

类风湿性关节炎基因治疗的病毒载体与基因转移方法的研究进展

高 玲 许瑞艳 张省爱

滨州职业学院 山东 滨州 256600

【摘 要】：临床免疫系统性疾病中，类风湿性关节炎（RA）属于不可忽视的一种，且关节性滑膜炎为此疾病的主要特征表现。类风湿性关节炎疾病的传统治疗多以药物为主，但患者应用后的副作用较强，临床接受度较差。而随着时代的发展，生物治疗的研究出现得到广泛应用，但生物药剂的价格比较高，且经临床多次应用后发现，生物疗法的应用会限制人体免疫系统功能的使用，致使其机体被其他病毒所感染。因此，临床医学还需对类风湿性关节炎的有效诊治方法给予研究和探讨。在这篇文章中，我们将探讨基因治疗在类风湿性关节炎中的应用，并介绍病毒载体和基因转移技术的最新发展。

【关键词】：类风湿性关节炎；基因治疗；病毒载体；基因转移；方法研究

DOI:10.12417/2705-098X.23.10.006

Research progress on viral vectors and gene transfer methods for rheumatoid arthritis gene therapy

Ling Gao, Ruiyan Xu, Shengai Zhang

College of Health Binzhou Vocational College Shandong Binzhou 256600

Abstract: Among the clinical immune system diseases, rheumatoid arthritis (RA) is one that cannot be ignored, and articular synovitis is the main feature of this disease. The traditional treatment of rheumatoid arthritis disease is mainly drugs, but the side effects after application are strong and the clinical acceptance is poor. With the development of the times, the research of biological therapy has been widely used, but the price of biological agents is relatively high, and after many clinical applications, it has been found that the application of biological therapy will limit the use of the function of the human immune system, resulting in its body being infected by other viruses. Therefore, clinical medicine needs to study and discuss effective diagnosis and treatment methods of rheumatoid arthritis. In this article, we will explore the use of gene therapy in rheumatoid arthritis and introduce the latest developments in viral vectors and gene transfer technology.

Keywords: rheumatoid arthritis; Gene therapy; viral vectors; Gene transfer; Methodological research

类风湿性关节炎是一种严重的慢性关节炎，它会影响到人体的各种关节，而它的致病原理仍未被明确。类风湿性关节炎疾病发生后若未在时效期内及时完成诊疗，患者可随自身疾病的恶化而形成关节僵直、畸形又或是残疾等表现情况，严重影响其日常生活和工作。长时间以来，药物疗法、外科手术一直被作为此类疾病的常见干预方式，虽可改善相应的症状表现，但有效性欠佳，无法满足于患者的实际治疗需求。而随着近年来生物医学的发展和进步，基因治疗中载体的构建与表达成为了类风湿性关节炎疾病治疗成功的关键性因素^[1]。与此同时，在最佳情况下，载体具有优良的特征，如：浓缩率较高，能够快速被细菌接种，易于制备，而且能够多次使用。它们能够精确地针对某个特定细胞，将其结合在宿主染色体上，以附属物的形式出现，而且具有可以被调节的转录因子，而不会产生任何免疫反应。根据目前的研究结果，在针对类风湿性关节炎的基因治疗方面，主要采取了两种不同的载体技术：一种是病毒载体系统，另一种则是非病毒载体系统^[2]。本文将对类风湿性关节炎基因治疗的病毒载体进行深入研究，并分析其基因转移方法，具体综述内容如下文。

1 病毒载体系统

通过对病毒基因组的精心设计和重组，最终创造出一种能够载体化的病毒颗粒，它能够容纳来自其他病毒的基因，并且能够将这些基因转录到病毒载体中。现目前，临床基于对类风湿性关节炎的治疗中，常将病毒载体分为以下几种。

1.1 反转录病毒载体

反转录病毒是一种具有极高的研究价值和实际使用价值的病毒，它的基因编码仅有 10kb，但却拥有 3 个关键的基因：gag、env 和 pol。它是目前可能会作为一种有效的抗病毒药物。env 基因的排列方式是 5'，而-gag-pol-env-3'，其两端位于长末端重复区并实施对病毒的整合介导，这种载体具备许多显著的特征，例如：传播速度快、表型稳定、适用的宿主种类丰富、毒副作用较低。通过将 MT1-MMP 反义 mRNA 与传统载体结合，我们发现它们的抗类风湿关节炎活性比传统载体高出 15 倍，并且能够大幅度减少病毒载体的表达，从而有效缓解类风湿性关节炎病人的关节软骨受损和炎性病变。经过改造，我们能够在纤维细胞内合成 CLmRNA 和 RzCL533 的载体，这些载体能够在类风湿性关节炎患者的成纤维样滑膜细胞上进行传播。结

果表明, CLmRNA 的含量比对照组下降了 44%, rzcl533 和 rzcl790 的含量也下降了 20%, 而 CL 蛋白的含量则从原先的 16.0 $\mu\text{g/L}$ 下降到了 4.1 $\mu\text{g/L}$ 和 8.2 $\mu\text{g/L}$ 。与此同时可最大程度上减轻对患者软骨的损害, 抑制其关节炎症的严重性。但反转录病毒载体同样存在些许不足, 如: 反转录病毒对分裂增殖期的细胞产生转染作用, 且表现为随机与受染细胞进行整合的特点, 可增加潜在性的危险因素; 基于此, 临床还需对此病毒载体进行科学的改造, 以此来确保人体应用的安全性。

1.2 慢病毒载体

慢病毒是一种免疫缺陷性病毒, 可将其归于逆转录病毒类别, 其主要是因慢性转染而被大众所熟知。经过一些学者的深入探索, 他们发现, 逆转录病毒载体和慢病毒载体的差异在于: 前者既可能转染分离的细菌, 也可能转染非分裂细胞, 从而在临床神经系统、巨噬细胞、肝脏和造血干细胞的转移治疗过程中取得良好的疗效; 然而, 由于 G0 期细胞的特性, 它们的逆转录过程受到了限制, 从而使得慢病毒无法完成对 G0 期细胞的转移治疗。研究发现, 通过在患有类风湿性关节炎鼠身上植入一种具有 TNF α 基因的人工免疫缺陷病毒载体, 即可显著降低其对膝关节滑膜细胞增生和血管翳形成的影响, 同时还可能快速地传播到患有 SCID 疾病动物身上。目前, 免疫缺陷病毒已作为遗传学诊断的重要工具, 然而, 由于其使用上的局限性, 仍然面临着许多挑战, 因此, 必须加强对其滴定、持久性的研究^[3]。

1.3 腺病毒载体

腺病毒是无包膜的线性双链 DNA 病毒, 具有 36kb 的基因组长, 并具备早期和晚期的转录活性, 早期的分子序列分别由 E1、E2、E3 和 E4 构成, 晚期的分子序列分别由 L1、L2、L3、L4 和 L5 构成。在基因组的 1.0 到 1.6Mu 范围内, E1 基因可以帮助病毒进行复制, 但如果 E1 基因缺失, 就会导致缺陷腺病毒载体的形成。而 E3 基因在基因组的 78 到 86Mu 范围内, 它可以帮助病毒进行不需要的复制, 同时也可以成功地将外部基因植入。腺病毒载体具有五大显著的优势, ①它能够有效地传播和修复 E1 和 E3 区, 从而提供多种有用的抗病毒药物, 并且能够有效地进行多种病毒的转录和扩增。②在细胞培养物中的重组病毒产量滴度较高; ③腺病毒进入至细胞后与其宿主细胞无法完成基因组整合, 瞬间表达性较强, 应用安全性较高。但由于腺病毒载体的优点较多, 其可符合类风湿性关节炎的治疗应用。研究表明, 将胶原诱导的关节炎模型注入腺病毒载体的鼠关节内, 与未注入的对照组相比, 前者的关节炎炎症程度有了显著的改善, 血管内皮生长因子的数量也有了明显的减少, 而凝血酶敏感素 1 和转化生长因子 β (TGF β) 的生成量也有了显著的增加, 从而有效地抑制了滑膜肿胀的症状, 从而达到了良好的关节炎治疗效果。④可实现对非分裂细胞的转染。⑤基因组大, 可行大片段的外源基因插入。

1.4 腺相关病毒载体

腺相关病毒载体是一种 DNA 病毒, 它的结构相对简单, 但具有一条线状单链 DNA, 它能够通过辅助病毒的作用, 将病毒转染到脑、肝脏、骨骼肌等多种细胞, 具有良好的转染效率, 而且具有较低的抗原性和毒性, 分析优、劣势在于。优势: 可以插入更多的外源基因, 可以有效地包装细胞, 制备滴度更高, 制备过程更加简单。

1.5 疱疹病毒载体

HSV1 是一种人嗜神经病毒载体, 它能够在神经元细胞内建立潜伏转染。且具有两种不同形态表现: 一种是扩增子载体, 它能够将 HSV1 的复制起点和包装信号序列插入至细菌的质粒中, 而当其转染至包装细胞后, 可行 HSV1 来完成病毒超转染的辅助, 以此获取含扩增子的假病毒。另一种是重构的 HSV1, 它能够通过删除了全部非必需基因, 以此来减弱细胞毒性, 可实现在宿主神经元细胞中外源性治疗基因的长期表达。而松鼠猴疱疹病毒则是疱疹病毒类型, 表现为双连 DNA 分子结构, 较容易对哺乳动物细胞的转染。且松鼠猴疱疹病毒载体是首个被应用的基因治疗载体。经体内外的实验证实, 松鼠猴疱疹病毒载体是首个被证明具有良好治疗效果的基因治疗载体, 它能够有效地将特定基因转录到靶组织, 并能够在体内和体外进行持久的表达。

2 基因转移具体方法

基因治疗是一种利用先进的生物技术, 将正常和治疗作用的基因通过特定的方法植入靶细胞, 纠正基因的缺陷而发挥治疗作用, 进达到治疗目的的生物医学高技术。现可将质粒 DNA 进入靶组织的方式分为以下几种。

2.1 电转移法

体内电转移法属于较为常见的非病毒载体转移基因的方式, 属于物理方法的一种。电转移技术在体内应用时, 具有成本低廉、操作简单、安全性高的优势, 而且通过对组织结构的变化、质粒 DNA 的重新排列以及蛋白质编码的优化, 可以依托于生物扰动、质粒 DNA 的结构和编码蛋白的设计等大大提高效率。此外, 体内电转移被认为是当前最有效的非病毒基因转移技术, 临床将对此归于研究的热点话题。通过 CIA 鼠模型的实验, 我们发现电转移技术可以有效地转运抑制炎症细胞因子和抗炎性细胞因子的基因治疗。

2.2 基因枪直接注射法

基因枪是一种高效的基因转移工具, 它能够以 4 μm 的钨等金属颗粒精确地投放到细胞内, 从而使得特定的基因能够被转移到细胞内。若将目的 DNA 附着于金属粒子表面即可实现直接性的基因转移。基因枪直接注射法的优势在于: 其可直接用于细胞/组织的操作, 应用便捷性较强。且另有研究证实基因枪可向 CIA 鼠模型行 IL4 质粒表达的直接注射, 以此来改善

此鼠的炎症程度，减少发病率。

2.3 脂质体转染法

脂质体属于阳离子脂质体基因转移媒介，具有许多显著的优点，如生产快速、安全、有效、操作简单、转移成本低廉，因此，它被越来越多的人所采纳，并被广泛地运用于外源基因转移的实验和治疗，受到了医学界的一致好评。通过将 IL8 基因表达于真核表达载体，并将其以脂质体方式转染至 RA 小鼠的原始滑膜细胞，我们发现表达的抗炎性细胞因子和蛋白的表达量都比对照组高出许多。此外，通过荧光免疫细胞化学染色法的检测，我们发现 IL18 基因也成功被表达出。尽管脂质体和 DNA 复合体可以用作转基因的工具，但它们的转基因效果却不如病毒载体。这可能的原因可能是，脂质体介导的转基因有赖于受染细胞的分裂增值活性，而即使在生长旺盛的肺癌组织中处于分裂期的瘤细胞也 <20%。

2.4 人工酵母染色体法

人工酵母染色体法是一种新型载体技术，它拥有高效的克隆百万碱基对的特异性，从而有效确保巨大基因的完整性，并且它的顺序和基因的排列也没有发生任何改动，从而极大地改善了转基因动物的基因组组成和表达效果。人工染色体表达系统是基于自身特性，开发出来的，它不仅不受病毒影响，还能像自身染色体那样正常运行，与其他表达载体相比，它具有更大的潜力，能够持续、更加稳定地表达特异性基因。通过在佐

剂性关节炎鼠的滑膜组织内注射 24 至 48 小时后检测被移植的人工染色体的表达水平会显现为明显提升。

3 结论

类风湿性关节炎属于一种难治性疾病，其基因治疗的研究工作已被医学界所重视。现目前，动物实验的成果在很大程度上推动了研究进展，但基因治疗在体外又或是动物试验中所获得的结果无法在人体中完全体现，临床研究面临的问题较多。经过深入研究，我们发现基因治疗中存在的一些问题，其中最主要的是：①缺少理想的类风湿性关节炎动物模型；②载体的选择是基因治疗研究中的一个难题；③载体可能会传播到靶器官，导致患者的免疫反应变得异常强烈；④动物模型只能模拟疾病的一部分，而无法完整地反映整个系统的表现。⑤非病毒载体作为一种新型的基因转运技术，具有表达转运时间短、转染率低的特点，但其方式应用稳定性强、可容纳大容量外源基因、不会引发人体免疫系统反应等优点，而且它们易于生产，有望成为一种有效的基因治疗载体；⑥然而，由于目标基因的稳定表达性较差，它们所产生的物质无法满足临床类风湿性关节炎的治疗需求。

总之，随着现代免疫学、基因工程技术、分子生物学的发展，临床对于类风湿性关节炎的病因、发病机制将会有更深入的认知，且基因转移治疗也会取得更加突破的进展，进而为类风湿性关节炎疾病的临床治疗提供更加便利的治疗条件。

参考文献：

- [1] 余明芳,陈白露,何欣玲,等.时辰艾灸干预类风湿性关节炎模型大鼠核心钟基因 Clock、Bmal1 表达与细胞焦亡的关系[J].中国组织工程研究,2022,26(35):5700-5706.
- [2] 卢燕玲,曹爱娣,蔡春芳.以全基因组关联分析大数据为基础的孟德尔随机化方法探究类风湿性关节炎与宫颈癌发病风险的因果关联[J].循证医学,2021,21(3):151-154,172.
- [3] 郑国洪,孙斌,王晶晶,等.杜仲皮水提取物调节 circFADS2 靶向 miR-491-5p 干预类风湿性关节炎滑膜成纤维样细胞生长与凋亡[J].中国病理生理杂志,2021,37(11):2044-2049.

作者简介：高玲，女（1976.10-），汉族，山东菏泽人，硕士，滨州职业学院，副教授，研究方向：健康管理；许瑞艳，女（1973.01-），汉族，河北邯郸人，硕士，滨州职业学院，副教授，研究方向：大学生健康。