

重组腺相关病毒载体基因表达效率与辐射的关系

焦兰¹ 唐明青¹ 许瑞安^{1,2*}

(1. 华侨大学 分子药物研究院 福建 泉州 362021)

(2. 分子药物教育部工程研究中心 福建 泉州 362021)

摘要: 重组腺相关病毒(rAAV)载体被认为是最有希望的临床应用基因治疗载体之一。rAAV载体基因传递的有效性与病毒衣壳蛋白的免疫原性之间的矛盾是制约该类基因药物开发的关键难题,提高其表达效率是rAAV载体研发的主攻方向之一。研究发现,紫外线、 γ 射线等辐射可以提高rAAV载体的基因表达效率,其作用效果与辐射种类和剂量、细胞种类和状态、载体感染指数和感染时间等因素有关。其机制可能与DNA损伤反应,特别是DNA双链断裂修复有关。对辐射与rAAV载体的表达效率之间关系的深入了解,为两者的联合应用打开方便之门。本文将对UV、 γ 射线等辐射提高rAAV载体表达效率的机制、影响因素及其在基因治疗领域的应用进展进行综述。

关键词: 腺相关病毒载体, 基因治疗, 辐射, 基因表达效率, 双链断裂修复

Relationship between radiations and expression efficiency of recombinant adeno-associated virus vector

JIAO Lan¹ TANG Ming-Qing¹ XU Rui-An^{1,2*}

(1. Institute of Molecular Medicine, Huaqiao University, Quanzhou, Fujian 362021, China)

(2. Molecular Medicine Engineering Research Center, Ministry of Education, Quanzhou, Fujian 362021, China)

Abstract: Recombinant adeno-associated virus (rAAV) vector, one of the most promising vectors, has been widely used in clinical trials for gene therapy. However, the contradiction between the effectiveness of gene delivery and the immunogenicity of viral capsid protein restricts the development of gene drugs designed based on this vector. Thus, improving the transduction efficiency is one of the most important research fields for rAAV vector. Recent results showed that radiations, such as UV light and γ -ray, can significantly improve the gene expression efficiency of rAAV vector in various types of cells and tissues. These effects vary across the radiation types and doses, the cell types and statuses, the time and infection index of vectors. It is proposed that DNA damage responses (especially for double strand break repair) induced by radiations might contribute to improve transgene expression of rAAV vector. A better understanding of the relationship between radiations and rAAV gene expression will facilitate the combination use of these two strategies in disease therapy. This review discussed the mechanism of UV and γ -ray radiation to improve the expression efficiency of

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 81072578, 81271692)

*通讯作者: Tel: 86-595-22690952; 信箱: ruianxu@hqu.edu.cn

收稿日期: 2013-03-11; 接受日期: 2013-05-08; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-30

rAAV, the influencing factors as well as the application and progress of it in the field of gene therapy.

Keywords: Recombinant adeno-associated virus vector, Gene therapy, Radiations, Expression efficiency of gene, Double strand break repair

基因治疗是生物医学研究的热点领域之一^[1], 其关键共性部分是基因载体。重组腺相关病毒(Recombinant adeno-associated virus, rAAV)载体具有无致病性、低免疫原性、基因表达时间长、宿主范围广泛、基因组结构简单和理化性质稳定等显著优点, 被认为是最有希望的基因载体之一^[2], 目前已有超过 80 项临床研究报告(<http://www.abedia.com/wiley/>), 且在欧洲成功上市。本单位多项研究也证实 rAAV 基因药物在肿瘤、纤维化等疾病中具有良好的应用前景^[3]。基因传递的安全性和有效性是 rAAV 基因药物开发的两大关键问题。临床研究发现高剂量的 rAAV 基因药物会引发针对靶细胞的细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)免疫反应外, 导致肝脏和肌肉中靶细胞裂解、转基因表达消失及转氨酶活性升高^[4-6]。除了 CTL 反应, rAAV 基因药物对治疗 α -抗胰蛋白酶(Alpha-antitrypsin, AAT)缺陷和帕金森病基本无效的临床试验结果, 都对基因载体的表达效率提出了更高的要求^[7-8]。

辐射包括电离辐射和非电离辐射。电离辐射包含 α 射线(α 粒子)、 β 射线(β 粒子)、中子等高能粒子流与 γ 射线、X 射线等高能电磁波, 非电离辐射包含紫外线或近紫外线(Ultraviolet, UV)、可见光、红外线、微波、激光和无线电波等。近年来发现, X-射线、 γ 射线和紫外线(UV)等电离辐射和非电离辐射可显著提高 rAAV 载体的表达效率。UV 是波长 10–400 nm 之间的非电离辐射的通称, 根据生物效应不同, UV 可按照波长划分为 4 个波段: (1) UVA 波段, 波长 320–400 nm, 穿透力很强, 能量较低; (2) UVB 波段, 波长 275–320 nm, 中等穿透力, 能量中等; (3) UVC 波段, 波长 200–275 nm, 穿透能力最弱, 能量较强; (4) UVD 波段, 波长 10–200 nm。X 射线是一种波长很短的电离辐射, 其波长约为 0.01–10 nm, 临床上被广泛应用于医学影像。 γ 射线是由核子蜕变过程中发射的一种电

磁波, 又称为 γ 粒子流, 波长短于 0.02 nm, 穿透力很强, 医疗上常用于治疗肿瘤。辐射能引起 DNA 损伤, 从而对细胞有杀伤作用, 主要是引起 DNA 损伤。辐射提高 rAAV 载体表达效率的机制与 DNA 损伤修复系统有关。本文将阐述 γ 射线、UV 等电离辐射和非电离辐射提高 rAAV 载体表达效率的机制、影响因素及其在基因治疗领域的应用进展。

1 辐射可提高 rAAV 载体的表达效率

1.1 rAAV 载体的来源与结构

野生型 AAV (wtAAV)属于细小病毒家族, 是一种单链 DNA (ssDNA)病毒, 基因组长约 4.7 kb, 由两末端的倒转重复序列(ITR)及中间的编码区组成^[9]。反向末端重复序列(Inverted terminal repeat, ITR)是 wtAAV 复制、整合、拯救和包装所必须的顺式作用元件, 并具有转录启动子的活性。编码区表达 4 个 Rep 蛋白(Rep78、Rep68、Rep52 和 Rep40)、3 个 Cap 蛋白(VP1、VP2 和 VP3)及一个装配激活蛋白(Assembly activating protein, AAP)。Rep78 和 Rep68 蛋白与 wtAAV 基因表达的正负调控有关, 对于 wtAAV 生活周期的每一时期都是必需的。Rep52 和 Rep40 参与病毒装配。结构蛋白 VP1、VP2 和 VP3 组成病毒的衣壳, 在装配过程中可能需要 AAP 参与。基因治疗用 rAAV 载体由 wtAAV 改造而来, 两者最大的区别是 rAAV 基因组只保留了两端的 ITR 序列, 中间的 Rep、Cap 基因被其它与病毒无关的基因所取代。

1.2 辐射可提高 rAAV 载体的表达效率

wtAAV 通常被认为是一种依赖辅助病毒(如腺病毒和单纯疱疹病毒)、不能自主复制的病毒。然而, 在一些经过特殊处理(包括化学致癌物、环乙酰胺、羟基脲及 UV 等)的细胞中, wtAAV 不需要辅助病毒也能产生子代病毒^[10], 表明 UV 可使

细胞获得生产子代 wtAAV 的能力。同样, γ 射线也被证明与 wtAAV 之间存在某种协同作用^[11], 能够增强 AAV 的感染和复制能力。基于 UV、 γ 射线与 wtAAV 存在的密切相互作用, 研究人员将辐射应用于 rAAV 载体, 发现可显著提高其基因表达效率^[12]。例如, 在原代人成纤维细胞中, UV、 γ 射线照射可使 rAAV 载体表达效率提高 20–90 倍^[12]。X-射线也被证明可提高 rAAV 载体的表达效率^[13–14]。

1.3 辐射提高 rAAV 载体表达效率的影响因素

研究逐步证实, 辐射的波长、辐射剂量、细胞种类和状态、载体感染指数(MOI)和感染时间等因素都可影响辐射与基因载体之间的相互作用^[15–18]。

辐射的波长是影响载体表达效率的因素之一。以 UV 为例, UVC (254 nm)最早被证明可提高 rAAV 载体表达效率^[12]。UVB 中, 288、311 和 320 nm 波长都可显著提高载体表达效率^[18]。在 C3H 细胞中, 311 nm 和 320 nm 的 UV 照射引起 rAAV 载体表达效率提高超过 700 倍; 在 293 细胞中, 311 nm 和 320 nm 的 UV 也可使表达效率提高 150 倍。在关节软骨细胞中, 311 nm 的 UVB 可使 rAAV 载体表达目的基因的能力提高 6–7 倍^[18]。波长较长的 UVA (≥ 330 nm)并不能提高 rAAV 载体的表达效率^[12,18], 而靠近 UVB 的较短波长的 UVA (325 nm)却可显著提高 rAAV 载体在体内和体外的表达效率^[12,19]。不同波长的作用也可以影响 wtAAV 的复制能力^[10]。

无论是 UV, 还是 γ 射线和 X 射线, 其对载体表达效率的影响都具有剂量依赖性。UV 剂量与表达效率之间呈现双相效应, 即在辐射剂量依次增加的过程中, 表达效率由低到高并达到峰值, 随着剂量的进一步增加, 表达效率由峰值又开始回落^[18]。如果使用的剂量较低, 则可能无法观察到双相效应, 而表现为表达效率随剂量的增加而增加^[12–17,20]。

不同细胞对辐射的敏感度不同, 因此其基因表达效率提高的幅度也不同。如前面提到的 C3H 与 293 细胞就相差 5 倍^[18]。再如, 永生化软骨细胞系 tsT/AC62 中, UV 的作用表现为每个细胞中目的基

因表达强度增加, 而目的基因阳性细胞的比例变化不大; 而在原代软骨细胞中, 无论是目的基因表达强度还是阳性细胞数都明显提高^[16]。即便是同一细胞, 从不同的侧面感染载体, 也有不同影响。人原代呼吸道上皮细胞中, UV 处理可使经顶侧感染的 rAAV 载体表达效率提高 20–30 倍, 而对于经基底侧感染的细胞只提高 2 倍^[21]。另外, 细胞的状态也会影响辐射的作用效果。以 γ 射线为例, 在人原代成纤维细胞中, 处于 S 期的细胞, 只有在辐射剂量超过 20 Gy 时才起作用, 而对于非 S 期的细胞, 在 2.5 Gy 时就有 7 倍提高, 20 Gy 时 35 倍, 到 40 Gy 时超过 100 倍。体内研究表明, γ 射线对 rAAV 载体表达效率影响具有细胞特异性, 但与细胞的有丝分裂状态关系不大^[22]。在海马组织中, γ 射线不起作用, 而在成熟的头皮横纹肌细胞中, 表达效率提高 12–50 倍; 在视网膜和脉络膜内皮中, 提高幅度分别可达到 50 和 250 倍; 在肝细胞中, 则可达 900 倍^[23]。

一般来说, 先辐射处理再转染 rAAV, 其表达效率高于先转染 rAAV 载体再辐射处理^[24]。辐射处理的–6–12 h 是有利于 rAAV 转染的时间区间, 超出这个时间范围, 目的基因的表达效率都不会有明显的提高^[15,24]。这一结果与 wtAAV 类似, 病毒感染在 UV 处理之后的 4–12 h 进行, 产生子代病毒的数量较多^[10]。在 HuMSC 细胞中, rAAV 在 UV 照射 8 h 后感染, 其基因表达效率是最高值的 50%^[15]。MOI 对辐射的影响似乎不大, MOI 从 10 到 1 000 的范围内, UV 都能提高载体的基因表达水平, 且提高的幅度比较接近^[16–17]。另有报道称 γ 射线提高 rAAV 载体表达效率依赖于 wtAAV 的存在, 这可能与 Rep 蛋白的作用有关^[23]。

2 辐射提高 rAAV 载体表达效率的机制

wtAAV 感染经历附着、内吞、胞质牵引、内涵体逃逸、入核、脱壳、DNA 复制、病毒蛋白基因的转录与翻译、病毒包装和释放等过程。rAAV 表达基因, 除了最后不需要装配并释放病毒外, 其

他的步骤与 wtAAV 类似。干扰其中的任何一个步骤, 都可能影响载体表达效率。虽有报道称辐射可加强不依赖于受体的内吞作用, 促进 rAAV 进入细胞^[17,21], 但目前认为, 可表达形式的双链 DNA (dsDNA) 数量增加是辐射提高 rAAV 载体表达效率的最主要原因^[12,18,25]。

2.1 ssDNA 向 dsDNA 转变过程并非关键因素

wtAAV 在表达基因时, 需要经历由 ssDNA 到 dsDNA 的转变过程, 这个过程是以其自身末端 ITR 上的 3'-OH 区为引物开始。在腺病毒存在时(裂解途径), 需要的细胞因子有 DNA 聚合酶 δ 、细胞增殖核抗原(PCNA)、复制因子 C (RFC)、微小染色体维持复合物(MCM)、DNA 单链结合蛋白(ssDBP 和 RPA)及 DNA 依赖蛋白激酶(DNA-PK)等^[26]。rAAV 载体表达基因, 也需要经历类似过程。dsDNA 形成是影响 rAAV 载体表达效率的关键步骤之一, 如果将基因组改为本身为双链的自身互补型 AAV (scAAV)载体(无需 DNA 合成), 其表达效率可明显提高^[27-28]。

UV 对 S 期和非 S 期细胞中 rAAV 载体表达效率有不同影响, 表明 DNA 复制相关的酶可能参与了 UV 与 rAAV 载体之间的相互作用^[12]。UV 可能通过影响 ssDBP (又称 FKBP52)而发挥作用。ssDBP 是一种单链结合蛋白, 非磷酸化 ssDBP 不能与 rAAV ITR 上的 D-sequence 结合, 从而方便 dsDNA 合成。Sanlioglu 等认为, UV 通过提高 EGFR 磷酸化水平, 促使细胞内去磷酸化 ssDBP 蛋白含量增加, 加速 dsDNA 的形成^[17]。蛋白酪氨酸磷酸酶抑制剂 NaOV 妨碍 UV 发挥作用, 表明 EGFR 信号确实参与了 UV 影响 rAAV 载体的过程^[17]。但这一结果与其他研究存在矛盾: EGFR 信号的多种抑制剂能提高而非降低 rAAV 载体的表达效率; EGFR 促使 ssDBP 磷酸化而非去磷酸化^[29-31]。不同研究得出的不同结论表明, ssDBP 磷酸化与否可能并非辐射提高 rAAV 载体基因表达效率的关键因素。有报道称 UV 可以激活 DNA 聚合酶 δ ^[32], 但是目前还缺乏辐射通过诱导 DNA 聚合酶 δ 而促进

rAAV 表达基因的直接证据。

DNA 复制系统的激活可能有助于提高表达效率。DNA 合成抑制剂及 DNA 拓扑异构酶抑制剂都能提高 rAAV 载体的表达效率^[33]; 而且无论是分裂细胞还是非分裂细胞, 辐射都能提高基因表达效率^[12,22]。这说明 DNA 合成能力并非提高 rAAV 载体表达效率的主要因素。这可能与 dsDNA 形成过程中存在另外一种机制有关: 即正链 DNA 和负链 DNA 直接互补形成 dsDNA, 而该过程不需要 DNA 合成系统参与^[27]。

2.2 DNA 损伤修复系统激活是主要机制

dsDNA 形成之后, 最初以复制形式单体 (Replicative form monomer, Rfm) 存在。Rfm 可能被降解, 也可能自身环化形成单分子环状附加体 (Monomeric circular episome, Mce), 还可能头-头、头-尾、尾-尾串联而形成复制形式二聚体 (Replicative form dimer, Rfd)。Rfd 可环化成连环状附加体 (Concatemeric episome, Ce), 也可与其他 Rfm 或者 Rfd 形成高分子量的串联体 (High molecular weight concatamer, Hmwc), 再环化成多分子的 Ce。各种不同形式的基因组也可与宿主染色体发生整合。环状附加体 Mce 和 Ce 是 rAAV 载体转基因长期表达的最主要形式, MOI 较低时, Mce 较多, 当 MOI 较高时, Ce 较多。不过其他形式的 dsDNA 也具有基因表达的能力, 不同形式的 dsDNA 对基因表达效率的贡献也不同, 这可能与感染时间、感染滴度、细胞和组织类别等有关。无论是串联、环化, 还是整合, 这些过程均需要细胞内 DNA 损伤修复系统的参与。多项研究已经表明, 同源重组修复 (Homologous recombination repair, HRR) 和非同源断裂连接 (Non-homologous end-joining, NHE) 相关机制参与了 AAV dsDNA 串联、环化和整合, 关键分子包括毛细血管扩张-共济失调突变蛋白 (Ataxia-telangiectasia mutated, ATM)、毛细血管扩张-共济失调 Rad3 相关蛋白 (Ataxia-telangiectasia and Rad3-related, ATR)、DNA-蛋白激酶催化亚基 (DNA-protein kinase

catalytic subunit, DNA-PKcs)、DNA 修复蛋白 Ku70、DNA 修复蛋白 Ku80、复制蛋白 A (Replication protein A, RPA)、双链断裂修复蛋白 Mre11 和 NBS1、布卢姆综合症蛋白(Bloom syndrome protein, BLM)、 β 连环蛋白相关蛋白(β -Catenin-related proteins) WRM 和 RAD52、DNA 连接酶(DNA ligase) LIGIII 和 LIGIV、核酸蛋白 Artemis、DNA 聚合酶 δ 及双链 DNA 断裂复合物 MRN 复合物等^[26,34-38]。这些关键分子,都可能影响 rAAV 载体的表达效率。

目前辐射对 DNA 损伤的诱导作用已研究清楚,这种损伤作用既有直接的,又有间接的^[39]。DNA 损伤类型包括碱基损伤、单链断裂(Single strand break, SSB)和双链断裂(Double strand break, DSB)等,可分别通过核苷酸切除修复、DNA 单链断裂修复系统修复和 DSB 修复(DSBR) 系统进行修复。现有证据表明, rAAV 载体的表达效率与核苷酸切除修复、单链断裂修复及错配修复关系不大,而与 DSBR 存在密切联系^[25,40]。拓扑酶抑制剂、 H_2O_2 等都能诱导产生 DSB, 这些药物也被证明都能提高 rAAV 载体的基因表达效率^[12,17]。rAAV 载体进入细胞核后释放 ssDNA, 形成 dsDNA, 其独特的末端 ITR 发夹结构可能被认为是 DSB 信号。辐射诱导细胞产生 DNA 损伤反应, 激活 DSBR, rAAV 载体正好利用这种修复系统促进其基因组以 ITR 为基础进行串联、环化, 甚至与宿主染色体整合, 从而提高基因表达效率。

UVC 射线作用于 DNA, 可特异地使其形成嘧啶二聚体, 主要表现为直接损伤; UVA 的作用主要通过 ROS 实现; UVB 介于 UVA 和 UVC 之间, 其作用机制视波长而定^[18]。UVA、UVB 及 UVC 都能提高 rAAV 载体表达效率^[18], 说明 DNA 直接损伤和间接损伤诱导的修复系统都与 rAAV 载体存在相互作用。Ferrari 等认为, UV 与 E4 ORF6 蛋白的作用类似, 可提高细胞内复制形式(Replicative form, Rf)的水平^[13]。E4 ORF6 是腺病毒表达的一个蛋白, 它可以通过影响 Mre11 (MRN

复合物的一员)而提高基因表达效率。然而, Sanlioglu 等认为 UV 导致细胞环状附加体增加; 而 E4 ORF6 则促使 Rf 增加^[17]。 γ 射线也被证明在多种细胞中可增加 Rf^[24,41-42]。这些研究都证实, 无论是增加 Rf 还是环状 dsDNA, 辐射确实提高了可表达形式基因组的数量。

ATM 在辐射诱导的 DNA 双链断裂的 HRR 途径中具有非常重要的作用, 它可能参与了影响 UVC 对 rAAV 表达效率的过程^[25]。ATM 缺失细胞中, rAAV 载体的表达效率显著增高, 而照射 UV 并不能明显提高其表达效率^[25,40]。ATM 缺失的细胞和 UV 处理的 ATM 表达正常的细胞具有相似的基因表达水平, 表明 UV 提高 rAAV 载体基因表达效率的机制可能与 ATM 有关。ATM 缺失既不影响 rAAV 载体与细胞的结合, 也不影响 rAAV 载体的入核。既不能提高细胞中 ssDNA 的含量, 也不影响 ssDBP 的磷酸化。但 ATM 缺失却可显著提高环状附加体的数量, 这与 UVC 的作用类似^[17,25]。而环状附加体数量的增加幅度与基因表达效率的增加幅度并不一致, ATM 介导的 HRR 途径导致可表达形式的基因组减少可能是 ATM 阳性细胞表达效率低的主要原因^[34]。但 ATM 阳性细胞中 AAV 基因组可能只是暂时处于失活状态, 可重新被 UV 等激活^[25]。

除了 HRR 途径之外, 细胞中还存在两条 NHEJ 途径可修复 DSB, 特别是经典的 NHEJ 途径(C-NHEJ), 它是 DSB 修复的主要途径。C-NHEJ 依赖于 DNA-PK, DNA-PK 活性降低, 细胞中 rAAV 载体的表达能力下降, 这与 ATM 的作用正好相反^[34,43]。虽然 DNA-PK 可能参与了 AAV 基因组的串联、环化和整合过程, 但目前尚无直接证据表明辐射能通过影响这一途径提高 rAAV 载体的表达效率。ATM 缺失的细胞中, C-NHEJ 应该是最主要的 DSB 修复途径, 但是在该类细胞中, UVC 并不能继续提高载体的表达效率, 这似乎说明该类细胞中 UVC 诱导的损伤修复已经存在。但是 ATM 缺失的细胞可能具有较高的本底修复能力, 因此其基因表达效率较

高。按照这样的理论, 我们可推测细胞中本底修复能力越强, rAAV 载体的表达效率越高, 反之, 本底修复能力越弱, rAAV 载体表达效率越低。

3 辐射提高载体表达效率的应用

3.1 光激活基因治疗 (Light-activated-gene therapy, LAGT) 与关节疾病

关节软骨组织多处于人体骨骼的重要功能部位, 一旦缺损, 很难愈合。传统的恢复、置换、缓解和切除关节软骨等疗法被证明基本是无效的。关节内注射生长因子的方法曾一度盛行, 但由于蛋白药物半衰期短, 生长因子在软骨损伤局部很难维持有效的治疗浓度, 常需反复注射。基因治疗可持续表达目的基因的特性使其成为治疗关节疾病的一种理想选择。rAAV 载体在关节软骨中的表达能力有限, 基于 UV 在提高其表达效率方面的巨大作用, 研究人员提出了 LAGT 的概念, 并试图将其应用于关节疾病的基因治疗^[15-16,18-19]。无论是永生化的软骨细胞系 tsT/AC62, 还是原代培养的软骨细胞, UV 辐射都可显著提高载体的表达效率, 其幅度与 MOI、辐射剂量及检测时间都有关, 但是与软骨细胞来源患者的年龄、性别无关^[16]。在体外培养的软骨组织中, UV 可显著提高关节中软骨细胞表达目的基因的能力, 特别是在软骨移植体的外围, 当 $MOI=3.5 \times 10^6$ 时, 阳性细胞从 38% 增加到 84%。在 $MOI=1.1 \times 10^7$ 时, 阳性细胞从 64% 增加到 93%。体内研究表明, UVA 和 UVB 可使膝盖组织中表层的软骨细胞基因表达效率提高近 5–10 倍^[18-19]。

rAAV 载体以其独特的优势被应用于关节炎基因治疗的临床研究, 虽然 LAGT 还未被用于治疗关节疾病, 但其对 rAAV 载体的诱导作用已初步展示了潜在的应用价值。

3.2 γ 射线与肿瘤基因治疗

在 wtAAV 发现之后不久, 其本身的抗肿瘤活性也被发现。wtAAV 感染肿瘤细胞之后, 本身可引起多方面的作用, 如抑制肿瘤细胞增殖、引起细

胞周期发生变化、增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性 & 延迟病毒转化细胞的成瘤性等, 其抗肿瘤机制可能与 Rep 蛋白有关^[44]。早在 1992 年, 研究人员就报道, wtAAV 感染可使肿瘤细胞对 γ 射线作用的敏感性增加^[11]。虽然 wtAAV 本身具有一定的肿瘤抑制活性, 但是 Rep 蛋白对正常细胞具有一定的细胞毒性^[45-46]。因此, 以 wtAAV 本身作为肿瘤治疗药物的研究逐渐减少, 转而开发以其作为载体介导的基因治疗药物。

体外研究表明, γ 射线(40 Gy)可使 rAAV 载体在 Hep3G 细胞中的表达效率提高 38 倍^[41]。体内研究发现, γ 射线(18 Gy)处理之后, 73% 的肿瘤细胞目的基因呈阳性, 较腺病毒与 rAAV 共转导的肿瘤提高近 1 倍(40%)。因此, γ 射线除了具有直接的抗肿瘤作用之外, 还可通过加强 rAAV 载体在肿瘤细胞中的表达效率, 协同 rAAV 基因药物而发挥抗肿瘤作用。利用 rAAV 作为自杀基因 HSVtk 的载体(rAAV-HSVtk), 该基因药物在 GCV 存在下, 可选择性地杀死肿瘤细胞。在 HeLa 细胞和 HEp2 细胞中, γ 射线可显著提高该基因药物的表达效率, 且两者之间具有剂量依赖性^[42]。在 NKO-1 细胞中, γ 射线单独处理, 感染 rAAV-HSVtk 的细胞存活率为 47%, 但如果联合 GCV 治疗, 则只有 15% 的细胞存活^[24]。体内研究发现, γ 射线使肿瘤细胞内目的基因阳性的比例增加了 2.5 倍, 使 HSVtk/GVC 药物的抗肿瘤作用提高了 5 倍^[42]。 γ 射线与 rAAV-endostatin、rAAV-CD40L 及 rAAV-siRNA-Snail 联合应用治疗结肠癌、卵巢癌和胰腺癌同样被证明可提高 rAAV 基因药物的疗效^[46-48]。

4 展望

基因治疗作为一种新的手段, 在肿瘤等疾病的治疗上取得了初步成功。本课题组也在这方面进行了一系列研究, 以 rAAV 为载体开展了针对肝癌、肺癌及结肠癌等进行基因治疗的临床前研究^[49-55]。辐射可提高 rAAV 载体表达效率的这一发现, 为两者的联合应用打开了方便之门。 γ 射线等已经被应

用于肿瘤放疗,其本身就可以杀死肿瘤细胞。辐射可通过激活肿瘤细胞的DNA损伤修复系统,提高rAAV载体的基因表达效率。反过来,rAAV载体本身可以提高细胞对放疗的敏感性,另外,基因载体携带的治疗基因在发挥治疗作用的同时,也可能影响细胞对辐射的敏感性^[56]。两者的有机结合,可以对治疗肿瘤起到协同增效的作用。

然而,在将辐射应用于基因治疗的临床研究之前,还有很多问题需解决。辐射对人体有害,比如在辐射过程中可能伤及正常细胞,如何既保证安全性,又能提高载体的表达效率?辐射的波长不同,提高基因载体表达效率的机制不同,像UV那样,多长的波长是最合适的呢?Myakishev-Rempel等认为311 nm的UV最合适^[18],体内情况是这样的吗?紫外线(UV)、X射线和 γ 射线等辐射会造成基因损伤,在修复过程中又可能存在突变等不稳定因素,所以,运用辐射时必须考虑其对正常细胞和组织的损伤并采用合适的剂量^[57-60]。同时,基因治疗本身存在安全性和有效性还没有得到很好的解决和临床验证。

另外,辐射提高rAAV载体表达效率的机制还有待发掘,大部分的研究结果都只是证明了辐射可提高可表达形式dsDNA的水平,辐射导致rAAV基因组发生变化的分子机制还不太清楚。相信今后对rAAV载体核内基因组行为的深入了解有助于优化辐射与rAAV载体的联合应用,促进基因治疗的研究进展。

参 考 文 献

- [1] Büning H. Gene therapy enters the pharma market: the short story of a long journey[J]. *EMBO Molecular Medicine*, 2013, 5(1): 1-3.
- [2] Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, et al. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis[J]. *The New England Journal Medicine*, 2008, 358(21): 2240-2248.
- [3] 王启钊, 吕颖慧, 肖卫东, 等. 重腺相关病毒载体临床实验研究[J]. *中国生物工程杂志*, 2010, 31(1): 49-53.
- [4] Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-factor IX and limitations imposed by the host immune response[J].

Nature Medicine, 2006, 12(3): 342-592.

- [5] Mingozzi F, Meulenberg JJ, Hui DJ, et al. AAV-1-mediated gene transfer to skeletal muscle in humans results in dose-dependent activation of capsid-specific T cells[J]. *Blood*, 2009, 14(10): 2077-2086.
- [6] Flotte TR, Trapnell BC, Humphries M, et al. Phase 2 clinical trial of a recombinant adeno-associated virus vector expressing alpha 1 antitrypsin: Interim results[J]. *Human Gene Therapy*, 2011, 22(10): 1239-1247.
- [7] Allay JA, Sleep SE, Long S, et al. Good manufacturing practice production of self-complementary serotype 8 adeno-associated viral vector for a hemophilia B clinical trial[J]. *Human Gene Therapy*, 2011, 22(5): 595-604.
- [8] Marks WJ Jr, Bartus RT, Siffert J, et al. Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial[J]. *The Lancet Neurology*, 2010, 9(12): 1164-1172.
- [9] 王启钊, 吕颖慧, 李招发, 等. 腺相关病毒的衣壳装配和DNA衣壳化机制[J]. *生物工程学报*, 2011, 27(4): 531-538.
- [10] Yakobson B, Hrynko TA, Peak MJ, et al. Replication of adeno-associated virus in cells irradiated with UV light at 254 nm[J]. *Journal of Virology*, 1989, 63(3): 1023-1030.
- [11] Walz C, Schlehofer JR, Flentje M, et al. Adeno-associated virus sensitizes HeLa cell tumors to gamma rays[J]. *Journal of Virology*, 1992, 66(9): 5651-657.
- [12] Alexander IE, Russell DW, Miller AD. DNA-damaging agents greatly increase the transduction of nondividing cells by adeno-associated virus vectors[J]. *Journal of Virology*, 1994, 68(12): 8282-8287.
- [13] Ferrari FK, Samulski T, Shenk T, et al. Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors[J]. *Journal of Virology*, 1996, 70(5): 3227-3234.
- [14] Maass G, Bogedain C, Scheer U, et al. Recombinant adeno-associated virus for the generation of autologous, gene-modified tumor vaccines: evidence for a high transduction efficiency into primary epithelial cancer cells[J]. *Human Gene Therapy*, 1998, 9(7): 1049-1059.
- [15] Ito H, Goater JJ, Tiyyapatanaputi P, et al. Light-activated gene transduction of recombinant adeno-associated virus in human mesenchymal stem cells[J]. *Gene Therapy*, 2004, 11(1): 34-41.
- [16] Ulrich-Vinther M, Maloney MD, Goater JJ, et al. Light-activated gene transduction enhances adeno-associated virus vector-mediated gene expression in human articular chondrocytes[J]. *Arthritis Rheum*, 2002, 46(8): 2095-2104.
- [17] Sanlioglu S, Engelhardt JF. Cellular redox state alters recombinant adeno-associated virus transduction through tyrosine phosphatase pathways[J]. *Gene Therapy*, 1999, 6(8): 1427-1437.
- [18] Myakishev-Rempel M, Kuper J, Mintz B, et al. Investigation of the peak action wavelength of light-activated gene transduction[J]. *Gene Therapy*, 2011, 18(11): 1043-1051.
- [19] Maloney MD, Goater JJ, Parsons R, et al. Safety and

- efficacy of ultraviolet-a light-activated gene transduction for gene therapy of articular cartilage defects[J]. The Journal of Bone and Joint Surgery, 2006, 88(4): 753-761.
- [20] Yang J, Hirokawa Y, Dougherty C, et al. Adeno-associated virus vector mediated transduction of primary normal human breast epithelial cells[J]. Oncology Reports, 1998, 5(4): 793-797.
- [21] Duan D, Yue Y, Yan Z, et al. Polarity influences the efficiency of recombinant adenoassociated virus infection in differentiated airway epithelia[J]. Human Gene Therapy, 1998, 9(18): 2761-2776.
- [22] Alexander IE, Russell DW, Spence AM, et al. Effects of gamma irradiation on the transduction of dividing and nondividing cells in brain and muscle of rats by adeno-associated virus vectors[J]. Human Gene Therapy, 1996, 7(7): 841-850.
- [23] Koeberl DD, Alexander IE, Halbert CL, et al. Persistent expression of human clotting factor IX from mouse liver after intravenous injection of adeno-associated virus vectors[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(4): 1426-1431.
- [24] Kanazawa T, Urabe M, Mizukami H, et al. Gamma-rays enhance rAAV-mediated transgene expression and cytotoxic effect of AAV-HSVtk/ganciclovir on cancer cells[J]. Cancer Gene Therapy, 2001, 8(2): 99-106.
- [25] Sanlioglu S, Benson P, Engelhardt JF. Loss of ATM function enhances recombinant adeno-associated virus transduction and integration through pathways similar to UV irradiation[J]. Journal of Virology, 2000, 268(1): 68-78.
- [26] Choi YK, Nash K, Byrne BJ, et al. The effect of DNA-dependent protein kinase on adeno-associated virus replication[J]. PLoS One, 2010, 5(12): 1-10.
- [27] Schultz BR, Chamberlain JS. Recombinant adeno-associated virus transduction and integration[J]. Molecular Therapy, 2008, 16(7): 1189-1199.
- [28] 吕颖慧, 王启钊, 肖卫东, 等. 自身互补型腺相关病毒载体研究进展[J]. 生物工程学报, 2009, 25(5): 658-664.
- [29] Mah C, Qing K, Khuntirat B, et al. Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: role of epidermal growth factor receptor protein tyrosine kinase in transgene expression[J]. Journal of Virology, 1998, 72(12): 9835-9843.
- [30] Qing K, Li W, Zhong L, et al. Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: role of cellular T-cell protein tyrosine phosphatase in transgene expression in established cell lines *in vitro* and transgenic mice *in vivo*[J]. Journal of Virology, 2003, 77(4): 2741-2746.
- [31] Zhong L, Zhao W, Wu J, et al. A dual role of EGFR protein tyrosine kinase signaling in ubiquitination of AAV2 capsids and viral second-strand DNA synthesis[J]. Molecular Therapy, 2007, 15(7): 1323-1330.
- [32] Yoon JH, Prakash L, Prakash S. Highly error-free role of DNA polymerase ϵ in the replicative bypass of UV-induced pyrimidine dimers in mouse and human cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(43): 18219-18224.
- [33] Russell DW, Alexander IE, Miller AD. DNA synthesis and topoisomerase inhibitors increase transduction by adeno-associated virus vectors[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, 92(12): 5719-5723.
- [34] Cataldi MP, McCarty DM. Differential effects of DNA double-strand break repair pathways on single-strand and self-complementary adeno-associated virus vector genomes[J]. Journal of Virology, 2010, 84(17): 8673-8682.
- [35] Choi VW, McCarty DM, Samulski RJ. Host cell DNA repair pathways in adeno-associated viral genome processing[J]. Journal of Virology, 2006, 80(21): 10346-10356.
- [36] Vasileva A, Linden RM, Jessberger R. Homologous recombination is required for AAV-mediated gene targeting[J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(11): 3345-3360.
- [37] Jiang Mx, Zhao Lb, Gamez M, et al. Roles of ATM and ATR-Mediated DNA Damage Responses during Lytic BK Polyomavirus Infection[J]. PLoS Pathogens, 2013, 8(8): 1-12.
- [38] Oh S, Wang Yb, Zimbric J, et al. Human LIGIV is synthetically lethal with the loss of Rad54B-dependent recombination and is required for certain chromosome fusion events induced by telomere dysfunction[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(3): 1734-1749.
- [39] Ikehata H, Ono T. The mechanisms of UV mutagenesis[J]. Journal of Radiation Research (Tokyo), 2011, 52(2): 115-125.
- [40] Zentilin L, Marcello A, Giacca M. Involvement of cellular double-stranded DNA break binding proteins in processing of the recombinant adeno-associated virus genome[J]. Journal of Virology, 2001, 75(24): 12279-12287.
- [41] Peng D, Qian C, Sun Y, et al. Transduction of hepatocellular carcinoma (HCC) using recombinant adeno-associated virus (rAAV): *in vitro* and *in vivo* effects of genotoxic agents[J]. Journal of Hepatology, 2000, 32(6): 975-985.
- [42] Kanazawa T, Mizukami H, Okada T, et al. Suicide gene therapy using AAV-HSVtk/ganciclovir in combination with irradiation results in regression of human head and neck cancer xenografts in nude mice[J]. Gene Therapy, 2003, 10(1): 51-58.
- [43] Inagaki K, Ma C, Storm TA, et al. The role of DNA-PKcs and artemis in opening viral DNA hairpin termini in various tissues in mice[J]. Journal of Virology, 2007, 81(20): 11304-11321.
- [44] Ponnazhagan S, Curiel DT, Shaw DR, et al. Adeno-associated virus for cancer gene therapy[J]. Cancer Research, 2001, 61(17): 6313-6321.
- [45] Zhou CH, Yang QC, Trempe JP. Enhancement of UV-induced cytotoxicity by the adeno-associated virus replication proteins[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression, 1999, 1444(3): 371-383.
- [46] Shi W, Teschendorf C, Muzyczka N, et al. Gene therapy

- delivery of endostatin enhances the treatment efficacy of radiation[J]. *Radiotherapy and Oncology*, 2003, 66(1): 1-9.
- [47] Koppold B, Sauer G, Büning H, et al. Efficient gene transfer of CD40 ligand into ovarian carcinoma cells with a recombinant adeno-associated virus vector[J]. *International Journal of Oncology*, 2005, 26(1): 95-101.
- [48] Zhang KJ, Jiao XL, Liu XY, et al. Knockdown of snail sensitizes pancreatic cancer cells to chemotherapeutic agents and irradiation[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2010, 11(12): 4891-4892.
- [49] Shi J, Liu YX, Zheng Y, et al. Therapeutic expression of an anti-death receptor 5 single-chain fixed-variable region prevents tumor growth in mice[J]. *Cancer Research*, 2006, 66(24): 11946-11953.
- [50] Cai K, Tam P, Xu RA, et al. Suppression of lung tumor growth and metastasis in mice by recombinant adeno-associated virus-mediated expression of vasostatin[J]. *Clinical Cancer Research*, 2008, 14(3): 939-949.
- [51] Shi J, Liu Y, Guo J, et al. Expression of an anti-DR5 single chain antibody in muscles of nude mice prevents lung cancer growth[J]. *Cancer Research*, 2006, 66(24): 11946-11953.
- [52] Shi J, Zheng D, Liu Y, et al. Over-expression of soluble tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induces apoptosis in human lung adenocarcinoma and inhibits growth of tumor xenografts in nude mice[J]. *Cancer Research*, 2005, 65(9): 1687-1692.
- [53] Xu RA, Sun X, Tse LY, et al. Long-term expression of angiostatin and suppression of liver metastatic cancer[J]. *Hepatology*, 2003, 37(6): 1451-1461.
- [54] 刁勇, 马健, 李欣燕, 等. 表达血管抑制因子的腺相关病毒载体的构建及其体内外活性[J]. *生物工程学报*, 2008, 24(11): 1949-1954.
- [55] Ma H, Liu Y, Liu S, et al. Oral adeno-associated virus-sTRAIL gene therapy suppresses human hepatocellular carcinoma growth in mice[J]. *Hepatology*, 2005, 42(6): 1355-1363.
- [56] Zhou PK, Sun Y, An J. Interaction between viral proteins and hosts and its disturbance in the cellular responses to ionising radiation[J]. *International Journal of Radiation Biology*, 2009, 85(7): 587-597.
- [57] Robbins MEC, Zhao W. Chronic oxidative stress and radiation-induced late normal tissue injury: a review[J]. *International Journal of Radiation Biology*, 2004, 80(4): 251-259.
- [58] Lorimore SA, Write EG. Radiation-induced genomic instability and bystander effects: related inflammatory-type responses to radiation-induced stress and injury? A review[J]. *International Journal of Radiation Biology*, 2003, 79(1): 15-25.
- [59] Yan Sq, Brown SL, Kolozsvary A, et al. Mitigation of radiation-induced skin injury by AAV2-mediated MnSOD gene therapy[J]. *The Journal of Gene Medicine*, 2008, 10(9): 1012-1018.
- [60] Zelefsky MJ, Leibel SA, Gaudin PB, et al. Dose escalation with three-dimensional conformal radiation therapy affects the outcome in prostate cancer[J]. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 1998, 41(3): 491-500.