

重组腺相关病毒载体诱导的天然免疫反应及机制

刁勇, 许瑞安

分子药物教育部工程研究中心, 华侨大学分子药理学研究所, 泉州 362021

摘要:重组腺相关病毒(rAAV)已成为基因治疗领域应用最广泛的载体之一。临床前研究显示其具有很高的安全性,但人体免疫毒性仍是制约其临床疗效的关键,因此有关rAAV免疫机制的研究成为近期热点。尽管天然免疫在获得性免疫反应中发挥重要作用,但与rAAV有关的天然免疫研究过去一直未被重视。直到最近,才确认有至少3种人体细胞(树突状细胞、巨噬细胞和内皮细胞)参与了rAAV的天然免疫,作用机制为可识别载体基因组的TLR9或病毒衣壳TLR2所介导,NF- κ B或干扰素调节因子(IRFs)信号通路被激活,导致各种炎症因子及I型干扰素的大量表达。自身互补型rAAV诱导的TLR9依赖性天然免疫较单链rAAV更为强烈。本文重点对近期发现的激活天然免疫反应的宿主与rAAV的相互作用、涉及的信号通路、天然免疫对获得性免疫以及转基因表达的影响进行综述。

关键词:重组腺相关病毒,基因治疗,免疫,信号通路

中图分类号:R392 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2012)05-0550-08

随着重组腺相关病毒(rAAV)载体在基因治疗领域的广泛应用,人们逐渐认识到rAAV并不是原来一直认为的对人完全没有致病性^[1-2],在人体应用时甚至会引起严重的细胞免疫毒性^[3]。近年来对rAAV进行的大量基础免疫学研究,发现rAAV诱导的天然免疫及获得性免疫反应与其它病毒基本类似^[4]。抗原呈递细胞(APC)通过模式识别受体(PRRs)识别入侵AAV的病原体相关分子模式(PAMPs)后,天然免疫反应立即启动。参与天然免疫反应的细胞主要是外围组织中的巨噬细胞和树突状细胞(DC)等。APC通过有关信号转导级联反应,激活核因子- κ B(NF- κ B)和干扰素调节因子(IRFs)等转录因子,启动IL-6、TNF- α 和I型干扰素(IFN-I)等炎症因子的表达,刺激APC的成熟,增强细胞

的吞噬活性,上调抗原处理所需要的主要组织相容性复合体(MHC)分子、共刺激分子CD80/86等的表达。当APC迁移到淋巴结后,将病毒抗原以MHC I或MHC II复合物的形式递呈至天然淋巴细胞,分别致敏抗原特异性CD8⁺和CD4⁺T细胞,随即激活获得性免疫反应。但rAAV诱导的天然免疫反应及涉及的机制也明显具有鲜明的特点,以下将近期研究结果进行阐述。

1 免疫细胞对rAAV的识别

1.1 浆细胞样DC

浆细胞样DC(pDCs)是连接天然和获得性免疫的桥梁^[5-6]。pDCs是DC两大主要亚群之一,最初

基金项目:国家“863计划”(2008AA02Z135),国家科技重大专项(2009ZX09103-643),国家自然科学基金(30973591)

作者简介:刁勇(1967-),男,山东鄄城人,教授,博士,研究方向为基因治疗。Tel: +86-595-22692516; Fax: +86-595-22690516; E-mail: diaoyong@hqu.edu.cn

收稿日期:2011-12-20;修回日期:2012-02-23

被发现于免疫活性活跃的病理标本或肿瘤淋巴结内,与高内皮静脉密切接触。其形态与浆细胞非常类似,但具有抗原递呈功能。人 pDCs 随血流在体内循环,主要存在于淋巴组织(淋巴结、扁桃体、脾、胸腺、骨髓、派氏斑)和特定的外周组织(胎儿肝脏)。pDCs 可以聚集于在炎症部位(如增生淋巴组织)。pDCs 可直接和/或间接激活许多其它免疫细胞,如单核细胞、常规 DC (cDCs)、B 细胞、NK 细胞、T 细胞等。

AAV 是单链 DNA 病毒,早期 rAAV 即单链 rAAV (ssrAAV) 的基因组也是单链 DNA,因此可特异性识别病毒 DNA 中 CpG 基序的受体 TLR9 自然成为研究的重点。TLR9 在人 pDCs 中大量表达,是 pDCs 识别病毒核酸的主要 PRRs。在静息 pDCs, TLR9 主要定位于内质网,在受到病原体刺激后,可与内质网跨膜蛋白 UNC93B1 相互作用,并转移至内质网膜上以识别相应的 PAMPs。

小鼠及人源性 pDCs 经 ssrAAV 刺激,可大量分泌 IFN- α 和 IFN- β 等 IFN-I,但炎症细胞因子 IL-6 和 TNF- α 的表达变化不明显^[7]。缺失 TLR9 的 *Tlr9*^{-/-} 小鼠 pDCs,经 ssrAAV 刺激不能促进 IFN-I 的表达,但 *Tlr2*^{-/-} pDCs 无影响。以 TLR9 拮抗剂 H154 寡脱氧核苷 (ODN) 预处理人 pDCs,ssrAAV 对 IFN-I 的诱导作用完全丧失。rAAV 对 pDCs 的刺激作用与 rAAV 的衣壳类型(血清型)无关,与携带的转基因类型无关。说明 TLR9 是 pDCs 在胞内识别 rAAV 的 PRRs,rAAV 基因组内 CpG-DNA 基序是 TLR9 的 PAMPs,ssrAAV 诱导 pDCs 的天然免疫效应是大量产生 IFN-I。

1.2 枯否细胞

以根本不包含任何核酸成分的空心 AAV 颗粒刺激人肝脏原代枯否细胞,炎症细胞因子 TNF- α 和 IL-1 β 的表达显著增加,说明枯否细胞一定存在可识别 AAV 衣壳成分的 PRRs^[8]。经门静脉注射的 rAAV 诱导小鼠肝脏 TLR2 的表达增加,提示 TLR2 有可能也是 AAV 的 PRRs^[9]。以 TLR2 抗体预处理枯否细胞后再刺激,TNF- α 和 IL-1 β 的表达增加得以抑制。稳定表达 TLR2 和辅助蛋白 CD14 的细胞株 HEK293/hTLR2-CD14 以空心 AAV 颗粒刺激后,报告基因 IL-8 表达显著上调,但野生型 HEK293 细胞则无反应^[8]。说明 TLR2 的确可以识别 AAV 衣壳上的 PAMPs。

在 TLR2 被发现之初,人们认为其在细胞膜表面与 TLR1 或 TLR6 形成异源二聚体,负责识别细菌或支原体的酰基脂蛋白^[4]。最近研究表明,TLR2 也具有识别病毒衣壳 PAMPs 的功能^[10],AAV 衣壳显然也含有可被 TLR2 识别的 PAMPs^[8]。

AAV 衣壳对枯否细胞表面 TLR2 的激活需要达到一定阈值^[8]。当 rAAV 的感染复数 (MOI) 为 1×10^3 时无明显的炎症反应。当 MOI 提高到 1×10^5 时才观测到明显的炎症基因表达激活,TLR2、TLR2 下游 NF- κ B 信号通路的接头蛋白 IL-1 受体相关激酶 2 (IRAK2)、炎症因子 (IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1 样受体 2 (IL-1R2)、TNF- α 、IL-6、IL-10 等)、趋化因子 (MCP-1 和 MIP-1 等) 的表达明显增加,但 TLR3、TLR6 和 TLR9 的表达下调,IFN-I 和干扰素响应基因的表达不变。说明 AAV 衣壳通过 TLR2,激活了枯否细胞的 NF- κ B 信号通路,但涉及的机制与 pDCs 内 TLR9-IRFs 信号通路^[7] 明显不同。

rAAV 在体内也可以激活枯否细胞的天然免疫反应^[9,11]。以氯化钆反复处理灭活肝内枯否细胞后,自身互补型 rAAV (scrAAV) 诱导的 IFN- α/β 、IFN- γ 诱导蛋白 10 (IP-10) 和 IL-6 的表达增加完全被抑制,TLR9、接头蛋白髓系分化因子 88 (MyD88)、单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1) 和巨噬细胞炎症蛋白 1 (MIP-1) 的表达部分降低,而 TNF- α 和 TLR2 的表达则没有明显改变^[3]。这与 Zaiss 等^[11] 的实验结果基本一致,说明 rAAV 在肝脏引起的天然免疫反应至少部分依赖于枯否细胞。

但 TLR9 一定参与了 rAAV 诱导的体内肝脏天然免疫反应,且对 scrAAV 的反应程度明显强于 ssrAAV。小鼠经门静脉注射 ssrAAV 2 小时后,其肝内 TLR9 及其下游信号接头蛋白 MyD88、炎症细胞因子 (TNF- α 、IP-10、MCP-1)、IFN-I 的表达增加 3-4 倍。scrAAV 诱导后,除前述炎症因子增加幅度更高外,肝内 IL-6、IL-12 α 、受激活调节正常 T 细胞表达和分泌因子 (RANTES)、MIP-1、TLR2 的表达也显著增加,且血清 IL-6 水平也显著升高。TLR9 报告细胞 HEK-293-TLR9 的体外刺激实验表明,scrAAV 对 TLR9 的激活能力高于 ssrAAV 3 倍,且与载体血清型及转基因无关。与野生型小鼠比较,*Tlr9*^{-/-} 小鼠门静脉注射 scrAAV 后,肝内与天然免疫相关的标志因子均显著降低,特别是 IL-6、MCP-1 和 TNF- α 等几乎与未给药组一致,但 TLR2 降低不明显。说

明肝内天然免疫反应的激活与 TLR2 和 TLR9 均有关,且不仅仅是枯否细胞发挥作用。

1.3 内皮细胞

从人原代肝细胞内分离的肝窦内皮细胞的体外表现与枯否细胞类似^[8],说明二者均可以经 TLR2 活化。人血管内皮细胞(HUVEC)是大血管内皮细胞,静息状态几乎检测不到 TLR2 的表达,在炎性刺激后,如经 IL-1 β 或 TNF- α 处理,TLR2 的表达上调高达 300 倍^[12]。以 AAV 衣壳诱导经炎性刺激的 HUVEC,发现 TNF- α 和 E-选择素的表达均显著升高^[8],说明可以经 TLR2 活化。

1.4 cDCs

在体外,rAAV 本身不能激活人 cDCs 的 NF- κ B 信号通路^[13],也不能激活 IRFs 信号通路^[7]。但在炎性细胞因子(TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、PGE2)刺激下,NF- κ B 亚基 p52 蛋白的胞内水平明显增加,说明非经典 NF- κ B 通路被激活^[13]。以 rAAV 和上述炎性细胞因子同时刺激人 cDCs,可促进共刺激分子 CD83 和 CD86 的表达,而这两种分子被认为是未成熟 DC(iDC)转变为成熟 DC(mDC)的主要标志。rAAV 转导被激活的 cDCs 后,转基因表达大幅增加。因 DC 成熟化最显著的功能变化就是从病原体摄取转变为抗原递呈,所以可以推测,被 rAAV 转导的 mDC 递呈转基因抗原并诱导获得性免疫反应的能力将大大增强^[14]。rAAV 所诱导的获得性免疫反应程度与衣壳血清型有关^[15],暗示 TLR2 可能参与了 cDCs 的免疫反应。

1.5 巨噬细胞

血浆补体系统也是天然免疫的重要成分。体外转导试验表明^[16],血清可以促进巨噬细胞对 rAAV 的摄取,并增强 NF- κ B 依赖性炎性因子(MIP-2、IL-1 β 、IL-8、MIP-1 β)的表达。当血清经加热失活或排空补体 C3 后,则恢复至基础水平,说明补体 C3 参与了巨噬细胞对 rAAV 的天然免疫反应。补体系统的激活可导致微生物的调理素化,促进靶细胞的裂解。补体系统激活后,形成 C3 转化酶,C3 裂解为 C3a 和 C3b。C3b 可维持 C3 的继续裂解,并激活下游补体蛋白和效应器。而 C3b 转化为 iC3b 后,则抑制 C3 的裂解,下调补体系统。补体 C3、C3b 和 iC3b 可直接与 rAAV 的衣壳结合,调节天然免疫反应。但体内研究显示,血浆补体系统对 rAAV 诱导的天然免疫反应无明显影响^[16]。

2 rAAV 诱导的信号通路

2.1 IRFs 信号通路

IRFs 因能与 IFN- λ 的病毒诱导类增强子元件结合,并诱导 IFN- λ 的表达而被命名。作为转录因子,IRFs 在 IFN 的转录调控、病原体的免疫反应、细胞因子的信号转导、细胞增值调控和造血干细胞的发育分化等方面均发挥非常重要的作用。IFN- λ 的生成是抗病毒免疫反应非常关键的组成部分^[17]。IFN- λ 可诱导数百个与细胞抗病毒状态有关的基因表达。缺乏 IFN- λ 受体小鼠对病毒感染极度敏感,即说明 IRFs 信号通路的重要性^[18]。所有识别核酸的 TLRs 均可诱导 IFN- λ 的表达,也说明 IFN- λ 在抗病毒免疫反应中的重要性。

pDCs 是体内最重要的 IFN- λ 的生产细胞^[19],其生产 IFN- λ 的效率是其它细胞的 100 倍以上。TLR9 只诱导 pDCs 生成 IFN- λ ^[20]。TLR2 不在 pDCs 表达^[21],也不诱导其他类型细胞产生 IFN- λ 。因此,rAAV 只能通过 TLR9 激活 pDCs,并经 TLR9-MyD88-IRF-7 信号通路产生 IFN- λ (图 1)^[2]。

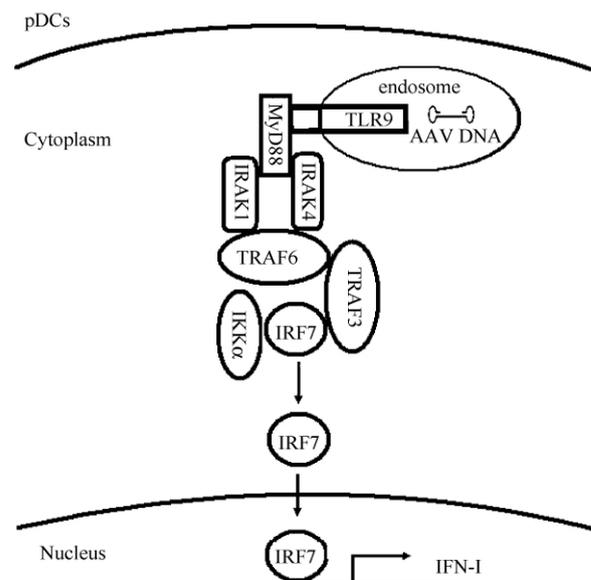


图 1 浆细胞样树突细胞内 TLR9-MyD88-IRF-7 依赖性 I 型干扰素的产生

Fig. 1 TLR9-MyD88-IRF-7 dependent type I interferon production in plasmacytoid dendritic cells.

根据其它病毒激活 pDCs 分泌 IFN- λ 的研究结果,推测 rAAV 激活 TLR9-MyD88-IRF-7 信号通路的

基本过程如下(图1): rAAV 经内吞或转导作用进入 pDCs 后, 其基因组内未甲基化的 CpG DNA 与细胞内涵体膜上 TLR9 的结合, 启动 TLR9-MyD88-IRF3 信号通路。TLR9 通过同嗜相互作用招募 MyD88 和 IRAK 家族成员。被招募的 IRAK-4 可促使 IRAK-1 的磷酸化, 活化的 IRAK-1 促使 IRF-7 的磷酸化和泛素化。活化的 IRF-7 随即入核, 与干扰素基因启动子的正性调节域结合, 启动 IFN- γ 的表达。

IRF-7 在静息态的 pDCs 中高表达, 是宿主干扰素反应的主要参与者^[22]。TLR9 介导 MyD88 可以活化 IRF-7, 但不能活化 IRF-3。TLR9 刺激后, 来自 IRF-7^{-/-} 小鼠的 pDCs 无干扰素诱导反应, 而 IRF-3^{-/-} 小鼠的 pDCs 干扰素诱导反应正常。因此, pDCs 的 IFN- γ 诱导完全依赖于 IRF-7。此外, CD8⁺ T 细胞反应的诱导也依赖于 IRF-7 的活化。因此, IRF-7 不仅对天然免疫重要, 对获得性免疫也很重要。

IRAK-1 是 IRF-7 活化的关键接头蛋白。体外研究表明, IRAK-1 可以直接结合磷酸化的 IRF-7。IRF-7 在脯氨酰异构酶 PIN1 介导的异源二聚体化后^[23], 可直接由 IRAK-1 磷酸化。IRAK-1 基因敲除小鼠不能发生 TLR9 介导的 IFN- α 生成。活化的 IRAK-1 还可以进一步招募 IRF-5、TNF 受体相关因子-6 (TRAF-6)、TRAF-3、和 I κ B 激酶 (IKK α) 等, 协同 IRF-7 的功能发挥^[24-25]。被 NIK 激活的 IKK α , 也能够直接磷酸化 IRF-7^[26]。有报道骨桥蛋白也参与 IRF-7 的激活, 但其作用仍然不明^[27]。

2.2 NF- κ B 信号通路

NF- κ B 是一类可诱导活化的二聚体转录因子, 其靶基因主要是参与天然免疫及病原体防御的基因, 以及与炎症、损伤、应激和急性反应有关的基因。处于静息态的细胞中, NF- κ B 同源或异源二聚体与 NF- κ B 抑制蛋白 (I κ B) 结合, 将二聚体滞留在细胞质中, 无法启动靶基因的转录。当 I κ B 被降解后, NF- κ B 二聚体被活化, 然后入核与 DNA 结合, 启动靶基因的表达。根据 NF- κ B 二聚体组成及其活化过程的不同, 可将其调控通路分为经典或非经典通路。

2.2.1 经典 NF- κ B 通路: NF- κ B 异源二聚体 p50/p65 的形成, 是经典 NF- κ B 通路激活最重要的特征。细胞表面的 TLR2 及内涵体膜上的 TLR9 等受体与相应配体 (AAV 衣壳或基因组 DNA) 结合后, 刺激 MyD88 招募 TRAF-6 等接头蛋白。TRAF-6 本身具有泛素酶活性, 触发自身及 NF- κ B 基本调节因子

(NEMO) 发生 K63 多聚泛素化。TRAF-6 通过 K63 多聚泛素链募集 TGF- β 激活激酶 1 (TAK1), 并与 TAK 结合蛋白 (TAB) 2 和 3 结合形成 TAK1 复合体。TAK1 复合体导致 IKK 复合体中的 IKK β 磷酸化并使之活化。IKK 复合体由 IKK α 和 β 以及调节蛋白 NEMO 组成, NF- κ B 抑制蛋白 (I κ B) 的磷酸化主要由 IKK 复合体中的 IKK β 所控制。活化的 IKK β 导致 I κ B 磷酸化。磷酸化的 I κ B 在泛素 E3 连接酶 SCF β TrCp 的催化下发生 K48 多聚泛素化, 导致 I κ B 被 26S 蛋白酶体水解, 并与 NF- κ B 二聚体解离。游离的 NF- κ B 二聚体 (p50/p65 异二聚体) 被转运入核, 与 NF- κ B 的 DNA 结合位点结合, 激活靶基因转录。

在经典 NF- κ B 通路中, TAK1 复合体是 TRAF 蛋白和 NF- κ B 的重要连接因子, TAK1 与其调控蛋白 TAB 组成的复合体直接磷酸化 IKK β 。IKK β 和 Nemo 是激活 p65/p50 必不可少的, 而 IKK α 在很大程度上是可有可无的。通过 IKK β 磷酸化 I κ B α , 从而激活 p50/p65 异二聚体, 是经典 NF- κ B 通路最重要的过程特征。

scrAAV 经尾静脉给药后 2 小时, 即可在小鼠肝脏检出 NF- κ B 亚基 p50 的表达增加, 同时参与经典 NF- κ B 通路的受体 TLR2 和 TLR9、接头蛋白 (MyD88、TRAF 等)、炎症细胞因子 (IL-1 α 、IL-6、TNF- α 、IL-12 α 等)、IFN- γ 的表达增加^[13]。在给药前 1 天, 小鼠腹腔注射可抑制 IKK α 和 IKK β 活性的药物 BAY11, NF- κ B 通路激活引起的各种炎症因子的表达均受到抑制, 但与经典 NF- κ B 通路无关的因子, 如 IFN- γ 的表达则不受 BAY11 的影响。这些结果说明, rAAV 转导肝脏引起的促炎症细胞因子表达的瞬态升高是由经典 NF- κ B 通路激活所介导的。

2.2.2 非经典 NF- κ B 通路: scrAAV 体外转导 HeLa 细胞后, 参与非经典 NF- κ B 通路的标志分子 p100 和 p52 表达水平显著提高, 而参与经典 NF- κ B 途径的标志分子 p65 并没有受到影响, 表明 scrAAV 体外转导可以激活非经典 NF- κ B 通路^[13]。scrAAV 经尾静脉给药 9 小时, 在小鼠肝脏检出 p65 的表达增加, 但在更早时间及 24 小时后则未检出。说明非经典 NF- κ B 通路的激活迟于经典通路。经典通路主要是与炎症有关, 该通路激活引起的炎症信号, 也可能有助于激活非经典通路。

非经典 NF- κ B 通路的激活取决于 IKK α , 而不是 IKK β 或 NEMO。非经典 NF- κ B 通路的受体与配体结合后, 募集包括 TRAF3 在内的接头蛋白。本来

与 TRAF3 紧密结合的 NF- κ B 诱导激酶 (NIK) 被释放而恢复活性。活化的 NIK 导致 IKK α 的磷酸化, 从而导致与之结合的 p100 在 Ser-866 和 Ser-870 处发生磷酸化。磷酸化的 p100 募集 β TrCP E3 连接酶复合物, 导致在 Lys-855 处发生 K48 多重泛素化, 随后在蛋白酶体降解形成 p52。p52 与 RelB 形成 p52/RelB 异源二聚体。RelB/p52 发生核移位, 转录激活相应的靶基因。

前已述及在炎症因子的刺激下 cDCs 胞内非经典 NF- κ B 通路被激活, rAAV 转导后表达转基因的效率提高^[13]。有充分的证据表明, NIK 是激活 DC 内非经典 NF- κ B 通路必不可少的^[28], NIK 激活导致 DC 内共刺激分子, 细胞因子和趋化因子的表达上调, 促进抗原呈递。所以非经典 NF- κ B 通路的激活, 有助于启动获得性免疫反应。

3 对获得性免疫反应的影响

天然免疫的激活是诱导获得性免疫反应的前提^[1]。rAAV 与 APC 相互作用, 刺激 APC 的活化和成熟, 并促进 APC 迁移到淋巴结, 与天然 T 细胞接触。APC 的成熟度决定获得性免疫的性质是免疫激活还是免疫耐受。T 细胞的致敏需要 3 种信号的协同作用。信号 1 是 APC 表面递呈的 MHC 抗原复合物与 T 细胞受体 (TCR) 的相互作用, 其中 MHC I 抗原复合物与 CD8 + T 细胞受体结合, MHC II 与 CD4 + T 细胞受体结合。信号 2 是共刺激分子 CD80/CD86 和 CD28 的相互作用, 可促进 T 细胞功能和生存。共刺激分子 CD40 - CD40L 的相互作用也是信号 2 的一部分, 可进一步激活 APC, 支持 CD80/86 上调。各种炎症细胞因子共同组成信号 3, 决定 T 细胞的分化状态。信号 3 中 IL-12 和 IFN- α 利于致敏 Th1 型 CD4 + T 细胞, 有助于形成细胞毒性 CD8 + T 淋巴细胞 (CTL)。IL-4、IL-6 和 IL-10 利于致敏 Th2 型 CD4 + T 细胞, 有助于 B 细胞发育和抗体的产生。TGF- β 则利于致敏调节性 T 细胞 (Treg)。

3.1 AAV 衣壳特异性获得性免疫反应

小鼠肌肉注射 ssrAAV 第 12 和 26 天, 可检出大量的 AAV 衣壳抗原专属性 CD8 + T 细胞。对于 *Myd88*^{-/-} 或 *Tlr9*^{-/-} 小鼠, CD8 + T 细胞未被明显激活^[7], 说明针对 AAV 衣壳抗原的细胞免疫是由 TLR9-MyD88 信号通路所介导的天然免疫反应所诱导。在小鼠肌肉注射 ssrAAV 第 36 天, 在血清中检出高滴度的 AAV 中和抗体, 但 *Myd88*^{-/-} 或 *Tlr9*^{-/-}

小鼠的血清内均未检出^[7], 说明 rAAV 的体液免疫反应也由 TLR9-MyD88 介导。对 AAV 特异性中和抗体的亚型进行分析, 发现与野生型 BALB/c 小鼠比较, *Myd88*^{-/-} 和 *Tlr9*^{-/-} 小鼠血清内 IgG2a (Th1 依赖性 B 细胞反应的指标) 显著降低, 而 IgG1 (Th2 依赖性 B 细胞反应的指标) 和 IgG3 (不依赖 TH 的 B 细胞反应的指标) 降低不显著。在相同剂量下, scrAAV 诱导的细胞及体液免疫反应强于 ssrAAV^[3]。TLR9 抑制性 ODN 显著降低 CD8 + T 细胞水平, 延缓中和抗体的出现。IFN-I 对获得性免疫也非常重要, *Ifnr*^{-/-} 小鼠未见明显的细胞和体液免疫反应^[7]。从以上结果推测, TLR9 介导的天然免疫在诱导 AAV 衣壳特异性获得性免疫反应中发挥主要作用, 但 TLR2 对中和抗体的产生也发挥重要作用。

3.2 转基因特异性获得性免疫反应

小鼠肌肉注射 ssrAAV 后表达的转基因产物也可以激活 CD8 + T 细胞, 但 *Myd88*^{-/-} 和 *Tlr9*^{-/-} 小鼠显著降低, 注射部位 CD8 + T 细胞浸润也明显减轻^[7]。

有意思的是, 转基因特异性细胞免疫的动力学过程与 AAV 衣壳特异性有明显区别^[7]。转基因产物抗原特异性 CD8 + T 细胞在肌肉注射的第 26 天时才被大量检出, 其原因可能是来自 AAV 衣壳的抗原在给药后即可大量获得, 而来自转基因产物的抗原只能出现在转基因大量表达后, 一般需要给药 1 - 2 周后。因此本课题组曾质疑输入性衣壳蛋白是引起 rAAV 人体细胞免疫毒性的分析^[29], 认为可复制性类 AAV (rcAAV) 杂质所表达的衣壳蛋白才是真正的毒性元凶^[30], 并提出了可行的解决方法^[31]。也有研究认为 AAV 衣壳蛋白在体内需要数周时间的降解, 才能被 APC 有效递呈并激活 CD8 + T 细胞^[32]。

4 对转基因表达的影响

以同时激活经典及非经典 NF- κ B 通路的 VP16 处理 HeLa 细胞后, 再以 rAAV 转导, 转基因的表达效率提高 25 倍; 以同时抑制经典及非经典 NF- κ B 通路的 BAY11 处理, 转基因表达完全被抑制; 但以仅阻滞经典 NF- κ B 通路的吡咯烷二硫代氨基酸盐 (PDTC) 处理, 转基因表达不受影响^[13]。因此, 非经典 NF- κ B 通路对 rAAV 的转基因表达具有调节作用。非经典 NF- κ B 通路的激活会促进 DC 等抗原递

呈细胞的成熟和抗原递呈, 以免疫抑制剂短暂处理对 rAAV 的转基因长期表达没有任何影响^[13], 因此在用药后以免疫抑制剂短暂处理, 是减弱 rAAV 诱导免疫反应的有效方法^[33-34]。

5 总结

基于 rAAV 诱导的天然免疫反应表现及发生机制、对获得性免疫及转基因表达影响的现有认识, 本文提出 rAAV 本身及转基因产物诱导免疫反应的基本过程如下(图 2)。^①rAAV 刺激转导部位的 DCs、NK 细胞、粒细胞及巨噬细胞分泌各种炎症因子,^②rAAV 经内吞或转导等方式进入未成熟 APC (如 iDC)。^③各种炎症因子与 rAAV 共同促进未成熟 APC 的成熟化, mDC 将 AAV 衣壳抗原以 MHC 抗原肽复合物 (pMHC) 的形式递呈至细胞表面。^④3 种信号的协同作用致敏 T 细胞。^⑤Th2 细胞协助激活 B 细胞分泌抗原特异性抗体, 抗体攻击表面递呈 pMHC 的靶细胞。^⑥Th1 细胞协助激活 CTL, CTL 消灭表面递呈 AAV 衣壳 pMHC 的靶细胞。^⑦rAAV 转导靶细胞, 靶细胞表达转基因并递呈转基因产物抗原肽。^⑧靶细胞表达的转基因产物被 APC 吞噬, 加工处理为抗原肽, 按照前述步骤激活针对转基因的免疫反应。总之, rAAV 可以激活宿主细胞天然免疫反应, 该反应虽然非常短暂和轻微, 但在一定条件下, 也会诱导干扰转基因表达, 甚至引起细胞毒性的获得性免疫反应。TLR9 是介导 rAAV 免疫反应的主要受体, 在大剂量刺激条件下 TLR2 也可发挥重要作用。这两种受体既可引起 NF- κ B 通路的活化, 也可引起 IFN- γ 的高表达, 但炎症因子的激活模式因细胞而异。

rAAV 临床研究出现的免疫毒性, 大大促进了 rAAV 免疫学的研究, 加深了对其基本过程和机制的认识。但在细胞间^[7-9, 13]、体内外^[8-9, 16]、动物种属与人类之间^[35-36] 获得的研究结果仍存在极大的差异, 对 rAAV 载体血清型、转基因类型对免疫反应的影响等问题也存在争议。不同给药途径, 所转导靶组织或靶细胞的差异, 都对 rAAV 所诱导的免疫反应有显著影响^[1]。动物实验表明, 合用免疫抑制剂^[33]、改变 rAAV 血清型等策略确实可以发挥预防或降低 rAAV 免疫反应风险的作用, 但要想更加有效地指导临床研究的合理设计, 大量的基础研究仍是本领域研究人员的首要任务。

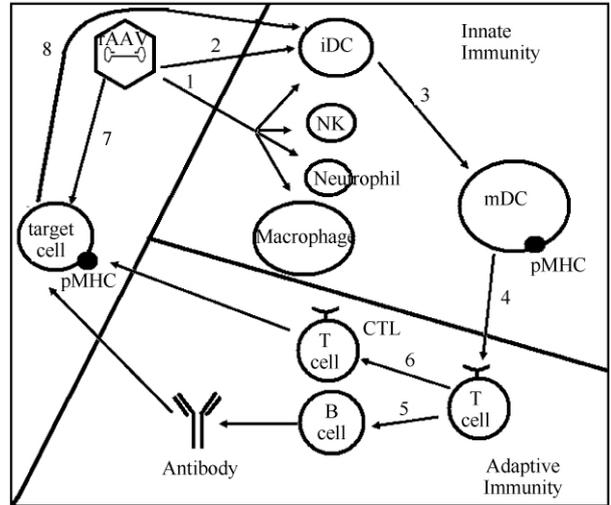


图 2 rAAV 及其转基因产物诱导天然及获得性免疫反应

Fig. 2 Innate and adaptive immune response to rAAV and its transgene products.

参考文献

- [1] Mays LE, Wilson JM. The complex and evolving story of T cell activation to AAV vector-encoded transgene products. *Molecular Therapy*, 2011, 19(1):16-27.
- [2] Zaiss AK, Muruve DA. Immunity to adeno-associated virus vectors in animals and humans: a continued challenge. *Gene Therapy*, 2008, 15(11):808-816.
- [3] Mingozzi F, High KA. Immune responses to AAV in clinical trials. *Current Gene Therapy*, 2011, 11(4):321-330.
- [4] Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nature Immunology*, 2006, 7(2):131-137.
- [5] McKenna K, Beignon AS, Bhardwaj N. Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity. *Journal of Virology*, 2005, 79(1):17-27.
- [6] Sabado RL, Bhardwaj N. Directing dendritic cell immunotherapy towards successful cancer treatment. *Immunotherapy*, 2010, 2(1):37-56.
- [7] Zhu J, Huang X, Yang Y. The TLR9-MyD88 pathway is critical for adaptive immune responses to adeno-associated virus gene therapy vectors in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 2009, 119(8):2388-2398.
- [8] Hösel M, Broxtermann M, Janicki H, Esser K, Arzberger S, Hartmann P, Gillen S, Kleeff J, Stabenow D, Odenthal M, Knolle P, Hallek M, Protzer U, Büning H. TLR2-mediated innate immune response in human non-parenchymal liver cells towards adeno-associated viral (AAV) vectors. *Hepatology*, 2012, 55(1):287-297.

- [9] Martino AT, Suzuki M, Markusic DM, Zolotukhin I, Ryals RC, Moghimi B, Ertl HC, Muruve DA, Lee B, Herzog RW. The genome of self-complementary adeno-associated viral vectors increases Toll-like receptor 9-dependent innate immune responses in the liver. *Blood*, 2011, 117(24):6459-6468.
- [10] Barbalat R, Lau L, Locksley RM, Barton GM. Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands. *Nature Immunology*, 2009, 10(11):1200-1207.
- [11] Zaiss AK, Liu Q, Bowen GP, Wong NC, Bartlett JS, Muruve DA. Differential activation of innate immune responses by adenovirus and adenoassociated virus vectors. *Journal of Virology*, 2002, 76(9):4580-4590.
- [12] Satta N, Kruithof EK, Reber G, de Moerloose P. Induction of TLR2 expression by inflammatory stimuli is required for endothelial cell responses to lipopeptides. *Molecular Immunology*, 2008, 46(1):145-157.
- [13] Jayandharan GR, Aslanidi G, Martino AT, Jahn SC, Perrin GQ, Herzog RW, Srivastava A. Activation of the NF-kappaB pathway by adenoassociated virus (AAV) vectors and its implications in immune response and gene therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(9):3743-3748.
- [14] 刁勇,王启钊,肖卫东,许瑞安. 重组腺相关病毒基因药物的细胞免疫毒性及对策. *药学学报 (Acta Pharmaceutica Sinica)*, 2010, 45(9):1071-1077.
- [15] Lu Y, Song S. Distinct immune responses to transgene products from rAAV1 and rAAV8 vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(40):17158-17162.
- [16] Zaiss AK, Cotter MJ, White LR, Clark SA, Wong NC, Holers VM, Bartlett JS, Muruve DA. Complement is an essential component of the immune response to adeno-associated virus vectors. *Journal of Virology*, 2008, 82(6):2727-2740.
- [17] Stetson DB, Medzhitov R. Type I interferons in host defense. *Immunity*, 2006, 25(3):373-381.
- [18] Decker T, Stockinger S, Karaghiosoff M, Müller M, Kovarik P. IFNs and STATs in innate immunity to microorganisms. *The Journal of Clinical Investigation*, 2002, 109(10):1271-1277.
- [19] Watowich SS, Liu YJ. Mechanisms regulating dendritic cell specification and development. *Immunological Reviews*, 2010, 238(1):76-92.
- [20] Gilliet M, Cao W, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nature Reviews Immunology*, 2008, 8(8):594-606.
- [21] Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *The Journal of Experimental Medicine*, 2001, 194(6):863-869.
- [22] Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, Mizutani T, Shimada N, Ohba Y, Takaoka A, Yoshida N, Taniguchi T. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature*, 2005, 434(7034):772-777.
- [23] Tun-Kyi A, Finn G, Greenwood A, Nowak M, Lee TH, Asara JM, Tsokos GC, Fitzgerald K, Israel E, Li X, Exley M, Nicholson LK, Lu KP. Essential role for the prolyl isomerase Pin1 in Toll-like receptor signaling and type I interferon-mediated immunity. *Nature Immunology*, 2011, 12(8):733-741.
- [24] Hoshino K, Sugiyama T, Matsumoto M, Tanaka T, Saito M, Hemmi H, Ohara O, Akira S, Kaisho T. IKK kinase- α is critical for interferon- α production induced by Toll-like receptors 7 and 9. *Nature*, 2006, 440(7086):949-953.
- [25] Oganessian G, Saha SK, Guo B, He JQ, Shahangian A, Zarnegar B, Perry A, Cheng G. Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and-independent antiviral response. *Nature*, 2006, 439(7073):208-211.
- [26] Wang RP, Zhang M, Li Y, Diao FC, Chen D, Zhai Z, Shu HB. Differential regulation of IKK α -mediated activation of IRF3/7 by NIK. *Molecular Immunology*, 2008, 45(7):1926-1934.
- [27] Shinohara ML, Lu L, Bu J, Werneck MB, Kobayashi KS, Glimcher LH, Cantor H. Osteopontin expression is essential for interferon- α production by plasmacytoid dendritic cells. *Nature Immunology*, 2006, 7(5):498-506.
- [28] Andreanos E, Williams RO, Wales J, Foxwell BM, Feldmann M. Activation of NF-kappaB by the intracellular expression of NF-kappaB-inducing kinase acts as a powerful vaccine adjuvant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(39):14459-14464.
- [29] Mingozzi F, Maus MV, Hui DJ, Sabatino DE, Murphy SL, Rasko JE, Ragni MV, Manno CS, Sommer J, Jiang H, Pierce GF, Ertl HC, High KA. CD8+ T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nature Medicine*, 2007, 13(4):419-422.
- [30] 刁勇,王启钊,肖卫东,许瑞安. 重组腺相关病毒载体相关性杂质. *生物工程学报 (Chinese Journal of Biotechnology)*, 2011, 27(5):712-718.
- [31] Lu H, Qu G, Yang X, Xu R, Xiao W. Systemic elimination of de novo capsid protein synthesis from

- replication-competent AAV contamination in the liver. *Human Gene Therapy*, 2011, 22 (5) :625-362.
- [32] Li H, Tuyishime S, Wu TL, Giles-Davis W, Zhou D, Xiao W, High KA, Ertl HC. Adeno-associated virus vectors serotype 2 induce prolonged proliferation of capsid-specific CD8 + T cells in mice. *Molecular Therapy*, 2011, 19 (3) :536-546.
- [33] Jiang H, Couto LB, Patarroyo-White S, Liu T, Nagy D, Vargas JA, Zhou S, Scallan CD, Sommer J, Vijay S, Mingozzi F, High KA, Pierce GF. Effects of transient immunosuppression on adenoassociated, virus-mediated, liver-directed gene transfer in rhesus macaques and implications for human gene therapy. *Blood*, 2006, 108 (10) :3321-3328.
- [34] Mingozzi F, Hasbrouck NC, Basner-Tschakarjan E, Edmonson SA, Hui DJ, Sabatino DE, Zhou S, Wright JF, Jiang H, Pierce GF, Arruda VR, High KA. Modulation of tolerance to the transgene product in a nonhuman primate model of AAV-mediated gene transfer to liver. *Blood*, 2007, 110 (7) :2334-2341.
- [35] Hurlbut GD, Ziegler RJ, Nietupski JB, Foley JW, Woodworth LA, Meyers E, Bercury SD, Pande NN, Souza DW, Bree MP, Lukason MJ, Marshall J, Cheng SH, Scheule RK. Preexisting immunity and low expression in primates highlight translational challenges for liver-directed AAV8-mediated gene therapy. *Molecular Therapy*, 2010, 18 (11) :1983-1994.
- [36] Wang L, Figueredo J, Calcedo R, Lin J, Wilson JM. Cross-presentation of adeno-associated virus serotype 2 capsids activates cytotoxic T cells but does not render hepatocytes effective cytolytic targets. *Human Gene Therapy*, 2007, 18 (3) :185-194.

Innate immune mechanisms against recombinant adeno-associated virus vectors—A review

Yong Diao^{*}, Ruian Xu

Engineering Research Center of Molecular Medicine, Ministry of Education, Institute of Molecular Medicine, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China

Abstract: Recombinant adeno-associated virus (rAAV) is one of the most commonly used vectors for gene therapy. Despite the promising safety profile demonstrated in preclinical trials, the clinic efficacy of using rAAV was hampered by undesired response from the immune system. It is important to understand the mechanisms that lead to the induction of immune response against rAAV. Although a crucial role for innate immunity is shaping adaptive immune responses, the innate immune to rAAV was ignored in the past. Till now, at least three human cell types (dendritic cells, macrophages and endothelial cells) were discovered to be involved in sensing rAAV infection. The engagement of TLR9 by rAAV vector genomes triggers the activation of NF- κ B signaling cascades, leading to the induction of pro-inflammatory cytokine genes. The viral capsid components are detected by TLR2, and this leads to the production of type I interferon mediated by interferon regulatory factors (IRFs) pathway. Self-complementary rAAV vectors induced higher TLR9 dependent innate immune response than single stranded rAAV. This review highlights the recent findings regarding the innate immune responses to rAAV vectors, the signaling pathways involved, and the impacts of innate immunity on the adaptive immune response to rAAV and its transgene expression.

Keywords: recombinant adeno-associated virus, gene therapy, immunology, signal pathway

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (2008AA02Z135), by the National Science & Technology Major Projects (2009ZX09103-643) and by the National Natural Science Foundation of China (30973591)

^{*} Corresponding author. Tel: +86-595-22692516; Fax: +86-595-22690516; E-mail: diaoyong@hqu.edu.cn

Received: 20 December 2011 / Revised: 23 February 2012