·综 述·

重组腺相关病毒载体转导与整合机制的研究进展

何伟伟[1,2]，郑明岚[3]，陈建军[1,2]，周长慧[1,2]，常　艳[1,2*]
（1. 中国医药工业研究总院，上海 201203；2. 上海益诺思生物技术股份有限公司，上海 201203；
3. 国家药品监督管理局药品审评检查长三角分中心，上海 201203）

摘要：重组腺相关病毒载体因整合率、致病性低等优势，被广泛应用为基因治疗产品的递送载体，但可能在宿主基因组中发生整合，有潜在遗传毒性风险。因此，需要对重组腺相关病毒载体的转导过程和基因组整合机制进行深入研究，以建立适用且高效的遗传毒性评价方法。该文对重组腺相关病毒载体的生物学特性进行简介，对其转导过程、可能的整合机制、整合位点的偏好以及潜在的遗传毒性风险进行综述，并对重组腺相关病毒载体的遗传毒性评价方法作一展望，以期为进一步评价重组腺相关病毒载体的遗传毒性风险提供参考。

关键词：重组腺相关病毒；载体；转导；整合机制；遗传毒性
中图分类号：R450　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1672-9188(2024)04-0435-05
DOI：10.13683/j.wph.2024.04.016

Research progress on the transduction and integration mechanisms of recombinant adeno-associated virus vectors

HE Weiwei[1,2], ZHENG Minglan[3], CHEN Jianjun[1,2], ZHOU Changhui[1,2], CHANG Yan[1,2*]
(*1. China State Institute of Pharmaceutical Industry,Shanghai 201203, China; 2. Shanghai Innostar Bio-tech Co. Ltd, Shanghai 201203, China; 3. Yangtze River Delta Sub-Center for Drug Evaluation and Inspection, National Medical Products Administration, Shanghai 201203, China*)

Abstract: Recombinant adeno-associated virus vectors are widely used as delivery vectors for gene therapy products due to their low integration rate and low pathogenicity. But, they can still be integrated in the host genome, resulting in potential genotoxicity risks. So, it is necessary to conduct in-depth research on the transduction process and genome integration mechanism of recombinant adeno-associated virus vectors, in order to establish an appropriate and efficient genotoxicity evaluation method. This paper introduced the biological characteristics of recombinant adeno-associated virus vectors, reviewed the transduction process, possible integration mechanisms, integration site preferences and potential genotoxicity risks, and prospected the genotoxicity evaluation methods of recombinant adeno-associated virus vectors, to provide a reference for further evaluation of the genotoxicity risk of recombinant adeno-associated virus vectors.

Key words: recombinant adeno-associated virus; vector; transduce; integration mechanism; genotoxicity

目前主流的基因治疗载体分为病毒载体和非病毒载体。其中，病毒载体又可分为整合型和非整合型。整合型病毒载体如逆转录病毒载体（retroviral vector，RV）、慢病毒载体（lentivirus vector，LV）等；非整合型病毒载体如腺病毒载体（adenoviral vector，AdV）、腺相关病毒（adeno-associated virus，AAV）载体等。重组腺相关病毒（recombinant adeno-associated virus，rAAV）载体由 AAV 人工改造，被视为“明星载体”，是最有前途的基因研究和基因治疗载体之一。rAAV 载体作为非整合型病毒载体

收稿日期：2024-01-19
作者简介：何伟伟，硕士研究生，研究方向：遗传毒理学。
郑明岚，博士，副研究员，研究方向：药物毒理学。
通信作者：常艳，博士，研究员，研究方向：药物毒理学。
基金项目：上海市科委研发公共服务平台项目(21DZ2291000)

的代表被广泛用于基因治疗[1]：一方面基于 rAAV 载体理想的基因传递性，能感染分裂和未分裂期细胞，具有低致病性和低免疫原性，这些特性赋予较高的安全性；另一方面，rAAV 载体可长期稳定表达外源基因，维持长期治疗的目的[2]。但 rAAV 载体或会罕见地整合到宿主细胞基因组中，导致插入突变，改变染色体基因的表达。尽管整合频率不高，但潜在遗传毒性风险不容忽视，可能导致整合位点基因失活、邻近基因失调以及转导细胞恶性转化[3—4]。因此，本文基于 rAAV 载体的生物学特性，对其转导过程、可能的整合机制、整合位点以及潜在的遗传毒性风险作一综述，并对 rAAV 载体的遗传毒性评价方法进行展望，以期为进一步评价 rAAV 载体的遗传毒性风险提供参考。

1 rAAV 的生物学特性

rAAV 隶属于细小病毒科依赖病毒属，是一类微小、无被膜的线性单链 DNA 病毒，同时也是一种缺陷型病毒，需辅助病毒的存在，才能感染宿主细胞，产生新的病毒颗粒。无辅助病毒存在时，野生型（wild type，WT）-AAV 只能整合到 19 号染色体长臂上，形成潜伏感染，随宿主细胞染色体复制而复制[5—6]。

rAAV 载体通常将 WT-AAV 中的 *rep* 和 *cap* 基因用目的基因所取代，只保留 rAAV 基因组两端长 145 bp 的 2 个反向重复序列（inverted terminal repeats，ITR），ITR 对病毒的复制和包装起决定作用，其外侧的 125 bp 是一个较长的回文样结构，可通过碱基配对方式进行折叠，使 ITR 呈发夹样结构，是 rAAV 复制和包装所需的唯一顺式作用元件[2]。2 个 ITR 之间包含 2 个开放阅读框（open reading frame，ORF），左侧 ORF 编码包括 Rep78、Rep68、Rep52 及 Rep40，右侧 ORF 编码包括 3 个衣壳蛋白 VP1、VP2 及 VP3，以 1 ∶ 1 ∶ 10 比例组装形成病毒衣壳，使病毒具有感染力。rAAV 衣壳由 60 个衣壳蛋白构成，排列成 T ＝ 1 的二十面体结构。目前 rAAV 载体已发现 13 种血清型，不同血清型具有不同的组织和细胞嗜性，即 rAAV 载体对不同组织和细胞的感染效率不尽相同：如 rAAV1、rAAV8 分别对骨骼肌和肝细胞具有较高的感染效率；rAAV9 可穿过血脑屏障，靶向进入到中枢神经和外周组织中[7]。

2 rAAV 的转导过程

rAAV 首先被宿主细胞的糖基化细胞表面受体识别，通过网格蛋白介导的内吞作用触发病毒的内化，这是 rAAV 最常见的细胞进入机制[8—9]，以此形成由细胞膜、rAAV、糖基化受体、网格蛋白以及细胞骨架组成的转导复合物。转导复合物进入到细胞质后，早期内涵体在靶向细胞核行进途中历经细胞质内 pH 值由高到低（6 ～ 4）变化，网格蛋白及细胞骨架消失，早期内涵体转变为晚期内涵体。随即，在溶酶体的作用下，包被晚期内涵体的细胞膜及受体裂解，衣壳蛋白 VP1/VP2 区域构象也发生改变。在经历内体逃逸后，rAAV 通过核孔进入到细胞核，然后衣壳脱落并释放基因组。此外，也有部分 rAAV 在进入细胞核前被蛋白酶水解形成多肽。有研究表明，rAAV 脱衣壳的速率取决于血清型和细胞特异性，因此病毒脱衣壳可能是转导过程的限速步骤[8—10]。

rAAV 基因组在细胞核内可以多种分子状态持续存在。单链基因组在进入细胞核时仍是转录惰性的，须转化为双链 DNA 才能实现转录，所以宿主细胞 DNA 聚合酶的第二链合成机制，或者细胞核中可能共存的正负链的链退火机制介导单链基因组向双链环状基因组的转化。据报道，破坏 DNA 的辐射（如紫外线或 γ 辐射）或抑制 DNA 合成的药物［如羟基脲（hydroxycarbamide）或拓扑硫酶抑制剂］，可增加体外 rAAV2 载体转导速率。这表明 DNA 修复机制可能参与转导过程，后期研究进一步确定第二链合成是 rAAV2 载体转导的限速步骤[10—12]。

基因组两端的 ITR 可驱动分子间或分子内重组，催化发生头对尾（5'ITR 融合到 3'ITR）、头对头（5'ITR 融合到 5'ITR）及尾对尾（3'ITR 融合到 3'ITR）的环状连接。在该连接过程中，发现 ITR 附近可能有缺失或重排现象。最终在细胞核中形成可持续存在的 ITR 融合片段，其中以头尾相连形式存在的居多[4]，称为环状连接游离体或附加体[13]，包括单体、二聚体及串联体。

rAAV 载体基因组也可以非常低的频率整合到宿主基因组中，最有可能发生在染色体双链断裂时[9]。Duan 等[14] 使用 Southern blot 发现捕获的环状 DNA 呈头尾相连，具有一个或两个 ITR。随着时间增加，检测到更大的环状双链基因组，且环状双链基因组的 ITR 阵列由数量越来越多的 ITR 组成。这表明 rAAV 载体基因组最终确实以附加体的形式存在，大概在启动转导后 80 天大小开始增加[8]。

rAAV 的转导是一个非常复杂的过程，其影响因素包括信号通路分子，如病毒粒子的内涵体处理导致核定位信号的外化和衣壳蛋白上的磷脂酶结构域 *N* 末端序列的外化，从而允许发生内体逃逸和核靶向运输。有研究发现，使用 siRNA 敲低跨膜受体 Notch1 的表达可使 293T 细胞中的转导降低 97%，而其过表达会增加 rAAV2 核运输和转导。此外，转导效率还部分取决于细胞类型（包括细胞周期）、血清型和载体剂量等[15]。

3 rAAV 的整合机制

rAAV 作为基因治疗载体，通过在载体基因组上移除 *rep* 与 *cap* 基因消除其整合能力，因此缺乏 *rep* 介导的主动整合。然而，rAAV 载体仍能以低频率随机整合到靶细胞基因组中，同时造成潜在的遗传毒性风险[13]。研究发现，rAAV 载体整合有两种方式：随机整合和靶向整合[17]。

3.1 随机整合

随机整合发生在 DNA 损伤位点的非同源位置，通过非同源末端与宿主基因组连接发生整合[17]。由于 rAAV 载体序列和宿主染色体连接点之间缺乏同源性，非同源末端连接（non-homologous end joining，NHEJ）被认为是最可能的整合机制[18]。rAAV 载体不提供整合所需的蛋白质，因此整合机制取决于宿主因子。缺乏载体编码的核酸酶表明，整合的关键步骤之一是宿主游离染色体末端的可用性，这些染色体末端可以与 AAV 基因组发生连接[8]。Miller 等[19] 使用 I-SceI 核酸内切酶、DNA 损伤剂依托泊苷（etoposide）或 γ 辐照作用于 HT-1080 细胞和原代人成纤维细胞以诱导双链断裂（double strand break，DSB）。研究发现，HT-1080 细胞和原代人成纤维细胞在 I-SceI 位点均有整合，整合率分别为 7.4% 和 7.7%，比随机整合事件中预期的要高。与早期研究一致，依托泊苷作用的结果使整合率增加 3 倍，而 γ 辐照使整合率增加 14 倍，表明 DSB 的诱导可导致更高的整合频率，DSB 的形成可能是随机整合的限速步骤。然而，在没有 DSB 的情况下，rAAV 载体以非常低的频率整合，可能发生在自发 DNA 断裂的位点[16]。有研究发现，与培养的成纤维细胞相比，因肝细胞的低增殖率而缺乏 DNA 复制，从而增加转录导致的 DSB 的比例，显示出在肝细胞中转录对整合的影响大于培养的成纤维细胞[18]。

现有整合证据与 rAAV 载体在预先存在的染色体断裂处整合的模型一致，该模型为非同源末端连接途径提供游离的染色体末端，从而为随机整合的发生提供先决条件，同时基因组潜在的微同源区域和 ITR 特殊的发夹结构均有利于与宿主游离染色体末端连接[17]。因此，通过 DSB 进行 NHEJ 是随机整合的主要机制[18—20]。NHEJ 的特点是速度快、效率高，但准确率低。故在染色体序列和 rAAV 载体基因组之间的连接处发现完整、部分或重排的 ITR 序列，整合连接的特征包括 rAAV 载体 - 染色体微同源性、染色体插入以及染色体和 / 或载体 ITR 缺失[8,19]。

3.2 靶向整合

靶向整合通过同源重组（homologous recombination，HR）发生在特定位点[17]。rAAV 载体可通过 HR 进行整合，也被称为 rAAV 载体介导的基因靶向[21]。有研究为促进 HR，使用一种包含源自宿主染色体 DNA 的同源臂载体，该同源臂位于 rAAV 载体基因组插入基因的两侧，此类载体称为靶向载体。在最佳条件下，使用 AAV 靶向载体转导的总细胞群中有 0.1% 到 1.0% 的细胞发生靶向整合[22]。靶向载体基因组和宿主染色体在 5' 和 3' 端同源区域内进行交叉和拆分，而成功对齐需要较长的同源区域。因此，同源臂的存在对于与染色体基因组序列的比对至关重要。靶向整合发生在同源臂内，rAAV 载体基因组与宿主同源染色体序列成功配对并进行重组，与随机整合不同的是不在同源臂内的 ITR 被

排除在外[16]。

Smith 等[23]评估 rAAV 载体介导的 HR 后基因编辑的染色体位点序列。通过对许多基因编辑的染色体序列进行 Sanger 和 NGS 测序，证明 rAAV 载体在 HR 期间未将 ITR 插入到宿主染色体。与随机整合相反的是，添加依托泊苷或羟基脲并不能增强基因靶向，这表明 HR 存在独特的重组机制[21—24]。随着参与 HR 的相关分子的敲低，发现 rAAV2 载体基因靶向的频率降低约 5 倍。此外，靶位点的二次突变率极低，综合表明 HR 是靶向整合的主要机制[8,25]。rAAV 载体基因靶向已在多个基因组位置得到证实，包括次黄嘌呤磷酸核糖转移酶、I 型胶原蛋白等基因[23]、人和鼠 IL2RG[26]、AAVS1 位点、人苯丙氨酸羟化酶以及鼠 ROSA26 位点[16,26]等。

HR 的特点是速度慢、效率低，但准确率高。基因靶向的效率随着与目标序列同源性片段的延长、载体剂量的增加以及感染后时间点增加而增加，且基因靶向的效率高度依赖于细胞周期，与细胞进入 S 期的可能性有关[28]。靶向整合的一个主要优势是可能减少或消除插入突变的风险，通常不会观察到 rAAV 载体整合位点常见的缺失和插入，但 rAAV 载体在靶向整合时仍可发生随机整合，并通过设计去除增强子或启动子的载体，让潜在的遗传毒性风险最小化[19]。

4 rAAV 的整合位点

rAAV 载体的整合位点在宿主基因组中广泛分布，但也存在偏好性，表明 NHEJ 介导的随机整合并不是完全随机的[29]。rAAV 载体的优先整合位点可能代表易发生 DSB 或其他形式 DNA 损伤的基因组不稳定的区域[17]，这些区域可能更易发生自发断裂，导致缺失、插入及易位[30—31]。例如，CpG 岛易发生甲基化和诱变，可促进 DNA 修复；核糖体 DNA 重复序列、节段重复及回文序列均可能参与重组事件，从而产生游离染色体末端；转录起始位点在伴随转录起始的碱基展开和暴露过程中易受到损伤[30]。rAAV 载体的整合位点通常位于活性转录单元和相关位点附近，整合事件发生在 CpG 岛和富含 GC 片段的频率在逐步增加，这与活性转录有关[4,32]。不同物种间也存在整合位点偏好性，如新生小鼠的整合“热点”包括 Rian 位点、白蛋白（albumin，ALB）及甲胎蛋白[32]，但人类基因组无 Rian 位点；对犬的研究发现其整合“热点”有早期生长反应基因、细胞周期蛋白 D1 基因、双特异性磷酸酶 1 基因及 ALB[4]；非人灵长类动物和人类肝细胞的研究也报告了 ALB 中的多个 rAAV 载体整合事件[34—35]，这些数据证明 rAAV 载体的整合位点存在偏好性，且一些整合位点如 ALB 跨种属存在。

5 结语

基于目前已有的遗传毒性评价方法和检测工具，rAAV 载体表现出低频率整合，可能导致不良事件的发生。因此必须对 rAAV 载体的转导过程和基因组整合机制进行持续研究，并对已有的遗传毒性评价方法不断优化和创新，以提高检测灵敏度和扩大检测范围来获得实际的整合频率，从而快速、准确地评价其潜在遗传毒性风险。

参考文献：

[1] 李嫚琪, 魏丽萍, 陶巧玉, 等. 基因治疗递送载体应用现状及安全性研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2022, 53(12): 1671-1682.

[2] 杨小娟, 李振昊, 苟元凤, 等. 腺相关病毒介导的基因治疗在肿瘤中的研究进展[J]. 基础医学与临床, 2021, 41(4): 573-577.

[3] 王丹阳, 徐婷婷, 陈建军, 等. 基因治疗产品及其载体的研究进展和挑战[J]. 中国医药工业杂志, 2023, 54(4): 481-488.

[4] Dalwadi DA, Calabria A, Tiyaboonchai A, *et al*. AAV integration in human hepatocytes[J]. Mol Ther, 2021, 29(10): 2898-2909.

[5] 谭靓, 李泰明. 腺相关病毒载体在基因治疗领域中的应用和挑战[J]. 科技与创新, 2020, (13): 157-159.

[6] 陈平, 张利娟, 李娜. 腺相关病毒载体的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2022, 35(4): 500-507.

[7] 黄薇霖, 邵文威. 腺相关病毒在自身免疫性疾病中的研究进展[J/OL]. 中国免疫学杂志.（2023-09-19）[2023-11-05]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/22.1126.R.20230918.1549.002.html.

[8] Schultz BR, Chamberlain JS. Recombinant adeno-associated virus transduction and integration[J]. Mol Ther, 2008, 16(7): 1189-1199.

[9] Wang D, Tai PWL, Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery[J]. Nat Rev Drug Discov, 2019, 18(5): 358-378.
[10] Sipo I, Fechner H, Pinkert S, *et al*. Differential internalization and nuclear uncoating of self-complementary adeno-associated virus pseudotype vectors as determinants of cardiac cell transduction[J]. Gene Ther, 2007, 14(18): 1319-1329.
[11] Fisher KJ, Gao GP, Weitzman MD, *et al*. Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is limited by leading-strand synthesis[J]. J Virol, 1996, 70(1): 520-532.
[12] Ferrari FK, Samulski T, Shenk T, *et al*. Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors[J]. J Virol, 1996, 70(5): 3227-3234.
[13] Sabatino DE, Bushman FD, Chandler RJ, *et al*. Evaluating the state of the science for adeno-associated virus integration: an integrated perspective[J]. Mol Ther, 2022, 30(8): 2646-2663.
[14] Duan D, Sharma P, Yang J, *et al*. Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue[J]. J Virol, 1998, 72(11): 8568-8577.
[15] Ren C, White AF, Ponnazhagan S. Notch1 augments intracellular trafficking of adeno-associated virus type 2[J]. J Virol, 2007, 81(4): 2069-2073.
[16] Bijlani S, Pang KM, Sivanandam V, *et al*. The role of recombinant AAV in precise genome editing[J]. Front Genome Ed, 2022, 3: 799722.
[17] Deyle DR, Russell DW. Adeno-associated virus vector integration[J]. Curr Opin Mol Ther, 2009, 11(4): 442-447.
[18] Rutledge EA, Russell DW. Adeno-associated virus vector integration junctions[J]. J virol, 1997, 71(11): 8429-8436.
[19] Miller DG, Petek LM, Russell DW. Adeno-associated virus vectors integrate at chromosome breakage sites[J]. Nat Genet, 2004, 36(7): 767-773.
[20] Yang CC, Xiao X, Zhu X, *et al*. Cellular recombination pathways and viral terminal repeat hairpin structures are sufficient for adeno-associated virus integration *in vivo* and *in vitro*[J]. J virol, 1997, 71(12): 9231-9247.
[21] Hirata R, Chamberlain J, Dong R, *et al*. Targeted transgene insertion into human chromosomes by adeno-associated virus vectors[J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(7): 735-738.
[22] Hendrie PC, Hirata RK, Russell DW. Chromosomal integration and homologous gene targeting by replication-incompetent vectors based on the autonomous parvovirus minute virus of mice[J]. J virol, 2003, 77(24): 13136-13145.
[23] Smith LJ, Wright J, Clark G, *et al*. Stem cell-derived clade F AAVs mediate high-efficiency homologous recombination-based genome editing[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2018, 115(31): E7379-E7388.
[24] Hirata RK, Russell DW. Design and packaging of adeno-associated virus gene targeting vectors[J]. J virol, 2000, 74(10): 4612-4620.
[25] Mizukami H, Mimuro J, Ogura T, *et al*. Adipose tissue as a novel target for in vivo gene transfer by adeno-associated viral vectors[J]. Hum Gene Ther, 2006, 17(9): 921-928.
[26] Hiramoto T, Li LB, Funk SE, *et al*. Nuclease-free adeno-associated virus-mediated *Il2rg* gene editing in X-SCID mice[J]. Mol Ther, 2018, 26(5): 1255-1265.
[27] Miller DG , Wang PR, Petek LM, *et al*. Gene targeting *in vivo* by adeno-associated virus vectors[J]. Nat biotechnol, 2006, 24(8): 1022-1026.
[28] Vasileva A, Linden RM, Jessberger R, *et al*. Homologous recombination is required for AAV-mediated gene targeting [J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(11): 3345-3360.
[29] Miller DG, Trobridge GD, Petek LM, *et al*. Large-scale analysis of adeno-associated virus vector integration sites in normal human cells[J]. J virol, 2005, 79(17): 11434-11442.
[30] Nakai H, Montini E, Fuess S, *et al*. AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice[J]. Nat Genet, 2003, 34(3): 297-302.
[31] Nguyen GN, Everett JK, Kafle S, *et al*. A long-term study of AAV gene therapy in dogs with hemophilia a identifies clonal expansions of transduced liver cells[J]. Nat Biotechnol, 2021, 39(1): 47-55.
[32] Chandler RJ, LaFave MC, Varshney GK, *et al*. Vector design influences hepatic genotoxicity after adeno-associated virus gene therapy[J]. J Clin Invest, 2015, 125(2): 870-880.
[33] Chandler RJ, Sands MS, Venditti CP. Recombinant adeno-associated viral integration and genotoxicity: insights from animal models[J]. Hum Gene Ther, 2017, 28(4): 314-322.
[34] Gil-Farina I, Fronza R, Kaeppel C, *et al*. Recombinant AAV integration is not associated with hepatic genotoxicity in nonhuman primates and patients[J]. Mol Ther, 2016, 24(6): 1100-1105.
[35] Dalwadi DA, Torrens L, Abril-Fornaguera J, *et al*. Liver injury increases the incidence of HCC following AAV gene therapy in mice[J]. Mol Ther, 2021, 29(2): 680-690.

（编辑：沈 盈）