

丙型肝炎基因治疗研究进展

徐东平 陈国凤

我国丙型肝炎病毒(HCV)感染发生率较高,一般人群抗-HCV阳性率为3.2%,其中相当一部分可发展为慢性丙型肝炎,成为肝硬化和肝癌的高发人群。对HCV感染目前尚无有效疫苗预防,目前临床上最有效的抗HCV治疗方案为聚乙二醇化干扰素联合利巴韦林,但有约50%患者不能产生持续病毒学应答,对我国常见的1型HCV感染有效率更低^[1,2]。

基因治疗是指通过基因水平的操纵而达到治疗或预防疾病的疗法。自1990年美国批准了世界上第一例基因治疗人体试验以后,至2007年9月,已有1300多项人类基因治疗临床验证项目获得批准,其中我国批准进行临床试验的基因治疗项目有17项;针对感染性疾病的项目共有85项,涉及的疾病包括HIV/AIDS、破伤风、EBV感染、CMV感染、腺病毒(ADV)感染、乙型肝炎、流行性感、乙型肝炎和丙型肝炎^[3,4]。基因治疗技术的发展,对慢性丙型肝炎的抗病毒治疗开辟了一个新的途径,本文将近年来的相关研究进展作一综述如下。

一、丙型肝炎基因治疗的基本策略

机体不能有效清除感染HCV的机制目前尚未完全明了,但已证明与病毒变异和免疫耐受密切相关。病毒变异主要与2个因素相关:一是HCV的RNA聚合酶均缺乏校正功能,不能纠正链合成延伸中误掺的核苷,使病毒在复制过程中容易出现错误;二是HCV有较高的复制能力,大量产生病毒导致产生较高的错配几率。HCV感染可引起特异性T细胞特别是细胞毒T淋巴细胞(CTL)的免疫耐受。针对慢性丙型肝炎的基因治疗也将围绕抑制病毒复制和提高机体抗病毒免疫力两个方面进行。前者通过反义技术和小分子RNA干扰技术阻断病毒与肝细胞分子结合、抑制病毒复制、装配或蛋白表达,通常直接进行体内基因转移。后者主要通过以下方法:(1)用病毒抗原转基因表达增强病毒抗原表达和提呈,使机体主动性产生特异性免疫应答能力;(2)通过转基因表达干扰素等具有抗病毒活性的细胞因子或蛋白的表达,增强机体基础抗病毒应答能力;(3)通过转基因表达特异性抗体产生细胞内免疫状态;(4)通过TCR转基因表达提高特异性T细胞的数量和活性,过继性地使机体被动产生特异性免疫应答能力。上述方法多数是以患者自体细胞作为载体实施目的基因的体外基因转移。

二、丙型肝炎基因治疗的技术手段

1. 反义核酸:为人工合成的互补于靶RNA的小DNA或RNA片段,可形成RNA-RNA或RNA-DNA杂交双链,从而抑制或封闭靶基因的表达。为防止体内

作者单位:100039 北京市,解放军第三〇二医院

通讯作者:徐东平,Email: xudongping@yahoo.com

核酸酶降解,通常对其进行硫代磷酸化和甲基化修饰。针对 HCV 的反义寡核苷酸在细胞和实验动物体内显示出一定的抗病毒作用。Guerniou 等^[5]研究表明,针对 HCV 内部核糖体进入位点(IRES)的反义寡核苷酸-咪唑结合物具有良好的亲和力,在低浓度(500 nmol/L)下 37℃作用 1 小时可以使 HCV RNA 水解,所结合的咪唑基团可有效降低病毒蛋白合成,效率是未带咪唑基团的反义寡核苷酸的 4 倍。目前,波兰 AVI Biopharma 公司研制的针对 HCV 的反义核酸 AVI-4065 已进入 I/II 期临床试验^[6]。

2. 核酶与脱氧核酶:核酶(ribozyme)是一类分子结构简单、分子量小、具有酶催化活性的 RNA 分子,其重要作用之一是催化 RNA 特殊序列的切割、断裂反应。从结构上核酶分为锤头状、斧头状和发夹状 3 种,以锤头状核酶的结构最简单。Gonzalez-Carmona 等^[7]设计了 4 种针对 HCV 5'-非翻译区的核酶,分别针对 GUA165、GUC270、GUA330 和 GCA348,通过化学修饰使核酶抵抗核酸酶降解,通过在转染表达 HCV 的肝癌细胞系中比较发现 GCA348 核酶(Rz1293)效能最好,可使病毒翻译活性下降 70% 以上。然而核酶在体内环境中相对脆弱,化学修饰虽可增强其稳定性,却降低了酶活性,而且核酶发挥最大作用所需的二价阳离子浓度高于生理环境,使核酶在体内的应用受到了限制。脱氧核酶(DNAzyme)为具有特定结构和酶催化活性的 DNA 分子,主要催化 RNA 切割反应,其中一种 10~23 DNAzyme 的脱氧核酶构型切割位点序列简单为研究常用。Trepanier 等^[8]报告构建了一种抗 HCV 脱氧核酶 DZ-158-15-15,对靶序列亲和力较高($k_m = 2.1 \times 10^{-7}$ mol/L)、裂解活性较强[$Kat/K_m = 5.7 \times 10^{-4}$ (mol/L)/min],作用 24 小时可使 HCV 转染细胞 HCV RNA 靶序列含量降低 32%~48%。然而脱氧核酶的应用还需提高其在体内的稳定性和高效导入靶细胞。

3. 小分子干扰 RNA(siRNA)与 RNA 干扰:通过 siRNA 进行的 RNA 干扰是一种由双链 RNA 引发的序列特异性基因沉默机制,具有特异高效的特点,只引起同源 mRNA 的降解,数量远远少于 mRNA 的双链 RNA 就能完全抑制基因表达,是当前病毒性肝炎基因治疗研究领域的热点之一。在抗 HCV 研究方面,siRNA 针对的靶位包括 HCV 的 5'-UTR(含 IRES)、3'-UTR、C、NS3、NS4、NS5B 等基因调控或编码序列,与 HCV 感染相关的宿主分子的 mRNA,如 CD81、La、PTB、eIF2B、hVAP-33 等^[9-11]。Watanabe 等^[12]用乳糖化阳离子脂质体包裹 siRNA,可将针对 HCV 的 siRNA 靶向转入肝实质细胞,抑制 HCV 转基因小鼠肝脏中的病毒蛋白表达。采用日本 Oncolys BioPharma 公司与美国 Tacere Therapeutics 公司联合研发三靶位 RNA 干扰制剂 TT-033,动物实验结果表明,用 ADV 介导静脉一次注射即可有效切割不同亚型 HCV 的靶序列,未见毒副作用,该制剂在 2008 年下半年已进入 I 期临床试验^[13]。RNA 干扰应用的主要问题是克服病毒变异对 siRNA 与靶序列特异性结合的影响以及提高转基因的效率和安全性。

4. DNA 疫苗:DNA 疫苗是最近几年从基因治疗研究领域发展起来的一种全新疫苗,实际上是一种抗原基因重组质粒,接种后使目的基因通过宿主细胞的表

达系统合成抗原蛋白,诱导免疫应答。与传统疫苗相比,DNA疫苗的一个重要优势在于既可诱导体液免疫,又可诱导细胞免疫。研究表明,HCV DNA疫苗具有以下特点^[14]:(1) HCV-C(表达C蛋白)DNA疫苗可同时诱导较强的细胞和体液免疫,而HCV-E(表达E蛋白)DNA疫苗主要诱导体液免疫;(2) HCV-C DNA疫苗免疫产生的抗体以IgM为主,而直接用C抗原重组蛋白免疫产生的抗体以IgG为主;(3) HCV-NS3、HCV-NS4、HCV-NS5 DNA疫苗与相应的蛋白疫苗相比,前者在诱导CD4⁺和CD8⁺T细胞反应上优于后者;(4)表达单一蛋白的HCV DNA疫苗作用有限,因接种HCV-E2 DNA疫苗不能使黑猩猩免受HCV感染,只能在感染后诱导动物产生较强的CTL应答,较早产生抗E2血清学转换。近来还有多项研究表明采用编码HCV多抗原表位的DNA疫苗在HCV转基因小鼠等实验动物体内诱导出了多表位特异性细胞和体液免疫反应^[15-17]。Nam等^[18]报道用表达HCV E基因和HBV S基因的DNA疫苗同时免疫,可在小鼠体内同时诱导产生针对2种病毒抗原的特异性抗体和细胞免疫应答反应。目前已有HCV DNA疫苗获准进入临床试验,但尚未见到相关总结报告。

DNA疫苗存在的主要问题有以下两点:(1)目标蛋白表达水平往往较低,诱导的特异性免疫应答强度不够,需提高抗原表达水平、研发有效安全的佐剂、优化接种途径和方式。(2)HBV病毒变异使抗原表位产生较大差异,病毒蛋白中还可能含有免疫抑制性表位,需要在表位的鉴定、筛选、组合、改造上做进一步研究。

5. 抗原基因修饰的树突状细胞(DC)疫苗:DC是人体内抗原加工提呈能力最强的专职抗原提呈细胞,慢性HBV感染者的DC对HBV抗原刺激的反应性降低与HBV慢性化机制相关^[19]。通过用细胞因子活化和抗原致敏DC,可以激发机体打破免疫耐受状态,被称为治疗性DC疫苗疗法。将HBV抗原基因转导(转染)DC,使病毒抗原在DC内表达并通过内源途径获得加工提呈,能更有效地诱导机体的细胞免疫应答。Kuzushita等^[20]采用了一种新的体内活化DC的方法,即用静脉水动力(高压水注射)方法将分泌表达人DC活化因子FMS样酪氨酸激酶3配体(FLI3L)的重组质粒高效转染小鼠DC,然后在体外用抗CD11c抗体交联磁珠分选出活化DC,用一种短两亲多肽载体(short amphipathic peptide carrier)介导的蛋白质转导技术,将HCV C或NS5蛋白抗原转入这些DC。结果表明将表达病毒抗原转导的DC接种免疫小鼠后,可激发特异性CTL反应,其中NS5转导DC还可激发CD4⁺T细胞对病毒抗原的细胞因子应答反应;将NS5转导DC接种免疫小鼠,可诱导特异性长效免疫反应,效果明显优于DNA疫苗,10周后用表达HCV NS5抗原的骨髓瘤细胞进行攻击,观察到肿瘤生长受到明显抑制。Yu等^[21]用电穿孔法介导HCV NS3/4A mRNA转染小鼠DC,将转基因DC输入小鼠体内后可诱导较强的细胞免疫应答,并保护小鼠抵御HCV重组痘苗病毒的攻击,与输入对照DC的小鼠相比,HCV重组痘苗病毒滴度降低了近5 log₁₀。

6. 抗病毒细胞因子转基因表达:研究较多的是干扰素(IFN)的转基因表达,转基因表达与外源性输入细胞因子的抗病毒作用机制不完全相同,外源重组的

IFN- α 可能主要是干扰病毒的成熟和装配过程,而内源性自分泌表达的 IFN- α 则可能主要作用于病毒的转录水平及影响转录的 mRNA 的稳定性方面。Suzuki 等^[22] 先用 HCV 感染 PH5CH8 细胞(一种非肿瘤的人肝细胞系),1 天后再用其构建的 IFN-cDNA 重组腺病毒进行基因转导,观察到 9 天后细胞内 HCV RNA 完全消失,伴有 IFN- 诱导细胞合成的重要抗病毒蛋白 2',5'-寡腺苷酸合成酶(2',5'-AS)活性显著增高。Shin 等^[23] 构建了 IFN- 基因重组的带有 HBV 和肝脏特异性启动子的复制缺陷型 HBV 载体(该载体对肝细胞有亲嗜性),用其对慢性 HCV 感染的 2 只黑猩猩进行基因治疗。结果表明与对照相比,治疗后实验动物外周淋巴细胞中 NK 标志 CD16 和肝脏归巢标志物(liver-homing marker) CXCR3 的表达明显增高,血清 ALT 未升高,外周血和肝脏浸润淋巴细胞中 HCV 特异性 T 细胞频率增高,但并未使病毒受到长期明显抑制,提示 IFN- 转基因治疗可以增强非特异性和特异性细胞应答,但尚不足以控制病毒感染。

7. 淋巴细胞特异性 T 细胞受体(TCR)转基因表达:慢性丙型肝炎患者缺少清除病毒所需的特异性细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)。CTL 的特异性由 TCR 基因所决定,采用转基因表达 TCR 可使经 CD3 抗体活化的 CD8⁺ T 细胞转化为特异性 CTL。CTL TCR 由 α 、 β 两条链组成,其中 α 链有 30 多个亚家族, β 链有 20 多个亚家族(subfamily),亚家族内又有不同的亚型(subset),TCR 的多样性通过 α 链的 V-J 重排和 β 链的 V-D-J 随机重排决定。Gallender 等^[24] 建立了抗 HCV NS3(表位 1406-1415)特异性的 CTL 克隆,从中获得 TCR 编码基因,用逆转录病毒转导,使不表达 TCR 的 SupT1 细胞表达较高水平的 TCR,亚型组成与转移的目的基因一致;将 TCR 基因转导人 T 淋巴细胞瘤 Jurkat,使其获得表位特异性,在抗原刺激下,转基因表达 TCR 的 Jurkat 细胞可大量分泌 IL-2。然而清除病毒感染往往需要多特异性 CTL 的作用,这是 TCR 转基因方法用于丙型肝炎基因治疗面临的一个问题。

总之,丙型肝炎的基因治疗研究已取得很大进展,但尚需解决提高目的基因表达效率、增强基因治疗靶向性、提高安全性、实现对目的基因转录表达的监测与调控以及解决病毒序列异质性带来的困扰等问题。未来基因治疗有望与抗病毒药物治疗、免疫治疗一起成为丙型肝炎治疗的有效手段。

参 考 文 献

- 1 中华医学会肝病分会、传染病与寄生虫病学会. 丙型肝炎防治指南. 中华医学杂志,2004,84:775-780.
- 2 Hughes CA, Shafraan SD. Chronic hepatitis C virus management: 2000-2005 update. Ann Pharmacother,2006,40:74-82.
- 3 Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J. Gene therapy clinical trials worldwide to 2007--an update. J Gene Med,2007,9:833-842.
- 4 Kim S, Peng Z, Kaneda Y. Current status of gene therapy in Asia. Mol Ther, 2008,16:237-243.
- 5 Guemio V, Gillet R, Berree F, et al. Targeted inhibition of the hepatitis C internal ribosomal entry site genomic RNA with oligonucleotide conjugates. Nucleic Acids Res,2007,35:6778-6787.
- 6 Fox JL. Antivirals become a broader enterprise. Nat Biotechnol,2007,25:1395-1402.
- 7 Gonzalez-Carmona MA, Schussler S, Serwe M, et al. Hammerhead ribozymes with cleavage site specificity for NUH and NCH display significant anti-hepatitis C viral effect in vitro and in recombinant HepG2 and CCL13 cells. J Hepatol, 2006,44:1017-

1025.

- 8 Trepanier J, Tanner JE, Momparler RL, et al. Cleavage of intracellular hepatitis C RNA in the virus core protein coding region by deoxyribozymes. *J Viral Hepat*, 2006,13:131-138.
- 9 Watanabe T, Umehara T, Kohara M. Therapeutic application of RNA interference for hepatitis C virus. *Adv Drug Deliv Rev*, 2007,59:1263-1276.
- 10 Sakamoto N, Tanabe Y, Yokota T, et al. Inhibition of hepatitis C virus infection and expression in vitro and in vivo by recombinant adenovirus expressing short hairpin RNA. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008,23:1437-1447.
- 11 Xue Q, Ding H, Liu M, et al. Inhibition of hepatitis C virus replication and expression by small interfering RNA targeting host cellular genes. *Arch Virol*, 2007,152:955-962.
- 12 Watanabe T, Umehara T, Yasui F, et al. Liver target delivery of small interfering RNA to the HCV gene by lactosylated cationic liposome. *J Hepatol*, 2007,47:744-750.
- 13 Anonymous. Oncolys BioPharma and Tacere Therapeutics Form Strategic Alliance to Develop RNAi Hepatitis C Drug. <http://uss-tock.jrj.com.cn/news/2007-06-21/000002352032.html>. Enter on 2008-01-14.
- 14 Wintemeyer P, Wands JR. Vaccines to prevent chronic hepatitis C virus infection: current experimental and preclinical developments. *J Gastroenterol*, 2007,42:424-432.
- 15 Encke J, Geissler M, Stremmel W, et al. DNA-based immunization breaks tolerance in a hepatitis C virus transgenic mouse model. *Hum Vaccin*, 2006,2:78-83.
- 16 Shi L, Liu S, Fan GX, et al. Effective induction of type 1 cytotoxic T cell responses in mice with DNA vaccine encoding two hepatitis C virus cytotoxic T lymphocyte epitopes. *Viral Immunol*, 2006,19:702-711.
- 17 Ahlen G, Soderholm J, Tjelle T, et al. In vivo electroporation enhances the immunogenicity of hepatitis C virus nonstructural 3/4A DNA by increased local DNA uptake, protein expression, inflammation, and infiltration of CD3⁺ T cells. *J Immunol*, 2007, 179:4741-4753.
- 18 Nam SH, Park JH, Kang JH, et al. Modulation of immune response induced by co-administration of DNA vaccine encoding HBV surface antigen and HCV envelope antigen in BALB/c mice. *Arch Pharm Res*, 2006,29:1042-1048.
- 19 Rehmann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol*, 2005,5:215-229.
- 20 Kuzushita N, Gregory SH, Monti NA, et al. Vaccination with protein-transduced dendritic cells elicits a sustained response to hepatitis C viral antigens. *Gastroenterology*, 2006,130:453-464.
- 21 Yu H, Babiuk LA, van Drunen Littel-van den Hurk S. Immunity and protection by adoptive transfer of dendritic cells transfected with hepatitis C NS3/4A mRNA. *Vaccine*, 2007,25:1701-1711.
- 22 Suzuki K, Aoki K, Ohnami S, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of interferon alpha inhibits hepatitis C virus replication in hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003,307:814-819.
- 23 Shin EC, Protzer U, Untergasser A, et al. Liver-directed gamma interferon gene delivery in chronic hepatitis C. *J Virol*, 2005, 79:13412-13420.
- 24 Callender GG, Rosen HR, Roszkowski JJ, et al. Identification of a hepatitis C virus-reactive T cell receptor that does not require CD8 for target cell recognition. *Hepatology*, 2006,43:973-981.

(收稿日期:2009-02-28)

(本文编辑:温少芳)

徐东平,陈国凤. 丙型肝炎基因治疗研究进展[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版, 2009,3(3):338-342.