

基因治疗: 治疗遗传病的根本措施

Gene Therapy: A Radical Approach for Genetic Disease Treatment

张 晶 陈云弟

(上海市儿童医院 上海 200040)

基因治疗的原义是指将正常基因导入患者体内, 弥补突变基因的不足。随着研究的深入, 基因治疗的概念不断延伸, 方法不断翻新, 应用范围不断扩大。现在基因治疗的范围已经涵盖了传递遗传信息的主要分子: 既有基因导入, 也有基因修补; 既有 DNA 操纵, 也有 RNA 改造; 既有基因结构的修正, 也有基因功能的调整。虽然付诸临床实践还有一个较长过程, 但现有的成就使人们对它充满了信心。

早期基因治疗的努力主要是 DNA 操纵, 称为 DNA 治疗。近年来, 有人另辟蹊径, 在 RNA 上作文章, 如 RNA 修复 (RNA repair)^[1] 和剪接控制^[2] 等, 称为 RNA 治疗。RNA 修复代表了基因治疗研究的新方向。从 DNA 到 RNA, 扩展了基因治疗的内涵, 开拓了人们的思路。

虽然基因治疗至今已有近 10 年历史, 但尚难以实现基因输入后的稳定性及正确调控。RNA 治疗虽不像 DNA 治疗那样直接了当, 但它较好地解决了这个问题, 在现在技术水平上也更为可行, 有希望成为基因治疗的突破口。

一、基因治疗的着眼点

从异常的遗传信息到形成患者的症状要经过许多环节。遗传信息传递的主要路线是: DNA → [转录] → RNA 前体 → [剪接] → RNA → [翻译] → 蛋白质, 即所谓中心法则 (图 1), 基因突变使所有这些环节都受到影响。因此, 对其中任何一个环节进行干预, 都可以治疗遗传病。通常, 蛋白质水平上的干预不属于基因治疗范畴, 基因治疗只包括 DNA 及 RNA 水平上的干预。DNA 治疗系修复基因的结构, RNA 治疗系修复基因的功能。目前已有的技术有 DNA 修复、外源 DNA 输入、剪接修复和 RNA 修复等。对于转录和翻译的控制手段尚待研究。

二、DNA 治疗

1. 基因输入

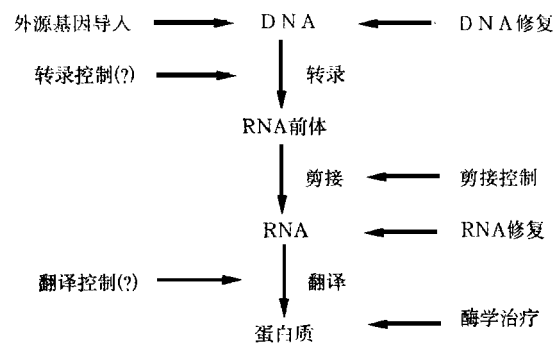


图 1 遗传病治疗的着眼点

重组逆转录病毒、YAC、BAC 等载体都可以用来向突变细胞中导入正常基因, 外来基因在突变细胞中整合后, 成为其遗传物质的一部分。如果条件适当, 外来基因能发挥作用, 即可部分弥补突变基因的功能。将这种改造好的细胞移植给病人, 可以改善甚至消除临床症状。可用的细胞有造血干细胞和成纤维细胞等。问题主要是: 功能好的载体往往不稳定, 基因输入难以大规模进行; 载体可能有副作用 (基因毒性); 外来基因的不恰当表达可能扰乱体内的代谢平衡; 外来基因的整合位点无法控制, 万一破坏了其他基因, 后果不堪设想。

2. 基因修复

病毒载体用来向突变细胞中导入正常基因, 同源重组则用来原位修复基因缺陷。在正常基因的两边加上特殊的元件, 这两个元件在基因组中的位置是已知的。由于同样的 DNA 片段可以互相交换 (称为同源重组), 这两个元件的交换就可以把正常基因插入到基因组的特定位置。定向插入比毫无目的基因导入前进了一大步, 可以对基因缺陷作精确修复。如果修复的是受精卵等生殖细胞, 有可能一劳永逸地解决问题。但是同源重组效率低至 10^{-7} , 几乎没有临床价值。生殖细胞的改造则将改变个体的生命历程, 影响重大, 因此国际上禁止此类实验。

病毒转移和同源重组技术的一个共同障碍是干细胞的体外培养技术至今仍未过关, 即难以在体外

使干细胞大规模增殖而不分化, 因此 DNA 治疗步履维艰, 进展甚微。

三、RNA 治疗

1. RNA 修复

RNA 修复可以间接地恢复突变基因的功能, 使用的主要工具是核酶。核酶是有催化能力的天然 RNA 分子, 能催化 RNA 剪接。通常, 同一分子内不同部分之间的剪接称为顺式剪接, 不同分子间的剪接称为反式剪接。反式剪接可以把正常基因片段剪接到异常 RNA 上去, 换下突变的部分, 从而修复基因缺陷或引入新的基因功能。1994 年, 苏伦格(Sullenger) 等对大肠杆菌的一个突变基因进行了修复^[3], 最近又对镰形细胞贫血的突变 RNA 作了修复^[1], 显示了其诱人的发展前景。

镰形细胞贫血是由于 β -珠蛋白基因中第 6 密码子 A $\rightarrow$ T 突变引起的。苏伦格等构建了一个能够识别这种 RNA(β^S -RNA) 突变位点上游序列的核酶, 并将正常 γ -珠蛋白基因片段连接上去。将这种带有 γ -片段的核酶导入培养的病人造血干细胞, 检测到大部分 β^S -RNA 被剪接成 β^S - γ 融合分子(图 2)。胎儿型血红蛋白(HbF, $\alpha_2\gamma_2$) 与成人型(HbA, $\alpha_2\beta_2$) 功能相近, 也就是说 γ -珠蛋白能代偿 β^S -珠蛋白所丧失的功能, 起到治疗镰形细胞贫血的作用。这一构想与用羟基脲、丁酸等药物使已经关闭的成人 γ -基因重新表达的努力可谓异曲同工。虽然修复不是 100%, 但只要 γ 表达占 β^S -珠蛋白的 10~20%, 就可以显著改善病人的临床症状。

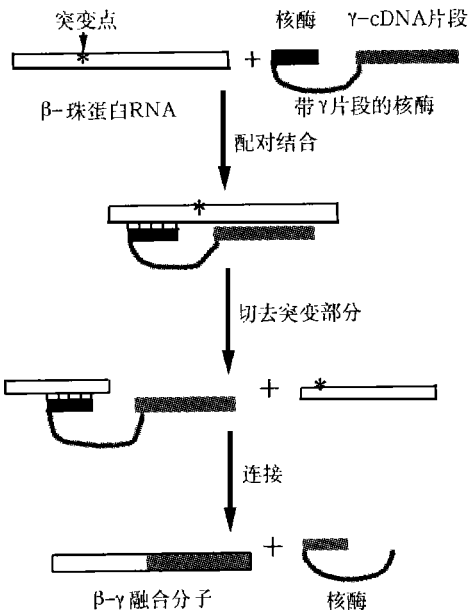


图 2 镰形细胞贫血突变的 β -珠蛋白 RNA 修复

2. 剪接纠正

剪接涉及到 5' 剪接点、3' 剪接点、分支点和剪接体等元件和因子。许多基因突变在 RNA 上生成异常剪接点, 与左邻右舍原来不起作用的隐匿的剪接点搭配起来, 形成错误剪接, 从而使 RNA 失活。这类突变不破坏正常剪接点, 只抑制其作用。用反义核酸将异常剪接点或相关剪接元件封闭住, 或者对剪接体成分作适当改造, 都可以堵住异常剪接, 引导体内剪接系统走上正轨, 纠正剪接错误。

β -地中海贫血(β -地贫) 是由于 β -珠蛋白基因突变、红细胞内 β 链减少、成人型血红蛋白($\alpha_2\beta_2$) 不足或缺乏引起的。在已知的 130 多种“ β -地贫”突变中, 很大一部分是剪接缺陷型, 如我国常见的内含子 2 第 654 位 C $\rightarrow$ T(β^{64}) 突变即在 653 位形成了一个新的剪接点, 同时又激活了其上游 579 位一个隐匿的剪接点, 导致一小段内含子 2 序列被插入到外显子 2 和 3 之间, 引起“地贫”表型。用反义核酸封闭 653 或 579 位点, 能够迫使人体剪接系统选择正常的剪接途径, 减少异常 mRNA 的形成(图 3)。这一设想已由科尔(Kole)等在细胞模型上证实^[2]。

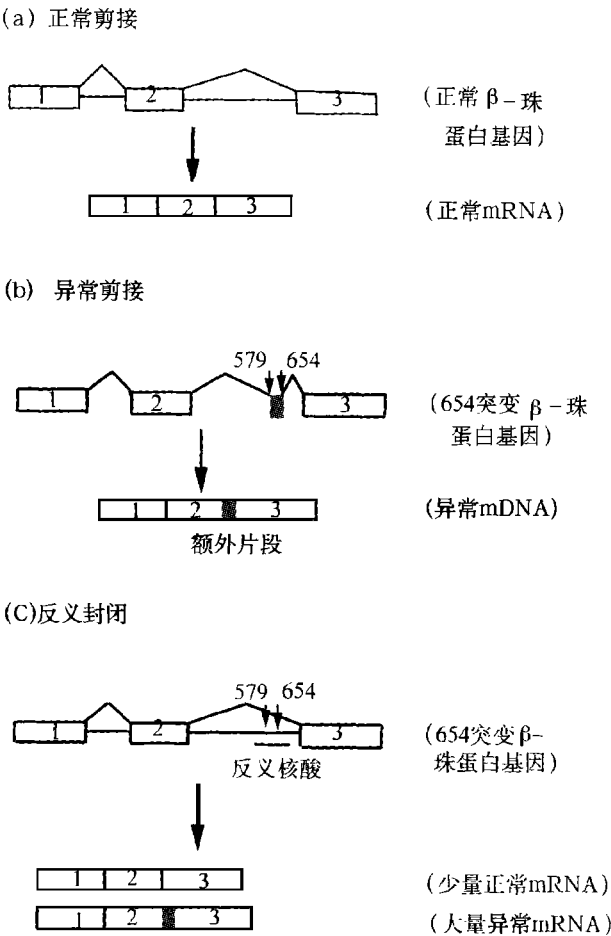


图 3 反义核酸对 β -珠蛋白 RNA 剪接错误的纠正作用

虽然反义封闭并没有对基因突变作任何修补,但是所产生的成熟 mRNA 可以指导合成正常蛋白质。这种对 RNA 表达或者说功能的修复构思巧妙,简便易行。

snRNA 是细胞核中的一类小分子量 RNA, 其中一部分参与 RNA 加工, 对剪接起关键作用, 如 U1 snRNA 识别 5' 剪接点, U2 snRNA 识别分支点。对特定 snRNA 的识别位点作改造, 可以有目的地调节剪接方式, 修复剪接缺陷。 β^{705} 是另一种剪接缺陷型“ β -地贫”突变, 致病机理与 β^{654} 类似。最近戈尔曼 (Gorman) 等^[4]设计了一系列载体, 表达携带有针对 β^{705} 异常剪接位点的修饰的 U7snRNA。在 β^{705} 细胞模型中, 经过改造的 U7snRNA 使 65% 的 RNA 剪接恢复了正常。

在遗传病突变中将近 15% 导致剪接缺陷, 如囊性纤维化和 ADA 缺损症等。许多抑癌基因的失活也是由于突变引起剪接错误, 所以剪接纠正的策略应用广泛。

3. 剪接抑制

基因突变往往扰乱了体内蛋白质的表达平衡而引起疾病。珠蛋白、载脂蛋白、干扰素、组织凝集素、组蛋白、肌动蛋白等多基因家族的成员之间都有一定的比例, 其平衡一旦被打破即导致疾病。反义封闭剪接技术也可以用来调整蛋白质肽链平衡, 下面以血红蛋白 H 病为例来说明。

正常人每个细胞有 4 个 α 基因, 2 个 β 基因, α 和 β 链缔合成四聚体 $\alpha_2\beta_2$ 。血红蛋白 H 病患者的 4 个 α 基因中只有 1 个正常, 红细胞中 α 链合成不足, β 链相对过剩。多余的 β 链聚合为四聚体 β_4 , 即血红蛋白 H。血红蛋白 H 不稳定, 容易解体成游离的 β 链, 它在红细胞内沉淀附着于细胞膜上, 使膜失去柔韧性, 易被脾脏破坏, 导致慢性溶血性贫血。用反义核酸封闭正常 β -珠蛋白 mRNA 前体的剪接位点, 使加工成熟的 β mRNA 减少, 降低 β 链合成, 与 α 链在低水平上达到平衡(图 4), 即可改善临床症状。这一策略虽与上述思路反其道而行之, 但功效一致。

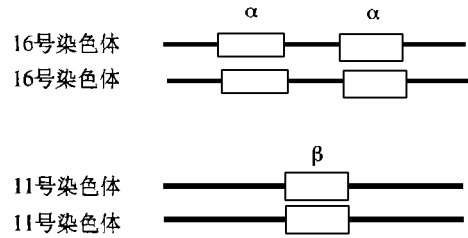
四、发展方向

遗传病是典型的不治之症, 人们战胜遗传病的愿望也非常迫切。基因治疗的提出曾令人们大喜过望, 但头脑过热并没有带来研究的突飞猛进, 许多人又因此大失所望。经历了这种大起大落之后, 应该说, 现在基因治疗已进入了一个比较理性的阶段。

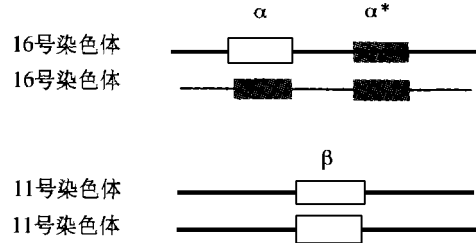
当 DNA 治疗由于基因导入效率低, 在体内难以正确调控以及基因毒性等问题而停滞不前的时候, RNA 修复技术的异军突起, 其着眼点的选择更为机

巧, 令人耳目一新。虽然 RNA 治疗给遗传病带来了

(a) 正常人(4个 α , 2个 β 正常)



(b) 血红蛋白H病患者, 3个 α 异常(1个 α , 2个 β 正常)



(c) 反义封闭1个 β 基因(1个 α , 1个 β 正常)

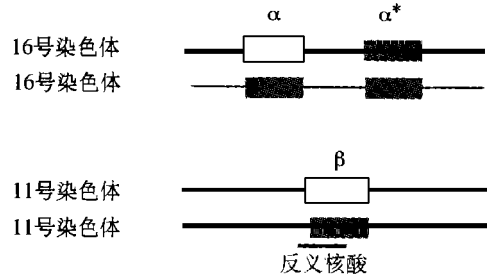


图 4 血红蛋白 H 病的珠蛋白肽链平衡调节

福音, 但它并没有改变基因缺陷, 病根未除, 子代仍需反复修补, 因此需要进一步深入研究。

剪接控制的成功启发我们, 研究转录和翻译控制有可能发明有效的基因治疗技术, 但总的发展方向仍然是修复 DNA 本身, 这是治疗遗传病的根本方法。DNA 修复研究开始较早, 但难度很大, 深入研究天然的 DNA 修复机制, 有可能从中得到启发。

参考文献

- [1] Lan N, et al. Science, 1998, 280: 1593
- [2] Sierakowska H, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 12840
- [3] Sullenger BA, Cech TR. Nature, 1994, 371: 619
- [4] Gorman L, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 4929

(责任编辑 肖庆山)