

用慢病毒载体制备转基因动物的研究进展*

邓继先^{1**} 沈伟^{1,2}

(1 军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071 2 西北农业大学动物科技学院 杨凌 712100)

摘要 慢病毒是逆转录病毒的一种,具有逆转录病毒的基本结构,但也有不同于逆转录病毒的组分和特性,作为基因治疗载体发展起来,最近已用于转基因动物制备。慢病毒像其它逆转录病毒一样,其基因组经逆转录后能整合在宿主 DNA 上;由于病毒载体经改构后,不在宿主细胞增殖,不会导致寄主细胞的死亡,被它感染的或转化的动物细胞能够连续传代;这种载体的最大优势是能感染静止细胞和不产生嵌合体动物。详细介绍了慢病毒载体构建原理、近年慢病毒载体在转基因动物制备方法和应用研究的新进展。

关键词 慢病毒载体 转基因动物 逆转录病毒

慢病毒 (Lentivirus) 属于逆转录病毒科 (Retroviridae), 为 RNA 病毒, 由于这类病毒的一个重要特点是毒粒中含有依赖 RNA 的多聚酶即逆转录酶, 故现名为逆转录病毒。在这一科里还包括一些 RNA 肿瘤病毒 (RNA tumorviruses), 白血病毒 (Leukoviruses) 和致瘤 RNA 病毒 (Oncobaviruses) 等。慢病毒是一类重要病毒, 如人免疫缺陷病毒 (HIV) 和猴免疫缺陷病毒 (SIV) 等。慢病毒除了具有一般逆转录病毒 *gag*、*pol* 和 *env* 3 个基本基因结构外, 还包含 4 个辅助基因, *vif*、*vpr*、*nef*、*vpu* 和 2 个调节基因 *tat* 和 *rev*。慢病毒载体 (Lentiviral vector, LV) 作为外源基因载体, 已广泛地用于体外细胞的转染和基因治疗的研究^[1,2]。

1 非慢病毒的逆转录病毒载体法的发展

以前人们将逆转录病毒载体注入小鼠囊胚腔或用高滴度的逆转录病毒载体颗粒感染着床前或着床后胚胎, 或直接将胚胎与能释放逆转录病毒的单层培养细胞共育以达到感染目的。逆转录病毒作为动物基因转移载体最早的研究见于 1974 年的报道。Jaenisch R 等 (1974 年) 将 SV40 DNA 注入小鼠囊胚腔中发现获得的小鼠体内有 SV40 DNA 整合。大多逆转录病毒载体通过病毒两端的特殊

序列在逆转录时整合到分裂细胞, 这一过程依赖有丝分裂的核裂开, 使逆转录前整合复合体转位到核上。这样, 逆转录病毒载体转染动物胚胎的早期, 产生延迟的整合, 产生不同组织和不同位点的镶嵌体。为了提高逆转录病毒载体的转移效率和减少嵌合体形成, 近些年, 人们对逆转录病毒载体转染生殖细胞的研究逐渐增多, 生殖细胞包括卵母细胞、精原干细胞和精原细胞都有可能成为转基因动物制备的一条新的途径, 特别对于有商业价值的大型动物转基因更有意义^[3]。1998 年, Chan 等^[4] 利用复制缺陷型 MoMLV 作载体转染牛卵母细胞最终产生了转基因牛。2001 年, Cabot 等^[5] 则利用携带 GFP 蛋白基因的复制缺陷型 MoMLV 作载体转染体外成熟的猪卵母细胞后, 进行体外受精, 获得转基因猪, 表达了 GFP。最近, Kyle 等^[6] 在用 Gen-pgkβgal 载体转染体外培养的大鼠精原干细胞, 然后将精原干细胞移植到裸鼠睾丸内成熟, 经 3 天感染, 0.5% 的干细胞被转导, 能在小鼠受体睾丸内产生转基因精子, 类似于从小鼠到小鼠的精原干细胞移植获得转基因子代水平。精原细胞在体外培养比较困难, 但这些细胞也是接受基因治疗的病毒载体整合的潜在的目标受体细胞之一, De Miguel 等^[7] 在建立体外培养精原细胞后, 用携带 MDM₂ 基因的逆转录病毒载体成功地高效转染精原细胞。

非慢病毒的逆转录病毒载体在转基因动物制备的应用方面, 使用的时间已很长, 但存在一些难以克服的缺陷, 应用不十分广泛。主要问题是非慢

收稿日期: 2004-04-05 修回日期: 2004-05-11

* 国家“863”计划资助项目 (2002AA206621)

** 电子信箱: dengjx@lycos.com

病毒的逆转录病毒载体对不分裂的静止细胞不感染和表达沉默^[8]。近些年发展的 LV 克服了这些缺陷。随着分子病毒学研究的不断深入,人们对慢病毒的分子生物学特性有了较为深刻的了解,发展出 LV,不仅在基因治疗方面显示出优越特性,而且在转基因动物制备方面发挥出优势,近些年基因表达调控和基因功能的应用研究越来越多。LV 与其它转基因技术方法相结合用于转基因动物的构建,从而大大提高了产生转基因动物的成功率。

2 慢病毒的特点与载体构建

因为 LV 克服了其它逆转录病毒载体的一些缺陷,便于发展为转动物基因的载体。就目前所知,在大多数情况下,慢病毒像其它逆转录病毒一样,其基因组经逆转录后能整合在宿主 DNA 上,也可以在正常细胞中进行操作,因此可将它改建为有用的外源基因的转移载体;LV 与其它逆转录病毒载体不同,它不但感染分裂细胞,也感染静止细胞;由于病毒载体经改构后,不在宿主细胞繁殖,不会导致寄主细胞的死亡,被它感染的或转化的动物细胞能够连续传代。因此利用慢病毒作载体,改变动物细胞的基因型,并遗传到子代。LV 的发展正受到人们的重视,其中包括 SIV、猫免疫缺陷病毒(FIV)、牛免疫缺陷病毒(BIV)、马感染性贫血病毒(EIAV)等。这些病毒对人无致病性,在人类细胞中不会复制。可以高效转染分裂期及静止期细胞。但是 SIV 和 FIV 的 RNA 可与 HIV-1 颗粒交叉包装产生有复制能力的病毒(RCV),这就可能在人畜之间产生新的有复制能力的病毒。而且, Hofmann 等^[9]研究发现在非人类慢病毒转染人细胞的过程中,可能存在转导效率的障碍。LV 的发展开始来自基因治疗,而且人是 HIV-1 的天然宿主,在人类的临床实践中应用 HIV-1 要比应用动物病毒所获得的期望值要高。

HIV-1 是慢病毒中最具特征性的病毒,第一个 LV 系统即以此病毒为基础进行构建的。HIV-1 DNA 前病毒的主要结构基因及其排列形式与其它逆转录病毒相同,均为 5' LTR-*gag-pro-pol-env*-3' LTR。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, *pro* 基因则编码切割蛋白前体所需的蛋白酶。与其它逆转录病毒不同的是, HIV-1 基因组尚有较多调节基因,其中属于 HIV-1 基因复制所

必需的 *tat* 基因和 *rev* 基因,分别编码两个反式激活因子 Tat 蛋白和 Rev 蛋白,前者在 HIV-1 基因组复制和转录延伸过程中发挥重要作用,后者则可促使 HIV-1 基因的表达由早期向晚期转化。非 HIV-1 复制所必需的调节基因有 *nef*、*vif*、*vpr* 和 *vpu*。这些基因的编码产物都有各自的功能,在此不一一赘述。慢病毒载体的构建原理就是将 HIV-1 基因组中的顺式作用元件(如包装信号、长末端重复序列)和编码反式作用蛋白的序列进行分离。载体系统包括包装部分和载体部分:包装部分由去除了包装、逆转录和整合所需的顺式作用序列 HIV-1 基因组而构建,能反式提供产生病毒颗粒所需的蛋白;载体部分与包装成分互补,仅含有包装、逆转录和整合所需的 HIV-1 顺式作用序列,同时具有异源启动子控制下的多克隆位点及在此位点插入的目的基因。为进一步降低两部分因同源重组产生 RCV 可能性, Naldin 等将包装部分的 5' LTR 换成巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子, 3' LTR 换成人 β -珠蛋白 poly A 信号序列,并将包装部分分别构建在两个质粒上,即一个表达 *gag* 和 *pol*、另一个表达 *rev*,在载体部分的 5' 端使用嵌合体序列,用 RSV 的增强子/启动子替代 U3 区(RRL),这样在转录时不依赖 *tat* 的存在,在载体中去掉 HIV 的 *tat* 基因,在 3' LTR 也删掉了 U3 的绝大部分序列,从而极大地增加了使用的生物安全性。为了使载体能扩大感染范围,人们采用表达水疱性口炎病毒(VSV)糖蛋白 G 的质粒和双嗜性小鼠白血病病毒(MLV)包膜蛋白 Env 的质粒,分别取代表达 HIV 本身包膜蛋白 Env 的质粒,使 HIV-1 载体颗粒包上了 VSV 或双嗜性 MLV 的包膜。这样做的结果至少具有三个方面的积极意义:(1)包膜的更换进一步降低了 HIV-1 载体恢复成野生型病毒的可能;(2)使 HIV 载体感染宿主的范围不再仅限于 CD4⁺ 细胞,而扩大到几乎能感染所有组织来源的细胞;(3)VSV 的包膜赋予 HIV 载体颗粒高度的稳定性,使其能够通过超速离心而浓缩,达到高滴度。目前,已使 HIV-1 载体滴度达到 $10^7 \sim 10^8$ TU/ml^[10,11]。

LV 与逆转录病毒载体的基因转移基本一样,由于用含病毒的 *gag* 和 *pol* 质粒、含病毒 *env* 的质粒构建成的包装细胞系,为了安全起见还需要使转移载体与上述两个质粒不存在同源重组序列,将外源目的基因克隆到转移载体中,将克隆了目的基因的转移载体转入包装细胞中形成有感染活性的重

组慢病毒,再去感染早期胚胎或显微注射受精卵。由于慢病毒的高效率感染和在宿主细胞 DNA 上的高度整合特性,可以大大提高基因转移的效率。

3 慢病毒载体转基因动物

尽管 LV 已于 1996 年就发展出来,一直用于细胞转染和基因治疗的研究,但直到 2002 年 Lois 等^[12]试用于转基因大鼠和小鼠的制备。为了提高外源基因在体内表达水平,他们对用于细胞转染的慢病毒载体进行了改构,在外源基因后添加早獭肝炎病毒转录后调控元件(WRE);为了提高病毒滴度,在 5' 端 LTR 和外源基因启动子之间添加了 HIV-1 的侧翼元件(flapp element)。在小鼠单细胞胚胎的卵周隙注射大约 10~100 pl 病毒液(浓度:10³ IU/ μ l),然后移植到代孕鼠。Southern blot 检测 82% 至少携带一个拷贝基因,检测表达的荧光蛋白,为 76%。第二次实验,分别达到 87.5% 和 80%。将去掉透明带的胚胎与 20 000 IU/ μ l、4000 IU/ μ l、800 IU/ μ l 的慢病毒培养 3 天,直到桑葚胚期或囊胚期,再移植到代孕鼠子宫内,这样处理胚胎,其存活率降低,但病毒载体能感染胚胎,整合到 DNA 上。转基因阳性率基本上与病毒载体浓度成正比,尽管不成线性关系。注射大鼠胚胎的卵周隙,获得 59% 的转基因阳性率。并且使用组织或细胞表达特异性启动子,转基因的表达部位非常特异。

对于畜牧动物转基因,显微注射的效率低下造成成本过高一直是困扰人们的问题,为了寻求解决这个问题,最近, Hofmann 等^[13]使用 LV-PGK 转移外源基因到猪和牛胚胎获得初步成功。携带调控 GFP 蛋白基因表达的 PDK 启动子、中间聚嘌呤区(cPPT)和 WRE, LV 包被 VSV 包膜糖蛋白 G, 收集人工受精的猪胚,采用 10⁹~10¹⁰ IU/ml 的经显微注射到受精卵的卵周隙,获得的仔猪 70% 携带外源基因 GFP,其中表达率 94%,经直接荧光显影和免疫组化检测,在转基因猪的所有组织均表达 GFP,包括生殖细胞;实验还证实外源基因能经生殖细胞传递到子代动物;在 LV 使用人角蛋白 K14 启动子(LV-K14)表达 GFP,能特异地在动物皮肤基层角质细胞表达;用 LV-GFP 在体外受精前后感染牛卵母细胞,其胚胎的感染率分别为 45%、92%。这些结果表明 LV 具有很高的外源基因转移效率,表达具有组织特异性,并对胚胎显微操作要求低。

LV 具有其它逆转录病毒的特点,可在从生殖

细胞到囊胚期各发育阶段转移外源基因,近两年已有几家实验室分别进行一些观察,其结果均获得成功。Hamra 等^[14]用 LV-EGFP 转染体外培养的精原细胞,然后将整合有 LV-EGFP 的精原细胞移植到化学杀死精原细胞的野生型雄性大鼠睾丸,移植后大约 60 天,与相当年龄的雌性大鼠交配,获得 44 只子代大鼠,其中有 26 只来自移植精子干细胞克隆,13 只携带慢病毒转基因,大约 30% 转基因阳性。说明 LV 可整合到精原细胞 DNA 上经自然交配制备转基因动物。Ikawa 等^[15]用 LV-GFP 和 RV-GFP 进行同步比较,观察两种载体的转基因效率、表达特异性和水平,采用与去透明质带受精卵共培育,产生的囊胚移植到代孕鼠子宫,PCR 分析判断两种载体均有 60%~70% 的 F0 鼠整合外源基因, Southern blot 分析整合在不同位点,并观察到能经生殖细胞传递外源基因到下一代。观察表达情况则存在区别, LV 的转基因小鼠大多数能表达外源基因,而肿瘤逆转录病毒载体小鼠的外源基因完全保持沉默;如使用的启动子具有组织特异性,其表达部位具有组织特异性,使用视网膜紫质蛋白、红色素基因的调控序列表达 EGFP,均能特异地在杆状和锥状光接受细胞表达,但使用角膜表皮特异存在角质蛋白 12 启动子(K12)表达 EGFP,不但能在角膜表达,也在其它组织表达,这可能与 K12 启动子的特异性有关。这一实验结果说明了受精卵经适当处理,可以感染 LV,如此看来,用 LV 制备转基因动物是一种简单而有用的方法。由于逆转录病毒载体转染小鼠 ES 细胞常常出现转基因表达沉默,局限了使用范围。Pfeifer 等^[8]用携带 CAG 和 PGK 启动子调控 GFP 与 LacZ 的 LV 转染小鼠 ES 细胞,转移的基因能在未分化 ES 细胞增殖期间稳定地表达,ES 细胞体外或体外分化时都能表达转移基因,移植这种细胞到小鼠的囊胚,生产的嵌合体鼠在多种组织中表达外源基因,嵌合鼠交配产生的胚胎仍能表达外源基因产物。用这些 LV 感染小鼠植入前的桑葚胚,无论在胚胎期还是新生小鼠都能稳定表达外源基因。用于人 ES 细胞感染,在传代几次后仍能稳定表达外源基因。LV 比以前发展的逆转录病毒载体对 ES 细胞和植入前胚胎转染效率和表达水平有明显改善。

4 展 望

LV 载体与 SMGT 结合可能是提高转基因效率

的手段之一,特别是 LV 注射曲细精管感染动物的精原干细胞,使外源 DNA 整合到动物精原干细胞上,使动物通过自然受精产生转基因动物。直接将 DNA 注射到动物的曲细精管,使外源 DNA 整合到精原干细胞的染色体上,随精原干细胞增殖而复制,通过自然交配产生转基因动物^[16]。

LV 载体与小的干扰性 RNA (siRNA) 技术结合抑制特异基因的表达或 Knockdown, 可能成为制备抗病毒动物的有用方法。RNA 病毒可能最适合使用这种方法抑制其增殖,从理论上讲,病毒基因组和转录链核酸都可能是靶链^[17,18]。国际动物流行病学机构列入甲型传染性疾病因子的 2/3 是 RNA 病毒,如口蹄疫病毒、猪传染性肠胃炎冠状病毒和最近爆发的禽流感等。Bitkio 等用呼吸道合胞病毒 mRNA 的 siRNA 转入细胞,能减少病毒的 mRNA 表达,在细胞上进行试验的还有 HIV、肝炎病毒和脊髓灰质炎病毒,都获得预想的结果。预计使用这种小的 RNA 不会影响到动物的生理功能,需要 siRNA 能在动物体内高效表达,抑制致病病毒转录产物产生或表达。还有一些需要解决的问题,那些短发夹结构 RNA (shRNA) 结构是最有效的? 需要什么样的表达水平才能抑制病毒的复制或阻断感染? 针对病毒的多种血清型的 RNA 共表达是否能达到预期效果? 制备出的抗病毒动物的一致性怎样? 能否持久存在? 这些问题目前尚无答案。

英国 Roslin 研究所的 Clark 和 Whitelaw (2003 年)对 LV 在转基因动物上使用推崇备至,认为是今后转基因畜牧动物最有力的手段之一,特别是与 siRNA 结合使用,对于改良畜牧动物生长性状、提高饲料利用率和抗病能力都有重要使用价值。特别是禽类受精卵产于体外时已经处于桑椹胚阶段,采用 LV 作为基因转移的载体具有很大的优越性。近些年发展的 LV 不论从理论上还是实践中都具有广阔的应用前景。这种方法的优点是基因转移效率高,整合率也明显高于其他基因转移方法;转录病毒生命周期中具有 DNA 阶段,并且基因组结构简单,便于基因操作;易于分离,重组反转录病毒感染细胞后不引起细胞病变,并且产生的病毒粒子以芽生的方式从细胞膜上释放,存在于细胞的培养上清液中,易与宿主细胞分离,且污染宿主细胞 DNA 等成分的概率低。对于大型动物的转基因有很大的诱惑力,可以大幅度地节省制备费用,而且容易操作,LV 克服了肿瘤性逆转录病毒载体易形

成嵌合体、表达沉默等不利因素。另外,LV 用于畜牧动物的改良,也存在与基因治疗相同的问题,如随机插入是否干扰插入位点基因表达,甚至引起突变,整合的拷贝过多,携带基因较小 (< 10kb) 也是 LV 限制因素之一。在安全方面,由于在基因治疗方面的需要和考虑,现在已有自身灭活的载体可利用。

参考文献

- [1] Solaiman F, Zink M A, Xu G, et al. Modular retro-vector for transgenic and therapeutic use. *Molecular Reprod Develop*, 2000, 56:309 ~ 315
- [2] 李振宇,徐开林.慢病毒载体构建及结构优化.国外医学:分子生物学分册,2002, 24:310 ~ 313
- [3] Nagano M, Shinohara T, Mary R. Retrovirus-mediated gene delivery into male germ line stem cells. *FEBS Letters*, 2000,475: 7 ~ 10
- [4] Chan A W, Homan E J, Ballou L U, et al. Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998,95(24):14028 ~ 14033
- [5] Cabot R A, Kuhholzer B, Chan A W, et al. Transgenic pigs produced using *in vitro* matured oocytes infected with a retroviral vector. *Anim Biotechnol*, 2001,12(2):205 ~ 214
- [6] Kyle E Orwig, Mary R Avarbock, Ralph L Brinster. Retrovirus-mediated modification of male germline stem cells in rats. *Biology of Reproduction*, 2002,67:874 ~ 879
- [7] De Miguel M P, Donovan P J. Determinants of retroviral-mediated gene delivery to mouse spermatogonia. *Biol Reprod*, 2003,68(3): 860 ~ 866
- [8] Pfeifer P, Ikawa M, Dayn Y, et al. Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99:2140 ~ 2145
- [9] Hofmann W, Schubert D, Labonte J, et al. Species-specific, postentry barriers to primate immunodeficiency virus infection. *J Virol*, 1999,73(12):10020 ~ 10028
- [10] Naldini L, Blomer U, Gally P, et al. *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 1996,272:263 ~ 267
- [11] Dull T, Zuffery R, Kelly M, et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *Journal of Virology*, 1998,72(11):8463 ~ 8471
- [12] Lois C, Elizabeth J Hong, Shirley Pease, et al. Germline Transmission and Tissue-Specific Expression of Transgenes Delivered by Lentiviral Vectors. *Science*, 2002, 295:868 ~ 872
- [13] Hofmann A, Kessler B, Ewerling S, et al. Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. *EMBO Rep*, 2003,4(11):1054 ~ 1060
- [14] Hamra F K. Production of transgenic rats by lentiviral transduction

- of male germ-line stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99 (23):14931 ~ 14936
- [15] Ikawa M, Tanaka N, Kao WWY, et al. Generation of transgenic mice using lentiviral vectors: a novel preclinical assessment of lentiviral vectors for gene therapy. Mol Ther, 2003, 8(4):666 ~ 673
- [16] Carmell M A, Zhang L, Conklin D S, Germline transmission of RNAi in mice. Nat Struct Biol, 2003, 10(3):147
- [17] Wiznerowicz M, Trono D. Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. J Virol, 2003, 77(16):8957 ~ 8961
- [18] Rubinson D A, Dillon C P, Kwiatkowski A V, et al. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. Nat Genet, 2003, 34(2):231

Progress About the Generation of Transgenic Animals with Lentiviral Vector

DENG Ji-xian¹ SHEN Wei^{1,2}

(1 Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

(2 College of Animal Sciences and technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

Abstract Lentiviruse is a kind of retroviridae. Some of their characters are different from retroviruses though they possess the basic structures and components. Lentiviral vectors have been used as vector of gene therapy. Recently, these vectors are applied to generation of transgenic animals. DNA produced by lentiviruses genomic retro-transcription can integrate into host cell DNA as that produced by other retroviruses. Lentiviral vectors can't proliferate in host cells or cause host cell death after viruses are rebuilt. Host cells transformed by lentiviral vectors can proliferate and transfer. A considerable advantage of lentiviral vector is the ability at infecting still cells and non-generation of chimera animals. The construct principle of lentiviral vectors, and some progress about the present methods of production and application of transgenic animals were introduced in detail.

Key words Lentiviral vector Transgene animal Retrovirus

《中国医药导刊》征订征稿启事

《中国医药导刊》是由国家食品药品监督管理局主管,国家食品药品监督管理局信息中心主办,国内外公开发行的医药科技性专业期刊。读者对象为国内临床医师、临床药学工作者及从事药品研发和生产的科研人员。

《导刊》主要设置的栏目包括:政策法规、临床医学、药物临床研究与应用、大规模临床试验、疾病治疗指南、治疗经济学、临床药事管理、药物安全性监察、新产品介绍与述评、信息快递、医海撷英、GCP 讲座、GCP 实践、争鸣及其他。

《导刊》由国内著名心血管专家胡大一教授担任总编辑,由国内 100 多位著名临床药理学专家参与编审。本刊紧密结合临床实际,突出先导性、实用性和时效性,是临床医药工作者的重要参考期刊。也是药品和医疗设备生产、营销企业了解我国临床需求信息的重要窗口。

《导刊》为双月刊,大 16 开本,胶印、80 页,约 18 万字,每册定价 15 元,全年 6 期,共 90 元。全国邮局均可订阅,邮发代号 2-492。读者也可直接与本刊编辑部联系订阅,开户名称:国家食品药品监督管理局信息中心,开户行:建设银行北京展览路支行,帐号:6510003042610002517,通讯地址:北京西城区北礼士路甲 38 号,邮编:100810,联系人:黄宏星,温雅歆,电话:62210493、62213654、62210425,传真:62214866, E-mail: yydk@public.cpi.gov.cn, cjmg@2911.net。