

昆津病毒复制子——一种新型病毒载体

李世华, 李晓峰, 秦鄂德, 秦成峰

军事医学科学院微生物流行病学研究所 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071

摘要: 病毒复制子 (Replicon) 是指来源于病毒基因组的能够自主复制的 RNA 分子, 保留了病毒非结构蛋白基因, 而结构蛋白基因缺失或由外源基因替代。昆津病毒 (Kunjin virus) 为黄病毒科黄病毒属成员, 其复制子具有表达效率高、细胞毒性低、遗传稳定等特点, 在病毒基因组复制调控机制、外源蛋白表达、新型疫苗和基因治疗等领域得到了广泛应用。以下就昆津病毒复制子系统的构建、特性及应用方面的研究进展作一综述。

关键词: 昆津病毒, 复制子, RNA 病毒, 病毒载体

Kunjin virus replicon——a novel viral vector

Shihua Li, Xiaofeng Li, E'de Qin, and Chengfeng Qin

State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

Abstract: Viral replicon is a kind of self-replicating viral RNA sourced from viral genome, which contains viral non-structural genes that are critical for viral genome replication with structural proteins deleted or replaced by foreign genes. Kunjin virus is a member of the *Flaviviridae* family, *Flavivirus* genus, and Kunjin virus replicon is the first and the clearly defined flavivirus replicon. Kunjin virus replicon has been regarded as an excellent viral vector on account of its high expression, lower cytotoxicity and genetic stability. These unique characteristics of kunjin virus replicons make them suitable for the study of viral genome replication, recombinant proteins production, vaccine development and gene therapy. In this article, recent progress in the development, properties and applications of kunjin virus replicon system was briefly reviewed.

Keywords: Kunjin virus, replicon, RNA virus, viral vector

复制子是一种基于 RNA 病毒的能自主复制的 RNA 分子, 在病毒学研究中有着广泛的应用。RNA 病毒复制子保留了病毒基因组复制所必需的非结构

蛋白基因和非编码区的关键顺式作用元件, 因而能够在宿主细胞内有效复制; 但同时缺失其结构蛋白基因, 因此无法形成感染性的病毒颗粒, 操作较为

Received: May 5, 2010; **Accepted:** July 29, 2010

Supported by: Major Special Projects in National Science and Technology Pillar Program during the Eleventh Five-Year Plan Period (No. 2008ZX10004-015).

Corresponding author: Chengfeng Qin. Tel: +86-10-66948604; Fax: +86-10-63898239; E-mail: cfqin@hotmail.com

国家“十一五”重大科技专项课题 (No. 2008ZX10004-015) 资助。

安全。目前，绝大多数单股正链 RNA 病毒的复制子已经构建成功，如甲病毒、黄病毒、冠状病毒、小 RNA 病毒和副粘病毒等，其中最为成熟的是甲病毒复制子，如塞姆利基森林病毒 (Semliki Forest Virus, SFV) 复制子已成为一种商业化的真核表达载体，基于甲病毒复制子的 HIV 疫苗也已进入一期临床研究^[1]。黄病毒科黄病毒属包括 70 多种病毒，其中超过一半与人类疾病相关，如登革病毒、蜱传脑炎病毒、乙型脑炎病毒、黄热病毒、西尼罗病毒和墨累河谷脑炎病毒等。昆津病毒 (Kunjin Virus, KUNV) 复制子是构建成功的第一个黄病毒复制子，在基因组结构与功能、外源蛋白表达、复制子疫苗及基因治疗等方面得到广泛的应用。本文就昆津病毒复制子的研究进展作一综述。

1 昆津病毒复制子

昆津病毒仅见于澳大利亚北部，与西尼罗病毒同属一个血清亚型。该病毒感染人类后一般不会致病，偶尔会引起轻微的脑炎。昆津病毒的基因组为全长 11 022 nt 的单股正链 RNA，含有一个单一开放读码框，编码 3 个结构蛋白 (C、prM/M 和 E) 和 7 个非结构蛋白 (NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 和 NS5)，5'端和 3'端为非编码区 (Untranslated

region, UTR)。结构蛋白参与病毒的组装，非结构蛋白和两端的 UTRs 共同参与病毒的复制翻译过程。

1996 年，澳大利亚 Khromykh 等在昆津病毒感染性全长 cDNA 克隆的基础上首次构建获得了昆津病毒复制子^[2]。昆津病毒复制子保留了病毒 RNA 复制所需的 NS1-NS5 非结构基因，以及两端的 UTRs，缺失了 C、PrM 和 E 蛋白基因 (图 1)。由于编码昆津病毒 C 蛋白的基因中含有一段保守序列 (Cyclization sequence, CS)，该序列与 3' UTR 的另一个 CS 参与基因组环化，与病毒 RNA 的复制和翻译密切相关。因此，昆津病毒复制子保留了 C 蛋白氨基端的前 20 个氨基酸 (C20) 的编码序列。同时，昆津病毒 E 蛋白羧基末端含有一段在 NS1 蛋白成熟过程中发挥重要作用的信号肽序列，所以在昆津病毒复制子的构建过程中还保留了 E 蛋白羧基末端 22 个氨基酸 (E22) 的编码序列^[3]。

为了在体外或者体内启动复制子的转录，复制子的 5' UTR 上游必须含有 SP6 或者 CMV 启动子。对于 CMV 启动子而言，复制子 3' UTR 下游还需引入 HDVr (Hepatitis delta virus ribozyme) 的反义基因和多聚腺苷酸 (Polyadenylation, PA) 信号，从而保证获得完整的病毒基因组 3'末端，有效地起始复制子的复制过程。为保证外源基因插入复制子后获

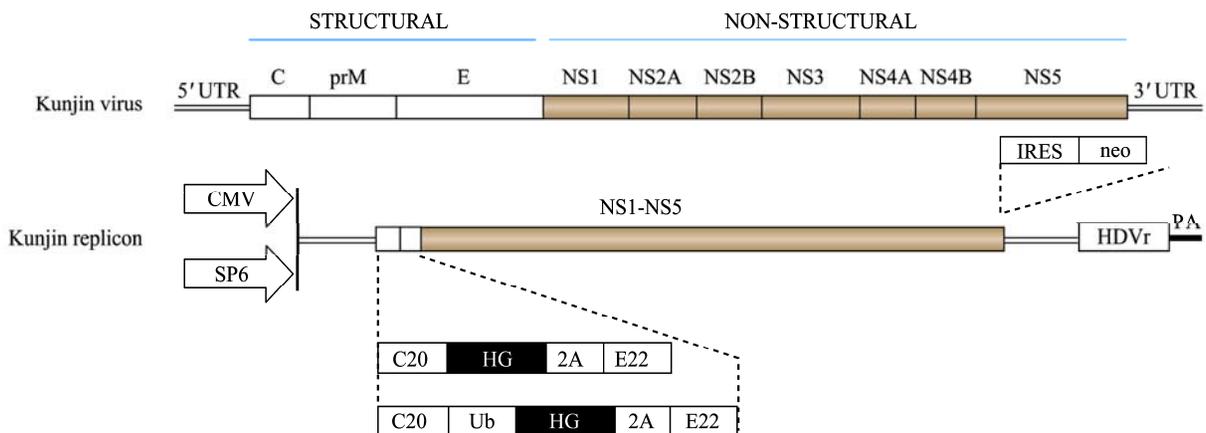


图 1 昆津病毒复制子亚基因组结构示意图 (由 Pijlman GP 发表于 2006 年 Biol Ther 的文章修改而成^[24])
 Fig. 1 Construction of Kunjin virus replicon genome. neo: neomycin phosphotransferase II gene; HG: Heterologous gene; Ub: Ubiquitin; HDVr: hepatitis delta virus ribozyme; PA: ployadenylation; IRES: Internal ribosome entry site.

得正确的表达和加工, 外源基因两端一般还需融合一段具有自我切割功能的序列, 如口蹄疫病毒自身水解酶 2A 序列 (FMDV-2A)^[4], 或小鼠泛素 (Ubiquitin, Ub) 序列。此外, 为了保证病毒非结构蛋白的正确翻译, 需在外源基因的 3' 末端添加终止密码子和内部核糖体进入位点 (Internal ribozyme entry site, IRES) (图 1)。另外, 昆津病毒复制子 NS5 蛋白终止密码子与 3' UTR 之间存在可变区 (Variable region, VR), 亦可允许外源基因的插入。如新霉素磷酸转移酶 II (Neomycin phosphotransferase II, neo) 基因被插入该区域以筛选稳定表达昆津病毒复制子的细胞系 (Rep-cell)^[2]。

昆津病毒复制子主要以 3 种形式进入细胞: 第一种是以体外转录获得的 RNA 形式进入细胞, 该方式能迅速增加细胞内复制子 RNA 的含量, 从而大幅提高外源蛋白的表达水平。第二种是将其置于 CMV 启动子下游的复制子以质粒 DNA 的形式转染细胞, 再借助细胞内的 RNA 聚合酶 II 进行转录来获得病毒 RNA^[5], 该方式省去了体外转录环节, 降低成本的同时也避免了 RNA 的降解。最后一种是以单轮感染型病毒样颗粒 (Virus like particle, VLP) 的形式进入细胞。RNA 复制子与其结构蛋白仍能形成具有感染性的病毒样颗粒, 但再次侵入细胞后会因其 RNA 的缺陷而无法生成病毒的结构蛋白, 从而无法形成子代病毒样颗粒, 故被称为单轮感染型 VLP。Khromykh 等将昆津病毒复制子和表达其结构蛋白的塞姆利基森林病毒复制子共转染细胞, 获得了昆津病毒的 VLP^[6]。Harvey 等进一步构建了稳定表达昆津病毒结构蛋白的细胞系, 将复制子转染至该细胞系后也获得了昆津病毒的单轮感染型 VLP^[7]。

2 昆津病毒复制子的生物学特性

昆津病毒复制子具有 RNA 复制子的共有特征: 一是复制效率高, 可以持续的合成双链 RNA, 可作为高效的表达载体; 二是无整合至宿主基因组的危险; 三是免疫效果良好, 少量的 DNA 质粒就能同时

诱导粘膜免疫、抗体应答和 CTL 反应。

除上述特征外, 昆津病毒复制子还具有优于其他 RNA 复制子的特性。其一是细胞毒性低。甲病毒复制子虽是应用最广泛的 RNA 复制子, 但其细胞毒性强, 在细胞内仅能复制几天即可致细胞凋亡, 因此无法持续表达外源蛋白。昆津病毒复制子的细胞毒性则很弱, 在细胞内能持续复制数十天之久。其二是产生重组活病毒的概率极低。理论上讲, RNA 复制子可能与其结构基因的同源序列发生重组, 进而产生具有持续感染性的病毒颗粒。但研究显示, 昆津病毒复制子转染至表达其结构基因的细胞后, 并未产生具有感染性的野生型病毒颗粒^[8]。此外, 研究也未发现其与其他黄病毒复制子间存在重组现象^[9]。其三是昆津病毒 RNA 聚合酶的保真性高, 即该病毒的 RNA 序列在复制过程中能够保持较高的稳定性。因此, 当昆津病毒复制子作为疫苗载体时, 其免疫原性就能保持高度稳定。其四是便于遗传学操作。昆津病毒复制子的 RNA 仅为 8 000 nt 左右, 易于对其序列进行改造。正是基于以上优点, 昆津病毒复制子已成为一种新型的病毒载体, 在病毒复制机制、蛋白表达、新型疫苗及基因治疗等方面显示出巨大的应用潜力。

3 昆津病毒复制子的应用

3.1 黄病毒基因组复制调控机制的研究

由于复制子仅在细胞内完成 RNA 的复制过程, 而不涉及病毒的吸附、侵入、包装和释放等阶段, 因而能直观地反映病毒基因组复制的特征以及靶细胞的生理变化情况。以昆津复制子为模型, 不同学者先后发现了一系列重要的复制调控元件。Khromykh 等对昆津病毒复制子 5' UTR 和 3' UTR 的不同环化序列、保守区和 3' 末端的核苷酸进行了突变分析, 结果表明这些区段是病毒 RNA 复制的关键序列^[2]。这是首次在细胞水平上证明了黄病毒非编码区在病毒复制中具有重要功能。此外, Liu 和 Leung 等还先后借助昆津病毒复制子证实 NS3 和

NS2A 分别在 RNA 复制和病毒组装过程中具有重要作用^[10-11]。本实验室利用登革病毒的复制子系统,发现登革病毒 C 蛋白编码区发夹 (C-coding region hairpin, cHP) 结构对病毒基因组的复制具有重要的调控作用^[12]。

此外, 昆津病毒复制子在复制机制研究中也有重要的应用。当非结构蛋白缺陷型的全长克隆转染至复制子细胞系后, 复制子将提供具有完整功能活性的非结构蛋白, 进而协助缺陷型全长克隆完成复制, 最终通过是否形成感染性的病毒颗粒来确定非结构蛋白在病毒复制中的功能。利用上述反式互补系统, Khromykh 等研究了非结构蛋白 NS5 的功能, 在此基础上提出了黄病毒 RNA 复制复合体 (Replication complex, RC) 形成模型以及在其形成过程中 NS3 和 NS5 的作用^[13-14]。另外还发现了昆津病毒非结构蛋白编码区中与复制复合体形成相关的一系列顺式和反式作用元件, 并研究了其相互作用^[15]。上述研究不仅丰富了黄病毒基因组复制机理的相关内容, 也为进一步阐明黄病毒复制机制奠定了基础。

3.2 外源蛋白表达

与其他病毒表达载体相比, 昆津病毒复制子载体具有一系列优势。首先, 其细胞毒性低的特点决定了其拥有更广的宿主范围; 其次, 昆津病毒复制子可以随细胞分裂而分配到子代细胞中, 继续其复制周期, 以此持续表达外源蛋白。此外, 昆津病毒复制子能够对外源蛋白进行糖基化等翻译后修饰, 因此能获得更接近天然活性的目的产物。目前, 利用昆津病毒复制子载体已成功表达了报告基因、病毒类抗原、病毒糖类蛋白以及细胞因子等多达 20 多种外源蛋白^[16]。如 Varnavski 利用昆津病毒复制子表达系统先后成功表达了氯霉素乙酰转移酶, 绿色荧光蛋白, β -半乳糖苷酶和丙型肝炎病毒 NS3 蛋白等^[17]。除上述的瞬时表达形式外, 建立昆津病毒复制子细胞系是另一种持续表达外源蛋白的途径。含有抗性基因的昆津病毒复制子转染细胞后, 经抗生素筛选后可获得稳定的复制子细胞系, 如 Varnavski

等利用筛选获得的 BHK-21 细胞系可以稳定表达绿色荧光蛋白和氯霉素乙酰转移酶达 17 代以上。

3.3 复制子疫苗

复制子疫苗是近年来新兴的疫苗形式。与传统的疫苗相比, RNA 复制子疫苗具有如下优势: 第一, 复制效率高, 并且能同时诱导体液和细胞免疫反应; 第二, 只在细胞质中复制, 无整合至宿主细胞基因组的危险; 第三, 病毒样颗粒形式的疫苗不仅免疫原性强, 而且仅能完成单轮感染, 安全性高。如前所述, 昆津病毒复制子可持久的表达外源蛋白, 因此能有效诱发机体产生相应的体液免疫反应。更重要的是, 该复制子还能同时诱导 CD8⁺型 T 细胞免疫反应。Anraku 等发现, 0.1 μ g 质粒 DNA 形式的昆津病毒复制子诱发的 T 细胞免疫反应效力与 100 μ g 传统 DNA 疫苗的 T 细胞免疫反应相当^[18], 这表明昆津病毒复制子在诱导 T 细胞免疫方面具有明显的优势。研究还发现, 用含有 HIV gag 基因的昆津病毒复制子 VLP 免疫小鼠后, 可以诱发机体产生针对 HIV 的 CD8⁺型 T 细胞免疫保护反应, 并且持续 6~10 个月之久^[19]。此外, 基于该复制子 VLP 的 SIV 疫苗在不同的动物模型中进行了免疫保护能力的评价, 并证实均具有较好的免疫保护性^[20-21]。总之, 正是由于昆津病毒复制子能同时诱导体液和细胞免疫, 因此成为极具潜力的新型 RNA 复制子疫苗候选载体。

3.4 基因治疗

基因治疗是指通过特定手段将基因类药物导入病灶中的靶细胞, 从而改善或治愈疾病的一种治疗手段。昆津病毒复制子靶细胞范围广, 可持续表达外源产物, 而且还能有效诱导干扰素的产生, 因此该复制子系统是基因治疗领域中理想的递送系统。粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 GM-CSF 能产生具有抗癌作用的 CD8⁺型 T 细胞反应, Hoang-Le 等将 GM-CSF 通过病毒样颗粒形式的昆津病毒复制子系统导入肿瘤细胞内, 使其在宿主细胞内表达, 结果显示其可以明显抑制结肠癌细胞 CT26 和黑色素瘤

细胞 B16 的增殖^[22]。该研究表明, 昆津病毒复制子系统可作为理想的抗癌基因导入载体, 并将在癌症的基因治疗领域发挥更大作用。

4 小结与展望

同其他 RNA 复制子一样, 昆津病毒复制子可高效表达外源蛋白。更重要的是, 该复制子几乎无细胞毒性, 因此可建立能持续稳定表达复制子的细胞系, 进而获得高产量的 VLP; 同时, 昆津病毒复制子以基因重组方式产生野生型病毒颗粒的概率极低, 故其安全性也很高。正是基于上述优点, 昆津病毒复制子在外源蛋白表达、新型疫苗研制以及基因治疗等领域得到广泛应用。尽管目前的研究显示, VLP 是最为有效的复制子递送方式, 但其靶向性还有待进一步提高。此外, 尽快研发能够高效递送 RNA 和 DNA 形式复制子的技术也是今后亟待解决的问题。目前, 澳大利亚的 Replikun Biotech 公司致力于昆津病毒复制子技术的商品化, 并取得了一系列成果, 如已成功开发了基于昆津病毒复制子的艾滋病疫苗和肿瘤的治疗性疫苗, 有些业已进入临床应用阶段。总之, 随着相关研究的不断深入, 有理由相信昆津病毒复制子在更多领域会发挥更为重要的作用, 真正为人类造福。

REFERENCES

- [1] Davis NL, West A, Reap E, et al. Alphavirus replicon particles as candidate HIV vaccines. *IUBMB Life*, 2002, 53(4/5): 209–211.
- [2] Khromykh AA, Westaway EG. Sugenomic replicons of the flavivirus Kunjin: construction and applications. *J Virol*, 1997, 71(2): 1497–1505.
- [3] Khromykh AA, Meka H, Guyatt KJ, et al. Essential role of cyclization sequences in flavivirus RNA replication. *J Virol*, 2001, 75(14): 6719–6728.
- [4] de Felipe P. Skipping the co-expression problem: the new 2A ‘CHYSEL’ technology. *Genet Vaccines Ther*, 2004, 2(1): 13.
- [5] Varnavski AN, Young PR, Khromykh AA. Stable high-level expression of heterologous genes *in vitro* and *in vivo* by noncytopathic DNA-based Kunjin virus replicon vectors. *J Virol*, 2000, 74(9): 4394–4403.
- [6] Khromykh AA, Varnavski AN, Westaway EG. Encapsidation of the flavivirus Kunjin replicon RNA by using a complementation system providing Kunjin virus structural proteins *in trans*. *J Virol*, 1998, 72(7): 5967–5977.
- [7] Harvey TJ, Liu WJ, Wang XJ, et al. Tetracycline-inducible packaging cell line for production of flavivirus replicon particles. *J Virol*, 2004, 78(1): 531–538.
- [8] Khromykh AA, Sedlak PL, Guyatt KJ, et al. Efficient trans-complementation of the flavivirus Kunjin NS5 protein but not of the NS1 protein requires its coexpression with other components of the viral replicase. *J Virol*, 1999, 73(12): 10272–10280.
- [9] Lindenbach BD, Rice CM. Trans-Complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. *J Virol*, 1997, 71(12): 9608–9617.
- [10] Liu WJ, Chen HB, Khromykh AA. Molecular and functional analyses of kunjin virus infectious cDNA cloned demonstrate the essential roles for NS2A in virus assembly and for a nonconservative residue in NS3 in RNA replication. *J Virol*, 2003, 77(14): 7804–7813.
- [11] Leung JY, Pijlman GP, Kondratieva N, et al. Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. *J Virol*, 2008, 82(10): 4731–4741.
- [12] Yu XD, Jiang T, Chen SP, et al. Role of cHP element present at the C gene of dengue virus type 4 in viral translation and RNA replication. *Bull Acad Mil Med Sci*, 2008, 32(3): 201–206.
于学东, 姜涛, 陈水平, 等. 登革 4 型病毒基因组 cHP 发卡结构对病毒复制和翻译的调控作用. *军事医学科学院院刊*, 2008, 32(3): 201–206.
- [13] Liu WJ, Sedlak PL, Kondratieva N, et al. Complementation analysis of the flavivirus kunjin NS3 and NS5 protein defines the minimal regions essential for formation of a replication complex and shows a requirement of NS3 *in cis* for virus assembly. *J Virol*, 2002, 76(21): 10766–10775.
- [14] Khromykh AA, Kenney MT, Westaway EG. Trans-complementation of flavivirus RNA polymerase gene NS5 by using Kunjin virus replicon-expressing BHK cells. *J Virol*, 1998, 72(9): 7270–7279.

- [15] Khromykh AA, Sedlak PL, Westaway EG. Cis- and trans-acting elements in flavivirus RNA replication. *J Virol*, 2000, 74(7): 3253–3263.
- [16] Pijlman GP, Suhrbier A, Khromykh AA. Kunjin virus replicons: an RNA-based, non-cytopathic viral vector system for protein production, vaccine and gene therapy applications. *Expert Opin Biol Ther*, 2006, 6(2): 135–145.
- [17] Varnavski AN, Khromykh AA. Noncytopathic flavivirus replicon RNA-based system for expression and delivery of heterologous genes. *Virology*, 1999, 255(2): 366–375.
- [18] Anraku I, Harvey TJ, Linedale R, et al. Kunjin virus replicon vaccine vectors induce protective CD8⁺ T-cell immunity. *J Virol*, 2002, 76(8): 3791–3799.
- [19] Harvey TJ, Anraku I, Linedale R, et al. Kunjin virus replicon vectors for human immunodeficiency virus vaccine development. *J Virol*, 2003, 77(14): 7796–7803.
- [20] Anraku I, Mokhonov VV, Rattanasena P, et al. Kunjin replicon-based simian immunodeficiency virus gag vaccines. *Vaccine*, 2008, 26(26): 3268–3276.
- [21] Kent SJ, Rose RD, Mokhonov VV, et al. Evaluation of recombinant Kunjin replicon SIV vaccines for protective efficacy in macaques. *Virology*, 2008, 374(2): 528–534.
- [22] Hoang LD, Anraku I, Wang XJ, et al. A Kunjin replicon vector encoding granulocyte macrophage colony-stimulating factor for intra-tumoral gene therapy. *Gene Ther*, 2009, 16(2): 190–199.

《生物工程学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要：基本要素包括研究目的、方法、结果和结论（不用单列标题书写）。目的 (Purpose)：主要说明作者写此文章的目的，或说明本文主要要解决的问题；方法 (Methods)：重点说明作者的主要工作过程及使用的方法。应用性文章如需要，可注明条件、使用的主要设备和仪器。结果 (Results)：本文最后得出的结果（实验数据部分）。结论 (Conclusions)：如为基础研究，应写明本文的创新之处，及文章在讨论部分表述的观点；如为应用性研究，应尽可能提及本文结果和结论的应用范围和应用情况或应用前景。

2. 综述摘要：包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望，尤其要注意结合自己的研究工作。

3. 英文摘要的撰写要点：英文摘要的内容应与中文摘要一致，但比中文摘要更详尽。英文摘要完成后，务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的，即使学术上可以达到刊出的水平，本刊也将推迟发表。

(1) 建议使用第一人称，尽量不使用第三人称和被动语态。

(2) 建议用主动语态，被动语态表达拖拉模糊尽量不用，这样可以免好多长句，以求简单清晰。

(3) 尽量使用清晰简练的短句，避免很长的句子。注意正确使用英文写作习惯和语法。

(4) 摘要应当使用过去时态，语法正确，句子通顺。

(5) 摘要中避免使用缩写语，除非是那些人人皆知的（如DNA、ATP等），或者确实是非常长，而且出现多次的短语才允许用缩写语，并且在第一次出现时要写出全称。

(6) 在英语摘要中，不要使用任何汉字字符，包括标点、括号、温度、希腊字母等。

(7) 句子的开头处最好不要使用数字。