

基因治疗纵横谈

Thoughts on Human Gene Therapy

吴 旻

(中国医学科学院肿瘤研究所分子肿瘤学国家重点实验室, 学部委员 北京 100021)

基因治疗作为一种全新的治病手段正开始进入临床试验。美国自 1988 年批准第一个向人体转入外源基因的申请后, 就像水堤决口一样, 申请逐年递增, 到 1993 年初总数大概已经达 40 个左右, 美国国立卫生研究院(NIH)的重组体 DNA 咨询委员会(RAC)也一路开绿灯, 加快批准手续。今年 3 月宾州大学已成立世界上第一个人类基因治疗研究所, 聘请原来在密执安大学的威尔逊(J. M. Wilson)任所长。西欧国家如英、法、意等国也不甘落后, 纷纷上马。笔者自 70 年代后期起曾数次向国内介绍这方面的动向, 强调开展基因治疗研究, 尤其鼓吹开展恶性肿瘤的基因治疗研究。当时, 也许由于实验设备和经费的限制, 似乎反应不大, 收效甚微。最近情况有了急剧变化, 1992 年 863 高技术项目开始正式资助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, 交流了国内、外的主要进展, 与此同时在上海召开的遗传病分子生物学国际会议也进行了基因治疗的专题讨论。国内各种刊物上介绍国外基因治疗进展的文章也日渐增多。奇怪的是均未涉及国内的情况。

本文拟在下列几个方面谈一点看法。

一、基因治疗的目标和范围

最初考虑的目标是一些单基因隐性遗传病, 如重症联合型免疫缺陷症(SCID), 患儿缺乏腺苷脱氨酶(ADA)活性, 只能在无菌环境下生活。最近已有一名患儿接受治疗后部分恢复了免疫功能, 可以走出无菌室了。进行这种治疗的前提是正常基因已被分离, 功能比较清楚, 可以较容易地将其转入人体内特定细胞。实际上, 只有几种罕见的单基因隐性遗传病符合这些要求。80 年代末, 人们开始考虑恶性肿瘤的基因治疗, 跳出将外源正常基因转入体内以替代突变或缺失基因的框框。例如, 把肿瘤坏死因子(TNF)基因转入患者肿瘤中的浸润淋巴细胞(TIL), 再回输给患者, 希望这种细胞能再次进入肿

瘤, 分泌 TNF, 以杀死瘤细胞。甚至将疱疹病毒的胸苷激酶(TK)基因引入肿瘤, 再结合化疗药物选择性杀死瘤细胞。最近还有人提出将能产生 hygromycin 磷酸转移酶和疱疹病毒 TK 融合蛋白的复合基因转入细胞毒性淋巴细胞以治疗爱滋病。与此同时, 一些比较常见的单基因遗传病如囊性纤维化(cystic fibrosis, CF)、家族性高胆固醇血症也开始成为基因治疗的目标。表 1 列出部分正在进行临床试验的项目。从中可以看出, 基因治疗已经从最初的有限目标中解放出来, 最近几年基因治疗的目标和范围已大大拓宽, 从最初的用正常基因替代突变基因变成利用基因转移技术将各种各样的目的基因(包括正常的、改组的, 甚至病毒基因……)转入人体以达到治疗疾病的目的。至于治疗对象, 则既有较罕见的多种遗传病, 也有像恶性肿瘤、心血管病之类的常见病, 甚至像爱滋病那样的传染病。

二、基因治疗发展的基础

基因治疗的基础既深而广。1944 年, Avery 等证明 DNA 是诱导肺炎球菌发生转化的物质; 1953 年, Watson 和 Crick 等提出 DNA 双螺旋结构模型; 60 年代遗传密码的破译, 70 年代重组体 DNA 技术(recombinant DNA techniques)的出现, 肿瘤基因研究的突破, 以及体细胞遗传学、细胞生物学的发展, 都为基因治疗提供了坚实的理论基础和技术条件。其中产生最直接促进作用的是定位克隆(positional cloning)策略的完善化和基因转移技术的发展。所谓定位克隆就是综合家系分析、细胞和分子遗传学方法, 确定某个未知基因或 DNA 序列的染色体位置, 然后通过染色体步移或跳移的办法把该基因或序列分离到手, 再根据其核苷酸序列弄清其功能(主要是编码蛋白的结构和功能)。这种新近发展起来的策略在过去一段时间里曾被不恰当地称为逆向遗传学(reverse genetics), 1992 年已被建议废止。这种策略大大加快了人们分离人体与

各种疾病有关基因的速度,源源不断地为基因治疗提供有用的目的基因,使基因治疗的病种迅速增加。随着人类基因组项目的顺利进行,可望在不久的将来(2000年前后)分离到 McKusick 整理出的

5 000多种单基因遗传病的大部分基因、全部或大部抑癌基因和各种细胞因子的基因。到那时,人们手中可供基因治疗用的目的基因就会成十倍、百倍地增加,从目前的数百个增加到上万个。

表 1 人体基因治疗现状

方 案	病 种	单 位	开始时间
基因标志			
NeoR/TIL	黑色素瘤	美国 NIH	1989.5
NeoR/骨髓	儿童 AML	美国孟菲斯,儿童医院	1991.9
NeoR/骨髓	成神经细胞瘤	美国孟菲斯,儿童医院	1992.1
NeoR/TIL	黑色素瘤	美国匹兹堡大学	1992.3
NeoR/TIL	黑色素瘤	法国里昂	1991.12
基因治疗			
ADA/外周血 T 细胞	SCID	美国 NIH	1990.9
TNF/TIL	黑色素瘤	美国 NIH	1991.9
TNF/瘤细胞	晚期癌	美国 NIH	1992.10
IL2/瘤细胞	晚期癌	美国 NIH	1992.3
第 α 因子/自体皮肤成纤维细胞	B 型血友病	上海复旦大学长海医院	1991.12
ADA/外周血 T 细胞+骨髓富集祖细胞	SCID	意大利米兰	1992.3
以下项目已批准,开始时间不详			
基因标记			
NeoR/骨髓	慢性粒细胞白血病	美国 M.D. 安德森	
NeoR/肝细胞	肝功能衰竭	美国拜洛学院	
NeoR/骨髓	成人 AML 和 ALL	美国印第安纳大学	
NeoR/TIL	黑色素瘤和肾癌	美国 UCLA	
基因治疗			
LDL 受体/肝细胞	家族性高胆固醇血症	美国密执安大学	
HS-tk/卵巢癌细胞	卵巢癌	美国罗切斯特大学	
HLA-B7/黑色素瘤	黑色素瘤	美国密执安大学	
HS-tk/细胞毒 T 细胞	爱滋病	美国华盛顿大学	
ADA/骨髓	SCID	美国 IARI 和荷兰莱顿大学	

注:NeoR 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,HS-tk 单纯疱疹胸苷激酶,SCID 重症联合型免疫缺陷症。

分离的目的基因好比各种各样的子弹,适用的子弹还要打到相应的靶细胞里去,才能发挥作用。这就需要基因转移技术。在体外条件下已经发展了许多种比较有效的转移技术(表 2),但有的不能直接用于人体内。于是不约而同地发展了一种体内、外结合的策略,1992 年以来,被简称为 ex vivo。目前的临床试验绝大多数采用此法。这个词或许可译成“离体”。大致为:将患者的某种组织或细胞(如成纤维细胞、骨髓、肝、外周血干细胞,甚至肿瘤细胞)取出体外,经短期培养后转入目的基因,还可进行

筛选和富集含有外源基因的细胞,然后再回输患者体内。这样一来,原来适用于体外转移基因的许多方法就可以用上了。由于细胞培养的条件日臻完善,几乎所有的人体细胞都能用适当的培养条件维持其生存或增殖。连原来认为失去分裂能力的神经细胞,现在也能在培养条件下诱导分裂。举表 1 中倒数第 5 项申请为例,申请者 Wilson 在 1992 年 12 月美国 NIH 的 RAC 会议上提供了他对一名家族性高胆固醇血症女患者的初步治疗结果:1992 年 6 月,切下患者 15%的肝脏,切碎后置于 800 个小平

皿中培养,用携有 LDL 受体基因的逆病毒载体进行转导,再回输到患者的肝脏,6 个月后患者血清中的胆固醇含量明显降低,两种载脂蛋白的比例也由“坏”变“好”了。但是,这种方法费时费力,耗资很大,没有十分完善的设备和充足的经费是难以进行的。为了使基因治疗成为切实可行的手段,还要发展更简便易行的方法,如肌肉注射、静脉注射、器官内灌输、皮下或体内包埋等。新近出现一种颗粒轰击系统 (particle bombardment system),采用高压放电,直接将涂布有目的基因的微细金颗粒轰击到体内、皮肤表层或通过小手术暴露后的真皮、内脏器官或瘤体均可直接转入外源基因,并获得较长期的表达。它的优点是迅速、简便,可以“指到哪里,打到哪里”,目前在动物实验中已显示其应用潜力。

表 2 将外源基因转入哺乳类和人体细胞的方法

- | |
|-------------------------|
| I. 体外 (in vitro) |
| 磷酸钙沉淀,显微注射,电穿孔等 |
| 病毒载体,脂质体 |
| II. 体内 (in vivo) |
| 病毒介导:逆转录病毒、腺病毒、单纯性疱疹病毒等 |
| 肌肉注射,吸入法,颗粒轰击等 |
| III. 离体 (ex vivo) |

还有一个值得注意的动向是利用改造过的 DNA 病毒做基因载体。长期以来逆转录病毒 (RNA 病毒) 由于其特殊的生活周期一直受到青睐。人们将它改造成为相当安全的、能将目的基因携入受体细胞基因组的载体,已得到广泛应用。它的固有的缺点是,只能将外源基因携入分裂的细胞,只能携带较小的基因或序列,安全问题 (致癌性) 尚未完全解决,对于需长期、反复治疗的单基因遗传病患者要慎重。最近一两年腺病毒 (引起人上呼吸道感染的 DNA 病毒) 一下子走到了舞台的中央。与逆转录病毒相比,腺病毒的优点是,能感染许多种处于静止期的细胞,尤其是呼吸道的上皮细胞。它本身的 DNA 基因组较大 (有 36 000 对核苷酸),切除致瘤部分 (如 EI 区等) 后可以插入相当大的外源基因,即装载量比逆转录病毒大得多。由于它并不插入受体细胞的基因组,以染色体外形式长期存在和表达,故安全性也高于逆转录病毒。美国曾有数百万新兵接种过腺病毒疫苗,从未发现过任何毒副作用。囊性纤维化 (cystic fibrosis, CF) 是一种白人中相当常见的单基因遗传病,主要症状是呼吸道分泌物粘稠,患儿常死于肺部感染。引起此病的突变基因是 CFTR,编码细胞膜上形成氯离子通道的一个大

蛋白。经过若干实验室多年努力,这个基因终于在 1989~1990 年分离到手,1992 年底立即有三家同时向 NIH 的 RAC 各自提出对此病进行基因治疗的申请,而且均被通过。他们的方案都是采用腺病毒做基因载体。让患儿吸入携有 CFTR 基因的病毒就能将基因转入肺和上呼吸道上皮。1993 年 3 月的《Nature Genetics》杂志上又刊登了三篇利用重组腺病毒为载体,将不同外源基因直接引入小鼠或大鼠的中枢神经系统获得持续高表达的报道,说明腺病毒在基因治疗中前景看好。

三、结束语

由上述可知,基因治疗根植于数十年来分子遗传学、体细胞遗传学、细胞生物学和分子病毒学等学科的重大发现和技术进步,还得益于许多新技术的建立。虽然目前还处于起始阶段,还有不少技术问题和一些重大的理论问题有待进一步阐明,但可预期,在不太遥远的将来,这种全新的治疗方法将造福于人类,使治疗学的面貌改观。

美国在这方面处于领先的地位,西欧已紧紧跟上。美国政府多年来大力支持生物医学基础研究。NIH 每年经费超过 100 亿美元,NSF (国家自然科学基金) 将近 30 亿美元,其中很大部分用于资助基础研究。最近美国和西欧、日本等发达国家都在继续加强基础研究的同时大力支持发展性研究,使基础研究得以迅速转化为社会效益。美国基因治疗研究的高速发展和领先地位是美国政府确保其生物医学领域在 21 世纪继续领先的主要表现之一。

对于这个充满希望的领域,我们当然不能袖手旁观,无所作为。80 年代后期,在国家计委和卫生部的资助下,我国已建成若干设备较先进的重点实验室,开展了一些前期工作,个别实验室已开始进入临床试验阶段。但在总体上和基础上同发达国家尚有不小的差距,需要加强资助,制定相应政策,以利于稳定队伍和吸引人才。当然也要防止一哄而上,低水平重复,既浪费人力、财力,又影响深入和创新性的研究。

基因治疗涉及伦理问题,已在外国引起科学界、宗教界、法律界和议会的多次激烈辩论。在美国,目前已形成比较成熟的条例和审批程序。为了防止蛮干硬上,我国科委和卫生部也正在制定相应的法规条例。

衷心期望我国的基因治疗研究能获得应有的发展。

(责任编辑 蔡德诚)