

肿瘤基因治疗的现状与前景

Present and Future of Gene Therapy for Cancer

杨四旬

(北京医科大学免疫教研室, 博士后)

谢蜀生

(北京医科大学免疫教研室, 教授)

提要 继肿瘤生物治疗和肿瘤发生分子机制取得重要进展之后, 肿瘤基因治疗开始进入基因治疗领域, 初步的临床试验结果已显示出肿瘤基因治疗在晚期肿瘤治疗中的优越性及其广阔的临床应用潜能。本文系统论述肿瘤基因治疗产生的背景、原理、各种导入外源基因方法和目的基因的优缺点及其应用前景, 以及由此而产生的社会伦理学问题。

长期以来, 肿瘤治疗的方法主要是手术、化疗和放疗。近几十年来, 这些治疗方法的进展使恶性肿瘤的治愈率有了明显提高, 但在治疗已转移的晚期肿瘤病人方面, 手术方法显得无能为力, 而放、化疗法仍无明显突破, 且放、化疗法对患者的一般状况损伤很大, 体质虚弱的晚期病人难以承受。因此, 寻找一种对患者损伤小, 而又能有效控制转移病灶的肿瘤治疗方法已成为临床肿瘤治疗的迫切需要。近十余年来, 随着分子生物学、免疫学和生物高技术的迅速发展, 肿瘤生物治疗开始兴起。肿瘤生物治疗利用机体的抑癌机制, 把具有抗癌作用的免疫分子(如抗肿瘤抗体、白细胞介素、干扰素、肿瘤坏死因子等)和免疫活性分子(如淋巴因子激活的杀伤细胞、肿瘤浸润淋巴细胞等)作为肿瘤治疗的新型药物应用于临床。由于这种方法组织损伤少, 对常规治疗方法无效的晚期肿瘤仍可达到有效的治疗, 因此具有放、化疗法不可替代的优越性。十余年来, 肿瘤生物治疗取得了迅速发展, 并成为继手术、放疗、化疗之后的第四种肿瘤治疗模式。近来, 肿瘤的生物治疗进入了基因治疗的新阶段, 初步的临床治疗研究取得了超乎预想的满意效果。最近美国全面放宽了肿瘤基因治疗的范围, 西欧各国也都纷纷进入这个领域。可以预料, 肿瘤的基因治疗必将迅

速兴起并取得快速的进展。本文拟对肿瘤基因治疗产生的背景、现状、存在问题和前景作一比较全面的介绍。

一、肿瘤基因治疗产生的背景

基因治疗的概念最先是根据对基因缺陷造成的遗传性疾病(如腺苷脱氨酶缺陷导致的严重联合型免疫缺陷病)的治疗而提出的。即通过对基因缺陷的患者体内导入正常相应的基因, 以纠正由于基因缺陷所致异常。而肿瘤在发生上不外乎基因的缺失、突变, 进而导致细胞的恶性增生, 从基因水平着手治疗肿瘤就有可能根治肿瘤, 肿瘤基因治疗的设想主要基于以下实验事实:

1. 分子生物学的进展促进了对肿瘤发生分子机制的认识, 为肿瘤基因治疗提供了理论基础。

(1) 癌基因的发现。自 1979 年从人膀胱癌细胞系(EJ 和 T24)中发现了与 Harvey 肉瘤病毒癌基因同源的 Ha-ras 癌基因能使 NIH3T3 细胞恶性转化并在体内成瘤后, 提出了肿瘤发生的癌基因说。此后的研究发现癌基因是由正常细胞的原癌基因活化而来。目前在人类各种肿瘤细胞中陆续发现的癌基因已达 50 多种。癌基因编码的蛋白质通过影响

转录、信号传递过程等而干扰细胞的生长、分化过程。

(2)抑癌基因,又称抗癌基因。抗癌基因的产物是以一种负调控方式影响细胞的生长与分化。一旦抑癌基因出现突变、缺失或其产物受到抑制、失活时,必然会直接或间接地促进肿瘤的形成与发展。目前已报道的抑癌基因大约有十几种,但确认功能且研究最多的是P53和Rb基因。目前认为肿瘤的发生是激活原癌基因与失活抑癌基因共同作用的结果,而後者的作用占主导,恶性肿瘤的形成至少需要4~5个基因的突变。

(3)癌基因的反义RNA,即与翻译成蛋白质的mRNA链主体的一条RNA链,通过与相应癌基因的mRNA结合影响其转录与翻译,进而抑制肿瘤生长。

(4)抗药基因,在肿瘤细胞中存在有多种药物抗性基因,其编码的蛋白质可对抗化学药物的作用,而使化疗无效。

2. 免疫学的发展,克隆鉴定了一大批具有直接或间接抗癌作用的细胞因子,如白细胞介素2(IL-2)、肿瘤坏死因子(TNF)、干扰素(IFN)等,促进了肿瘤免疫及过继免疫治疗的研究进程。肿瘤浸润淋巴细胞(简称TIL,一种定向定位于肿瘤部位的淋巴细胞,对肿瘤细胞有直接杀伤作用)的发现,为肿瘤细胞基因治疗提供了极好的基因运载系统。

3. 基因克隆与转染技术日臻成熟。自1977年克隆到第一个人体基因以来,分离人体基因技术日趋成熟,其中对癌基因、抗癌基因、细胞因子基因的研究发展十分迅速。这一方面促进了人们对癌本质的认识,另一方面也为基因治疗提供了可供选择的的目的基因。基因转染技术的日益完善为把目的基因导入运载细胞或体内靶细胞提供了方法学基础。

4. 分离、培养体细胞的技术不断完善。将外源基因导入体内有两种方法,一是直接导入体内的靶细胞,这在技术上目前还难以做到;另一种是先将外源基因导入用于移植的靶细胞(或称运载细胞),然后将带有外源基因的细胞输入体内,并使之到达预定部位,表达功能,这是目前基因治疗的主要方法。因此,用于移植的靶细胞必须能经受起体外操作、处理,另外还应是长寿的,至少能存活数月甚至数年。骨髓细胞、淋巴细胞、肝细胞、成纤维细胞、肌母细胞及各种瘤细胞等不同程度地符合这些要求,因此可考虑作为目的基因的合适的运载细胞。现有技术已能对这些细胞进行分离培养及其它体外操作。对肿瘤基因治疗来讲,带有外源基因的运载细胞必须在进入体内后能聚集到肿瘤部位。1990年美国的Rosenberg等证明从肿瘤组织中分离的淋巴细胞(即TIL细胞),再回输体内时,可重新定位于肿瘤部位,因此成为目的基因的理想运载细

胞。在这样的背景下,基因治疗开始进入肿瘤治疗领域,在短短的几年内,从实验动物研究迅速进入临床研究,成为肿瘤生物治疗的一种新方法。

二、肿瘤基因治疗的现状及前景

1. 肿瘤基因治疗的优越性

与传统肿瘤治疗方法及其它肿瘤生物治疗相比,基因治疗有以下优点:

(1)与化疗和放疗相比,对患者损伤小而且轻,对生殖细胞遗传物质没有影响,因此患者生命质量较高,也不会引起不育或对后代产生不良影响;

(2)对晚期肿瘤以及转移癌仍然有效;

(3)由于可使外源基因,如细胞因子、毒素基因等定位于肿瘤局部,因此可大大减轻其它生物疗法不可避免的全身毒副作用;

(4)由于肿瘤本质上属于体细胞基因突变,随着对肿瘤发生发展机制的进一步阐明,基因治疗比其它疗法更具有针对性,这就有可能在基因水平上控制肿瘤的发展,达到根治的目的。

与遗传性疾病的基因治疗相比,肿瘤基因治疗有以下特点:

(1)肿瘤细胞是基因治疗要消灭的细胞,不要求外源基因终生表达,因而较遗传病的基因治疗简便得多;

(2)遗传病的基因治疗要求外源基因精确调控,即外源基因的表达要有一定的时相性和一定的浓度范围,而肿瘤基因治疗一般不要求外源基因的精确表达;

(3)遗传病比较罕见,治疗起来费用相对较大,而肿瘤发病率高,危害性大,治疗的社会效益好。

2. 外源基因导入细胞的方法

向细胞内导入外源基因的方法较多,目前比较成熟的大体上可归为如下三类:化学法,物理法和病毒载体法。

化学法简单安全,但其转化率极低,通常为 $1/10^3 \sim 10^5$;物理法安全而有效,转化率可高达20%,然而由于一次只能注射一个细胞,这种乏味耗时耗力的方法对基因治疗来说显然是不足取的。由于病毒具有天然侵袭细胞并将其遗传物质整合入宿主细胞的能力,以病毒尤其是逆转录病毒为载体,将外源基因导入细胞是目前认为最有前途的方法。逆转录病毒载体的缺点是其潜在的致癌性。利用基因工程手段,切除其指导蛋白合成的基因,使之成复制缺陷型病毒,可大大提高其安全性,而不影响导入外源基因能力。

3. 肿瘤基因治疗可供选择的的目的基因

肿瘤基因治疗是在探索肿瘤发生的分子机制的同时发展起来的,近年来对细胞因子作用的研究

以及肿瘤生物过继疗法的发展也为肿瘤基因治疗开辟了新途径。归纳起来,用于肿瘤基因治疗的目的基因主要有:

(1) 药物敏感及抗性基因:将药物敏感基因导入肿瘤细胞以增加其对化疗药物的敏感性,提高化疗效果;或将药物抵抗基因导入正常细胞如骨髓细胞,以增加其化疗药的耐受性,减少毒副作用。

(2) 反义核苷酸:将癌基因的反义核苷酸(DNA或RNA)导入瘤细胞,干扰相应癌基因表达,阻止肿瘤生长。

(3) 抗癌基因:将野生型的抗癌基因导入瘤细胞,以替代突变的抗癌基因。

(4) 细胞因子基因:将细胞因子基因导入相应运载细胞,回输病人后通过释放细胞因子发挥抗癌效应。

上述第一种途径只是化疗的辅助手段,并无单独的治疗意义,严格讲不是基因治疗,临床应用前景亦不乐观。癌基因的反义核苷酸抑制癌基因表达的机制还不太清楚,就目前资料看,导入的反义核苷酸必须达到较高浓度才能有效阻止癌基因转录和表达,这在技术上目前还难以胜任。抗癌基因本质及其抗癌机制仍是目前基础研究的热点,其对瘤细胞的生长分化效应尚无定论,且抗癌基因一般较大,操作有一定困难。尤其重要的是,这两种方法均要求目的基因必须导入大多数瘤细胞,才能彻底消灭肿瘤,这在体内是不易做到的,况且细胞癌变后常伴有多种癌基因与抗癌基因的异常。尽管这两种方法前景乐观,但距临床应用还有较大距离。细胞因子基因治疗是目前认为最现实可靠的方法。细胞因子基因工程化的运载细胞在肿瘤局部维持高浓度的细胞因子既能提高抗癌效应,又能减少全身毒副作用。细胞因子基因的运载细胞至少有两种,其一为TIL细胞,它不但可作为目的基因的运载体定向到达肿瘤部位,本身又是效应细胞,可直接杀伤瘤细胞;其二是瘤细胞本身。动物实验表明,转染细胞因子基因的瘤细胞体内成瘤性明显降低,且可阻止相应未处理瘤细胞在体内生长。但细胞因子基因体内转染瘤细胞尚不可能,体外工程化的瘤细胞回输体内如何定位于肿瘤部位仍缺乏实验证据。另外,失活的工程化的瘤细胞可能会成为肿瘤的播散源。因此,瘤细胞作为运载细胞的临床应用仍存在许多问题。不过,体外细胞因子基因工程化的瘤细胞在体外灭活后,作为瘤苗回输体内,以激活抗肿瘤免疫应答,仍有一定的应用价值。

三、肿瘤基因治疗的伦理学问题

基因是决定生物体性状的遗传物质,对基因所进行的操作,无论是用以改变生物体的遗传性状

(包括细菌和其他细胞的基因工程),还是用于缺陷基因的修复或替代,都有可能引起难以预料的后果,因此对基因操作,科学家采取极为慎重的态度是可以理解的。

在基因治疗中,生殖细胞基因治疗是通过对有缺陷的生殖细胞进行基因操作,以纠正其后代的基因缺陷,从而达到永久性治愈疾病的目的。由于对生殖细胞基因的修饰以及导入外源基因将产生遗传性状的改变,由此所造成的任何差错及其它尚不能预料的问题也会世代相传,而影响生物进化,甚至会产生新的物种,在目前以及可预见的将来不会被人们所接受。体细胞基因治疗只影响受治疗的个体,但外源基因的随机插入宿主细胞DNA所引起的结果难以预测。同时作为目前有效转染载体的缺陷型反转录病毒也有可能体内重新“复活”,引起感染,同时具有潜在的致癌作用,尽管在灵长类动物及临床试验未见任何不良反应及致癌性,但其潜在的危险仍不能完全排除。所以尽管体细胞基因治疗对遗传物质的影响程度远不及目前已被人们广泛接受的肿瘤化疗与放疗,由此所产生的伦理学问题及对社会、家庭及个体的影响也不会超过器官移植、骨髓移植及试管婴儿,但其走过的道路是艰难的。

基因治疗直接用于人类始于1980年,当时美国加州大学洛杉矶分校的Cline教授首先应用化学方法将外源基因导入两名地中海贫血病人的骨髓细胞中,然后回输病人,进行人类基因治疗的尝试,结果病人并未因此而受益,也未遭损害,而Cline教授则因此受到美国国立卫生研究院(National Institutes of Health,NIH)的公开谴责及严厉处分。1982年在冷泉港召开的“人类基因治疗”专题研讨会上,不少学者仍对之持否定态度。但基因治疗的美好前景强烈地吸引着科学家们的探索欲望,在采取了更科学、更严密的研究实践和理论分析后,基因治疗的研究首先在实验动物中得到了更迅速的推动。研究有力地证明体细胞基因治疗是安全的,医学的需要及科学的发展把人类基因治疗提到了迫切需要解决的程度。

1985年6月,美国NIH正式制定了关于设计和提出申请进行人类体细胞基因治疗方案的详细规定,标志着美国政府已开始面对现实,有控制地开放这一研究领域。1988年6月20日,美国NIH肿瘤研究所(National Cancer Institute,NCI)的Rosenberg和Blaese与心肺血液研究所(National Heart, Lung and Blood Institute,NHLBI)的Anderson博士联合向NIH的科学研究审查委员会(Investigational Review Boards,IRB)提出基因治疗方案。他们设想将新霉素磷酸转移酶的基因(一种用于检测的标志性基因,可诱导产生抵抗新霉素

的能力)导入肿瘤浸润性淋巴细胞,其主要目的在于探讨肿瘤基因治疗的可行性。该方案经 IRB 批准后,又分别经生物安全委员会(Biosafety Committee)、重组 DNA 监察委员会(Recombinant DNA Advisory Committee,RAC)及美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration,FDA)仔细审查,在确信导入的外源基因及病毒载体动物实验安全可行,对 TIL 细胞无明显影响,对病人较少危害而对公众无害的情况下,首次获准对 10 例濒死的黑色素瘤病人(临床估计生存期不超过 90 天)进行人类体细胞基因治疗安全性试验研究。1989 年 5 月 22 日,他们将带有新霉素抗性基因的逆转录病毒载体转染 TIL 细胞,然后将这种工程化的 TIL 细胞回输病人。结果表明,回输的 TIL 细胞主要定位于肿瘤部位,在肿瘤局部定位可长达 64 天,在外周血中可检测到的 TIL 细胞生存期可达 189 天,外源基因表达持续 2 个月以上,且导入的外源基因对 TIL 细胞的表面标志、DNA 重排类型,对肿瘤细胞的杀伤功能,mRNA 表达情况等与未经基因修饰的 TIL 细胞无明显改变,安全性检测各项指标符合 FDA 规定要求,证实了以逆转录病毒为载体进行基因治疗对人体是安全可行的。一年以后(1990 年 9 月 14 日),该三人小组经官方批准对 ADA 缺陷性遗传病及恶性黑色素瘤进行基因治疗。他们首先成功地以淋巴细胞为运载细胞对一患腺苷脱氨酶(Adenosine deaminase,ADA)基因缺陷的严重联合型免疫缺陷病的女孩施行首次有治疗意义的基因治疗,淋巴细胞计数及免疫应答能力获得了意想不到的改善。1991 年 1 月 29 日,Rosenberg 及其同

事,首次将肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor,TNF)基因以逆转录病毒为载体导入 TIL 细胞,然后将这种 TNF 基因修饰的自体 TIL 细胞回输给两名恶性黑色素瘤病人,标志着肿瘤治疗正式步入基因治疗时代。目前他们已对晚期黑色素瘤病人进行了上述治疗,一次输入 10^{11} 个 TNF 基因修饰的自身 TIL 细胞,未见任何不良反应,显示了良好的耐受性。FDA 已准许他们对 50 例黑色素瘤病人进行基因治疗,治疗结果人们正拭目以待。

由于基因治疗所显示的独特优越性和出乎意料的效果,1992 年初美国 RAC 发布基因治疗新政策,缩短审批时间,在保证对公众无害的情况下,放宽对目前尚无有效治疗手段的恶性肿瘤施行基因治疗的限制,相继批准了对晚期结肠癌、直肠癌、肾癌及乳腺癌进行基因治疗的试验方案,并有进一步扩大治疗范围的趋势。截至 1992 年 3 月,RAC 已批准了 17 项基因治疗方案。这表明,基因治疗作为一种肿瘤生物治疗的新手段,已为生物医学界及公众认可和接受。此后,RAC 的决定在科学界引起了强烈的反应,很快越过大西洋,在欧洲激起了相应的回应。英国、荷兰、意大利以及其它欧洲国家政府也纷纷为基因治疗临床试验开绿灯。据有关专家推测,基因治疗在不久的将来,将有可能成为一种全新、方便、经济、有效的治疗手段,不但将广泛应用于晚期肿瘤的治疗,也必将在其他多种疾病,如心血管病、遗传病、肝病、糖尿病等的防治中得到应用。

(责任编辑 肖庆山)