

可诱导慢病毒载体的优化策略及应用

黄芳 王毅刚 蔡荣 杨光华 钱程*

(浙江理工大学生命科学院, 新元医学与生物技术研究所, 杭州 310018)

摘要 以1型人免疫缺陷病毒(HIV-1)为基础构建的慢病毒载体具有可感染非分裂细胞、免疫反应小、携带的基因片段容量大和可整合进宿主基因组而长期表达等优点, 因而成为最理想的基因转移载体之一。可诱导慢病毒载体介导的可诱导基因表达系统能够有效控制目的基因表达, 扩大了慢病毒载体的临床应用潜能, 成为很有前景的基因治疗载体。主要介绍带有四环素和其他几种诱导系统的可调控性慢病毒载体及其改进, 以及可诱导慢病毒载体在RNA干扰中的应用。

关键词 慢病毒载体; 可诱导; 基因治疗

随着对人类疾病发生的基因水平认识的逐步加深, 基因治疗已经成为治疗肿瘤和遗传病等难治性疾病的有效方法。目前用于基因治疗的载体大多数为病毒载体。以1型人免疫缺陷病毒(HIV-1)为代表的慢病毒载体具有可感染非分裂细胞、免疫反应小和可整合进宿主基因组长期表达等优点, 适于体内基因治疗, 因而成为新一代的高效基因转移载体研究热点。

然而, 发展应用于临床基因治疗的慢病毒载体, 要求能够严格控制目的基因的表达, 并确保治疗有效性和减少毒副作用。利用可诱导基因表达系统构建的可调控型慢病毒载体, 依赖无毒性小分子药物或激素在转录水平上能有效控制目的基因定时定量地表达, 扩大了慢病毒载体用于基因治疗的潜能。因此, 可诱导慢病毒成为极有前景的基因治疗载体, 也是当前慢病毒载体研究的新焦点。

1 慢病毒的结构特征及载体应用

慢病毒属于逆转录病毒科, 与一般逆转录病毒相比, 其基因组结构更为复杂。以HIV-1为典型代表的慢病毒, 其基因组包含3个结构基因gag、pol、env, 4个辅助基因vif、vpr、nef、vpu和2个调节基因tat、rev, 并且在病毒基因组的5'端和3'端各有一段相同的核苷酸序列, 称为长末端重复序列(long terminal repeat, LTR)。结构基因gag编码病毒核心蛋白, pol基因编码病毒复制所需要的酶, env基因则编码病毒的包膜糖蛋白; 调节基因tat和rev编码的蛋白质分别在转录及转录后水平调控病毒基因表达; 辅助基因vpu参与病毒颗粒的组装, vif基因编码的蛋白质与病毒的感染性有关, nef基因编码负调节蛋白, 对结构和调节基因的表达有下调作用, vpr基因编码的

产物参与形成整合前复合物。

近年来, 以慢病毒为载体的基因治疗研究发展非常迅速。从第一代慢病毒载体的应用至第三代慢病毒载体系统的改进以及自我灭活型慢病毒载体系统(self-inactivation vectors, SIN)的产生, 通过逐步去除野生型病毒基因组中的致病基因而大大提高了其生物安全性。第一代慢病毒载体系统的构建以Naldini等^[1]应用的三质粒系统为代表, 由包装, 包膜及载体质粒组成, 生产慢病毒的同时降低了野生型病毒产生的可能。在此基础上, 应用水泡性口炎病毒G蛋白(VSV-G)包膜构建的假构型慢病毒载体, 其病毒滴度和病毒感染能力都得到了提高, 使之能够感染原代肝细胞、外周血淋巴细胞和成纤维细胞等。为进一步降低野生型病毒产生的可能性, 第二代慢病毒载体系统又去除包装质粒中的4个辅助基因。结果表明不但没有降低病毒滴度, 而且增加了生物安全性^[2]。第三代慢病毒载体系统的构建是在三质粒系统基础上增加一个含rev基因的质粒而形成四质粒载体系统^[3]。改进后的系统进一步减少了HIV-1包装所需的序列同源性结构, 且对病毒滴度和转导效率都没有影响。SIN慢病毒系统将病毒基因组3'端LTR中U3区的增强子和启动子序列去除, 使LTR区的转录激活能力下降, 并使得所形成的载体缺少HIV增强子和启动子而产生失活的前病毒, 因此消除了对外源启动子的干扰作用和对下游基因组中原癌基因的激活^[4]。目前, 人

收稿日期: 2007-05-28 接受日期: 2007-07-21

国家高技术研究发展计划(863计划)(No.2006AA02Z126), 国家重点基础研究发展规划(973计划)(No.2004CB518804)和浙江省自然科学基金(No.Y205282)资助

* 通讯作者。Tel: 0571-86843186, Fax: 0571-86843185, E-mail: cqian3184@yahoo.com.cn

们已成功应用慢病毒载体有效感染造血干细胞、神经细胞、肝细胞、视网膜色素上皮细胞和肌肉细胞及进行相应疾病的治疗等,尤其在血液系统疾病治疗中有广泛的应用,如血友病、白血病、Fanconi 贫血症和镰刀状细胞贫血症等。

2 几种可诱导慢病毒载体系统及其改进

为进一步提高慢病毒载体的基因表达调控效率、扩大治疗应用范围和增强生物安全性,近年来,研究者们把可诱导基因表达系统应用于慢病毒载体并且作了进一步的结构改进,主要包括以下几个系统。

2.1 四环素诱导型慢病毒载体

目前应用最广泛的诱导系统为四环素诱导的慢病毒载体系统。该系统是利用大肠杆菌转座子 Tn10 的四环素抗性操纵子为基础而构建的,其反式激活因子(transactivator) tTA 和 rtTA 由四环素抑制蛋白的 DNA 结合区与 VP16 的转录激活区融合形成^[5]。利用反式激活因子 tTA 或 rtTA 的调控系统分别称为 Tet-off 系统或 Tet-on 系统。在 Tet-off 系统中,去除四环素或其类似物时,tTA 的 tetR 区能介导 tTA 与 tetO 特异结合,从而开启基因转录;反之,当加入四环素或其类似物时,引起 tetR 结构改变,rtTA 不能与 tetO 特异结合,关闭基因转录。与 Tet-off 系统相比,Tet-on 系统通过突变 tetR 的四个氨基酸使其作用逆转,即当四环素或其类似物存在时,rtTA 才可与 tetO 结合启动转录(图 1)。与其他调控系统相比,四环素调控系统在临床应用中具有以下优势^[6-8]:第一,其诱导剂强力霉素对人体无害,已被广泛作为抗生素使用;第二,强力霉素为脂溶性,容易渗透细胞和组织;第三,体内实验中,目的基因的表达可依赖强力霉素实现快速开启或关闭的转换,且单个细胞的基因表达水平与强力霉素呈剂量相关;第四,该系统已成功应用于许多病毒或非病毒载体以调控不同基因表达。

Kafri 等^[9]构建了一个包含完整四环素调控系统的可诱导慢病毒载体,其携带的报告基因 GFP 和反式激活因子分别在可诱导启动子和 CMV 的控制下表达。当该可诱导慢病毒载体体外转导 HEK293 细胞后,加入诱导剂仅有低水平的 GFP 表达;而去除诱导剂后,GFP 的表达则提高 500 倍。进一步的体内实验通过转导鼠脑组织,结果终末分化神经元中可见 GFP 的表达,而在鼠的饮水中加入或去除诱导剂,可观察到 GFP 的抑制或表达。此外,实验中还发现少量不被诱导剂控制的 GFP 表达,其原因可能受邻近 CMV 启动子或者 HIV U3 区增强子影响。运用 U3 区增强子缺失的 SIN 慢病毒载体构建的可诱导载体系统则能降低本底水平(basal activity)表达。目前几乎所有可诱导慢病毒载体都是在 SIN 慢病毒载体基础上构建的。

为降低本底水平表达,Haack 等^[10]构建了几组单个载体(single lenti-vector)系统,并分析得出顺式作用元件 -CMV 启动子在本底水平表达中是最主要因素,其次四环素诱导的启动子也起到较小作用。在此基础上,他们又构建了双载体(binary lenti-vector)系统。通过感染 293T 细胞,双载体系统的本底水平表达明显降低,并且基因表达的最大量也有所增加,诱导系数达到 100 多倍。然而,由于双载体系统介导的基因表达严格依赖于两个单载体同时感染一个细胞,因而限制其在体内实验中的效率。Haack 等又进一步将四环素诱导的启动子移到 3' 端 LTR 的 U3 区,目的基因放在 CMV 启动子的 5' 端,产生了第二代单个慢病毒载体系统(图 2)。此载体系统不仅维持了高水平的基因表达,同时本底水平表达很低。此外,他们将 tTA 中 VP16 的转录激活区换成人 NF- κ B 转录因子的 P65 转录激活区产生的新反式激活因子 tT65 而构建的慢病毒载体,转染不同种类细胞尤其是 CWR-R1 细胞后导致高水平的基因表达。

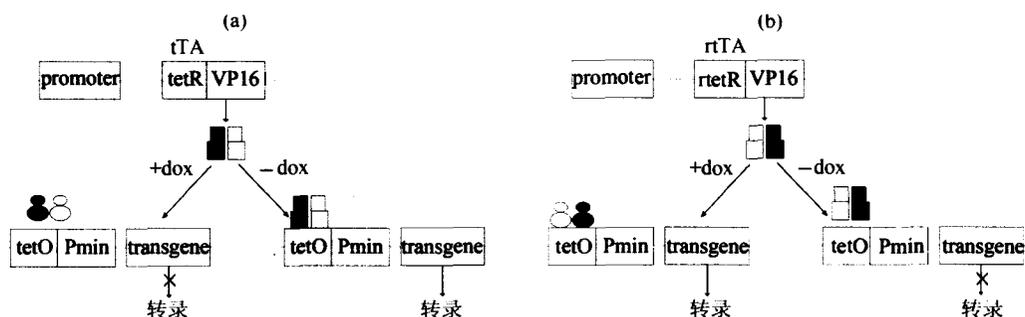


图 1 四环素调控系统^[5]

a: Tet-off 系统; b: Tet-on 系统。

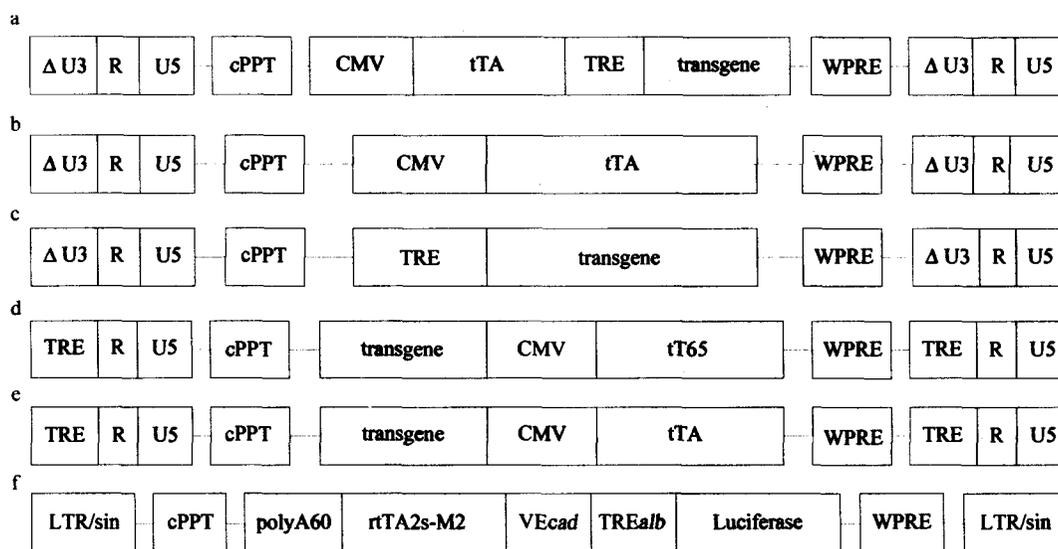


图2 不同结构的四环素可诱导慢病毒载体^[10]

a: 第一代单载体系统, 其中 U3 区缺失; CMV 启动子控制 tTA, TRE 启动子控制外源基因; b、c: CMV 启动子控制 tTA 或 TRE 启动子控制外源基因两个表达框分别位于两个载体而构建的双载体体系; d、e: 第二代单载体体系, 其中 CMV 启动子控制反式激活因子(tT65 或 tTA), TRE 启动子位于 U3 区, 外源基因位于 CMV 启动子的 5' 端; f: 祖/干细胞特异的可调控单个慢病毒载体, 其中鼠血管内皮特异启动子(VEcad)控制的反式激活因子(rtTA2s-M2)表达框反向插入慢病毒载体中。

近来, pluta 等^[11]通过改造四环素诱导的慢病毒载体而构建了新型双载体体系, 并在此基础上做了进一步的改进。他们在含有应答框的慢病毒载体 3' 端 LTR 中插入鸡 β - 球蛋白 cHS4 绝缘子元件, 结果降低了本底水平, 但当加入强力霉素时, 其基因表达水平比没有绝缘子有所降低。此外, pluta 等又通过第二代可诱导启动子替换掉原来的可诱导启动子, 不但本底水平表达减少, 而且诱导效率达到 522 倍。Kühnel 等^[12]证明用自动调节环(auto regulatory loop)控制 tTA 能得到高滴度的慢病毒载体, 并且转染高分化肝癌细胞后能有效控制基因表达, 为肝癌的治疗研究奠定了基础。Markusic 等^[13]进一步比较在单个慢病毒载体中分别用自动调节环和组成型(constitutive)启动子 CMV 控制反式激活因子 rtTA, 结果发现前者的作用优于后者, 不仅提高了安全性, 且增加了病毒滴度和诱导效率。然而, 其缺点是开启基因表达需要高浓度的诱导剂, 这给体内治疗带来难题。因此, 通过使用 rtTA 的突变体 rtTA3 以降低开启基因表达所需的诱导剂量, 为该载体系统在体内的治疗应用打开新的思路。

最近, 我们实验室构建了几种不同结构的四环素可诱导慢病毒载体系统, 并且证实了其有效感染内皮细胞的应用(图 2f, 待发表)。与反式表达框同向相比, 构建的反式表达框反向的 SindLuc-A1 载体体外转染 Huvec 和 HeLa 细胞具有低本底水平和高诱导效率(17.7~73 倍), 因而其被认为是最好的可诱导载体

之一。尽管该载体中的反式因子表达框是反向的, 但并不影响慢病毒载体的生产。此外, 为避免插入的 poly(A)影响慢病毒载体生产, 我们还合成了最小 60 个碱基的单向 polyA60。由于慢病毒包装容量限制, 该 polyA60 结构将会得到广泛运用。

总之, 为降低本底水平表达和提高调控系统的诱导效率, 对四环素诱导型慢病毒载体的改进主要体现在以下方面: 第一, 利用组织特异性启动子控制反式激活因子, 从而限制外源基因只在特定组织中表达。例如, 运用鼠血管内皮细胞特异启动子(murine vascular endothelial cadherin promoter, mVEcad)可控制反式激活因子特异性表达于内皮细胞。此外, 由于本底水平高低与调控反式激活因子的启动子强弱正相关, 因此可以选用相对较弱的组织特异性启动子。如在治疗肝癌过程中, 利用人血液结合素基因启动子(promoter of human hemopexin gene, Phpx)调节反式激活因子, 使得本底水平降低而诱导效率提高^[6]。第二, 运用反式激活因子的突变体(rtTA2s-M2)。当不加诱导剂时, rtTA2s-M2 与 tetO 区结合能力下降, 同时对强力霉素有更高的灵敏性, 达到相同基因表达水平只需要少 10 倍的诱导剂量^[14-16]。第三, 改进外源基因的可诱导启动子。例如, 第二代可诱导启动子缩短了 CMV 最小启动子并且包含八个四环素操纵子序列^[17]。又如, 利用鼠清蛋白 5' 端基因区的 196 bp 启动子代替 CMV 最小启动子而构建的新型可诱导启

动子,取得了理想的实验效果^[6]。第四,加入诱导抑制子也能降低本底水平表达。抑制子由四环素抑制蛋白和人Kox-1蛋白^[18]或人Mad-1蛋白^[19]的转录抑制区构成。受慢病毒载体包装能力的限制,同时加入的抑制蛋白可能与内源因子作用影响细胞功能,从而限制其在可诱导慢病毒载体中的应用^[19]。

2.2 蜕皮激素调控型慢病毒载体

由于四环素诱导的慢病毒载体存在其本身固有的缺点,如较高的本底水平、基因表达调控的诱导效率不高、四环素在体内难于清除以及反式激活因子(tTA 或 rtTA)为异种蛋白,在机体内可能引起毒性或免疫反应等,因此一定程度上限制了其应用。近年来,研究者构建的蜕皮激素调控型慢病毒载体系统可望弥补这些不足。

蜕皮激素可诱导慢病毒载体系统由蜕皮激素调控系统插入到 SIN 慢病毒载体构建而成。由于蜕皮类固醇激素为亲脂性化合物,可快速有效的进入各种组织,且不易在体内残留,是一种理想的基因表达诱导物。因此,该可诱导慢病毒载体具有明显的蜕皮激素调控系统自身优势。为了减少内源性类固醇激素和哺乳动物细胞核受体的干扰,在哺乳动物细胞中调控基因表达,运用果蝇蜕皮激素受体可构建一个蜕皮激素应答开关。其原理为,经修饰的蜕皮激素受体

因子 VgEcR(包含一个 DNA 结合区和一个 VP16 激活区)在蜕皮激素或其类似物存在时,与天然配体类似物 RXR(retinoid X receptor)形成异源二聚体 VgEcR-RXR,该二聚体激活含其效应因子(response element)E/GRE 的启动子,从而启动目的基因表达(图 3 a)。最近, Galimi 等^[20]构建了几种蜕皮激素诱导的慢病毒载体。其包括可诱导蜕皮激素启动子调控 GFP、CMV 启动子调控反式激活因子而构成的单个慢病毒载体和将应答、调控表达框放在两个慢病毒载体上的双载体系统(图 3)。体外实验表明,无论是单个慢病毒载体还是双载体诱导系统,其本底水平都很低,诱导效率很高,是一种诱导很严密的基因表达调控系统。当效应物存在时,双载体诱导系统体外转导 293T 和 293-ERV 细胞后导致高水平的 GFP 表达,而单载体系统的 GFP 表达水平比双载体低。为找出单载体和双载体系统在诱导 GFP 表达水平不同的原因, Galimi 等人又建立了表达双荧光的载体。通过加入诱导剂,可观察到可诱导启动子控制的荧光表达,而 CMV 控制的荧光则没有表达,这说明单载体系统中启动子之间存在干扰。同样, Northern 印迹方法也证实了单载体系统中存在的这种干扰。此外,用双载体诱导系统转导鼠造血干细胞移植模型,没有观察到与蜕皮激素相关的毒副作用。然而双载体慢病毒系统不是体内

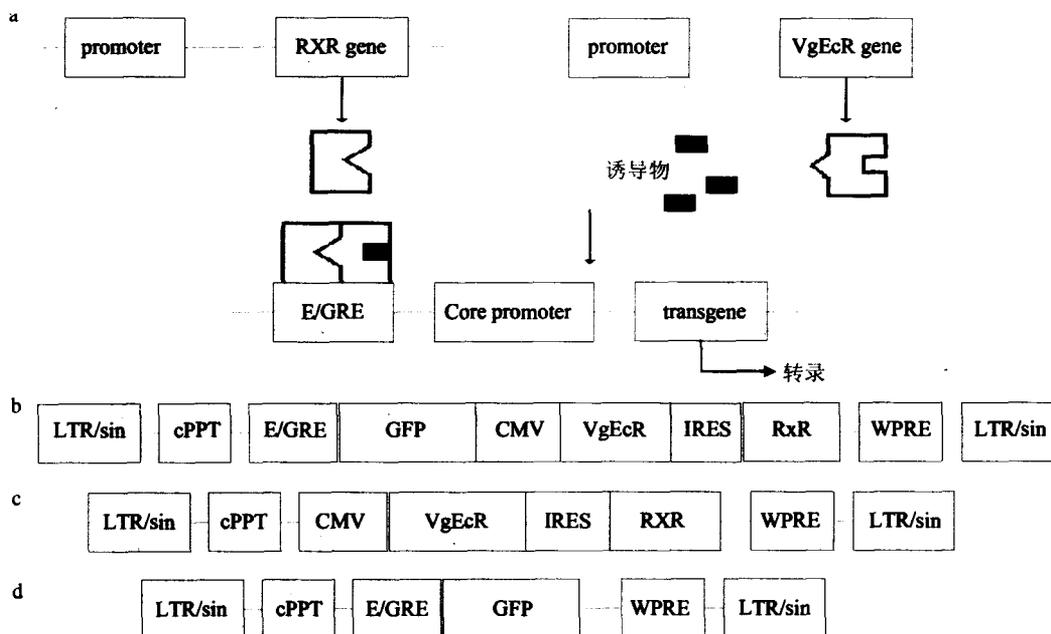


图 3 蜕皮激素调控系统和不同的蜕皮激素可诱导慢病毒载体结构图^[20]

a: 蜕皮激素调控系统原理图。其中,受体因子 VgEcR 与天然配体类似物 RXR 形成异源二聚体 VgEcR-RXR,在蜕皮激素等诱导物存在时激活 E/GRE 启动子,启动基因表达。b: 单载体系统; c、d: CMV 控制 VgEcR-RXR 或 VgEcR-RXR 应答的启动子控制 GFP 两个表达框分别位于两个载体而构建的双载体体系。

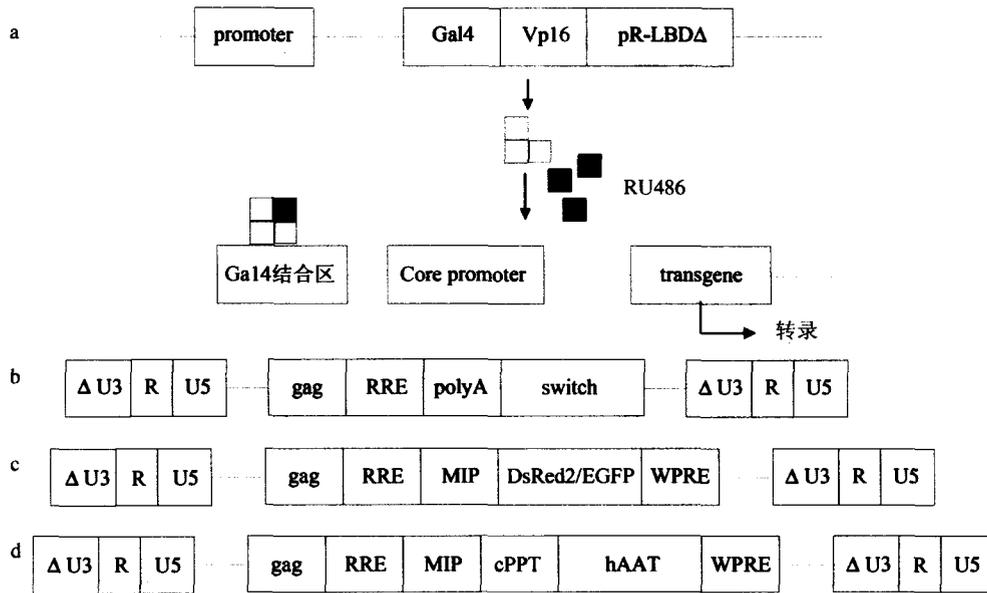


图4 RU486 诱导系统和 RU486 可诱导慢病毒载体结构图^[21]

a: RU486 调控系统原理图。其中反式激活因子 GLVP 由 Gal4、Vp16 和 PR-LBDA 组成; b: 表达反式激活因子 GLVP 的慢病毒载体, 其中 switch 表示启动子控制反式激活因子的表达框; c: RU486 可诱导的启动子控制报告基因表达的慢病毒载体, 其中 MIP 表示 RU486 可诱导的启动子; d: RU486 可诱导的启动子控制人 $\alpha 1$ 胰岛素基因(hAAT)表达的慢病毒载体。

基因治疗的理想方法, 但是能够为 *ex vivo* 治疗提供合理的平台。

2.3 RU486 诱导型慢病毒载体

RU486 系统利用人孕酮拮抗物 RU486(mifepristone) 做诱导剂, 其被用于腺病毒和 HSV 载体时, 只需加入少量 RU486 就可与启动子上游的转录子结合而启动转录的进行, 调控目的基因表达灵敏而有效, 提高了安全性和疗效。因此, RU486 系统在慢病毒载体中也具有广阔的应用潜能。

RU486 诱导型慢病毒载体系统原理为其反式激活因子 GLVP 由突变的人孕酮受体(HPRB891)的配体结合区(PR-LBDA)、酵母 GAL4 DNA 结合区和 VP16 转录激活区三者融合而成。PR-LBDA 不能与孕酮结合, 但能与孕酮拮抗物 RU486 结合。当加入 RU486 时, 反式激活因子 GLVP 与最小启动子上游的 GAL4 DNA 结合位点结合, 从而开启转录; 而孕酮及其他内源性激素无法与 PR-LBDA 结合, 不能开启转录(图 4)。实验证明, 低剂量的 RU486 即可诱导目的基因表达。同时 RU486 具有进入组织速度较快、半衰期较短和毒性较小等优点。因此, 利用 RU486 诱导系统和 SIN 慢病毒载体相结合, 应用前景广泛。Sirin 等^[21]构建了 SIN 慢病毒载体与 RU486 诱导系统相结合的基因诱导表达双载体体系。其中, 反式激活因子表达框反向克隆于慢病毒载体构成最优化的诱导

体系(图 4)。结果显示, 该诱导系统的效率很高。加入 RU486 时, GFP 和 RFP 基因表达分别增加 41 至 275 倍, 同时本底水平表达也很低。此外, 体外转染 HeLa 和 huH7 细胞时, 在 RU486 的诱导下人 $\alpha 1$ 胰岛素基因的表达量也增加 48 倍。这些数据表明, 将 RU486 诱导系统应用于 SIN 慢病毒载体而构建的新型基因表达调控系统为更广泛的体内基因治疗奠定了可靠的基础。

2.4 其他类型的可诱导慢病毒载体

目前, 除上述可诱导型慢病毒载体系统外, 许多研究者也尝试应用其它类型的可诱导载体系统, 包括类固醇激素和 Cre 重组酶双调控载体系统、链阳性菌素诱导慢病毒载体系统和大环内酯物诱导载体系统等。

最近, Siprashvili 等^[22]构建了一种由肾上腺皮质类固醇激素和 Cre 重组酶双调控的携带促红细胞生成素基因(Epo)的慢病毒载体系统(图 5)。该慢病毒通过注射入免疫缺陷老鼠再生的人体皮肤后, 局部加入激素可以在启动子水平调控 Epo 的表达和红血球的含量。同时通过停止加入肾上腺皮质激素和经由 4-羟基他莫昔芬(4-hydroxytamoxifen)诱导的 Cre 重组酶调控宿主基因组中前病毒的删除, 可以导致基因传输的停止。这些研究建立了一种可在人体皮肤组织中实现持续、可局部调控治疗蛋白表达的全身传输方

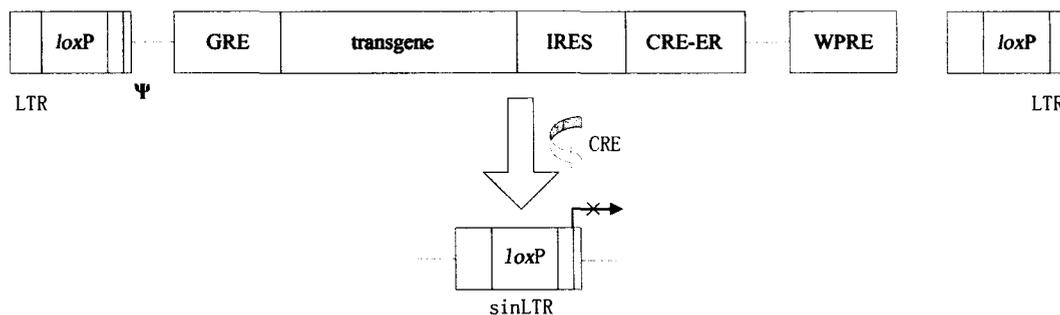


图5 类固醇激素和 Cre 重组酶双调控慢病毒载体^[22]

GRE 为糖皮质激素可诱导启动子, 由 5 个糖皮质激素应答元件和 2 型腺病毒晚期启动子构成; Cre-ER 为雌激素受体(ER)与重组酶 Cre 的融合基因。Cre-ER 由 4- 羟基他莫昔芬进行调控, 进而识别 loxP 区域, 将两个 loxP 位点间的整段基因切除。

法, 解决了重组治疗蛋白需要重复注射和外源基因传输和调控存在一定困难的难题, 为包括肾性贫血症在内的人体许多疾病的治疗提供了一个很好的平台。

近来, Mitta 等^[23]设计了最新一代的链阳菌素诱导(streptogramin-adjustable)的 SIN 慢病毒载体。该慢病毒载体系统由携带组成型链阳菌素依赖的反式激活因子(PIT)和 PIT 调控的外源基因表达框的双慢病毒载体系统组成, 其中目的基因由其 5' 端链阳菌素调控的启动子(P_{PIR8})控制。研究表明, 该载体携带报告基因、分化调节因子(人 C/EBP- α)和人 VEGF 基因转染啮齿类细胞(CHO-K1)、人细胞株(HT-1080, K-562)、人和小鼠原代细胞(NHDF, PBMC, CD4⁺)及鸡胚后, 不但可调节胞内及分泌型蛋白的表达、调控肌肉祖细胞向脂肪细胞或造骨细胞的分化, 还可精确调节鸡胚的血管生成。最近, 他们又设计了一种大环内酯物(macrolide)可逆调节人血管内皮生长因子 121(VEGF₁₂₁)的诱导型慢病毒载体系统^[24]。比较四环素和链阳菌素诱导系统, 该慢病毒载体可转导各种哺乳细胞和不同的人原代细胞, 并且转导鸡胚后能够更精确地调控 VEGF₁₂₁ 表达, 使新生血管形成严格依赖于诱导物的量, 为慢病毒介导的外源基因在体内的精确调控提供了佐证。

3 可诱导慢病毒载体在 RNA 干扰中的应用

最近, 应用可诱导慢病毒载体介导 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)抑制相关基因表达在基因治疗领域广受关注。与其他载体相比, 利用可诱导慢病毒载体介导外源 RNAi 序列的策略具有许多优势, 其中较显著的是可产生持续而稳定的诱导靶基因沉默作用。以组织器官缺损的再生与生理性修复以及活体组织器官的再造与功能重建为主要目的的再生

医学的最大障碍是因 HLA 的多态性而导致的免疫排斥反应。针对该问题, Figueiredo 等^[25]设计了包含 HLA 轻链或重链 RNAi 序列的可诱导表达框的慢病毒载体。加入诱导物后, 该载体转导 HeLa 和 B 淋巴细胞可使 I 类 HLA 抗原被抑制达 90%, 因而有效抑制活化的 Tc 和 B 细胞产生抗体杀伤移植细胞。Shin 等^[26]在慢病毒载体介导单个或多个外源 RNAi 序列的诱导表达基础上构建 shRNA(short hairpin RNAs)和外源基因共调节表达的载体系统。当转导 RAW 细胞时, 加入 Dox 后结果显示 G β 2 被完全沉默不表达而同时 GFP 表达迅速增加。该系统能够同时调控内源和外源基因表达, 为慢病毒在基因治疗中的应用打开了新的思路。为提高 RNAi 表达调控的效率和减少慢病毒整合位点附近或下游原癌基因的激活, Amar 等^[27]对可诱导慢病毒载体进行改进, 构建了靶向 GFP 的可调控表达 RNAi 的单个慢病毒载体。其改进在于①应用新型反式激活因子, 由原反式激活因子 rTA2-M2^[15]的 DNA 结合区与 Oct-2Q(Q-A)激活区^[28]组成; ② PGK 启动子控制反式激活因子; ③ 7 个四环素操纵子序列替换人 U6 启动子的 Staf 和 Oct-1 区形成四环素可诱导的 RNA 聚合酶 III 型启动子。该载体转导表达 GFP 的 293T 衍生细胞, 观察到 GFP 表达量减少 90%。近来一些研究表明, 剔除 p53 能有效抑制亨廷顿(Huntington)疾病动物模型的神经退行性病变^[29], 因此下调 p53 表达为治疗此类疾病开辟了一个新途径。针对 p53 基因设计的 shRNAi 序列在慢病毒载体介导下使内源性 p53 在 293T、MCF-7 和 A549 细胞中均被抑制。Tiscornia 等^[30]通过 Cre-LoxP 系统控制 Pol III 启动子, 能达到高效调控 RNAi 的目的。

4 小结与展望

一般来说,一个高效的可诱导系统要求其不能与内源基因的转录发生干扰,相关组成元件免疫原性小,并且能够被小的无毒诱导物分子严密调控。尽管上述可诱导慢病毒载体系统在体外和体内研究中取得了很好的效果,然而其应用于临床试验还有一段很长的路,需要进一步提高目的基因的表达调控效率,严格控制其生物安全性。虽然至今未见复制型病毒产生的报道,但并不意味慢病毒载体是绝对安全的。此外,慢病毒的整合位点不仅影响可诱导载体的本底水平表达而且影响其在特定组织中的诱导表达,因此发展定点整合的慢病毒载体对于提高可诱导慢病毒载体应用于临床治疗的安全性和高效性有极大的促进作用。由此可见,可诱导型慢病毒载体系统在人体疾病的治疗中必将有更加美好的应用前景。

参考文献(references)

- [1] Naldini L *et al. Science*, 1996, **272**: 263
- [2] Iwakuma T *et al. Virology*, 1999, **261**: 120
- [3] Dull T *et al. J Virol*, 1998, **72**: 8463
- [4] Zufferey R *et al. J Virol*, 1998, **72**: 9873
- [5] Kistner A *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 10903
- [6] Zabala M *et al. Cancer Res*, 2004, **64**: 2799
- [7] Aurisicchio L *et al. Gene Ther*, 2001, **8**: 1817
- [8] Kringstein AM *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 13670
- [9] Kafri T *et al. Mol Ther*, 2000, **1**: 516
- [10] Haack K *et al. Mol Ther*, 2004, **10**: 585
- [11] Pluta K *et al. J Gene Med*, 2005, **7**: 803
- [12] Kühnel F *et al. Nucleic Acids Res*, 2004, **32**: e30
- [13] Markusic D *et al. Nucleic Acids Res*, 2005, **33**: e63
- [14] Lamartina S *et al. Hum Gene Ther*, 2002, **13**: 199
- [15] Urlinger S *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 7963
- [16] Baron U *et al. Nucleic Acids Res*, 1997, **25**: 2723
- [17] Agha-Mohammadi S *et al. J Gene Med*, 2004, **6**: 817
- [18] Deuschle U *et al. Mol Cell Biol*, 1995, **15**: 1907
- [19] Jiang W *et al. J Biol Chem*, 2001, **276**: 45168
- [20] Galimi F *et al. Mol Ther*, 2005, **11**: 142
- [21] Sirin O *et al. Gene*, 2003, **323**: 67
- [22] Siphshvili Z *et al. Mol Ther*, 2004, **9**: 93
- [23] Mitta B *et al. Nucleic Acids Res*, 2004, **32**: e106
- [24] Mitta B *et al. J Gene Med*, 2005, **7**: 1400
- [25] Figueiredo C *et al. Transfusion*, 2007, **47**: 18
- [26] Shin KJ *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, **103**: 13759
- [27] Amar L *et al. Nucleic Acids Res*, 2006, **34**: e37
- [28] Das G *et al. Nature*, 1995, **374**: 657
- [29] Bae BI *et al. Neuron*, 2005, **47**: 29
- [30] Tiscornia G *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**: 7347

Application and Optimizational Strategy for Inducible Lentiviral Vectors

Fang Huang, Yi-Gang Wang, Rong Cai, Guang-Hua Yang, Cheng Qian*

(Institute of Xinyuan Medicine and Biotechnology, School of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract As human immunological virus type-1 (HIV-1) based lentiviral vector holds the characteristics of transfection to non-dividing cells, low rate of immunological response, larger capacity of transfer gene fragments and integrating into host genome for long-term expression of therapeutic gene, therefore it becomes one of the idealest gene transfer vectors in gene therapy. Transgene expression could be efficiently controlled by using the inducible lentivectors incorporating regulatable system, which expands the potential of lentivectors for a wide array of clinical gene transfer application, therefore it becomes a potential viral vector in gene therapy. Improvements of tetracycline and other kinds of inducible lentivector, and its application in gene therapy for RNA interference are emphasized in this review.

Key words lentiviral vector; inducible; gene therapy

Received: May 28, 2007 Accepted: July 21, 2007

The work was supported by the National High-Tech Research and Development Program of China (863 Program) (No.2006AA02Z126), the National Basic Research Program of China (973 Program) (No.2004CB518804) and the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.Y205282)

*Corresponding author. Tel: 86-571-86843186, Fax: 86-571-86843185, E-mail: cqian3184@yahoo.com.cn