

人类基因治疗

Human Gene Therapy

王钦南

(国家自然科学基金委员会生命科学部, 北京 100083)

一、概 况

经近十年来的研究和积累,建立了多种基因转移技术。1989年5月美国卫生研究院(NIH)和食品与药物管理局(FDA)批准进行的首例新霉素抗性基因/肿瘤浸润淋巴细胞(NEO/TIL)的临床基因标记试验结果表明,外源基因能转移到患者体内,以此为转机,揭开了基因治疗的序幕。于是,1990年批准对由ADA缺乏引发的重症联合免疫缺陷(SCID)进行基因治疗。经治疗,患儿血液中ADA水平逐渐升高,10个月后为正常值的25%,显示出基因治疗的明显效果。

由于基因治疗的特异性和高效率以及转移系统的广泛应用,将基因治疗推向临床试验阶段。尽管外源基因的表达水平和持久性等方面尚待进行研究,但是基因治疗的尝试证明了设计思想的有效性和技术路线的可行性。所以现阶段要求进行基因治疗的病例迅速增加,接受治疗的病种不断扩大,包括多种遗传病、恶性肿瘤及其它疑难病症。

在生物医学发展激流中,中国学者针对人类基因治疗的意义、前景、策略和伦理学等问题进行了讨论和研究。为此,国家高科技计划列入了,国家自然科学基金也加强了资助有关肿瘤基因治疗的课题。1992年10月在北京召开了第一次基因治疗国际会议,展示了国内外的主要进展。同时,在上海举行了遗传病分子生物学国际会议,并进行了基因治疗的专题讨论。经过数年努力,在我国成功地独创了以自体皮肤成纤维细胞为靶细胞的B型血友病基因治疗,获得了病情改善的预期效果。

今后的方向是要致力于建立效率高、疗效好、适合不同治疗目的,且经济有效、简便易行的基因转移方法和体系,如肌肉注射、静脉注射、器官内灌注、皮下包埋等。

二、依 据

人类基因治疗是将目的基因转移给靶细胞以调控患者由于某种基因的缺失或突变造成功能异常的病变而达到治疗疾病的目的。基因标记是基因治疗的前提,基因转移和受体细胞以及转移基因的表达则是基因治疗的基础。

1. 基因转移

借助于载体将目的基因转入患者细胞,有特异性(针对性)和非特异性之分。前者调节缺陷基因功能的异常,主要用于遗传病的治疗;后者纠正细胞的功能性异常,多用于对恶性肿瘤和免疫缺陷型的治疗。其方式,一是在体外(in vitro)用磷酸钙沉淀、显微注射、电击穿、病毒载体、脂质体等;二是在体内(in vivo)用反转录病毒(RV)、腺病毒(AD)、单纯疱疹病毒(HSV)、肌肉注射、吸入法、基因枪等;三是用离体法(ex vivo),由于许多体外转移不能直接用于体内,于是发展了体内外相结合的方法,用于临床试验,即将患者细胞(如成纤维细胞、骨髓、肝、外周血,以至肿瘤细胞)取出,扩增时转入目的基因,筛选和富集含有外源基因的细胞,回输给患者,由于培养技术完善,所有的人体细胞都能培养成活、增殖。

长期以来,一直用反转录病毒作载体,但其载运量小,只能携入分裂细胞,安全问题尚未完全解决,使基因治疗受到局限。近年来,对腺病毒(感染呼吸道的DNA病毒)的研究有新进展,由于它载运量大,不插入受体基因组,在染色体外长期存在,所以安全性有保障,并因有广泛的应用前景,而备受关注。

2. 受体细胞与转移基因的表达

受体细胞可以是体细胞,也可以是性细胞。体细胞基因治疗是将目的基因导入患者,使其在受体细胞的染色体上进行同源重组。自然同源重组率很低,筛选繁杂,在基因治疗中转移的目的基因都是

随机整合。由于性细胞转移基因的效率低,且涉及伦理学问题,目前难于基因治疗。

选择受体细胞,应考虑:第一,易得离体细胞,周期长,有增殖优势;第二,易受外源基因转化;第三,经转化的细胞扩增后输回体内能成活。例如,反转录病毒载体对分裂旺盛的细胞转移率高,适合于

造血细胞、成纤维细胞,部分切除肝脏诱导再生肝细胞也可提高基因转移率。腺病毒载体对肝、肺组织亲合力较高,单纯疱疹病毒载体对神经细胞亲合力高。转移基因在受体细胞内能否表达取决于自身在受体细胞内的整合状态。

表 1 部分基因治疗简况

方 案	疾 病	单 位	开始时间
基因标志			
(基因/靶细胞)			
Neo/TIL	黑色素瘤	美 NIH	1989.5
Neo/骨髓	儿童 AML	美 孟菲斯儿童医院	1991.9
Neo/骨髓	成神经细胞瘤	美 孟菲斯儿童医院	1992.1
Neo/TIL	黑色素瘤	美 匹兹堡大学	1992.3
Neo/TIL	黑色素瘤	法 里昂	1991.12
Neo/骨髓	慢性粒细胞白血病	美 M.D. 安德森癌研究中心	1992.7
Neo/肝细胞	肝功能衰竭	美 贝勒大学	不详
Neo/骨髓	成人 AML 和 ALL	美 印第安纳大学	1992.5
Neo/TIL	黑色素瘤和肾癌	美 UCLA	1993.2
TK/脑内注射	脑瘤	美 NIH	1992.12
基因治疗			
(基因/靶细胞)			
ADA/T 淋巴细胞	SCID	美 NIH	1990.9
TNF/TIL	黑色素瘤	美 NIH	1991.1
TNF/瘤细胞	晚期癌	美 NIH	1991.10
IL2/瘤细胞	晚期癌	美 NIH	1992.3
第 X 因子/自体皮	血友病 B	中 复旦大学	1991.12
肤成纤维细胞		上海长海医院	
LDL 受体/肝细胞	家族性高胆固醇血症	美 密执安大学	1992.6
Tk/卵巢癌细胞	卵巢癌	美 罗切斯特大学	1993.2
HLA-B7/黑色素瘤	黑色素瘤	美 密执安大学	1992.6
Tk/细胞毒 T 细胞	爱滋病并发症	美 华盛顿大学	1993.2
IL2/骨髓	神经母细胞瘤	美 孟菲斯儿童医院	1992.12
IL2/异体肿瘤细胞	黑色素瘤	美 孟菲斯儿童医院	1992.12
TK/脑内注射	脑瘤	美 NIH	1992.12
IL2/异体肿瘤细胞	黑色素瘤	美 纪念斯隆·凯特林 癌研究中心	1993.3
IL2/自体骨髓细胞	黑色素瘤	荷 莱顿大学	1992.2
ADA/淋巴骨髓细胞	SCID	意 米兰	1992.3
ADA/骨髓	SCID	荷 IARI	1993.3

注:Neo,新霉素抗性基因;TIL,肿瘤浸润淋巴细胞;ADA,腺苷脱氨酶;TNF,肿瘤坏死因子;IL2,白细胞介素 2;LDL,低密度脂蛋白;Tk,单纯疱疹胸苷激酶基因;SCID,重症联合型免疫缺陷症;AML,急性单核细胞白血病;ALL,急性淋巴细胞白血病。

3. 基因标记

标记实验在于获得基因治疗的信息,它应回答:第一,外源基因能否安全地转移给患者? 第二,患者的细胞内有无转移基因的存在? 第一例接受基因标记实验的是恶性黑色素瘤。从肿瘤组织中分离 TIL,由反转录病毒载体向 TIL 转移 NEO 基因,然后

输回给患者,结果在患者细胞内检出被转移基因,证实外源基因能转移给患者;亦用 NEO 基因标记自体骨髓移植治疗白血病,还标记治疗急性肝功能衰竭的肝细胞供体;用 hph-tk 基因标记治疗爱滋病的免疫缺陷病毒(HIV)抗原特异的 T 细胞等。

三、审批程序

人类基因治疗是全新的医学领域,采用多种方法,治疗多种疾病,治疗结果难以预料,因此其临床应用需专门机构审批。美国开展基因治疗最早,作法是先将基因治疗方案呈送 NIH 重组 DNA 咨询委员会(RAC),审查后送交食品药品监督管理局(FDA),经上述两个机构审查通过的方案才能用于临床。

RAC 负责审查治疗方案对患者与公众的安全性,审查内容包括:预测疗效与潜在危险,考虑临床治疗程序的质量,治疗的最终目的与具体检测指标,对副作用与潜在危险的检测指标,随访措施,治疗始末指征,所治疾病是否致命及替代疗法等。FDA 审查内容部分与 RAC 重复,主要考虑治疗程序的特点,对用于基因转移的生物制品质量的鉴定与控制。

我国已成立审查基因治疗的专门机构,挂靠在

卫生部药政司,对基因治疗采取严谨、稳妥、科学的审查,以指导基因治疗的健康发展。

四、基因治疗

目前基因治疗已用于多种疾病。截止到 1994 年初,美国批准实施的基因标记和基因治疗方案已达 124 项,治疗者超过 100 例。此外,中国、荷兰、意大利、法国等也进行了基因治疗的尝试(见表 1)。

1. 遗传病基因治疗

β -地中海贫血是最早实施基因治疗的遗传病,患病组织骨髓可以移植,由于珠蛋白基因表达非常复杂,其调控原理正在系统研究之中。

对 ADA 缺陷、嘌呤核苷磷酸化酶(PNP)缺陷与次黄嘌呤-鸟苷酸核糖转移酶(HGPRT)缺陷等遗传病的治疗是校正 DNA 代谢异常与细胞突变,使其功能恢复。现将可能进行基因治疗的遗传病和基因病列于表 2。

表 2 可能进行基因治疗的遗传病和基因病

缺陷基因	疾 病
苯丙氨酸羧化酶	苯丙酮尿症
腺苷脱氨酶	重症联合免疫缺陷(SCID)
α 1-抗胰蛋白酶	肺气肿(emphysema)
精氨酸琥珀酸合成酶	瓜氨酸血症(citrullinemia)
CD-18	白细胞粘附缺陷(leukocyte adhesion deficiency)
纤维囊肿跨膜调节物	囊性纤维变性(cystic fibrosis)
凝血因子Ⅳ	血友病 B(hemophilia B)
凝血因子Ⅷ	血友病 A(hemophilia A)
α -L-岩藻糖苷酶	岩藻糖苷症(Fucosidosis)
葡萄糖脑苷脂酶	葡萄糖苷酸沉积症(高歇氏病 Gaucher's)
β 葡萄糖苷酸酶	粘多糖增多症Ⅶ型(mucopolysaccharidosis type Ⅶ)
β -珠蛋白	地中海贫血(thalassemia)
β -珠蛋白	镰细胞贫血(sickle cell anemia)
α -L-艾杜糖苷酶	粘多糖增多症Ⅰ型(mucopolysaccharidosis type Ⅰ)
LDL 受体	家族性高胆固醇血症(family hypercholesterolemia)
鸟氨酸氨甲酰转移酶	高氨血症(hyperammonemia)
嘌呤核苷酸磷酸化酶	重症联合免疫缺陷(SCID)
神经鞘磷脂酶	鞘磷脂沉积症(Niemann-Pick 氏病)
营养因子	肌肉萎缩症
低密度脂蛋白受体	高脂血症

2. 肿瘤基因治疗

肿瘤基因治疗的新方法层出不穷,大致分为:

- (1) 将细胞因子(IL-2、IL-4、TNF、GM-CSF、r-INF)基因插入肿瘤细胞,包括 TIL,以激活 T 细胞对肿瘤的免疫应答,破坏肿瘤的特异性。
- (2) 将携带白细胞抗原(HLA)基因注入 HLA 阴性的肿瘤组织以诱导对外源 HLA 产生免疫应答。
- (3) 将自杀基因,如疱疹病毒胸苷激酶基因

(TK)插入肿瘤启动肿瘤细胞自杀。

- (4) 应用抗癌基因或肿瘤抑制基因向 P53 基因缺陷的非小细胞肺癌插入正常的 P53 基因,以及对携带 K-ras 基因的非小细胞肺癌插入反意的 K-ras 基因。
 - (5) 用多药物抗性(MDR)基因导入骨髓细胞保护其耐受大剂量化疗。
- 肿瘤发生是基因表达调控失常以及与其周围

组织相互作用关系的紊乱所致。一个正常细胞变成恶性细胞都涉及抗癌基因的丢失或失活,原癌基因被激活成癌基因等步骤。从理论上推测,原癌基因和抗癌基因相对应,在特定条件下它们对细胞分裂起正负调控作用,因此通过抗癌基因调变基因表达,使肿瘤细胞逆转而恢复正常的增殖分化,是治疗肿瘤最理想的途径。

3. 爱滋病的基因治疗

对爱滋病的治疗迄今仍非常棘手,必须采取联合治疗手段,可归纳为三个方面。

(1)强化免疫应答 提高患者或感染者对 HIV 表达抗原的免疫应答。感染者肌注携带 gp120 基因的质粒 DNA,或用阳离子脂质体处理的质粒 DNA;也可将纯化了的 gp160、gp120 蛋白直接注射给感染者。或将抗原(gp160、gp120)基因在体外转化的自体细胞(如成纤维细胞),输回给患者。从同源细胞毒淋巴细胞(CTL)中选出特异 CTL 克隆,并导入自杀基因细胞,例如导入毒素基因(白喉毒素基因等),筛选和扩增后输给患者。一旦输入的 CTL 产生副作用,可用 ganciclovir 杀死 CTL,该方案于 1993 年已用于临床。

(2)细胞外作用 降低爱滋病患者的感染强度。用反转录病毒载体将编码 CD4-IgG 杂合蛋白基因转入外周血淋巴细胞(PBL),使 PBL 不断分泌 SCD4-IgG,阻止 HIV 粒子与 CD4 受体结合。也有给患者口服干扰素制品,等等。

(3)细胞内作用 杀死 HIV 感染细胞或抑制 HIV 在细胞内增殖。为了干扰 HIV 的复制,将 TAR (Tat 反应序列)片段转化 HIV 感染细胞并高效表达,使 Tat(转录刺激子)抑制,不能再刺激 HIV RNA 转录。同样,感染细胞高效表达 RRE(Rev 反应序列)片段,也能使 Rev(病毒粒子表达调控子)的活性降低,阻断或抑制 HIV RNA 的转录。

1993 年 9 月 RAC 批准使用构建核小体拮抗 HIV 5' 端起始序列,由于核小体体积小,特异性高,具有广阔的临床应用前景。

最近提出,在具有 HIV 基因组活性的细胞中导入表达抗 HIV 外壳蛋白(Env)的单抗基因,导致 HIV Env 失活,从而不能产生感染性病毒粒子。如果体内的 PBL 也有同样结果,将值得庆幸。

五、展望与对策

基因转移技术飞速发展,给临床基因治疗奠定

了基础。英国学者威廉森(B. Williamson)指出:“现在能在一个新的高度——分子水平治疗疾病,这将从医学的各个方面改革医学”。比如,前不久作了用支气管镜方法将正常人的囊性纤维变性跨膜传导调节因子(CFTR)基因直接导入缓慢分裂的肺上皮细胞,用腺病毒做载体将目的基因转移到肺上皮细胞的尝试。又如,已知血管内皮细胞能接受转基因,有可能借助分泌抗凝血因子的工程细胞治疗心血管疾病,而且直接注射 DNA 的技术也日臻完善。

尽管临床基因治疗初见成效,解除了一些患者的疾苦,然而一些潜在的问题,如安全性急待立法。外源基因的随机整合有致癌的可能,尚须通过构建定向整合的基因载体加以解决。

面对基因治疗发展的挑战,必须根据我国实际情况采取相应的对策。

我国有 12 亿人口,56 个民族,遭受 5 000 多种与遗传相关的疾病、癌症等疾病的威胁和困扰,其中遗传性疾病发病率高达 4~5%,发病人数相当可观。象地中海贫血、血友病的发病率更高。为此,首先应加强对基因治疗的基础研究。比如,通过跨越人种基因定位(trans racial gene mapping)的研究,捕捉某些在我国有代表性疾病的致病基因及其相关基因,确定其相应疾病的易感成分,阐明致病的机制。这样就能体现出我国多人口、多民族性的特点,使我们对基因定位的研究在国际上占据独特的地位。

我国有丰富的人群资源、特异病种和人才优势。可以借助这些有利因素开展国际合作,利用国外的精良装备和先进技术从事双方感兴趣的研究来实施我们的某些研究计划,实现我们的设想和目标。另一方面,应广泛交流信息,了解研究动态和发展趋势,促进我们的学科发展和人才培养。

我国经济实力不强,基础研究薄弱,不能象欧美发达国家那样大规模投资,而只能周密计划,针对有限目标采取有限的投资。所以,要充分利用国家重点实验室的条件,对在我国发病率高、危害性大的某些疾病,如白血病、地中海贫血等开展持久而稳定的研究。同时也要开阔基础研究的视野,跟踪国外一些具有战略意义的、希望大的基因治疗新策略,包括特异性基因治疗。依靠专家制定基因治疗的研究计划,增加投资强度,给以相应的经费保证,使制定的计划付诸实现。

(责任编辑 蔡德诚 肖庆山)