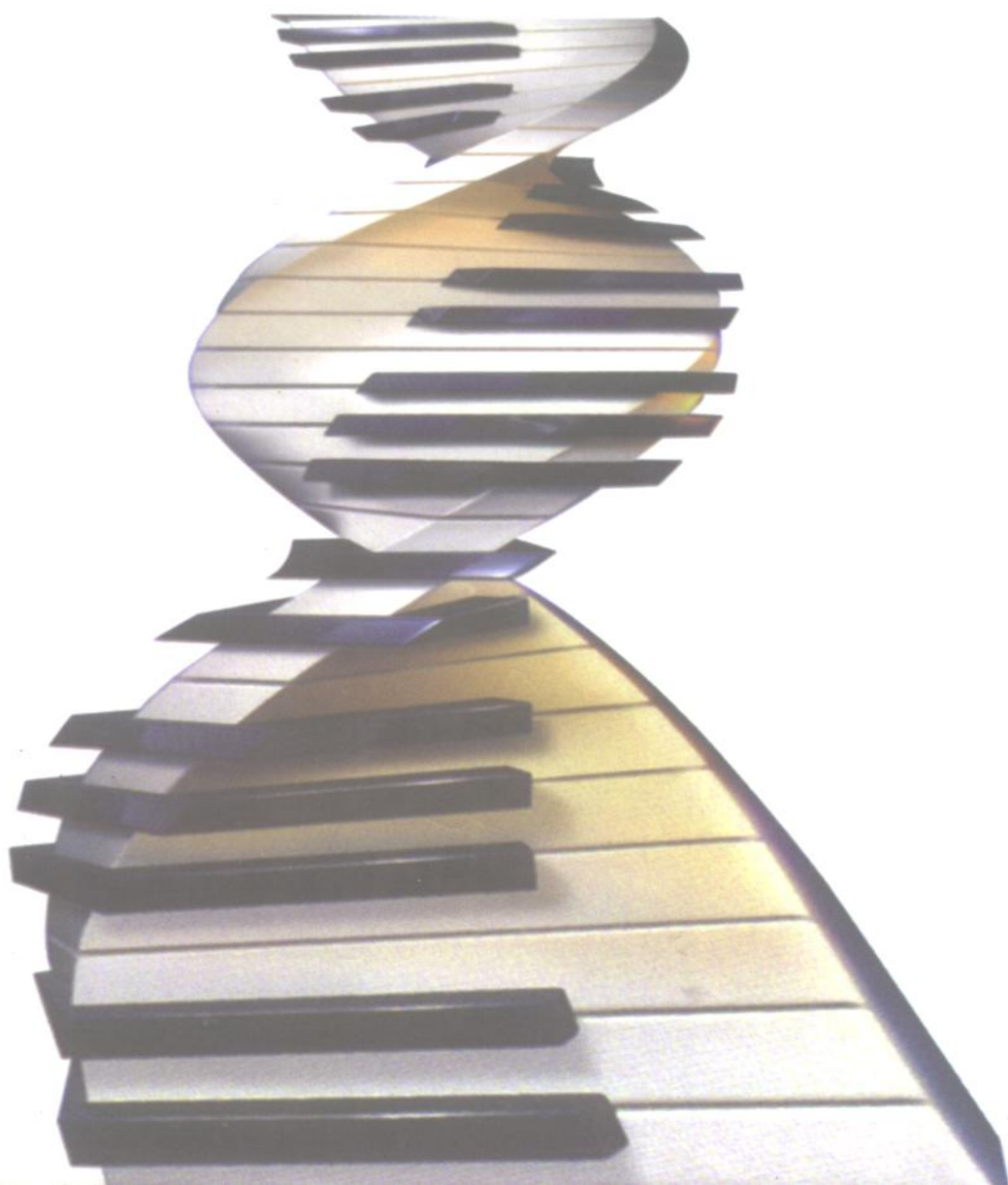


基因治疗的原理和实践

主编 杜宝恒



基因治疗的原理和实践

主编 杜宝恒

天津科学技术出版社

内 容 提 要

本书由旅居美国、加拿大、澳大利亚三国二十五位华人教授、博士根据个人特长分篇撰写。

全书共分二十章。第一章为概述。第二章至第九章为基础部分,介绍基因治疗的分子生物学基础、DNA 重组技术、遗传性疾病的分子生物学诊断、基因突变的检测、基因转移的方法。第十章至第二十章为临床部分,介绍心血管疾病、肿瘤、血友病、神经系统疾病等的基因治疗。书末附录介绍 1989~1996 世界各国主要的基因治疗研究课题、人类主要疾病的基因突变位点。

图书在版编目(CIP)数据

基因治疗的原理和实践/杜宝恒主著-天津:天津科学技术出版社,2000.1
ISBN 7-5308-2639-5

I.基… II.杜… III.基因治疗-理论 IV.R394
中国版本图书馆 CIP 数据核字 (1999) 第 39928 号

责任编辑:郝俊利

责任印制:张军利

天津科学技术出版社出版

出版人:王树泽

天津市张自忠路 189 号 邮编 300020 电话(022)27306314

天津新华印刷二厂印刷

新华书店天津发行所发行

*

开本 787×1092 1/16 印张 16.75 字数 371 000

2000 年 1 月第 1 版

2000 年 1 月第 1 次印刷

印数:1-2 000

定价:35.00 元

序 一

基因治疗是 90 年代发展起来的高新技术，它不仅使基因异常引起的疾病能够得到有效的治疗，同时也为非基因异常疾病的治疗开辟了一条新的途径。

由我校 20 余位工作在海外学者合作撰写的《基因治疗的原理和实践》一书，即将出版发行，我感到非常高兴。该书总结了他们在基因治疗方面的研究成果，介绍了国外最新研究动态，对于国内同道来说，无疑是十分有益的。作者们大多工作在美国、加拿大和澳大利亚等国的著名大学和研究机构，这些宝贵资料在一定程度上代表着基因治疗研究的前沿水平。

目前基因治疗已经在治疗遗传性疾病，心血管病，肿瘤，免疫和代谢性疾病中取得了突出的进展。我们预想，在今后 10 年中，经过不断改善基因治疗的设计和应用方法，建立更多人类疾病的动物模型，提高基因转移的成功率，有效地调节基因表达，减少近期和远期的副作用，基因治疗必在人类疾病的治疗学中起到越来越重要的作用。

天津医科大学校友们在海外的学习和工作中，时刻都在思念祖国和关心母校。我真诚希望他们继续努力钻研，在科研领域做出更大的成绩。同时，也希望他们为国内读者写出更多更好的专著，为促进我国医学科学的发展贡献力量。

中国工程院院士

吴咸中

1998 年 5 月写于天津医科大学

序 二

基因治疗是当前医学研究的前沿领域，它在治疗遗传性疾病、心血管疾病、肿瘤和代谢病等方面有广阔的应用前景。

我校在海外的校友们怀着热爱祖国、思念母校的心情，集他们的所学所能，吸取世界范围的研究成果，结合自己在基因治疗中的丰富经验，由杜宝恒教授任主编，由来自三个国家（美国、加拿大、澳大利亚），十三个城市的 25 位专家学者，共同编写了这本著作。

本书首先概述了基因治疗的基本理论和方法，然后分别叙述了基因治疗在各个医学领域的进展，部分章节还具体介绍了基础研究和临床应用的操作步骤。既有理论，又有实践，对广大的基础和临床医学工作者，均有较大的参考价值。

目前基因治疗的进展迅速，尤其在治疗肿瘤和心血管疾病的研究中取得了可喜的成果。当然，基因治疗与分子生物学、遗传学、免疫学、肿瘤学、微生物学，以及社会伦理学的发展密切相关。我相信，在今后 10 年中，随着基因和载体、转移方法和途径、基因表达和调控等方面的进一步提高，基因治疗必将成为预防和治疗人类疾病的重要手段。

海外留学人员是我国的巨大人才宝库，我们期望，今后有更多的国内学者和海外留学生的医学著作问世，为丰富和发展我国的医学科学，为人类健康事业造福而努力。

天津医科大学校长

郝希山

1998 年 6 月 15 日

前 言

随着医学分子生物学的迅速发展，基因治疗的研究更加深入，很多课题已进入临床，为医学发展开辟了一条新的途径，特别是在发病机制、治疗学、药理学和预防医学等方面更为突出。天津医科大学的很多校友工作在世界各地著名的高等学府和研究机构，他们勤于努力，成绩显著。近二年来，他们本着怀念母校，为国贡献的心情，集体编写了本书。

本书共分十九章，第一章为概论，第二至第九章为基础部分，第十至第十九章为临床部分。基础部分首先由明尼苏达大学医学院的赵忠和米沛博士介绍了基因治疗的分子生物学基础，特别是基因与遗传病的关系。加拿大不列颠哥伦比亚大学陈晓漪博士对基因重组做了全面描述。斯坦福大学的杨乃波博士和崔虹集中阐述了基因转移的方法学，特别是应用病毒做为基因载体的原理、方法和临床应用。德克萨斯大学顾泽宗和崔建昆博士根据自己阳离子脂质体的多年研究成果，以及有关非病毒类基因转移在神经系统应用的最新进展对其做了全面叙述。澳大利亚的高津博士概括了动物实验在基因治疗研究中的应用价值。霍普金斯大学的杜涛介绍了目前正在开展的人基因组计划，与基因治疗密切相关。

临床部分，康乃尔大学医学院的朱柏馨博士概述了基因治疗在十三个学科的进展。肯塔基大学耿兆波博士介绍了溶酶体贮积病的基因治疗。康乃尔医学中心心脏外科的杜晖详细介绍了基因治疗在周围血管、冠状动脉和心肌等领域的研究现状和应用前景，以及最近开始临床应用的成纤维细胞生长因子和血管内皮生长因子促进缺血心肌血管生成作用的研究。血液学方面由研究血液病多年的王天佑博士撰写了基因治疗在血友病中的应用。消化系统方面由杜宝恒博士介绍了具有一定实用价值的结肠癌肝转移瘤基因治疗。在神经系统方面，马里兰大学江泓博士和美国国家卫生研究院江浩博士介绍了基因治疗在神经系统疾病中的应用和发展前景。威斯康星大学医学院林雯博士重点介绍了基因治疗在肌营养不良疾病的应用，对基础和临床工作者很有参考价值。在肿瘤方面，

堪萨斯大学医学院傅凯博士和堪萨斯肿瘤研究所的侯晓英和邢超博士集体编写了肿瘤的基因治疗，介绍了基因治疗在化疗、免疫调节和肿瘤抑制基因等方面的应用。最后由杜宝恒博士介绍了抗肿瘤血管生成基因治疗的研究进展。

本书还特别邀请康乃尔大学医学院的曹维国博士编写了基因突变的检测和进展一章，对基因突变的诊断有重要参考价值。康乃尔大学血管生物学中心的韩际宏教授和刘菁博士编写了动脉粥样硬化的基因治疗，介绍了他们多年的研究成果和最新研究进展。内科的宋文濡博士和西奈山医学院人类遗传学室的李雷博士编写了肿瘤疫苗一章，这篇文章的研究报道了已经发表在著名的临床研究杂志，编者还为此文发了按语。另外，还邀请费城汉尼曼大学医院刘力民博士和康乃尔大学医学院付晨钟博士对本书的部分章节进行审校，在此一并感谢！

由于有 25 位作者参加编写，分布在三个国家，十余个城市，靠电子邮件互相联系，书中可能会有中文译名不妥，写作格式各异等不足，热诚希望国内同行指正。同时，文中附有作者通讯地址，望多加强联系。

编 者

1998 年 6 月于纽约

编 著 者
CONTRIBUTORS
(姓氏笔画为序)

王天佑

美国，佛罗里达，巴替斯特医院，临床实验室

Wang Tianyou. M. D.

Clinical Lab. Baptist Hospital. FL, U.S.A.

米 沛

美国，明尼苏达大学，微生物和免疫系

Mi Pei. M.D. Ph.D.

Dept. of Microbiology and Immunology

University of Minnesota Medical School, MN, U.S.A.

朱柏馨

美国，康乃尔大学医学院，国际医学系

Zhu Baixin. M.D.

Dept. of International of Medicine

Cornell Medical College, NY, U.S.A.

江 泓

美国，马里兰大学，神经学系

Jiang Hong. M.D.

Dept. of Neurology

University of Maryland, MD, U.S.A.

江 浩

美国，国家卫生研究院

Jiang Hao. M.D. Ph.D.

National Institute of Health. U.S.A.

刘 菁

美国，康乃尔大学医学院

Liu Qing. Ph.D.

Cornell Medical College, NY, U.S.A.

邢 超

美国，堪萨斯大学医学中心，堪萨斯癌症研究所

Xing Chao. M.D. Ph.D.

Kansas of Cancer Institute

University of Kansas Medical Center, KS, U.S.A.

杜宝恒

美国，康乃尔大学医学院，内科学系

Du Baoheng. M.D.

Dept. of Medicine, C-648

Cornell Medical College, NY, U.S.A.

杜 涛

美国，霍普金斯大学，生物学系

Du Tao. B.S.

Dept. of Biology

Johns Hopkins University, MD, U.S.A.

杜 晖

美国，康乃尔大学医学院皇后医院，心脏外科

Du Hui. M.S.

Dept. of Cardiac Surgery

Cornell Medical Center in Queens. U.S.A.

宋文濡

美国，康乃尔大学医学院，内科学系

Song Wenru. M.D. Ph.D.

Dept. of Medicine

Cornell Medical College, NY, U.S.A.

李 雷

美国，西奈山大学医学院，人类遗传学研究所

Li Lei. M.D. Ph.D.

Dept. of Human Genetic

Mount Sinai Medical College, NY, U.S.A.

林 雯

美国，威斯康星大学，医学系

Lin Wen. M.D. Ph.D.

Dept. of Medicine

University of Wisconsin. U.S.A.

杨乃波

美国，斯坦福大学，哈瓦德·休斯医学研究所，分子和细胞生理学系

Yang Naibo. M.D. Ph.D.

Dept. of Molecular & Cellular Physiology

Howard Hughes Medical Institute

Stanford University, CA, U.S.A.

侯晓英

美国，堪萨斯大学医学中心，堪萨斯癌症研究所

Hou Xiaoying. M.D. Ph.D.

Kansas of Cancer Institute

University of Kansas Medical Center, KS, U.S.A.

耿兆波

美国，肯塔基大学，骨与矿物质代谢系

Geng Zhaobo. M.D.

Dept. of Medicine, Division of Nephrology

University of Kentucky. U.S.A.

韩际宏

美国，康乃尔大学医学中心，血管生物学中心

Han Jihong. Ph.D.

Center of Vascular Biology

Cornell University Medical Center. U.S.A.

崔建昆

美国，贝勒大学医学院，神经外科学系

Cui Jiankun. M.D. Ph.D.

Dept. of Neurosurgery

Baylor College of Medicine, U.S.A.

崔 虹

美国，斯坦福大学，哈瓦德·休斯医学研究所

Cui Hong. M.S.
Howard Hughes Medical Institute
Stanford University, CA, U.S.A.

陈晓漪

加拿大，大不列颠哥伦比亚大学，微生物和免疫学系
Chen Xiaoyi M.D.
Department of Microbiology and Immunology
British Columbia University, Canada

高 津

澳大利亚，皇后岛牙科学院
Gao Jin. Ph.D.
Queensland Dental School, Australia

曹维国

美国，康乃尔大学医学院，微生物学系
Cao Weiguo. Ph.D.
Dept. of Microbiology
Cornell Medical College, NY, U.S.A.

傅 凯

美国，堪萨斯大学医学院，生物化学和分子生物学系
Fu Kai. M.D. Ph.D.
Dept. of Biochemistry and Molecular Biology
University of Kansas Medical Center, KS, U.S.A.

赵 忠

美国，明尼苏达大学，内科学系
Zhao Zhong M.D. Ph.D.
Dept. of Medicine
University of Minnesota Medical School, MN, U.S.A.

顾泽宗

美国，德克萨斯大学，盖威斯顿医学院，解剖和神经科学系
Gu Zezong. M.D. Ph.D.
Dept. of Anatomy and Neuroscience
The University of Texas Medical Branch at Galveston
Marine Biomedical Institute, TX, U.S.A.

目 录

第一章 基因治疗概论	杜宝恒 (2)
第二章 基因治疗的分子和细胞生物学基础	赵 忠 米 沛 (12)
第一节 基因表达的调控	(12)
第二节 基因与遗传性疾病	(14)
第三章 DNA 重组技术	陈晓漪 (18)
第四章 遗传性疾病的分子生物学诊断	(32)
第一节 遗传性疾病早期诊断的策略和方法	赵 忠 米 沛 (32)
第二节 PCR 技术在诊断杜兴-别克肌肉萎缩症中的应用	赵 忠 米 沛 (35)
第三节 地中海贫血症的分子生物学诊断	赵 忠 米 沛 (36)
第四节 核糖核酸酶保护分析法	崔建昆 (37)
第五节 单链构象多态性分析	杜宝恒 (41)
第六节 从福尔马林固定组织和精液中提取 DNA	杜宝恒 (44)
第五章 基因突变的检测方法与发展	曹维国 (48)
第六章 基因转移的方法	杨乃波 崔 虹 (69)
第一节 逆转录病毒载体	(69)
第二节 腺病毒载体	(74)
第三节 腺病毒相关病毒载体	(77)
第四节 脂粒	(80)
第五节 基因转移的直接方法	(83)
第七章 非病毒类基因转移技术在神经系统病变基因治疗以及生物机理研究方面的应用	顾泽宗 (90)
第一节 基因转移	(90)
第二节 阳离子脂质	(92)
第三节 阳离子多聚体	(96)
第四节 阳离子脂质转染实验步骤	(97)
第八章 人的基因组计划	杜 涛 (103)
第九章 动物模型在基因治疗研究中的应用	高 津 (108)
第十章 非肿瘤疾病基因治疗的概要	朱柏馨 (118)
第十一章 心血管疾病的基因治疗	杜 晖 (127)
第一节 周围血管系统的基因治疗	(128)
第二节 冠状动脉血管系统的基因治疗	(130)
第三节 心肌的基因治疗	(132)

第四节	动脉粥样硬化血管壁的转化生长因子 β 第二受体的突变	(133)
第五节	动脉血管壁阳离子脂质体介导基因转移	(136)
第六节	基因治疗对促进心血管生成作用的实验研究和临床应用	(139)
第十二章	结直肠癌肝转移瘤的基因治疗	杜宝恒 (145)
第一节	结直肠肿瘤的临床分子生物学	(145)
第二节	结直肠癌肝转移瘤的基因治疗	(148)
第十三章	血友病甲和乙的基因治疗	王天佑 (156)
第十四章	溶酶体贮积症的基因治疗	耿兆波 (163)
第十五章	神经系统基因治疗的进展	江 泓 江 浩 (173)
第十六章	肌营养不良的基因治疗	林 雯 (182)
第十七章	肿瘤的基因治疗	傅 凯 邢 超 侯晓英 (193)
第一节	基因与肿瘤	(193)
第二节	基因转移与抗肿瘤化疗	(196)
第三节	免疫调节与肿瘤的基因治疗	(199)
第四节	肿瘤抑制基因 p53 治疗肿瘤作用的检测方法	(201)
第五节	细胞因子基因修饰后的肿瘤细胞在肿瘤免疫治疗中作用的检测方法	(205)
第十八章	肿瘤疫苗	宋文濡 李 雷 杜宝恒 (209)
第十九章	动脉粥样硬化及 LDL 受体缺陷症的基因治疗	韩际宏 刘 菁 (219)
第二十章	抗肿瘤血管生成基因治疗的研究进展	杜宝恒 (229)
附录一	1989—1996 年世界各国主要的基因治疗研究课题	(237)
附录二	主要疾病的基因突变位点	(246)

CONTENTS

Preface

Contributors

Foreword

1. The Scope of Gene Therapy	Du Baoheng (2)
2. Background Molecular and Cellular Biology of Gene Therapy ...	Zhao Zhong,Mi Pei (12)
2.1 Regulation of Gene Expression	(12)
2.2 Gene and Genetic Diseases	(14)
3. Recombinant DNA	Chen Xiaoyi (18)
4. Molecular Biological Diagnosis of Genetic Disorders	(32)
4.1 Strategies and methods for early diagnosis of genetic disorders	Zhao Zhong,Mi Pei (32)
4.2 Diagnosis of Duchenne' Muscular Dystrophy by PCR	(35)
4.3 The Molecular Diagnosis of Mediterranean Anemia	(36)
4.4 RNase Protection Assay	Cui Jiankun (37)
4.5 Single-Strand Conformation Polymorphism	Du Baoheng (41)
4.6 Extraction of DNA from Sperm and Formalin Fixed Tissues	(44)
5. Current Methods of Gene Mutation Detection	Cao Weiguo (48)
6. Methods for Gene Transfer	Yang Naibo,Cui Hong (69)
6.1 Retrovirus Vectors	(69)
6.2 Adenovirus Vectors	(74)
6.3 Adeno-Associated Virus Vectors	(77)
6.4 Liposomes	(80)
6.5 Direct Techniques	(83)
7. Applications of Non-viral Gene Transfection for Nervous System Disorders and Biological Mechanism Study	Gu Zezong (90)
7.1 Gene Transfer	(90)
7.2 Cationic Lipids	(92)
7.3 Cationic Polymers	(96)
7.4 Cationic Lipid-mediated Transfection Protocol	(97)
8. Human Genome Project	Du Tao (103)
9. Role of Animal Models in Gene Therapy	Gao Jin (108)

10. Applications of Gene Therapy to non-Neoplastic Disorders	Zhu Baixin (118)
11. Gene Therapy for Cardiovascular Disease	Du Hui (127)
11.1 Gene Therapy for The Peripheral Vasculature	(128)
11.2 Gene Therapy for The Coronary Vasculature	(130)
11.3 Gene Therapy for The Myocardium	(132)
11.4 TGF β Type II Receptor Gene Mutation in Atherosclerotic Vascular Cells	(133)
11.5 Methods for Liposome-Mediated Gene Transfer to The Arterial Wall	(136)
11.6 Efficacy of Myocardial Angiogenic Gene Therapy and Clinical Trial	(139)
12. Gene Therapy for Liver Metastasis of Colorectal Carcinoma	Du Baoheng (145)
12.1 Molecular Biology of Colorectal Neoplasia	(145)
12.2 Protocols of Gene Therapy for Liver Metastasis of Colorectal Carcinoma	(148)
13. Gene Therapy for Haemophilia A and B	Wang Tianyou (156)
14. Gene Therapy for Lysosomal Storage Disorders	Geng Zhaobo (163)
15. Recent Developments in Gene Therapy for Neurological Disorders 	Jiang Hong, Jiang Hao (173)
16. Gene Therapy for The Muscular Dystrophies	Lin Wen (182)
17. Application of Gene Therapy to Cancer	Fu Kai, Xing Chao, Hou Xiaoying (193)
17.1 Gene and Tumors	(193)
17.2 Gene Transfer for Tumor Chemotherapy	(196)
17.3 Gene Therapy to Enhance The Immunogenicity of Tumor	(199)
17.4 Detection of The Expression of Tumor Suppressor Gene-p53 During Gene Therapy with p53	(201)
17.5 Methods for The Use of Cytokine Gene-Modified Tumor Cells in Immunotherapy of Cancer	(205)
18. Tumor Vaccine	Song Wenru, Li lei, Du Baoheng (209)
19. Atherosclerosis and Gene Therapy for The LDL Receptor Deficiency 	Han Jihong, Liu Qing (219)
20. Gene therapy strategies for Tumor Antiangiogenesis	Du Baoheng (229)

Appendix:

Appendix A. 1989-1996 Human Gene Therapy Clinical Research Project	(237)
Appendix B. Alphabetical Index of Health Disorders and Chromosome Location	(246)

第一章 基因治疗概论

一、基因治疗的定义	(2)
二、基因疾病的诊断方法	(4)
(一) 临床诊断	(4)
(二) 生化检查	(4)
(三) 分子生物学检查	(4)
三、基因转移	(4)
(一) 显微注射法	(4)
(二) 电涵法	(5)
(三) 磷酸钙法	(5)
(四) 融合法	(5)
(五) 生物媒介法	(5)
四、靶细胞的选择	(5)
(一) 骨髓细胞	(6)
(二) 肝细胞	(6)
(三) 成纤维细胞	(6)
五、第一例基因治疗——腺苷脱氨酶缺乏症	(6)
六、肿瘤的基因治疗	(7)
七、克隆羊的启示	(7)
八、目前存在的问题	(8)
(一) 安全性	(8)
(二) 稳定性	(8)
(三) 免疫性	(8)
(四) 伦理问题	(8)
九、展望	(8)

第一章 基因治疗概论

杜宝恒

随着近代医学的发展,分子生物学的研究和应用已经逐渐进入临床医学领域。基因治疗是 90 年代出现的一种新的治疗技术,为现代治疗学开辟了一条新途径。

基因的发现已有几十年的历史。它是一个遗传单位,具有独特的生物学特性,可以发生突变,引起疾病。基因是一条双链脱氧核糖核酸,它是编码一个多肽所必需的脱氧核糖核酸,是一个功能单位,在染色体上有固定的位置。

基因的定位,结构和功能是很多科学家长期工作的重点。1971 年有 15 种基因被确认,1990 年已达三千多种,目前已有四千余种。最近美国霍普金斯大学 McKusick 教授概括了人类较常见的基因性疾病,主要有 1 号染色体的高雪氏病,2 号染色体的家族性结肠癌,3 号染色体的色素性视网膜炎,4 号染色体的慢性遗传性舞蹈病,5 号染色体的家族性肠息肉病,6 号染色体的血色病和脊髓小脑共济失调,7 号染色体的囊性纤维化,8 号染色体的多发性外生骨疣,9 号染色体的恶性黑色素病,10 号染色体的多发性内分泌瘤 II 型,11 号染色体的镰状细胞性贫血,12 号染色体的苯丙酮尿症,13 号染色体的成视网膜细胞瘤,14 号染色体的老年痴呆症,15 号染色体的家族性黑蒙性白痴,16 号染色体的多囊肾,17 号染色体的乳腺癌,18 号染色体的淀粉样变,19 号染色体的家族性高胆固醇血症和强直性肌萎缩,20 号染色体的腺苷脱氨酶缺乏症,21 号染色体的肌萎缩性侧索硬化和唐氏综

合征,22 号染色体的神经纤维瘤,X 和 Y 染色体的血友病和假肥大性肌萎缩。

过去对基因突变引起的疾病,一直缺乏特异性的治疗方法。自 1990 年对一位腺苷脱氨酶缺乏 (Adenosine deaminase deficiency) 引起严重免疫功能低下的患者,应用基因治疗获得成功以后,又有 3 种疾病取得良好的结果:家族性高胆固醇血症 (familial hypercholesterolemia),囊性纤维化 (cystic fibrosis) 和高雪氏病 (Gaucher disease)。目前认为,基因治疗是治疗基因突变性疾病的一项根本性措施,同时它也为非基因突变性疾病提供了一个新的治疗手段。(详见表 1-1 和 1-2)

一、基因治疗的定义

基因治疗的定义比较广泛。从广义地说,基因治疗是应用基因或基因产物,治疗疾病的一种方法。从狭义地说,基因治疗是把外界的正常基因或治疗基因,通过载体转移到人体的靶细胞,进行基因修饰和表达,改善疾病的一种治疗手段。

在对病人施行基因治疗之前,必须完成下列几项工作。

1. 疾病的确认。
2. 基因检测和克隆。
3. 基因突变的鉴定。
4. 基因突变与疾病病理表现的关系。
5. 基因转移到靶细胞。

6. 检测基因在靶细胞中的表达,及其蛋白质功能的测定。