

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00567

φC31 整合酶系统介导的位点特异性整合研究进展

马晴雯

上海交通大学附属儿童医院, 上海交通大学医学遗传研究所, 上海 200040

摘要: 来源于链霉菌(*Streptomyces*)噬菌体φC31 的整合酶可介导链霉菌附着位点(*attB*)和噬菌体附着位点(*attP*)之间的同源重组, 这种重组亦可在多种动植物细胞内进行; 而且, 该整合酶还可介导含 *attB* 位点的载体以位点特异性方式整合于多种真核生物基因组内的假 *attP* 位点, 并使转基因持续高效表达。因此, φC31 整合酶在基因修饰、基因治疗及转基因动物研制等方面得到了广泛的应用。文章就近年来φC31 整合酶整合规律、提高效率方面的改进及安全性等相关领域的研究进展进行了综述。

关键词: φC31 整合酶; 位点特异性整合; 基因治疗; 转基因; 安全性

Progress of φC31 integrase system in site-specific integration

MA Qing-Wen

Children's Hospital of Shanghai, Institute of Medical Genetics, Shanghai JiaoTong University, Shanghai 200040, China

Abstract: Integrase of phage φC31 catalyses the homologous recombination between *Streptomyces* attachment site *attB* and the phage attachment site *attP*. Meanwhile, this integrase can mediate integration of *attB*-containing donor plasmids into the pseudo *attP* sites in eukaryotic genomes by a site-specific manner and resulting long-term and robust expression of integrated genes. Nowadays, φC31 integrase system is becoming a potential tool for genome modification, gene therapy and transgenic research. Recent progress of φC31 integrase system in integration mode in mammalian genomes, efficiency improvement and researches concerned on transgenic safety were summarized in this review.

Keywords: φC31 integrase; site-specific integration; gene therapy; transgenic; safety

链霉菌噬菌体φC31 的整合酶能够催化链霉菌基因组中的 *attB* 位点和噬菌体基因组 *attP* 位点之间的同源重组^[1]。由于φC31 整合酶介导的重组具有单向整合、无需外界化学能源和辅助因子、胜任大片段基因有效整合、可在多种高等植物和动物细胞中发挥作用及外源基因可长期高效表达等特点^[2], φC31 整合酶成为继 Cre 重组酶和 FLP 重组酶之后的又一种基因修饰的有力工具。研究表明, φC31 整合酶在基因治疗、转基因动物

研制、基因修饰等方面有着巨大的应用价值。本文就近年来φC31 整合酶系统在哺乳动物细胞中介导外源基因整合的规律、提高φC31 整合酶作用效率方面的改进及基因治疗安全性等相关领域的研究进展进行了综述。

1 φC31 整合酶在生物医学研究中的应用

1.1 基因治疗

由于φC31 整合酶可介导含 *attB* 位点及目的基

收稿日期: 2011-01-17; 修回日期: 2011-04-06

基金项目: 转基因生物新品种培育科技重大专项(编号: 2009ZX08010-018B)

作者简介: 马晴雯, 博士, 副研究员, 研究方向: 转基因动物。Tel: 021-62472308; E-mail: maqingwen@hotmail.com

致谢: 感谢上海交通大学附属儿童医院, 上海交通大学医学遗传研究所曾溢滔院士的长期指导及任兆瑞教授的支持和帮助。

网络出版时间: 2011-4-19 9:20:54

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20110419.0920.006.html>

因的质粒以位点特异性方式整合入哺乳动物基因组的假 *attP* 位点, 而且整合后目的基因能够长期高水平表达, 在多种遗传病的基因治疗临床前研究中取得了较好的结果, 如血友病 B^[3, 4]、遗传性皮肤病^[5, 6]、糖尿病^[7]、杜氏肌营养不良症(DMD)^[8-10]、遗传性高酪氨酸血症^[11]、遗传性视网膜疾病^[12]、关节疾病^[13]、血管类疾病^[14]、神经系统疾病^[15]等(近期已有综述^[16-18])对此方面研究进行了较为全面的总结, 本文就不再赘述。因此 ϕ C31 整合酶系统被认为是基因治疗的理想工具^[2]。

1.2 转基因动物

由于 ϕ C31 整合酶可以在高等动物细胞内介导 *attB* 位点和 *attP* 位点之间的重组, 尤其是在多种哺乳动物基因组中发现内源性假 *attP* 位点的存在, 即可利用 ϕ C31 整合酶系统将外源基因整合于基因组的假 *attP* 位点处, 进而实现外源基因的高水平表达, 因此, 很多研究者以 ϕ C31 整合酶系统进行了转基因动物研制的工作(见文献^[18, 19]), 如果蝇、爪蟾和小鼠。由于通过尾静脉高压注射可使质粒在肝脏有较高的整合效率, 因此该技术与整合酶系统结合可能成为制备肝脏疾病动物模型的快捷手段^[20]。

1.3 基因组修饰

除用于基因治疗及转基因动物制备中外源基因的位点特异性整合外, 整合酶系统还在多个物种的基因组修饰研究中得到了广泛的应用, 如利用整合酶介导 *attB* 和 *attP* 位点之间的重组以实现两个 *att* 位点之间序列的删除^[21-26]。整合酶系统在进行 *attB* 位点和 *attP* 位点之间盒交换反应时也有较高的效率, 该策略被证明是小鼠^[27]、果蝇^[28]以及家蚕^[29]基因组修饰的有效手段。另外, 整合酶系统也可与其他重组酶或转座酶系统, 如 Cre/LoxP 系统、FLP/FRT 系统、R4 整合酶系统、PB 转座酶等联合使用, 进行基因组的复杂修饰: 如实现长达 150 kb 的大片段复杂片段的转基因^[30]; 可在外源基因整合于基因组后将冗余序列删除, 提高转基因表达效率及安全性^[31, 32]; 构建转基因细胞系, 在同一位点引入多个表达元件^[33], 研究相同染色质环境下基因的功能。此外, ϕ C31 整合酶系统与腺病毒载体系统结合, 联合前者高效的整合率和后者高效的转染率, 不失为基因导入的良好策略^[34, 35]。

1.4 干细胞研究

研究发现, ϕ C31 整合酶在人胚胎干细胞(Embryonic stem cell, ES 细胞)中可介导外源基因整合于假 *attP* 位点处, 整合后 Oct4 启动子以及 EF-1 α 启动子驱动绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)基因的表达遵循这些启动子的组织特异表达模式: 即 Oct4-GFP 仅在未分化的 ES 细胞中表达, 而 EF-1 α -GFP 则在 ES 细胞及分化后的各胚层细胞中均有高水平表达^[36]。这些 ES 细胞仍然保持其分化为三胚层细胞的多能性。因此, 利用 ϕ C31 整合酶系统可构建工程化的胚胎干细胞系。此外, 联合应用 ϕ C31 整合酶和 R4 整合酶系统可在特定假 *attP* 位点进行基因的再次靶向整合^[33, 37], 这为研究 ES 细胞的发育和分化、利用 ES 细胞(和分化细胞)进行药物筛选建立了良好的技术平台。

由于具有潜在的巨大临床应用价值, 诱导多能干细胞(Induced pluripotent stem cells, iPS 细胞)技术^[38]问世以来一直是干细胞研究的热点。但传统的方法多采用逆转录病毒将用于诱导 iPS 细胞的转录因子导入细胞, 该方法存在较高的安全风险。位点特异性重组酶介导的整合降低了插入突变的风险, 因此有可能用于细胞重编程^[39]。而 ϕ C31 整合酶系统由于具有较高的整合效率、有限的整合位点等特点成为其中的最佳候选酶。以 ϕ C31 整合酶系统将小鼠成纤维细胞及人羊水细胞诱导为 iPS 细胞^[40], 具有外源转录因子单一一位点整合以及基因间整合的优点, 未检测到这些转录因子在 microRNA 基因位点处整合。而且, ϕ C31 整合酶系统介导的整合不干扰内源基因的表达, 因此提高了 iPS 细胞将来用于临床的安全性。此外, 以 ϕ C31 整合酶系统制备仅含有用于诱导 iPS 细胞的转录因子的小环 DNA, 将其转染入脂肪干细胞, 也可得到 iPS 细胞^[41]。

2 ϕ C31 整合酶作用效率的提高

2.1 整合酶关键结构域氨基酸的突变

为提高整合酶效率, Keravala 等^[42]将整合酶 N 端催化结构域的氨基酸进行了突变, 并在人细胞中检测了其重组效率。研究表明, 其中一个突变体 P2(D40A、D44A、D52A), 无论是介导 *attB* 位点与预先整合入染色体的 *attP* 位点, 还是与假 *attP* 位点

之间重组的效率均较野生整合酶提高 2 倍。体内实验(尾静脉注射)结果表明, P2 能使人凝血因子 IX(FIX)整合入小鼠肝脏中, 并以治疗水平长期表达, 表达水平是使用野生整合酶时的 2 倍, 且有肝脏整合热点 mpsL1 位点整合。而当另一个突变体 P3 与 P2 同时存在时则在人细胞中提高了含 *attB* 位点的外源基因在预先整合入染色体的 *attP* 位点处的整合效率。这些结果表明, 可以通过改变整合酶催化结构域的氨基酸来修饰整合酶, 使其更加适合人们的需要。

此外, Liesner 等^[43]尝试了对整合酶 C 端结合结构域的氨基酸进行突变, 期望提高整合酶的作用效率和安全性。他们在哺乳动物细胞中检测了 22 个突变体的活性。其中 5 个突变体介导 *attB* 和 *attP* 位点分子内剪切反应的活性较野生型整合酶增强 2 倍。有的突变体则催化 *attB* 位点和 3 个假 *attP* 位点重组(分子内剪切)的能力增强, 提示这些突变体对这些热点位点的识别特异性增加; 还有一些突变体活性的增加有细胞系依赖性。联合这些突变使整合酶的整合效率增强 5.5 倍。体内实验(尾静脉注射含 *FIX* 的质粒)表明, 突变体与野生整合酶介导的 *FIX* 质粒的整合率和 *FIX* 表达水平相当, 这些酶均未引起肝脏的急性毒性反应。另外, 有 3 个突变体在任何检测中都没有活性, 表明这些氨基酸对整合酶在哺乳动物细胞中发挥功能有重要作用。该研究为提高整合酶效率提供了重要资料, 也为人们进一步修饰整合酶, 提高其整合于特定假 *attP* 位点的靶向性奠定了基础。

2.2 添加核定位信号(NLS)

由于 ϕ C31 整合酶分子量较大, 为了增加其入核效率, 更好地发挥其作用, Andreas 等^[44]检测了 SV40 大 T 抗原的核定位信号用于提高 ϕ C31 整合酶作用效率的可能性。当表达整合酶的质粒与含有 *attB* 和 *attP* 序列的报告质粒共转染中国仓鼠卵巢细胞(CHO)时, C 端加入 SV40 核定位信号的整合酶介导的 *att* 位点间重组效率比野生型高 1.7 倍; 而当报告质粒整合入染色体时, 转染含 NLS 的整合酶质粒时报告基因的表达是转染野生整合酶质粒时的 10 倍。还有研究表明, 密码子优化及 C 端添加 NLS 的整合酶在 ES 细胞和小鼠个体中均提高了整合于 ROS26A 位点的 *attB* 和 *attP* 之间的重组效率^[45]; 在人 293(人胚胎肾细胞系)细胞中转染 TAT-INT-NLS 后 *attB* 和 *attP* 位

点之间基因的删除效率要比转染 TAT-INT 高^[46]。这些研究表明, 添加了 NLS 的整合酶在介导染色体外及整合在染色体上的 *attB* 和 *attP* 位点之间序列的删除效率得到了提高。

然而, 有关含 NLS 的整合酶在介导 *attB* 与基因组假 *attP* 整合反应时效果却不甚理想: 如 Aneja 等^[47]的研究表明, C 端加入 NLS 的整合酶与野生型整合酶相比, 两者介导 *attB* 整合入基因组并使报告基因长期表达的效率没有显著差异。在基因治疗研究需要整合酶介导含 *attB* 位点质粒整合入基因组时, 无论在培养细胞或体内研究中, C 端加入 NLS 并未提高整合效率。在研究的所有细胞类型中, NLS 的加入均未能提高基因整合效率及增加基因长期表达水平。甚至有研究表明, 在介导 *attB* 整合入基因组假 *attP* 位点时, HeLa 细胞中整合酶 C 端加 NLS 后效率反而降低 3~5 倍^[48], 但体内实验中整合酶 C 端加 NLS 对尾静脉注射后质粒的整合和表达均无影响。

同样, 在介导 *attB* 与野生型 *attP* 位点之间整合反应时, 添加了 NLS 的整合酶也未能表现出效率的提高: 在果蝇卵中注射 *attB* 质粒, 由整合酶介导其整合入染色体上预先引入的 *attP* 位点处, INT-NLS 并未显示出比野生型整合酶有较高的效率^[49]。在家蚕细胞系 BmN4 中利用 ϕ C31 整合酶将 *attP*-RFP-*attP* 整合到引入染色体的 *attB*-*attB* 位点时, 无论是 C 端还是 N 端加入 NLS 的整合酶均未能提高染色体外质粒间的盒交换效率^[29]。

因此, 含有 NLS 的整合酶在介导 *attB* 和 *attP* 位点之间序列删除反应时有一定的优越性, 但在介导 *attB* 和 *attP* 或假 *attP* 位点之间的整合反应时却效果不佳。在 HeLa 细胞中的研究表明, 加入了 NLS 的整合酶蛋白的可溶性较野生型蛋白降低^[48], 这可能影响了整合酶的作用效率。有关 NLS 的加入对整合酶介导不同反应的不同影响机制还有待于深入研究。

2.3 其他改进和优化

Raymond 等^[45]根据小鼠密码子偏好合成了整合酶的编码序列, 并进行了一系列的优化, 如去除了序列中的内源性 TATA 盒、核糖体进入位点、富含 AT 和 GC 序列、重复序列、RNA 二级结构、隐匿剪接位点以及 polyA 位点等, 并在其 C 端加入 NLS。研究表明, 无论是以 ES 细胞进行的体外实验还是以

小鼠个体进行的体内实验, 优化后的整合酶效率均与 Cre 相当。将优化的整合酶打靶到 ROSA26 位点, 无论是杂合子还是纯合子小鼠均无明显的不良表现, 且这些小鼠均有生育能力。

此外, 研究发现哺乳动物细胞内存在与整合酶相互作用的蛋白, 如死亡结构域相关蛋白(Death-domain associated protein, DAXX)^[50]以及 TRAF 和 TNF 受体相关蛋白(TRAF and TNF receptor associated protein, TTRAP)^[51]。采用针对 DAXX 以及 TTRAP 的双链 RNA knock down 相应蛋白的表达, 则可以提高整合酶的效率^[50, 51]。

3 ϕ C31 整合酶系统的安全性

3.1 整合特点和规律

自从发现 ϕ C31 整合酶系统在哺乳动物细胞中可以介导含 *attB* 位点序列的载体以位点特异性方式整合入基因组的假 *attP* 位点^[52]之后, 有关 ϕ C31 整合酶系统介导的外源基因整合规律以及假 *attP* 位点的特征在多个实验研究中得到了观察。

研究表明, ϕ C31 整合酶系统胜任大片段基因的整合。如 Liu 等^[37]将 13 kb 的质粒整合到了人 ES 细胞的假 *attP* 位点处; Quenneville 等^[8]将 17.2 kb 含 *DMD* 基因和 *eGFP* 融合基因的质粒与整合酶质粒共转入肌肉细胞中, 检测到了 *DMD* 基因的稳定整合; Ortiz-Urda 等^[5]将超过 10 kb 含 VII 型胶原 cDNA(8.9 kb)的质粒转入皮肤细胞, 得到了 VII 型胶原稳定整合的细胞; Nishiumi 等^[53]将大于 10 kb 的含有多个荧光蛋白 cDNA 的载体利用整合酶系统有效地整合入 HeLaS3 细胞基因组; Venken 等^[54]将细菌人工染色体与整合酶 mRNA 共注射入果蝇胚胎中, 得到了含有 73 kb、76 kb、86 kb 和 133 kb 片段的转基因果蝇。

尽管片段越大, 转基因效率越低, 但整合酶系统介导大片段基因整合入基因组的能力是慢病毒载体系统不可比拟的, 后者允许插入的片段最长不能超过 10 kb, 即与慢病毒基因组大小相当的片段。

有关假 *attP* 位点在基因组分布规律方面的研究表明, 假 *attP* 位点多位于基因间或基因内含子内, 整合很少发生在基因的外显子中^[34, 36, 53, 55, 56]。这种偏向于基因内部或转录活跃区的整合有利于基因的表达, 这有可能是整合酶介导的整合与随机整合相比普遍有较长时间高水平表达的原因^[2]。而且, 整合位点不偏好于转录起始位点^[55], Sivalingam 等^[56]发现, 超过 70%的整合位点位于转录起始位点 50 kb 以外。这一整合特点与逆转录病毒载体不同, 后者介导的整合偏好发生于转录起始位点附近, 可能导致基因表达紊乱^[57]。因此, 从这方面来讲, 整合酶介导的整合潜在的安全隐患较逆转录病毒载体系统要小。

有关假 *attP* 位点序列特征的研究表明, 整合位点核心序列具有回文序列基序(motif)^[34, 36, 53, 55, 56](图 1)。说明 ϕ C31 整合酶介导的整合需要识别有这些基序特征的序列。此外, 在整合酶介导的整合事件中发现外源基因可以正向或反向整合入假 *attP* 位点^[36, 55], 这可能与 motif 的回文序列特征有关; 且研究表明, 整合酶与核心两侧的序列均可结合^[58], 说明回文序列特征可能是整合酶识别假 *attP* 位点并完成位点特异性整合的主要因素之一。由于在多种细胞系中分离鉴定了较多的假 *attP* 位点, 因此, 整合位点的特异性没有先前预测的那样高。虽然如此, 大部分整合通常集中发生于少数假 *attP* 位点, 如 Thyagarajan 等^[36]发现 30%~60%的整合事件发生在少于 10 个位点上, Chalberg 等^[55]则发现 60%的整合集中于 19 个位点上。这种局限于少数几个位点的整合在一定程度上降低了整合酶系统的安全风险。



图 1 人类基因组假 *attP* 位点核心序列特征

野生型 *attB* 位点和 *attP* 位点以及人类基因组中各假 *attP* 位点回文基序中的反向重复序列(黑体字)。方框中为 4 个不同假 *attP* 位点回文基序中共有的碱基, 可见在核心序列两侧特定位置的碱基序列非常保守, 且围绕核心(下划线字母)呈回文结构。

研究还发现假 *attP* 位点有细胞特异性。有些位点在多种不同组织来源的细胞系中均出现,但有些位点却只出现在某一特定类型细胞中。如整合位点 3q26.31 仅在 HepG2 细胞(人肝癌细胞系)中出现,而在实验所用的其他几种组织来源的细胞,如人 293 和 D407(视网膜色素上皮细胞系)中均未检测到^[55],但 19q13.31 位点在所有类型细胞中都可检测到。假 *attP* 位点 12q22 处的整合仅发生在 HCT116 细胞(人结肠癌细胞系)中,而在 Huh7(人肝癌细胞系)和 293 细胞中未检测到,表明该位点可能为该细胞系特有的开放位点^[59]。同样,19q13.31 位点的整合在上述 3 种细胞中均可检测到,表明该位点是一个存在于多种不同组织细胞中的常用位点。Thyagarajan 等^[36]还在 ES 细胞中鉴定了一些未在其他细胞系中报道过的位点(23 个位点中只有 5 个为已报道位点),这些有可能为 ES 细胞中特有的假 *attP* 位点。

此外,整合酶介导的整合还具有整合拷贝数低的特点。研究发现,外源基因通常为单拷贝整合^[52, 55]。这种较低的整合拷贝数有利于降低在高风险位点的整合几率,从而有利于挑选那些只整合了一个拷贝外源基因且整合位点安全的细胞用于基因治疗。研究还发现,在整合酶已介导外源基因整合于一个假 *attP* 位点之后,若再次利用整合酶系统介导外源基因整合,整合将发生于另外的假 *attP* 位点。而且,整合也有可能同时发生于一个以上的假 *attP* 位点^[53]。

假 *attP* 位点虽然与噬菌体 *attP* 位点具有一定的序列同源性,但整合毕竟不是发生在野生型 *attP* 和 *attB* 位点之间,因此,在整合酶介导基因整合后发现存在少量碱基缺失或插入的现象^[36, 52, 55, 56, 60],但也有研究发现整合处有大片段缺失和插入^[59]。因此,整合酶介导的整合可能具有潜在的引起基因组不稳定的风险。这种大片段缺失和插入的发生频率以及其可能的不良后果都有待于深入研究。

3.2 整合酶对基因组稳定性的影响

为使含 *attB* 位点及目的基因的质粒以位点特异性方式整合入基因组的假 *attP* 位点,在转染细胞时通常使用的表达整合酶质粒的量要远高于含 *attB* 位点质粒的量。虽然整合酶蛋白的瞬时表达可以达到位点特异性整合的目的,但很少有实验检测以不同比例转染细胞时整合酶编码序列整合入基因组的情

况。整合酶基因的整合有可能带来安全隐患。Liu 等^[62, 63]的研究表明,当整合酶与含 *attB* 的质粒以 3:1 的摩尔比转染原代培养的人胚胎成纤维细胞或者成人成纤维细胞后,在药物筛选的细胞克隆中检测到了整合酶基因的整合,核型分析显示这些细胞克隆中存在染色体异常,而对照细胞则核型正常。这有可能是整合酶识别基因组中的假 *attP* 位点并介导其重组而引起染色体重排^[62]。此外,整合酶在转染细胞中也可引起 DNA 损伤反应^[63]。Ehrhardt 等^[59]虽然未在整合酶介导外源基因整合的细胞中检测到整合酶基因的整合,但同样发现了染色体重排现象:15%的整合位点所包含的整合基因两侧的序列来自两个不同的染色体。同样,Chalberg 等^[55]也在整合酶系统介导外源基因整合的细胞中从分子水平检测到了染色体重排现象。

尽管上述细胞水平的研究表明 ϕ C31 整合酶引起的染色体重排可能会给基因治疗应用带来安全隐患,但在 *C-MYC* 转基因小鼠中的体内实验研究表明^[64],尾静脉高压注射整合酶质粒后并未缩短该小鼠体内肿瘤形成时间,即整合酶在体内基因转移的应用中安全风险并未升高。但小鼠尾静脉高压注射后外源基因多在 *mpsL1* 位点整合^[3],而其他脏器中是否该位点仍为整合热点,以及某种脏器的整合热点的安全性如何都有待进一步研究。

上述几项研究主要从染色体重排及成瘤时间的角度评估了整合酶的安全风险,而从各种水平全方位地评估整合酶质粒和目的基因质粒共同转染细胞对基因组稳定性的影响,将为今后整合酶真正用于临床基因治疗提供科学依据。由于培养自人脐带外膜的上皮细胞(Cord-lining epithelial cells, CLECs)具有极大的临床应用价值,Sivalingam 等^[56]采用多种手段对整合酶在该细胞中介导外源基因整合的规律及安全性进行了较为全面的分析,主要从以下几个方面进行了评估:整合位点的序列分析和染色体定位、光谱核型分析、高分辨率基因组拷贝数、转录组、转基因拷贝数、尾静脉注射后基因表达水平及体内致瘤性等。研究表明:在 44 个独立的整合事件中,少于 5%的整合位点位于基因的外显子内;光谱核型分析结果显示,在整合酶修饰混合克隆的 90 个中期分裂相中有 4 个分裂相发现染色体易位。随后,又分析了 8 个稳定整合外源基因的单克隆细胞群超

过 210 个分裂相, 未发现有染色体结构或数量异常。这一结果与先前研究中整合酶系统修饰细胞中较高的染色体异常发生频率^[59, 62, 63]显著不同, 可能与研究的细胞种类不同有关。事实上, 该研究在整合酶修饰细胞中发现的非重复发生的染色体易位现象与人类正常体细胞中很低频率的染色体异常现象一致。表明这些易位有可能是一些罕见的随机事件。研究并未观察到那些有染色体异常细胞的混合克隆在细胞增殖方面有异常, 说明这些易位并不影响细胞生长或存活能力。高分辨率基因组拷贝数分析表明, 虽然在经整合酶系统修饰后外源基因稳定整合的 CLECs 中观察到少数基因发生了拷贝数变化, 但这些变化对基因表达改变影响甚小。基因表达谱分析结果显示, 整合酶系统修饰细胞中 95.6% 的基因表达未发生改变。虽然基因功能注释显示表达发生改变的 151 个基因中有 3 个基因(*CDK2*、*CCNB1* 和 *IGFBP3*)与 p53 信号通路相关, 但将整合酶修饰的细胞移植到免疫缺陷小鼠体内至少 4 个月后未观察到肿瘤形成(含有癌基因的人成纤维细胞移植后成瘤时间通常为 3-6 周)。将整合有凝血因子 VIII(*FVIII*) 基因并分泌 FVIII 的 CLECs 移植到免疫缺陷的血友病模型小鼠体内, 取得了显著的表型修正。因此, Sivalingam 等^[56]认为虽然在混合克隆细胞中发现了少量的异常现象, 但总体来讲, 其安全风险较低, 在通过多种手段预先检测后, 经整合酶系统修饰后的 CLECs 有可能被临床试验接受, 用于单基因疾病(如血友病)的细胞移植治疗。

3.3 整合酶细胞内互作蛋白

由于 ϕ C31 整合酶系统在体外研究中表现出潜在的安全风险, 且在体内研究中也发现整合酶系统可引起暂时性的细胞形态异常^[11], 因此研究 ϕ C31 整合酶在哺乳动物细胞中的生物学行为有助于评估该系统用于哺乳动物基因组修饰的安全性。Chen 等^[50]和 Wang 等^[51]利用酵母双杂交技术筛选出了人胚胎肾细胞(HEK293)中 11 个可能与 ϕ C31 整合酶相互作用的蛋白。其中, 61 个阳性克隆中有 51 个含有 DAXX 蛋白片段, 其余 10 个克隆中则为其他 10 种不同蛋白的片段。免疫共沉淀实验表明 DAXX 和 TTRAP 均可与整合酶结合, 从而降低了整合酶介导 *attB* 和 *attP* 重组的效率。DAXX 和 TTRAP 均为调控细胞凋

亡的早幼粒细胞白血病蛋白核体(Promyelocytic leukemia protein nuclear bodies, PML NBs)相关蛋白^[65, 66], 两者之间也存在相互作用^[66]。DAXX 是一种多功能蛋白, 参与多种不同的细胞凋亡通路^[65, 67], 且被证明可与鸟类肉瘤病毒整合酶相互作用^[68], TTRAP 也被证明可与人类免疫缺陷病毒整合酶相互作用而促进病毒整合^[69]。这表明 DAXX 和 TTRAP 在哺乳动物细胞外来 DNA 的整合过程中起重要作用。此外, DAXX 和肿瘤抑制因子 p53 均为 NB 相关蛋白^[65], ϕ C31 整合酶与 DAXX 和 TTRAP 之间的互作与整合酶修饰细胞中 p53 信号通路中有关基因表达的改变^[56]是否有关、其对基因组稳定性的影响以及如何利用这些信息进一步优化整合酶系统去规避与此关联的安全隐患都值得我们进一步探索。

4 展望

综上所述, ϕ C31 整合酶系统具有介导外源基因整合效率高、胜任大片段基因整合、整合的外源基因可长期高效表达等优点。但随着研究的深入, 整合酶系统潜在的安全风险得到了较多的关注, 其真正用于临床基因治疗还需要更多研究的积累和评估。虽然细胞水平的研究结果并不尽如人意, 但个体水平的研究表明整合酶系统相对于病毒载体系统仍较为安全。因此, 在利用整合酶系统进行基因导入时, 需要从分子水平及细胞水平全面检测整合事件, 鉴定整合位点, 排除插入突变、核型异常等危险因素, 进行全面的安全评估后才可考虑用于基因治疗。此外, 为避免整合酶可能带来的安全隐患, 也可以采取转染整合酶蛋白^[46]或诱导整合酶表达^[70]来完成基因的整合。还可以通过提高整合位点的可控性, 即改造整合酶使其识别特定的假 *attP* 位点, 或与锌指酶技术结合^[71], 提高其整合靶向性的同时也提高安全性。

总之, 深入研究 ϕ C31 整合酶系统在哺乳动物细胞中的作用机制, 进一步优化整合酶系统, 全面评估其用于多种疾病基因治疗的安全风险是未来该系统的主要研究方向。

参考文献(References):

- [1] Kuhstoss S, Rao RN. Analysis of the integration function

- of the streptomycete bacteriophage ϕ C31. *J Mol Biol*, 1991, 222(4): 897–908.
- [2] Calos MP. The ϕ C31 integrase system for gene therapy. *Curr Gene Ther*, 2006, 6(6): 633–645.
- [3] Olivares EC, Hollis RP, Chalberg TW, Meuse L, Kay MA, Calos MP. Site-specific genomic integration produces therapeutic Factor IX levels in mice. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(11): 1124–1128.
- [4] 张磊, 顾东生, 杜伟廷, 刘鹏霞, 卢士红, 杨仁池. 高压尾静脉注射和位点特异性整合介导的人凝血因子 IX 基因治疗血友病 B 小鼠. *中华血液学杂志*, 2010, 31(5): 294–299.
- [5] Ortiz-Urda S, Thyagarajan B, Keene DR, Lin Q, Fang M, Calos MP, Khavari PA. Stable nonviral genetic correction of inherited human skin disease. *Nat Med*, 2002, 8(10): 1166–1170.
- [6] Ortiz-Urda S, Thyagarajan B, Keene DR, Lin Q, Calos MP, Khavari PA. ϕ C31 integrase-mediated nonviral genetic correction of junctional epidermolysis bullosa. *Hum Gene Ther*, 2003, 14(9): 923–928.
- [7] 盛卫忠, 沈坤堂, 秦新裕. 应用整合酶 ϕ C31 治疗 1 型糖尿病的实验研究. *中国临床医学*, 2004, 11(3): 397–399.
- [8] Quenneville SP, Chapdelaine P, Rousseau J, Beaulieu J, Caron NJ, Skuk D, Mills P, Olivares EC, Calos MP, Tremblay JP. Nucleofection of muscle-derived stem cells and myoblasts with ϕ C31 integrase: stable expression of a full-length-dystrophin fusion gene by human myoblasts. *Mol Ther*, 2004, 10(4): 679–687.
- [9] Berton C, Jarrahan S, Wheeler TM, Li YN, Olivares EC, Calos MP, Rando TA. Enhancement of plasmid-mediated gene therapy for muscular dystrophy by directed plasmid integration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(2): 419–424.
- [10] Quenneville SP, Chapdelaine P, Rousseau J, Tremblay JP. Dystrophin expression in host muscle following transplantation of muscle precursor cells modified with the ϕ C31 integrase. *Gene Ther*, 2007, 14(6): 514–522.
- [11] Held PK, Olivares EC, Aguilar CP, Finegold M, Calos MP, Grompe M. *In vivo* correction of murine hereditary tyrosinemia type I by ϕ C31 integrase-mediated gene delivery. *Mol Ther*, 2005, 11(3): 399–408.
- [12] Chalberg TW, Genise HL, Vollrath D, Calos MP. ϕ C31 integrase confers genomic integration and long-term transgene expression in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005, 46(6): 2140–2146.
- [13] Keravala A, Portlock JL, Nash JA, Vitran DG, Robbins PD, Calos MP. ϕ C31 integrase mediates integration in cultured synovial cells and enhances gene expression in rabbit joints. *J Gene Med*, 2006, 8(8): 1008–1017.
- [14] Portlock JL, Keravala A, Berton C, Lee S, Rando TA, Calos MP. Long-term increase in mVEGF₁₆₄ in mouse hindlimb muscle mediated by phage ϕ C31 integrase after nonviral DNA delivery. *Hum Gene Ther*, 2006, 17(8): 871–876.
- [15] Keravala A, Ormerod BK, Palmer TD, Calos MP. Long-term transgene expression in mouse neural progenitor cells modified with ϕ C31 integrase. *J Neurosci Meth*, 2008, 173(2): 299–305.
- [16] 孙志东, 詹林盛. 高效位点特异性链霉菌 ϕ C31 噬菌体整合酶的研究进展. *生物技术通讯*, 2007, 18(6): 1036–1038.
- [17] 徐焕宇, 马晴雯. ϕ C31 整合酶与生物医学. *医学分子生物学杂志*, 2007, 4(4): 339–342.
- [18] 吴民耀, 文瑞丽, 师红, 王昭晖, 张耀君. ϕ C31 位点特异性整合酶系统研究进展. *重庆理工大学学报*, 2010, 24(7): 30–36.
- [19] 曲立娟, 黄英. ϕ C31 整合酶与转基因动物研制. *中国生物工程杂志*, 2009, 29(2): 103–107.
- [20] Sun ZD, Wang Y, Fu QX, Zhou Y, Jia SZ, Du J, Peng JC, Wang YL, Yang SH, Zhan LS. Long-term hepatitis C internal ribosome entry site-dependent gene expression mediated by phage ϕ C31 integrase in mouse model. *Antivir Ther*, 2009, 14(3): 393–400.
- [21] Lutz KA, Azhagiri AK, Tungsuchat-Huang T, Maliga P. A guide to choosing vectors for transformation of the plastid genome of higher plants. *Plant Physiol*, 2007, 145(4): 1201–1210.
- [22] Kittiwongwattana C, Lutz K, Clark M, Maliga P. Plastid marker gene excision by the ϕ C31 phage site-specific recombinase. *Plant Mol Biol*, 2007, 64(1–2): 137–143.
- [23] Lister JA. Transgene excision in zebrafish using the ϕ C31 integrase. *Genesis*, 2010, 48(2): 137–143.
- [24] Kempe K, Rubtsova M, Berger C, Kumlehn J, Schollmeier C, Gils M. Transgene excision from wheat chromosomes by phage ϕ C31 integrase. *Plant Mol Biol*, 2010, 72(6): 673–687.
- [25] Thomson JG, Chan R, Thilmony R, Yau YY, Ow DW. ϕ C31 recombination system demonstrates heritable germinal transmission of site-specific excision from the *Arabidopsis* genome. *BMC Biotechnol*, 2010, 10(1): 17.
- [26] Lu JJ, Maddison LA, Chen W. ϕ C31 integrase induces efficient site-specific excision in zebrafish. *Transgenic Res*, 2011, 20(1): 183–189.
- [27] Belteki G, Gertsenstein M, Ow DW, Nagy A. Site-specific cassette exchange and germline transmission with mouse ES cells expressing ϕ C31 integrase. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(3): 321–324.
- [28] Bateman JR, Lee AM, Wu CT. Site-specific transformation of *Drosophila* via ϕ C31 integrase-mediated cassette ex-

- change. *Genetics*, 2006, 173(2): 769–777.
- [29] Nakayama G, Kawaguchi Y, Koga K, Kusakabe T. Site-specific gene integration in cultured silkworm cells mediated by ϕ C31 integrase. *Mol Genet Genomics*, 2006, 275(1): 1–8.
- [30] Dafhnis-Calas F, Xu ZY, Haines S, Malla SK, Smith MCM, Brown WR. Iterative *in vivo* assembly of large and complex transgenes by combining the activities of ϕ C31 integrase and Cre recombinase. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(22): e189.
- [31] Schetelig MF, Scolari F, Handler AM, Kittelmann S, Gasperi G, Wimmer EA. Site-specific recombination for the modification of transgenic strains of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(43): 18171–18176.
- [32] Monetti C, Nishino K, Biechele S, Zhang P, Baba T, Woltjen K, Nagy A. ϕ C31 integrase facilitates genetic approaches combining multiple recombinases. *Methods*, 2011, 53(4): 380–385.
- [33] Lieu PT, Machleidt T, Thyagarajan B, Fontes A, Frey E, Fuerstenau-Sharp M, Thompson DV, Swamilingiah GM, Derebail SS, Piper D, Chesnut JD. Generation of site-specific retargeting platform cell lines for drug discovery using ϕ C31 and R4 integrases. *J Biomol Screen*, 2009, 14(10): 1207–1215.
- [34] Ehrhardt A, Yant SR, Giering JC, Xu H, Engler JA, Kay MA. Somatic integration from an adenoviral hybrid vector into a hot spot in mouse liver results in persistent transgene expression levels *in vivo*. *Mol Ther*, 2007, 15(1): 146–156.
- [35] 张磊, 顾东生, 薛峰, 杜伟廷, 刘鹏霞, 周泽平, 卢士红, 杨仁池. 新型血友病 B 基因治疗的腺病毒-整合酶嵌合系统的构建及其体外表达鉴定. *中国实验血液学杂志*, 2010, 18(5): 1229–1234.
- [36] Thyagarajan B, Liu Y, Shin S, Lakshmipathy U, Scheyhing K, Xue H, Ellerström C, Strehl R, Hyllner J, Rao MS, Chesnut JD. Creation of engineered human embryonic stem cell lines using ϕ C31 integrase. *Stem Cells*, 2008, 26(1): 119–126.
- [37] Liu Y, Thyagarajan B, Lakshmipathy U, Xue H, Lieu P, Fontes A, Macarthur CC, Scheyhing K, Rao MS, Chesnut JD. Generation of platform human embryonic stem cell lines that allow efficient targeting at a predetermined genomic location. *Stem Cells Dev*, 2009, 18(10): 1459–1472.
- [38] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126(4): 663–676.
- [39] Cela E. Efficacious non-viral methods of reprogramming somatic cells. *JULS*, 2009, 3(1): 73–75.
- [40] Ye L, Chang JC, Lin C, Qi ZX, Yu JW, Kan YW. Generation of induced pluripotent stem cells using site-specific integration with phage integrase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, DOI: 10.1073/pnas.1012677107.
- [41] Jia FJ, Wilson KD, Sun N, Gupta DM, Huang M, Li ZJ, Panetta NJ, Chen ZY, Robbins RC, Kay MA, Longaker MT, Wu JC. A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nat Methods*, 2010, 7(3): 197–199.
- [42] Keravala A, Lee S, Thyagarajan B, Olivares EC, Gaborovsky VE, Woodard LE, Calos MP. Mutational derivatives of ϕ C31 integrase with increased efficiency and specificity. *Mol Ther*, 2009, 17(1): 112–120.
- [43] Liesner R, Zhang WL, Noske N, Ehrhardt A. Critical amino acid residues within the ϕ C31 integrase DNA-binding domain affect recombination activities in mammalian cells. *Hum Gene Ther*, 2010, 21(9): 1104–1118.
- [44] Andreas S, Schwenk F, Küter-Luks B, Faust N, Kühn R. Enhanced efficiency through nuclear localization signal fusion on phage ϕ C31-integrase: Activity comparison with Cre and FLPe recombinase in mammalian cells. *Nucl Acids Res*, 2002, 30(11): 2299–2306.
- [45] Raymond CS, Soriano P. High-efficiency FLP and ϕ C31 site-specific recombination in mammalian cells. *PLoS One*, 2007, 2(1): e162.
- [46] Zhang MX, Li ZH, Fang YX, Zhu HZ, Xue JL, Chen JZ, Jia W. TAT- ϕ C31 integrase mediates DNA recombination in mammalian cells. *J Biotechnol*, 2009, 142(2): 107–113.
- [47] Aneja MK, Geiger J, Imker R, Üzgün S, Kormann M, Hasenpusch G, Maucksch C, Rudolph C. Optimization of *Streptomyces* bacteriophage ϕ C31 integrase system to prevent post integrative gene silencing in pulmonary type II cells. *Exp Mol Med*, 2009, 41(12): 919–934.
- [48] Woodard LE, Hillman RT, Keravala A, Lee S, Calos MP. Effect of nuclear localization and hydrodynamic delivery-induced cell division on ϕ C31 integrase activityNLS addition, cell division, and ϕ C31 integrase. *Gene Ther*, 2010, 17(2): 217–226.
- [49] Bischof J, Maeda RK, Hediger M, Karch F, Basler K. An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific ϕ C31 integrases. *Proc Natl Acad Sci U SA*, 2007, 104(9): 3312–3317.
- [50] Chen JZ, Ji CN, Xu GL, Pang RY, Yao JH, Zhu HZ, Xue JL, Jia W. DAXX interacts with phage ϕ C31 integrase and inhibits recombination. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(21): 6298–6304.

- [51] Wang BY, Xu GL, Zhou CH, Tian L, Xue JL, Chen JZ, Jia W. ϕ C31 integrase interacts with TTRAP and inhibits NF κ B activation. *Mol Biol Rep*, 2010, 37(6): 2809–2816.
- [52] Thyagarajan B, Olivares EC, Hollis RP, Ginsburg DS, Calos MP. Site-specific genomic integration in mammalian cells mediated by phage ϕ C31 integrase. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(12): 3926–3934.
- [53] Nishiumi F, Sone T, Kishine H, Thyagarajan B, Kogure T, Miyawaki A, Chesnut JD, Imamoto F. Simultaneous single cell stable expression of 2–4 cDNAs in HeLaS3 using ϕ C31 integrase system. *Cell Struct Funct*, 2009, 34(1): 47–59.
- [54] Venken KJT, He YC, Hoskins RA, Bellen HJ. P[acman]: a BAC transgenic platform for targeted insertion of large DNA fragments in *D. melanogaster*. *Science*, 2006, 314(5806): 1747–1751.
- [55] Chalberg TW, Portlock JL, Olivares EC, Thyagarajan B, Kirby PJ, Hillman RT, Hoelters J, Calos MP. Integration specificity of phage ϕ C31 integrase in the human genome. *J Mol Biol*, 2006, 357(1): 28–48.
- [56] Sivalingam J, Krishnan S, Ng WH, Lee SS, Phan TT, Kon OL. Biosafety assessment of site-directed transgene integration in human umbilical cord-lining cells. *Mol Ther*, 2010, 18(7): 1346–1356.
- [57] Wu XL, Li Y, Crise B, Burgess SM. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science*, 2003, 300(5626): 1749–1751.
- [58] Smith MCM, Thorpe HM. Diversity in the serine recombinases. *Mol Microbiol*, 2002, 44(2): 299–307.
- [59] Ehrhardt A, Engler JA, Xu H, Cherry AM, Kay MA. Molecular analysis of chromosomal rearrangements in mammalian cells after ϕ C31-mediated integration. *Hum Gene Ther*, 2006, 17(11): 1077–1094.
- [60] Ehrhardt A, Xu H, Huang Z, Engler JA, Kay MA. A direct comparison of two nonviral gene therapy vectors for somatic integration: *in vivo* evaluation of the bacteriophage integrase ϕ C31 and the *Sleeping Beauty* transposase. *Mol Ther*, 2005, 11(5): 695–706.
- [61] Groth AC, Olivares EC, Thyagarajan B, Calos MP. A phage integrase directs efficient site-specific integration in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(11): 5995–6000.
- [62] Liu J, Jeppesen I, Nielsen K, Jensen TG. ϕ C31 integrase induces chromosomal aberrations in primary human fibroblasts. *Gene Ther*, 2006, 13(15): 1188–1190.
- [63] Liu J, Skjorringe T, Gjetting T, Jensen TG. ϕ C31 integrase induces a DNA damage response and chromosomal rearrangements in human adult fibroblasts. *BMC Biotechnol*, 2009, 9: 31.
- [64] Woodard LE, Keravala A, Jung WE, Wapinski OL, Yang QW, Felsner DW, Calos MP. Impact of hydrodynamic injection and ϕ C31 integrase on tumor latency in a mouse model of MYC-induced hepatocellular carcinoma. *PLoS One*, 2010, 5(6): e11367.
- [65] Takahashi Y, Lallemand-Breitenbach V, Zhu J, de Thé H. PML nuclear bodies and apoptosis. *Oncogene*, 2004, 23(16): 2819–2824.
- [66] Xu GL, Pan YK, Wang BY, Huang L, Tian L, Xue JL, Chen JZ, Jia W. TTRAP is a novel PML nuclear bodies-associated protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 375(3): 395–398.
- [67] Salomoni P, Khelifi AF. Daxx: death or survival protein? *Trends Cell Biol*, 2006, 16(2): 97–104.
- [68] Greger JG, Katz RA, Ishov AM, Maul GG, Skalka AM. The cellular protein daxx interacts with avian sarcoma virus integrase and viral DNA to repress viral transcription. *J Virol*, 2005, 79(8): 4610–4618.
- [69] Zhang JQ, Wang JJ, Li WJ, Huang L, Tian L, Xue JL, Chen JZ, Jia W. Cellular protein TTRAP interacts with HIV-1 integrase to facilitate viral integration. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 387(2): 256–260.
- [70] Sharma N, Moldt B, Dalsgaard T, Jensen TG, Mikkelsen JG. Regulated gene insertion by steroid-induced ϕ C31 integrase. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(11): e67.
- [71] Hoyt JJ, Portlock J, Calos MP. Application and engineering of phage integrases for gene therapy[Dissertation]. Stanford: Stanford University, 2008.