

分子外科与 基因治疗

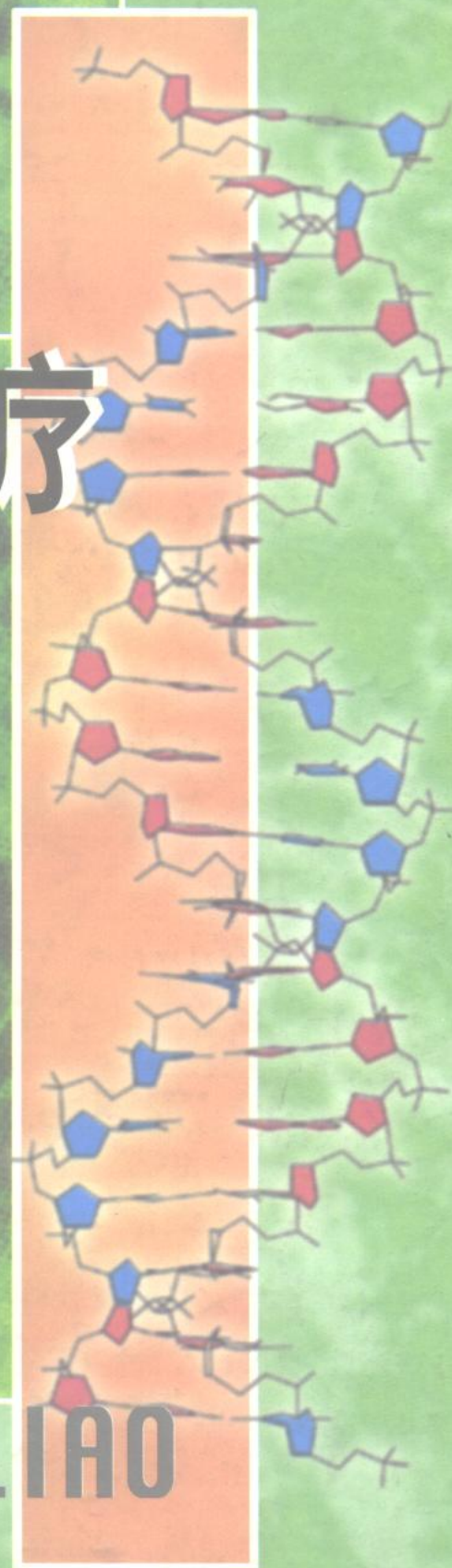
主 编 唐镇生

副主编 应其龙 田新华

FENZI WAIKE
YU JIYIN ZHI LIAO



上海医科大学出版社



分子外科与基因治疗

主 编 唐镇生

副主编 应其龙 田新华

上海医科大学出版社

内 容 提 要

分子外科与基因治疗是分子生物学的一个分支,方兴未艾。本书充分阐述了这一领域中的新观点、新理论、新技术和新发现在临床医学中的应用,尤其是对目前许多常规治疗尚未有理想根治效果的疾病如心血管疾病、肿瘤、遗传病、病毒性疾病、脑损伤等的基因治疗作了全面综述,将理论与实践紧密结合,并且密切追踪国际新动态,为基础和临床医学工作者提供了一本实用性较强的参考书。

ZW 14/13

主 编 唐镇生

副主编 应其龙 田新华

编写者(以姓氏笔画为序)

卫立辛(博士)第二军医大学

毛宇震(博士)上海医科大学

叶玉如(教授)香港科技大学

田新华(博士)上海医科大学

朱君明(博士)上海医科大学

刘隆熙(博士)上海医科大学

孙兮文(博士后)第二军医大学

孙林泉(研究员)瑞士洛桑大学

应其龙(博士后)上海医科大学

张明广(博士)上海医科大学

张登海(博士)第二军医大学

周 倩(博士)第二军医大学

袁正宏(教授)上海医科大学

夏国宏(博士)中国科学院细胞所

钱其军(博士后)第二军医大学

徐丛剑(博士)上海医科大学

唐辉滨(博士)中国科学院生命中心

唐镇生(教授)上海医科大学

黄 强(教授)苏州医学院

黄红莲(博士)第一军医大学

崔 宁(博士后)美国纽约州立大学

彭鲁英(副教授)上海医科大学

熊丁丁(博士)上海医科大学

序 言

分子生物学与分子遗传学的崛起使人们对自身疾病的认识步入到微观世界。许多疾病最终也发现是由于细胞染色体中某些基因的变异所导致,即所谓的基因突变。因此人们很自然地联想到如果能修复这些变异的基因,就有可能把病治愈。这便是近几十年来许多科学家不断追求的目标,而且在他(她)们的努力下已经取得了不少进展,使“梦想”有了实现的可能。我们已知道人类的基因组约有 30 亿个碱基对,估计含有 3 万~10 万个基因,编码大量的蛋白质产物。目前已经弄清楚的基因还只是少数,因此要把这么多的基因全部搞清楚,可能还有很长的路要走,而且必然会遇到这样或那样的困难。所幸人们已掌握了 DNA 重组、DNA 的序列测定、分子的克隆与排序、DNA 杂交、基因的转移与导入、限制性长度片段的多态性鉴定等研究技术,并已能将整个染色体的构筑绘制成图像。我国虽然在这方面起步较晚,但已经得国家领导部门的重视,投入了很大的资金、建起了完善的实验室及研究所,并已组建了有力的队伍进行攻关,相信在不久的将来必有成果不断地涌现。

作为临床工作者我们渴望亟早能得到有效治疗的新方法和新武器。虽然知道基因治疗是一项愚公移山式的工程,但相信只要大家齐心努力,共同投入,一定会取得实效。我们不能坐等佳音的到来,而应当了解与熟悉这门科学的发展,为达到我们自己的愿望而出力。

由上海医科大学华山医院神经外科教授唐镇生主编的《分子外科与基因治疗》一书正是为了这一目的而编写的。本书由 23 位教授、博士、研究员合作撰写。他(她)们博览群书,从各个角度对目前正在研究及试用中的基因治疗概况作了系统性的介绍。全书共 16 章,约 40 万字。内容涉及心血管疾病、肝病、肿瘤、肺病、神经系统疾病、脑瘤、脑损伤、病毒、血液病、脏器移植、遗传性疾病等各个方面,为临床外科医师提供了最新、最直接的信息,是临床外科医师阅读的好材料,并能为大家早日熟悉及掌握这方面的发展与动态提供方便,对当代医学在跨世纪时代向更高、更新的领域挺进将起促进作用。

史玉泉

上海医科大学华山医院

1999 年 1 月

前 言

分子外科与基因治疗是医学分子生物学的一个分支,是本世纪末医学研究最活跃的领域之一,方兴未艾,潜力无穷。这一领域中的新观点、新理论、新技术、新发现对临床医学都是十分重要的。我们学习理论、研究学问,主要目的是在于应用,应用它来充实自己,应用它来治病救人,应用它来创造财富,而最直接的体现是提高日常医疗、教学、科研的质量。

自英国科学家用成年绵羊的体细胞无性繁殖绵羊“多利”获得成功后,世界舆论为之震动,这一重大成果有着无限美好的应用前景,但这种技术也适用于无性繁殖人类本身,因此引起科技界及政界的严重关注。分子外科与基因治疗的深入发展,无疑亦会引起一些伦理问题的讨论,我们相信,人类能够解决复制人类的难题,也能解决好人类后天相处的难题。对高新技术的发展,既要支持,又要慎重,从一开始就采取规范措施,防止滥用,引导和保证高新技术用于生产和服务于人类。

基于以上目的,我们组织编写了本书,主要为临床医师、研究生提供参考,希望能进一步提高医疗、教学、科研的质量,不求系统全面,而是偏重专题应用。本书作者主要是来自中国科学院、上海医科大学和第二军医大学的博士和科技工作者,由于实践不多,水平有限,恳请读者批评指正。

唐镇生

1998年9月于上海

前 言

分子外科与基因治疗是医学分子生物学的一个分支,是本世纪末医学研究最活跃的领域之一,方兴未艾,潜力无穷。这一领域中的新观点、新理论、新技术、新发现对临床医学都是十分重要的。我们学习理论、研究学问,主要目的是在于应用,应用它来充实自己,应用它来治病救人,应用它来创造财富,而最直接的体现是提高日常医疗、教学、科研的质量。

自英国科学家用成年绵羊的体细胞无性繁殖绵羊“多利”获得成功后,世界舆论为之震动,这一重大成果有着无限美好的应用前景,但这种技术也适用于无性繁殖人类本身,因此引起科技界及政界的严重关注。分子外科与基因治疗的深入发展,无疑亦会引起一些伦理问题的讨论,我们相信,人类能够解决复制人类的难题,也能解决好人类后天相处的难题。对高新技术的发展,既要支持,又要慎重,从一开始就采取规范措施,防止滥用,引导和保证高新技术用于生产和服务于人类。

基于以上目的,我们组织编写了本书,主要为临床医师、研究生提供参考,希望能进一步提高医疗、教学、科研的质量,不求系统全面,而是偏重专题应用。本书作者主要是来自中国科学院、上海医科大学和第二军医大学的博士和科技工作者,由于实践不多,水平有限,恳请读者批评指正。

唐镇生

1998年9月于上海

目 录

第一章 分子外科与基因治疗概论

第一节	分子外科、基因治疗概述	2
第二节	分子外科和基因治疗的现状	8
第三节	分子外科与基因治疗的过去和未来	15

第二章 分子外科与基因治疗的现代技术

第一节	概述	19
第二节	逆转录病毒载体系统	19
第三节	腺病毒载体系统	26
第四节	腺病毒相关病毒载体系统	29
第五节	单纯疱疹病毒载体系统	30
第六节	痘苗病毒载体系统	32

第三章 心血管疾病的基因治疗

第一节	心血管疾病发病的分子生物学机制	36
第二节	心血管疾病基因治疗的主要技术与方法	43
第三节	常见心血管病的基因治疗	48
第四节	tPA cDNA 基因转移与基因治疗	51
第五节	基因工程与血管支架	52
第六节	心血管疾病基因治疗存在的问题	53

第四章 肝细胞基因治疗

第一节	肝细胞基因治疗的方法	57
第二节	α_1 -抗胰蛋白酶缺乏症	61
第三节	家族性高胆固醇血症	63
第四节	苯丙酮尿症	65
第五节	尿素循环紊乱	67

第六节	原发性肝细胞癌	68
第七节	肝细胞介导的基因治疗问题与展望	70
第五章	肿瘤的分子外科与基因治疗	
第一节	概述	73
第二节	直接杀伤肿瘤细胞或抑制其生长的基因治疗策略	76
第三节	肿瘤免疫基因治疗——依赖于机体免疫功能的间接杀伤和抑制肿瘤的 基因治疗策略	82
第四节	改善肿瘤传统化疗疗效的基因治疗策略	88
第五节	肿瘤基因治疗面临的问题与对策	89
第六章	肺癌的基因诊断与治疗	
第一节	肺癌的基因诊断	97
第二节	肺癌的基因治疗	101
第七章	分子神经外科与基因治疗	
第一节	概述	108
第二节	分子生物学、细胞生物学与基因治疗	109
第三节	分子神经外科靶细胞的选择	111
第四节	神经系统疾病基因治疗的方法	113
第五节	基因修饰细胞在脑内移植研究中的应用	117
第六节	几种神经系统疾病的基因治疗	119
第八章	胶质瘤的分子外科与基因治疗	
第一节	基因与胶质瘤的关系	123
第二节	基因治疗的途径	126
第三节	胶质瘤的分子外科治疗	127
第四节	存在的问题及展望	131
第九章	Parkinson 病的基因治疗	
第一节	概述	133
第二节	Parkinson 病的病理与生化基础	133
第三节	Parkinson 病动物模型的建立	136
第四节	基因治疗 Parkinson 病的原理	137
第五节	基因治疗 Parkinson 病的策略	139
第六节	基因治疗 Parkinson 病的方法	142
第七节	基因治疗 Parkinson 病的疗效评定	143

第十章 脑损伤的生物治疗与基因治疗

第一节	损伤后的大脑	146
第二节	成年大脑损伤后的生物治疗	149
第三节	基因治疗——促进脑损伤的修复	156
第四节	展望	161

第十一章 病毒性疾病的基因治疗

第一节	概述	163
第二节	抗病毒性疾病基因治疗的策略	163
第三节	抗病毒基因治疗的免疫调控策略	164
第四节	抗病毒基因治疗的基因失活策略	167
第五节	存在的问题和展望	172

第十二章 血液系统疾病的基因治疗

第一节	血友病的基因治疗	176
第二节	珠蛋白生成障碍性贫血的基因治疗	185

第十三章 移植免疫与分子生物学

第一节	移植的类型	195
第二节	移植免疫相关分子	196
第三节	组织相容性抗原	205
第四节	移植免疫反应的机制	208
第五节	移植排斥反应	209
第六节	延长移植存活措施	210

第十四章 遗传性疾病的基因治疗

第一节	概述	214
第二节	血友病 B 的基因治疗	215
第三节	囊性纤维化的基因治疗	217
第四节	ADA 缺陷所致 SCID 的基因治疗	221
第五节	家族性高胆固醇血症的基因治疗	222
第六节	Gaucher 病的基因治疗	223
第七节	神经系统遗传病基因治疗概况	223
第八节	基因治疗遗传病存在的问题与展望	225

第十五章 细胞凋亡与基因治疗

第一节	凋亡概念的提出及其发展	227
第二节	凋亡检测	232

第三节	凋亡的信号传导	235
第四节	凋亡与疾病	239
第五节	凋亡与基因治疗	240
第六节	展望	241

第十六章 分子外科与基因治疗的问题和展望

第一节	目的基因调控元件的选择问题	243
第二节	靶细胞选择问题	251
第三节	载体和转移技术的选择问题	254
第四节	临床前研究及安全性和社会伦理问题	257
第五节	基因治疗的展望	259

第一章 分子外科与基因治疗概论

1871年 Miescher 在莱因河鲑鱼精子中发现了 DNA, 但其后 70 多年都未受到重视。直至 1943 年, Avery 用肺炎球菌进行研究, 证明了决定细菌遗传性状的是 DNA 而非蛋白质, DNA 是遗传信息的携带者, DNA 才引人注目。1953 年, Watson 和 Crick 提出的 DNA 双螺旋结构和碱基互补规则, 成为本世纪最重要的科学发现, 因此获得了诺贝尔奖。1961 年, Nirenberg 破译了遗传密码。60 年代后期, 科学家们又分离出了制备重组 DNA 分子所必需的工具酶, 包括 DNA 连接酶和几种能在特异位点上切割 DNA 的限制性核酸内切酶, 为分子外科及基因治疗奠定了基础。像外科手术一样, 切除致病的基因, 然后置换上正常基因, 已不再是科幻小说中美好的设想了, 近年的发展逐渐使之成为现实。一个崭新的基因治疗时代已经来临了。

作为一种新的疾病治疗方法, 基因治疗诞生于 70 年代初。1972 年美国的 DNA 重组技术是基因疗法的“催生婆”。1977 年, 磷酸钙共沉淀法已广泛应用于各种体外的基因转移。1981 年, 第一个病毒载体——逆转录病毒的成功构建, 激起了人类对疾病基因治疗浓厚的兴趣和热情。此后, 各种基因转移技术陆续产生, 科学家们在动物体内和体外培养细胞上进行了大量基因转移和表达的实验。1989 年 5 月 22 日, 美国通过了第一例基因转移临床方案(应用逆转录病毒载体转移标记基因)。1990 年 9 月 14 日美国官方正式批准腺苷酸脱氨酶(ADA)缺乏性遗传病的临床基因治疗方案的实施, 并且取得了较好的治疗效果。自此, 基因治疗研究发展更加迅猛, 研究内容也已经从单基因的遗传病扩大到多基因的肿瘤、艾滋病、心血管病和神经系统疾病等。由于肿瘤基因治疗较少涉及伦理问题, 加之临床治疗上的迫切需要, 其发展走在了基因治疗的前列。迄今已经有 100 多个基因治疗方案被批准, 600 余名患者接受基因治疗。基因治疗研究主要集中在美国、中国、英国、法国、德国、意大利、荷兰、日本等国家也先后进行了临床试验。基因治疗已经成为生物科学和临床医学各领域中较热门的研究课题之一。

我国的基因治疗虽起步较晚, 但在医学、生物学、科技工作者们的共同努力下, 已呈现出生机勃勃的景象。“863”国家高技术的发展规划已将遗传病的基因治疗列入重点研究课题。对某些疾病如血友病 B 的基因治疗, 已达到世界先进水平。1993 年 5 月, 国家卫生部颁发了《人的体细胞治疗及基因治疗临床研究质控要点》, 保障了我国的基因治疗研究沿着正确方向健康发展。1994 年 11 月, 首届“人类基因诊断治疗与预防研讨会”召开, 这是我国基因治疗史上的一个里程碑, 势必对基因治疗的发展和普及产生深远的影响。特别可喜的是学苑出版社 1993 年出版了由成军、斯崇文编著的《基因治疗》; 中国科学技术出版社 1994 年出版了彭朝晖等主编的《基因治疗——基础与临床》一书, 对我国基因治疗的研究和发展起到了具大的推动作用。

随着分子生物学、细胞生物学、遗传学、免疫学等基础医学学科的迅速发展, 基因治疗的

进展可谓日新月异。基因治疗给人类征服疾病带来了光明的前景。著名遗传学家谈家桢教授高瞻远瞩地指出：“21 世纪的医疗革命将取决于基因治疗研究的成功。”

第一节 分子外科、基因治疗概述

一、基因治疗与分子外科的定义

1992 年 Roth 认为,随着对肿瘤的进一步认识,人们可以在分子水平通过基因操作来预防、诊断和治疗肿瘤,这种治疗方法称为“分子外科”。同年 Matruza 提出在神经系统内运用基因工程来杀伤肿瘤细胞,调节、改善或增强神经元和神经胶质细胞功能,从而治疗疾病的这种方法称为“分子神经外科”。我们认为在分子水平进行基因操作以达到外科治疗目的的可称为“分子外科”。

基因治疗有多种含义与定义,广义的基因治疗可被定义为应用遗传学原理治疗人类疾病。许多传统的内、外科治疗方法,因为它们是在对疾病的遗传及生物化学了解的基础上,也可以归结到广义的基因治疗范畴内。在有关专著中,经典的基因治疗 (gene therapy) 是指目的基因导入靶细胞后与宿主细胞内的基因发生整合,成为宿主遗传物质的一部分,目的基因的表达产物对疾病起治疗作用。近年来,采用基因转移技术,可使目的基因与宿主细胞基因不发生整合,目的基因也可表达产物,其产物同样也能产生治疗效果。这种目的基因不与宿主细胞基因发生整合,由表达产物发挥治疗作用的基因治疗方法称为基因疗法 (gene therapeutics)。

基因治疗和分子外科为临床提供了一个从治标到治本、从姑息疗法到根治的可能途径。

二、分子外科与基因治疗的策略

各种基因治疗的先决条件是治疗目的必须绝对明确。分子遗传学和 DNA 重组技术的飞速发展,使我们能正确了解人类基因组的结构和功能,认识引发疾病的分子机制,发现并克隆人类疾病的致病基因,从而为疾病的基因治疗奠定了基础。基因治疗的策略有很多种,取决于各种疾病。如单个基因缺陷可采用基因置换治疗;获得性遗传性疾病(如慢性感染性疾病)可用抑制异体基因治疗;复杂的遗传性疾病(如心血管系统疾病或肿瘤性疾病)可用基因局部表达治疗。目前报道基因治疗的文献浩如烟海,其治疗策略也是多种多样的,归纳起来有以下几种:

1. 基因置换 就是把正常的外源基因导入生物体靶细胞内,对产生疾病的基因进行置换(图 1-1)。如果能够将缺陷基因原位校正,并保证患者基因组序列不发生其他改变,能接受体内原有的复杂调控,维持原有的时空表达模式,这就是理想和真正意义上的基因治疗。同源重组法就是将正常 DNA 通过合适的载体导入细胞中,并与基因组上同源序列配对偶联。通过同源重组可置换原来有缺陷的遗传信息,达到基因定点整合 (gene targeting, 或称基因打靶)的目的,恢复基因正常功能。通过同源重组能在缺陷基因原位进行精密修复,因此是基因治疗研究中一种主要的技术。如果能成功地进行基因置换,则约 4 000 余种单基因遗传病将因此得到永久的治愈。基因置换已在培养细胞中通过加入同源性的 DNA 实现同源重组而获得成功。例如将正常 β 珠蛋白基因片段利用电穿孔对缺陷的 β 珠蛋白进行修复,发生同源重组的细胞能通过选择性标记而得到分离。用电击法同源重组的频率可

达到 1/10 个克隆。这项技术为基因治疗的最终运用提供了可能,然而,基因同源重组发生的频率太低,远不能满足基因治疗中基因置换技术的要求。除了完善基因定点整合技术外,还须探讨其他基因置换途径。

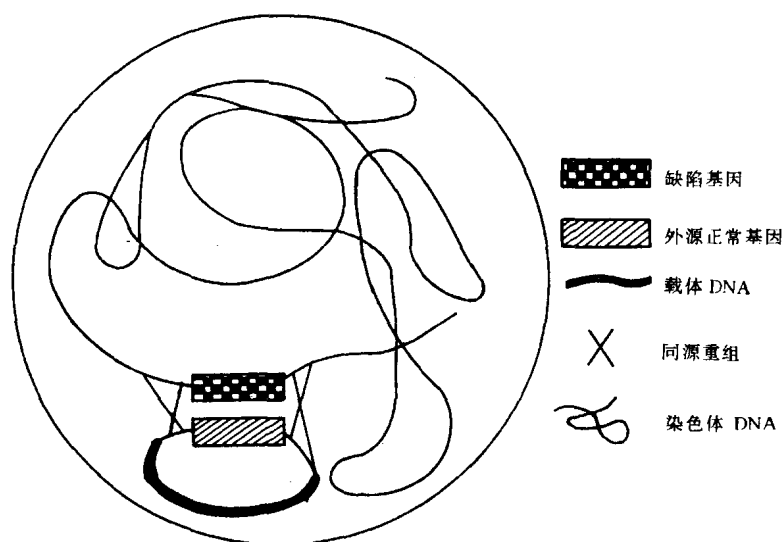


图 1-1 用同源 DNA 进行原位基因取代

用一个正常基因导入一个带有缺陷基因(位于其天然染色体上)的细胞中。通过同源重组,正常基因有可能取代缺陷基因

2. 基因修正 是指原位修复致病基因的功能,而不一定要改变致病基因的核苷酸顺序。因为在大多数情况下,单基因遗传病的分子遗传学病理基础是点突变,也就是单个碱基的突变,而其他编码基因的结构及其相应的调控结构是正常的,因此只要将突变的单个碱基成分予以更正就能达到基因治疗的目的,而不必将整个基因进行置换。这种疗治颇具吸引力,但目前在技术上似乎还无法做到,国内外尚无体内试验成功的报道。这是因为在人基因组的某个特异部位上进行重组是一个非常复杂的过程,是十分困难的。但基因修正可以使单基因遗传病得到永久的治愈,是进行基因治疗最为理想的途径。

3. 基因修饰 就是将有功能的目的基因导入原发病灶的细胞,或导入其他类型的相关细胞,目的基因的表达产物能补偿致病基因的功能,但致病基因本身未得到改变。在 β 珠蛋白生成障碍性贫血(β 珠蛋白生成障碍性贫血)基因的治疗研究中,就是采用基因修饰策略,最为常用的是由 MoLV 改建的逆转录病毒载体——包装细胞系来进行 β 珠蛋白基因的转移。目前已能高效地将 β 珠蛋白基因导入骨髓造血干细胞或红细胞中,使其表达和分泌正常的 β 珠蛋白链,替代 β 珠蛋白生成障碍性贫血丧失功能的致病 β 珠蛋白基因。但要想取得珠蛋白生成障碍性贫血基因治疗的良好效果,导入的正常 β 珠蛋白基因的表达必须达到一定的水平。这也是 β 珠蛋白生成障碍性贫血基因治疗中的一个关键问题。针对 β 珠蛋白生成障碍性贫血中 β 珠蛋白表达水平过低,现已采取将 β 珠蛋白基因簇中的位点控制区(locus control region, LCR)片段与 β 珠蛋白基因一起重组入逆转录病毒载体中,导入靶细胞内,以提高 β 珠蛋白基因转录以后的表达水平。与基因置换和基因修正策略相比,

基因修饰较易实现,因此是目前基因治疗中广泛应用的方法。但由于目的基因不是原位导入的,所以其表达水平和调控均难以取得理想的结果。

4. 基因抑制 导入外源基因以抑制原有的基因,其目的在于阻断有害基因的表达。例如野生型 p53 基因是人类肿瘤中基因改变频率最高的一种基因。几乎所有主要组织中均可发生 p53 突变,上皮、间质、血液、淋巴的肿瘤以及中枢神经系统的肿瘤均发现有 p53 基因突变。大约 1/2 的结肠癌、直肠癌、肺癌、乳腺癌、肝癌、食道癌以及网状内皮组织肿瘤存在着突变的 p53 基因及其表达产物。近年来的研究证明,野生型 p53 具有肿瘤抑制作用,是一种肿瘤抑制基因。由于 p53 基因失活与人类肿瘤发生有密切关系,人们设想将野生型 p53 基因导入肿瘤细胞中,发挥其肿瘤抑制作用,为肿瘤治疗提供一条新途径。研究者们相继利用巨细胞病毒或逆转录病毒载体,将野生型 p53 基因导入肝癌、肺癌、骨癌、乳腺癌以及神经上皮瘤等肿瘤细胞,发现野生型 p53 基因的表达可以对这些肿瘤细胞的形态变化、生长速度、DNA 合成、细胞克隆的形成等起抑制作用。国外现已开展了利用 p53 对非小细胞性肺癌进行基因治疗的临床治疗工作。

5. 基因封闭 反义 RNA 是利用碱基互补原理,通过载体的介导性封闭或阻断有害基因的表达,从而达到肿瘤治疗的目的,因此反义 RNA 被誉为“基因封闭”,它能封闭 mRNA,抑制有害基因的表达。从分子生物学的中心法则可知,遗传信息是从 DNA 传递到 mRNA,再由 mRNA 传递到蛋白质的。从根本上来说,一个细胞乃是该细胞中所有蛋白质活动的总和。如果某个细胞具有某种蛋白质的活性过高或过低,则该细胞将得“病”。许多疾病就是由于一种或多种蛋白质的活性过高或过低所致。反义 RNA 可特异地与靶基因或靶基因产物相互补,其特异性源自反义序列和它的靶序列之间的碱基配对。反义 RNA 通过严格的碱基互补与靶 RNA 配对结合使之失活,从而调节或封闭某个基因的表达,图 1-2

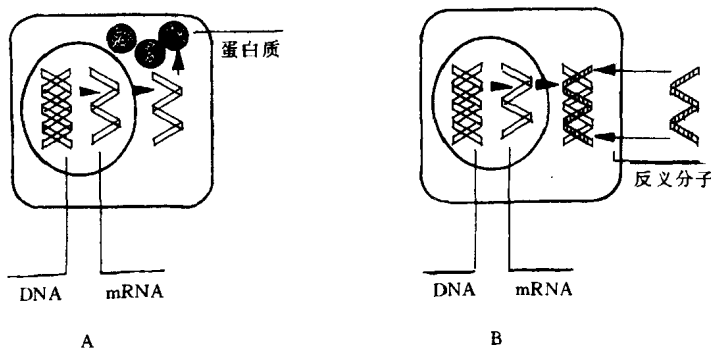


图 1-2 反义技术的原理

在某一特异基因部位中当 DNA 双螺旋的两条链相互分离后,随即就生成 mRNA。在正常情况下,生成的 mRNA 就从细胞核内移出,并组织好蛋白质的装配过程(A)。然而,当反义分子介入时,它和 mRNA 结合成双螺旋,从而阻断了引起疾病的蛋白质的产生(B)

细胞生存所必需的其他原癌基因的表达,从而达到治疗肿瘤的目的。目前,人们在肿瘤细胞系封闭相关癌基因或蛋白分子基因的工作中已取得了不少成功的经验,其中包括胶质细胞瘤(CD44 粘附分子),成胶质细胞瘤(IGF-1R, PDGF-A,B 链, bFGF),慢性髓细胞性白血病(bcl-2, GM-CSF), Burkitt 淋巴瘤(Lyn), Friend 白血病(spi-1), EBV 相关肿瘤(EBNA-1), 恶性畸胎瘤(IGF-1), 黑色素瘤(MYB), 乳腺癌细胞株(erb-B₂), 人卵巢癌细胞

总结了反义核酸是如何进行抑制特异基因的表达的。

用反义 DNA 或 RNA 来抑制与其互补的特异基因或 mRNA,乃是一种阻断某种蛋白质合成而阻断其活性的绝对精确的方法。由于人们对天然存在的反义 RNA 功能认识的不断深入,一种新的治疗观念应运而生,即用特定的反义 RNA 分子专门封闭那些引起细胞恶性转化的活性基因,而不影响细

株(IGF-1R),纤维肉瘤(TGF- β 1)和Caski细胞癌(HPV₁₆E₇)等。在裸鼠和SCID鼠,预注射或给反义寡核苷酸(分别针对NF-Kappa B p65和bcr/abl)治疗,均可减少靶基因mRNA表达,使成瘤过程阻断或肿瘤消退,荷瘤生存期延长一倍以上。这些结果表明,利用反义技术可以封闭有害基因的表达,从而使肿瘤细胞的形态、结构及恶性表型发生逆转,或增殖速率降低。目前反义核酸在抗肿瘤、抗病毒、调节免疫功能以及基因功能、细胞凋亡、神经系统和I~II期临床试验研究中取得了重大进展。

Ribozyme也是一种反义RNA,并且是具有催化活性的RNA。由于ribozyme可以序列特异性地水解RNA,原则上它的靶RNA可以是自然界存在的任何一种RNA,因此,其应用仅受限于对RNA的结构及RNA在生命过程中的作用的了解。随着对ribozyme结构及作用机制的进一步认识,人们现已可按照需要合成任何人为设计的ribozyme。这些ribozyme作用于不同的RNA序列,用于控制基因表达,阻止病毒感染,有可能发展成为一种很有前途的治疗制剂。近一二年来,ribozyme的理论和应用研究进入了一个平稳的发展阶段。在抗艾滋病(AIDS)的应用中,由于引起AIDS的HIV病毒是一种RNA病毒,因此是ribozyme应用的理想靶子,近几年来ribozyme的应用研究也主要集中在这一领域。除了研究ribozyme在抗AIDS治疗中的应用外,也有不少的实验室在研究ribozyme在其他方面如在肿瘤治疗中的应用。已知癌基因的致病机制之一是单个碱基的突变,在许多白血病中都发现有基因重排。如果形成原先不存在的ribozyme的切割位点,则可给ribozyme的应用创造机会。尽管这几年ribozyme在体内的应用研究还没有重大的突破,但其进展毕竟是令人兴奋的,大大丰富了人们对ribozyme的认识,表明ribozyme具有广阔的应用前景。

以上是基因治疗常用的基本策略。除此之外,还有其他新的策略,但总的说来不外是基因转移(gene transfer)和基因修饰(gene modification)。

三、基因转移的途径和方法

实施基因转移的途径有两类,一类是*in vivo*(在体),即活体直接转移,将带有遗传物质的病毒、脂质体或裸露DNA直接注射到试验个体内;另一类是*ex vivo*(离体),称为回体转移,是将试验对象的细胞取出,在体外培养并导入重组基因,而后再将这些遗传修饰的细胞重新输回试验个体体内。*ex vivo*的方法比较经典、安全,而且效果较易控制,但是步骤多,技术复杂、难度大,不容易推广;*in vivo*方法操作简便,容易推广,这类方法目前虽未成熟,存在疗效短、免疫排斥及安全性等问题,但它是基因转移研究的方向,只有*in vivo*基因转移方法成熟了,基因治疗才能真正走向临床。

基因治疗的成功较大程度上取决于是否能研制成功一套安全、简便的基因转移系统。目前,基因治疗中采用的基因转移方法有多种,按其性质可分为物理法、化学法、融合法以及逆转录病毒载体为代表的病毒载体生物学法等四大类。

(一) 基因转移的物理方法

包括裸露DNA直接注射、电脉冲介导法、显微注射微粒子轰击法等。此外使用金属微粒做载体采用物理方法进行基因转移。如Agracetus公司开发了一种粒子加速装置,它可以使携带外源DNA的金颗粒打入身体的一定部位以产生治疗作用。

(二) 基因转移的化学方法

包括DNA磷酸钙共沉淀法、DEAE-葡聚糖法、染色体介导法、聚阳离子-DM50转染

技术、脂质体包埋、多聚季铵盐等化学试剂转移方法。以上方法中,目前基因治疗研究中应用较多的有脂质体介导的基因转移。

(1) 脂质体通过与细胞膜发生融合的方式,将外源基因转移入靶细胞。脂质体介导的基因转移的最大优势在于能在活体内应用。当用注射法时,将磷脂、胆固醇或其他脂类的乙醚溶液加入到 DNA 溶液中,高温蒸发得到单层或双层带 DNA 的脂质体小泡;或反相蒸发将 DNA 溶液加入脂类混合物中,通过减压或超声处理得到脂质体小泡。DNA 被包裹在脂质体膜内部,可以与细胞膜融合,被细胞内吞而实施基因转移。这类方法基因转移效率较高,100% 离体细胞可以瞬时表达外源基因。脂质体的种类较多,大多为阳离子脂质体。目前,脂质体已经商品化,其中以 Lipofection 试剂较为常用。由于这种方法较适用于活体基因转移,所以可以静脉注射将脂质体运送到肝脏中,也可以直接注射到皮肤或肌肉内。1992 年美国 FDA 批准 G.Naboli 等将 HLA-BT 基因用脂质体包埋,基因转移治疗晚期黑色素瘤患者,患者部分肿瘤消退或缩小,临床试验取得了一定的成功。

(2) 受体介导转移基因的方法也是一种非常有前途的方法。国外已研究出一种可以与肝细胞上特定受体相结合的 DNA-蛋白质复合物,注射入患者体内后,这种配体-基因复合物可通过受体介导进入肝细胞内,并且此基因不需整合入宿主基因组即可表达。

(三) 基因转移的生物学方法

主要指病毒介导的基因转移,包括逆转录病毒(RV)、腺病毒(AV)、腺病毒相关病毒(AAV)、单纯疱疹病毒(HSV)、禽类病毒(PoV)、牛多瘤病毒(BPV)、痘苗病毒(VV)、细小病毒(PaV)等。现分述如下:

1. 逆转录病毒介导的基因转移 逆转录病毒属于 RNA 病毒,含两条 RNA,病毒进入细胞后其基因组即反转录为双链 DNA。该 DNA 将与宿主基因稳定整合,为其他 RNA 基因组的合成起模板作用。逆转录病毒中研究最多的是 Moloney 小鼠白血病病毒(Mo-MLV),该病毒能够产生高效感染分裂细胞。

逆转录病毒作为基因转移的载体有感染效率高和外源基因整合到细胞基因组中等优点,因而成为基因治疗研究中最有用的基因转移载体。尽管某些逆转录病毒几乎可以 100% 地感染靶细胞,但逆转录病毒载体在基因治疗方面的广泛应用尚存在一系列未解决的问题:①仅少数情况下所使用逆转录病毒的细胞受体是明确的,所以逆转录病毒的靶细胞谱在基因治疗前难以确定;②只有当靶细胞正在进行分裂时,病毒感染其 DNA 才能与靶细胞基因组重组。非复制性细胞,如神经元细胞很难用逆转录病毒介导基因转移;③与其他病毒颗粒比较,逆转录病毒颗粒不稳定,这使其难以在体内应用。

2. 腺病毒(adenovirus,AV)介导的基因转移 生物学特点与逆转录病毒有许多不同:①腺病毒对非复制细胞也能有效感染;②腺病毒功能稳定,因此可适合于许多情况的应用;③腺病毒基因组与宿主细胞染色体 DNA 的整合不恒定,与病毒生长周期无关;④与逆转录病毒相反,腺病毒感染导致靶细胞溶解。由于②、③原因,使用腺病毒只能获得暂时性基因表达。

3. 腺病毒相关病毒介导的基因转移 腺病毒相关病毒(adenovirus associated virus,AAV)载体最大和令人感兴趣的特点是 AAV 中一种叫 B19 的病毒,能够 70% 特异性地整合到宿主 19 号染色体上,较稳定地存在。另外,AAV 对人类无致病危害,无毒性,病毒颗粒比较稳定,而且较容易感染造血细胞。遗憾的是 rep 蛋白对细胞有毒性作用,目前尚