脾脏

的转导效率明显高于未包被的病毒, 而且在裸鼠模型中, 包被的杆状病毒能高效地抑制人异种移植肿瘤的生长。半乳糖化的 PEI 1800 与 PEI 效果一致, 却提高了杆状病毒在 10% 血清中的稳定性<sup>[35]</sup>。

已有研究发现, 利用另一种聚合物——聚乙二醇 (Polyethylene glycol, PEG) 修饰杆状病毒能提高基因在体外、鼠脑和肺中的转导效率, 而且聚乙二醇化的程度低于 36.5% 时对病毒的感染性影响最小<sup>[36]</sup>。此外, 叶酸-PEG 修饰杆状病毒后在体外表现出受体特异性的基因转移, 而且能抑制人表皮瘤异种移植模型中肿瘤的生长<sup>[34]</sup>。尽管未对聚乙二醇化杆状病毒的血清稳定性进行研究, 但是上述结果足以证明聚乙二醇化可以逃避免疫系统, 并延长生物分子的循环时间<sup>[37]</sup>。然而, 在利用 PEI 和 PEG 聚合物时, 为保证病毒的感染性和较低的细胞毒性, 需要对聚合物的尺寸以及聚合物与病毒粒子的比率进行最优化处理。

### 4.2 假型化

批次之间的差异以及保证病毒的感染性需要大量优化工作, 这两方面限制了化学修饰的应用。从遗传学角度对载体进行加工, 避免补体的攻击是一个理想选择。假型化是利用其他病毒表面蛋白替换病毒自身囊膜蛋白的过程, 目前已被证明可以缓和补体攻击的问题。VSV-G 假型化的杆状病毒应用最为广泛, 研究表明无论在体内还是体外, VSV-G 都提高了杆状病毒的转导效率<sup>[19]</sup>。与未修饰的杆状病毒相比, VSV-G 假型化的杆状病毒对人、兔、猪、大鼠、仓鼠和小鼠的血清补体都显示出较强的抵抗力。这些结果与 VSV-G 假型化的逆转录病毒和慢病毒的研究结果一致<sup>[38-39]</sup>。研究证明在 gp64-敲除型的杆状病毒中, VSV-G 和麻疹病毒受体 CD46 可以在一定程度上代替 GP64 的功能, 使得杆状病毒能够在昆虫细胞中复制和传播<sup>[40-41]</sup>。

Barsoum 等首先假定 VSV-G 假型化的杆状病毒可以抵抗补体的攻击,通过尾静脉注射 VSV-G 假型化的杆状病毒后,发现在小鼠肝细胞中有转基因的表达<sup>[42]</sup>。研究人员进一步实验证明,直接肌肉注射 VSV-G 修饰的杆状病毒有一部分不被补体系统中和,提高了基因传递到小鼠四头肌的效率<sup>[43]</sup>。Kaikkonen 等表明共展示 VSV-G 蛋白的一个短的跨膜片段与完整的 VSV-G 一样可以保护杆状病毒免受补体的攻击<sup>[30]</sup>。上述结果表明,对杆状病毒的囊膜进行修饰,可以改变其免疫特性,而共展示异种囊膜蛋白提供补体保护的机理有待进一步研究。

### 4.3 表面展示补体抑制剂

通过遗传方式在病毒粒子表面展示补体调节蛋白,这样可以增加杆状病毒载体在血清中的稳定性,第一个被展示的补体调节蛋白是 DAF<sup>[44]</sup>。展示 DAF-GP64 融合蛋白的杆状病毒可以高效转导补体充足新生鼠的肝软细胞组织,而对成鼠直接肝内注射后,发现转导效果一般。研究人员证明了展示 DAF 的保护特性,并且评估了其他补体调节蛋白以及不同组合间逃避补体攻击的效率,例如 FHL-1、C4BP 和 MCP<sup>[30]</sup>。杆状病毒在血清中的稳定性依赖于展示的补体调节蛋白和血清的来源,研究证明 70% 的小鼠血清以及 13% 的大鼠血清具有最佳的防护效果,将病毒粒子与 50% 的人血清孵育 1 h 后,大约 30% 的病毒粒子仍能够转导 HepG2 细胞。通常细胞表面结合的 DAF 和 MCP 能较好地阻止补体激活,而同时共展示几种补体调节蛋白达不到更好的效果。先前研究表明门静脉注射高剂量未经修饰的杆状病毒对小鼠是致死的,而门静脉注射抑制补体攻击的杆状病毒能安全将基因传递到靶器官,与补体的药理抑制剂相似,展示 DAF 提高了小鼠的存活率<sup>[7,30]</sup>。

越来越多的证据表明补体系统和 Toll-样受

体 (Toll-like receptors, TLR) 之间存在大量的串扰现象,例如,在缺失 DAF 的小鼠中检测到白介素 1-b (Interleukin-1b, IL-1b) 和白介素 -6 (Interleukin-6, IL-6) 在 TLR 的刺激下显著增加,表明了 TLR 引起的细胞因子反应对补体系统具有调节作用<sup>[45]</sup>。有趣的是,携带 DAF 的杆状病毒与巨噬细胞孵育后,与对照相比,发现诱导产生的炎症性细胞因子明显减少。已经证明,补体的激活可以引起血液凝固,当高剂量的杆状病毒接触到血液也会引起这种现象。研究报道,展示 DAF-VSV-GED 能降低补体的激活和炎症反应,也有可能降低血栓形成的风险。对表面展示补体抑制剂的不断研究势必会促进杆状病毒作为基因传递载体的广泛应用。

## 5 结论与展望

杆状病毒在哺乳动物细胞中不能复制,以及对哺乳动物细胞较高的转导效率使它成为基因治疗中越来越有吸引力的载体<sup>[46]</sup>。然而,杆状病毒对人体血清中的补体系统高度敏感,要使杆状病毒载体在基因治疗中得到广泛应用,必须克服补体系统的攻击。避免补体系统攻击的被动措施包括:将免疫赦免组织作为基因传递的靶标和体外转导,这些措施被证明有潜在的应用价值,但是在临床上不能广泛使用。在未来的发展中,补体的药理抑制剂有望以混合物的方式获得广泛应用,例如 C3 裂解的抑制剂,然而在基因治疗中抑制补体的潜在副作用有待进一步评估<sup>[47]</sup>。因此,最理想的选择是对载体自身进行加工,使其避免补体的攻击,研究证实 PEI 包被和展示 DAF 的杆状病毒具有巨大的应用潜力。

杆状病毒载体引起补体激活的分子机制仍不明确。C3b 与蛋白抑制剂或者细胞表面的唾液酸结合就能失活,而杆状病毒粒子缺少这些抑制蛋白,由于昆虫宿主细胞检测不到唾液酸转移酶的

活性, 因此杆状病毒也不携带唾液酸, 所以不能失活 C3b, 也就容易被补体系统失活<sup>[3]</sup>。在能够表达唾液酸的昆虫细胞中生产展示 DAF 的杆状病毒可能会更好地逃避补体的攻击。明确杆状病毒激活补体的详细机理, 对将来设计更高效的杆状病毒载体以及基因治疗的临床应用具有重要意义。

## 参 考 文 献

- [1] Airenne KJ, Makkonen KE, Mähönen AJ, et al. *In vivo* application and tracking of baculovirus[J]. *Current Gene Therapy*, 2010, 10(3): 187–194.
- [2] Hofmann C, Strauss M. Baculovirus-mediated gene transfer in the presence of human serum or blood facilitated by inhibition of the complement system[J]. *Gene Therapy*, 1998, 5(4): 531–536.
- [3] Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, et al. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis[J]. *Nature Immunology*, 2010, 11(9): 785–797.
- [4] Hourcade D, Liszewski MK, Krych-Goldberg M, et al. Functional domains, structural variations and pathogen interactions of MCP, DAF and CR1[J]. *Immunopharmacology*, 2000, 49(1/2): 103–116.
- [5] Blom AM, Villoutreix BO, Dahlbäck B. Complement inhibitor C4b-binding protein-friend or foe in the innate immune system?[J]. *Molecular Immunology*, 2004, 40(18): 1333–1346.
- [6] Rosengard AM, Liu Y, Nie ZP, et al. Variola virus immune evasion design: expression of a highly efficient inhibitor of human complement[J]. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, 2002, 99(13): 8808–8813.
- [7] Hoare J, Waddington S, Thomas HC, et al. Complement inhibition rescued mice allowing observation of transgene expression following intraportal delivery of baculovirus in mice[J]. *Journal of Gene Medicine*, 2005, 7(3): 325–333.
- [8] Georgopoulos LJ, Elgue G, Sanchez J, et al. Preclinical evaluation of innate immunity to baculovirus gene therapy vectors in whole human blood[J]. *Molecular Immunology*, 2009, 46(15): 2911–2917.
- [9] Simpson E. A historical perspective on immunological privilege[J]. *Immunological Reviews*, 2006, 213(1): 12–22.
- [10] Taylor AW. Ocular immune privilege[J]. *Eye*, 2009, 23(10): 1885–1889.
- [11] Haeseleer F, Imanishi Y, Saperstein DA, et al. Gene transfer mediated by recombinant baculovirus into mouse eye[J]. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 2001, 42(13): 3294–3300.
- [12] Kinnunen K, Kalesnykas G, Mähönen AJ, et al. Baculovirus is an efficient vector for the transduction of the eye: comparison of baculovirus- and adenovirus-mediated intravitreal vascular endothelial growth factor D gene transfer in the rabbit eye[J]. *Journal of Gene Medicine*, 2009, 11(5): 382–389.
- [13] Luz-Madrigal A, Clapp C, Aranda J, et al. *In vivo* transcriptional targeting into the retinal vasculature using recombinant baculovirus carrying the human flt-1 promoter[J]. *Virology Journal*, 2007, 4(1): 88.
- [14] Li Y, Yang Y, Wang S. Neuronal gene transfer by baculovirus-derived vectors accommodating a neurone-specific promoter[J]. *Experimental Physiology*, 2005, 90(1): 39–44.
- [15] Carson MJ, Doose JM, Melchior B, et al. CNS immune privilege: hiding in plain sight[J]. *Immunological Reviews*, 2006, 213(1): 48–65.
- [16] Sarkis C, Serguera C, Petres S, et al. Efficient transduction of neural cells *in vitro* and *in vivo* by a baculovirus-derived vector[J]. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, 2000, 97(26): 14638–14643.
- [17] Lehtolainen P, Tyynela K, Kannasto J, et al. Baculoviruses exhibit restricted cell type specificity in rat brain: a comparison of baculovirus- and adenovirus-mediated intracerebral gene transfer *in vivo*[J]. *Gene Therapy*, 2002, 9(24): 1693–1699.
- [18] Kaikkonen MU, Rätty JK, Airenne KJ, et al. Truncated vesicular stomatitis virus G protein improves baculovirus transduction efficiency *in vitro* and *in vivo*[J]. *Gene Therapy*, 2006, 13(4): 304–312.
- [19] Tani H, Limn CK, Yap CC, et al. *In vitro* and *in*

- vivo* gene delivery by recombinant baculoviruses[J]. Journal of Virology, 2003, 77(18): 9799–9808.
- [20] Boulaire J, Zhao Y, Wang S. Gene expression profiling to define host response to baculoviral transduction in the brain[J]. Journal of Neurochemistry, 2009, 109(5): 1203–1214.
- [21] Fijak M, Bhushan S, Meinhardt A. Immunoprivileged sites: the testis[J]. Methods Molecular Biology, 2011, 677(Pt 3): 459–470.
- [22] Park HJ, Lee WY, Kim JH, et al. Interstitial tissue-specific gene expression in mouse testis by intra-tunica albuginea injection of recombinant baculovirus[J]. Asian Journal of Andrology, 2009, 11(3): 342–350.
- [23] Airene KJ, Hiltunen MO, Turunen MP, et al. Baculovirus-mediated periadventitial gene transfer to rabbit carotid artery[J]. Gene Therapy, 2000, 7(17): 1499–1504.
- [24] Sung LY, Chiu HY, Chen HC, et al. Baculovirus-mediated growth factor expression in dedifferentiated chondrocytes accelerates redifferentiation: effects of combinational transduction[J]. Tissue Engineering Part A, 2009, 15(6): 1353–1362.
- [25] Ho YC, Lee HP, Hwang SM, et al. Baculovirus transduction of human mesenchymal stem cell-derived progenitor cells: variation of transgene expression with cellular differentiation states[J]. Gene Therapy, 2006, 13(20): 1471–1479.
- [26] Chuang CK, Sung LY, Hwang SM, et al. Baculovirus as a new gene delivery vector for stem cell engineering and bone tissue engineering[J]. Gene Therapy, 2007, 14(19): 1417–1424.
- [27] Lin CY, Chang YH, Lin KJ, et al. The healing of critical-sized femoral segmental bone defects in rabbits using baculovirus-engineered mesenchymal stem cells[J]. Biomaterials, 2010, 31(12): 3222–3230.
- [28] Zeng JM, Du J, Lin JK, et al. High-efficiency transient transduction of human embryonic stem cell-derived neurons with baculoviral vectors[J]. Molecular Therapy, 2009, 17(9): 1585–1593.
- [29] Bak XY, Yang J, Wang S. Baculovirus-transduced bone marrow mesenchymal stem cells for systemic cancer therapy[J]. Cancer Gene Therapy, 2010, 17(10): 721–729.
- [30] Yang Y, Lo SL, Yang JY, et al. Polyethylenimine coating to produce serum-resistant baculoviral vectors for *in vivo* gene delivery[J]. Biomaterials, 2009, 30(29): 5767–5774.
- [31] Kaikkonen MU, Maatta AI, Ylä-Herttuala S, et al. Screening of complement inhibitors: shielded baculoviruses increase the safety and efficacy of gene delivery[J]. Molecular Therapy, 2010, 18(5): 987–992.
- [32] van Oers MM. Opportunities and challenges for the baculovirus expression system[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2011, 107(Suppl): S3–S15.
- [33] Kadlec J, Loureiro S, Abrescia NGA, et al. The postfusion structure of baculovirus gp64 supports a unified view of viral fusion machines[J]. Nature Structural and Molecular Biology, 2008, 15(10): 1024–1030.
- [34] Kim YK, Kwon JT, Choi JY, et al. Suppression of tumor growth in xenograft model mice by programmed cell death 4 gene delivery using folate-PEG-baculovirus[J]. Cancer Gene Therapy, 2010, 17(11): 751–760.
- [35] Kim YK, Choi JY, Jiang HL, et al. Hybrid of baculovirus and galactosylated PEI for efficient gene carrier[J]. Virology, 2009, 387(1): 89–97.
- [36] Kim YK, Park IK, Jiang HL, et al. Regulation of transduction efficiency by pegylation of baculovirus vector *in vitro* and *in vivo*[J]. Journal of Biotechnology, 2006, 125(1): 104–109.
- [37] Jevševar S, Kunstelj M, Porekar VG. PEGylation of therapeutic proteins[J]. Biotechnology Journal, 2010, 5(1): 113–128.
- [38] Poeschla EM, Wong-Staal F, Looney DJ. Efficient transduction of nondividing human cells by feline immunodeficiency virus lentiviral vectors[J]. Nature Medicine, 1998, 4(3): 354–357.
- [39] Burns JC, Friedmann T, Driever W, et al. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells[J]. Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States



- of America, 1993, 90(17): 8033–8037.
- [40] Mangor JT, Monsma SA, Johnson MC, et al. A GP64-null baculovirus pseudotyped with vesicular stomatitis virus G protein[J]. Journal of Virology, 2001, 75(6): 2544–2556.
- [41] Kitagawa Y, Tani H, Limn CK, et al. Ligand-directed gene targeting to mammalian cells by pseudotype baculoviruses[J]. Journal of Virology, 2005, 79(6): 3639–3652.
- [42] Barsoum J, Brown R, McKee M, et al. Efficient transduction of mammalian cells by a recombinant baculovirus having the vesicular stomatitis virus G glycoprotein[J]. Human Gene Therapy, 1997, 8(17): 2011–2018.
- [43] Pieroni L, Maione D, La Monica N. *In vivo* gene transfer in mouse skeletal muscle mediated by baculovirus vectors[J]. Human Gene Therapy, 2001, 12(8): 871–881.
- [44] Hüser A, Rudolph M, Hofmann C. Incorporation of decay-accelerating factor into the baculovirus envelope generates complement-resistant gene transfer vectors[J]. Nature Biotechnology, 2001, 19(5): 451–455.
- [45] Hajishengallis G, Lambris JD. Crosstalk pathways between Toll-like receptors and the complement system[J]. Trends In Immunology, 2010, 31(4): 154–163.
- [46] Chen CY, Lin CY, Chen GY, et al. Baculovirus as a gene delivery vector: recent understandings of molecular alterations in transduced cells and latest applications[J]. Biotechnology Advances, 2011, 29(6): 618–631.
- [47] Ricklin D, Lambris JD. Compstatin: a complement inhibitor on its way to clinical application[J]. Advances In Cirrhosis, Hyperammonemia, and Hepatic Encephalopathy, 2008, 632: 273–292.



## 书 讯

### 《微生物学》(第三版) 出版

由蔡信之教授等老师主编的高等学校教材《微生物学》(第三版), 经过三年多的艰苦努力, 已完成修订工作, 于 2011 年 9 月由科学出版社出版发行。

第三版在第二版的基础上, 作了全面的修改补充, 对第二版的各章节都作了较大的调整, 增加了许多新的内容。全面、系统地介绍微生物学的基础知识、基本理论、基本技术, 较多地介绍新知识、新理论、新技术、新动态。内容新颖, 语言精炼, 图幅精美。

全书共 66 万多字(16 开本), 分十二章, 包括绪论、原核微生物、真核微生物、病毒、微生物的营养、微生物的代谢、微生物的生长、微生物的遗传和变异、微生物的生态、传染与免疫、微生物的分类、微生物的应用, 还有附录。本书取材广泛, 重点突出, 结构合理, 条理清晰, 概念准确, 图文并茂, 科学性强, 系统性好, 理论联系实际。每章配有习题。

本书不仅适合作高等院校生物科学、生物技术、生物工程等专业本科、专科和函授、自学考试等的微生物学课程的教科书, 也可以作相关专业的研究生和科研、生产技术人员参考书。还可供从事与微生物学相关工作的各类人员参考。