

基因治疗现状与前景

张夏华¹, 吴广通¹, 李 蓉² (1. 武警上海总队医院药剂科, 上海 201103, 2. 上海仁济医院五官科, 上海 200001)

摘要 基因治疗是一种新的治疗手段, 临床上用于治疗多种疾病, 癌症是其主要应用领域。过去十年, 基因治疗研究发展迅猛, 取得了很大的进步, 部分基因治疗方案已进入临床试验阶段。但也遇到了很多困难, 如其靶向性, 转移效率较低等问题亟待解决, 其安全性更是长期困扰着人们。基因治疗要能将外源遗传物质靶向性地导入到特异的细胞, 要有安全和高效的基因导入系统, 有等研究者更多的探索。本文结合近年来基因治疗的基础及临床研究, 对基因治疗的载体及治疗策略、主要成就、存在问题等方面进行了综述。

关键词 基因治疗; 逆转录病毒; 腺病毒

中图分类号: R394

文献标识码: A

文章编号: 1006 - 0111 (2009) 01 - 0004 - 08

1 基因治疗概述

基因治疗技术是随着 DNA 重组技术的成熟而发展起来的, 它是当代医学和生物学的一个新的研究领域, 可通过一定方式将正常基因或有治疗作用的 DNA 序列导入靶细胞以纠正基因的缺陷或发挥治疗作用, 从而达到治疗疾病的目的。

1990年, 美国科学家 Anderson 博士等人进行了首例基因治疗的临床试验, 并获得了成功, 这一成功标志着基因治疗时代的开始。1991年, 复旦大学薛京伦教授研究小组进行了我国第一例基因治疗临床试验, 说明我国在此研究领域起步较早。基因治疗技术当今发展迅速, 与干细胞治疗、免疫导向治疗等技术结合的越来越紧密, 形成新的治疗发展方向^[1-4]。

通常所说的基因治疗是指用完整的基因进行基因替代治疗, 主要的治疗途径是体外 (ex vivo) 基因治疗, 即在体外用基因转染病人靶细胞, 然后将经转染的靶细胞输入病人体内, 最终给予病人的疗效物质是基因修饰的细胞, 而不是基因药物。除间接体内法外, 还可以用基因药物进行直接体内途径治疗, 这些基因药物可以是完整基因, 也可以是基因片段 (包括 DNA 或 RNA); 可以是替代治疗, 也可以是抑制性治疗 (包括 DNA 转录水平和 mRNA 翻译水平)。从 1990 年转移 ADA 基因到现在的大部分基因治疗临床试验都是体外基因治疗, 另一种更为简便的方法是体内 (in vivo) 基因治疗, 1994 年美国科学家利用经过修饰的腺病毒为载体, 成功地通过这种方式将治疗遗传性囊性纤维化病的正常基因

CFDR 转入患者肺组织中。作为一种分子药物治疗形式, 基因治疗为许多遗传性和获得性疾病提供一种新的治疗方式, 从早期单基因遗传病的治疗, 目前已扩展到对人类健康威胁严重的多基因疾病, 包括遗传病、恶性肿瘤、心血管疾病、代谢性疾病, 以及感染性疾病 (如 AIDS、乙型肝炎) 等。

体内或体外基因转移都必须借助一定的技术方法或载体将外源的基因导入生物细胞。要求能在不同组织高效传递基因, 并且不具致病性, 其最大障碍在于载体的安全性和有效性, 治疗成功的关键因素也在于载体系统。载体系统分为病毒与非病毒两种, 研究者们对它们的结构、功能及安全性进行了研究, 获得了令人鼓舞的结果, 为治疗遗传性和获得性疾病的临床实践描绘出良好的前景。尽管这些试验取得了初步成功, 但对载体作进一步的研究以提高基因治疗技术仍是必要的。

2 基因治疗载体

选择恰当的转移方法或载体, 使目的基因靶向, 可控并有效地表达, 是基因治疗成功的关键。目前外源基因的转移方法主要有病毒法和非病毒法:

2.1 非病毒载体 迄今已完成的基因治疗临床研究结果都不尽如人意, 其最大困难在于开发无毒、高效的基因治疗载体。虽然多数研究仍采用转染效率较高的病毒载体, 但其非靶向性、有限携带能力、生产和包装以及安全性的困扰等问题, 使得非病毒基因治疗载体倍受关注。非病毒载体以其安全性、低毒性、低免疫反应、靶向性及易于组装等优点被寄予厚望, 在表达质粒、反义寡核苷酸或反义表达质粒真核细胞的靶向转移中, 有着病毒载体不可替代的作用, 人们对非病毒载体投入了很大的精力, 以期在基

因治疗方面有所突破。尽管非病毒载体具有相当的优势,但其缺点也不容忽视(见表 1)。

表 1 非病毒载体优缺点

优点	缺点
1. 不需包装细胞,制备容易、省时、滴度也不受限制,并且可对质粒或其他形式核酸进行快速分析;	1 转移效率较病毒低;
2. 对基因大小或核酸类型不限;	2 基因表达持续时间短;
3. 免疫原性低,急性毒性小,对受试者比较安全;	3 许多问题仍需求助病毒或病毒成分解决。
4. 可具有特异靶向性,并能转移至非分裂期细胞并有效表达;	
5. 制备方便且重复性好,具有完全人工合成和大规模生产可行性,因此较简单和廉价。	

非病毒载体的本质是将基因治疗中基因看作为药物,然后从药剂和药理学的角度将基因导入靶细胞或组织、器官并进行表达。非病毒载体包括裸质粒、脂质体、纳米颗粒及其它一些方式,以脂质体与阳离子聚合物使用较多^[5]。

2.1.1 裸 DNA 将目的基因连接在表达的质粒或噬菌体中直接注射而不依赖其它物质的介导,是最简单的非病毒载体系统。已知皮肤细胞、某些肿瘤细胞及免疫细胞对裸 DNA 较为敏感,可用多种物理操作方法来提高裸 DNA 的转染效率,包括电子枪^[6,7]、电穿孔^[8,9]、超声^[10]、高压注射^[11,12]等。

2.1.2 脂质体载体 应用于转基因的脂质体分为阳性、中性、阴性以及 pH 敏感的脂质体,其中以阳离子脂质体应用最多,而含有多价阳离子脂质的阳离子脂质体转染活力又较单价阳离子脂质体高。另外,大多数阳离子脂质体中都应用了中性脂质体。中性脂质体常与阳性脂质体混用,以提高转染效率。阴性脂质体 DNA 复合物静脉注射后不像阳性脂质体那样聚集在某一特定部位,而是弥散于各组织之中^[13]。此外,通过脂质体的修饰及改进,可提高其转染能力^[14]。Fukuhara 等^[15]报道,结合有脂质体的腺病毒载体(Ad/SUV)在体内体外的基因转染过程中,有更高的转染效率,并且避免了重复使用腺病毒载体易导致机体免疫排斥的难题,为肿瘤基因治疗提供了一个很好的途径。

2.1.3 阳离子多聚物 DNA 带负电,可以利用带正电荷的多聚阳离子通过电荷之间的相互作用,与 DNA 形成稳定的多聚复合物,使得 DNA 不易被核酸酶降解,并可以与细胞表面带负电荷的受体结合,从而有效地被内吞摄入介导基因转移。常见的阳离子多聚体有多聚左旋赖氨酸^[16,17]、多聚乙烯亚胺(PEI)^[18]、壳聚糖和壳聚糖衍生物^[19]以及树状高分

子^[20]等。

2.1.4 多肽导向载体系统 多肽载体的 DNA 结合部分多是碱性氨基酸,多肽长度 16-18 氨基酸足以转移 DNA 至细胞内,如 CWK18 寡肽^[20]。多肽载体是配体区,结合 DNA 的阳离子区、核定位信号区、两性分子功能区四位一体的合成短肽,加入组氨酸可增加转染效率,其机制可能是组氨酸的咪唑基类似于吞噬泡去稳定剂,有助于载体 DNA 复合物逃离吞噬泡^[22]。

2.1.5 纳米载体^[23] 纳米颗粒具有良好的生物相容性,对细胞的生长和代谢没有明显的影响。Kneuer 等^[24]发现在硅胶表面进行阳离子共价修饰后,将表达半乳糖苷酶的质粒固定于硅纳米微粒后,有效地转染了 COS-1 细胞。Roy 等^[25]报道了一种新的修饰过的硅纳米颗粒,实验结果显示 DNA 与硅纳米颗粒的结合更加牢固,并高效转染入培养细胞核。

2.1.6 嵌合载体 嵌合性载体即将不同性质的转基因载体联合应用,互补缺陷^[26,27]。

目前,尽管非病毒载体转导的外源基因不会整合入宿主细胞的染色体中,不会使插入位点附近的基因过度表达或失活,也无插入突变的危险,但其转移效率极低,表达时间短暂,在外源基因需要持续和高水平表达的疾病中缺陷尤其突出。因此对现有的表达载体加以改进,以得到能在临床上有效应用、靶向性好、可精确调控的载体还需要做大量工作,故实验中还是以病毒载体应用较多。

2.2 病毒载体 病毒具有一些独特的性质如多数病毒可感染特异的细胞,在细胞内不易降解;RNA 病毒能整合到染色体以及基因水平较高等。因此病毒载体是良好的基因运载体,现在约 85% 基因治疗临床项目采用病毒载体。

理论上,病毒通过删除与致癌、致毒和复制相关的基因片段等一系列的处理,在合适的位置插入外源治疗基因,均可发展成为基因传递的工具。所以,病毒载体设计的第一步是鉴定用于复制,病毒颗粒装配,病毒基因组包装和转运基因到靶细胞的病毒序列。其次,非必需基因应从病毒基因组中去除,以减弱病毒复制能力和致病力,以及免疫原性病毒抗原表达。如逆转录病毒用作载体时需进行以下改造:将天然的野生型 RNA 前病毒转变成 DNA 载体,并插入欲转移的相关外源基因。其基本原则是用标记基因和外源基因替代病毒的编码基因。制备辅助细胞为载体 DNA 提供其丧失的功能。将载体 DNA 导入辅助细胞以产生病毒载体。病毒载体感染靶细胞,外源基因在细胞内得以表达。

目前基于病毒的载体系统有多种,主要是逆转

录病毒 (RV, 包括慢病毒载体), 腺病毒 (AD), 腺相关病毒 (AAV), 单纯疱疹病毒 (HSV) 及痘病毒 (VV)。有研究者对它们的作用与致病性进行了研究, 获得了令人鼓舞的结果, 为治疗遗传性和获得性疾病的临床实践奠定了良好的实验基础。尽管这些试验取得了成功, 但对载体作进一步的研究以提高基因治疗技术仍是必要的。

2.2.1 RNA 病毒载体 最常用的 RNA 病毒载体来源于逆转录病毒, 它们属第一代病毒转运系统, 逐渐发展成为基因治疗载体。逆转录病毒是一个大的被膜 RNA 病毒家族, 存在于所有的脊椎动物, 又分为致癌性逆转录病毒, 慢病毒和泡沫病毒。

逆转录病毒属于正链 RNA 病毒, 可高效地感染许多类型的宿主细胞, 它虽是 RNA 病毒, 但有逆转录酶, 可使 RNA 转录为 DNA, 再整合到宿主细胞基因组中。并稳定地整合到宿主细胞基因组中。逆转录病毒是最先被改造且应用最为广泛 (>50%) 的基因治疗载体, 它具有以下优点: 逆转录病毒表面的糖蛋白能被很多哺乳动物细胞膜上的特异性受体所识别, 因而可以高效率地将基因转移到被感染的细胞内, 可使近 100% 的受体细胞被感染, 转化细胞效率高; 它能感染广谱动物物种和细胞类型而无严格的组织特异性; 被转移的外来基因能整合进被感染细胞的基因组中而不丢失, 有利于被转移基因的永久保存, 一般无害于细胞。2001 年, 法国 Cavazzana-Calvo 等曾成功地采用逆转录载体在两个患有 X 染色体关联的严重联合免疫缺陷症的婴儿身上实施了基因治疗。但同时也存在仅感染分裂期细胞、重组病毒滴度较低、整合可能致癌、包装外源 DNA 小 (<8 kb) 等缺陷。目前在基础与临床研究中多适用于间接体内 (ex vivo) 基因治疗, 特别是肿瘤的基因治疗。

慢病毒 (Lentivirus) 载体是以 HIV-1 (人类免疫缺陷型病毒) 为基础发展起来的基因治疗载体。区别一般的逆转录病毒载体, 它对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力。有研究者认为 HIV-1 完全可以被改造为基因治疗的高度安全的载体, 它对神经元细胞、肝细胞、心肌细胞等类型的细胞的基因治疗有很好的应用前景。

慢病毒载体的发展进一步促进了干细胞的基因治疗, 它能在不存在细胞因子的情况下转换造血前体细胞。尽管它们还没有被用于临床, 但在动物模型上已经取得了较好的结果。小鼠模型中, 慢病毒载体被成功用于将功能性球蛋白导入造血干细胞, 纠正地中海贫血和镰状红细胞疾病^[28, 29]。此外, 慢病毒载体治疗神经疾病具有较大的应用前景, 业已

证明, 该病毒载体在恒河猴 Parkinson's 病模型^[30]及小鼠异染性脑白质营养不良模型应用良好^[31]。

2.2.2 DNA 病毒载体 源于带 DNA 基因组的病毒载体中, 最突出的是腺病毒 (Adenovirus, Ad) 和腺相关病毒 (Adeno-associated Virus, AAV)。Ad 包含一个长约 36 kb 的双链 DNA 基因组, AAV 由单链 DNA 分子组成, 相对大小约 4.7KB。载体设计的基本原理也适用于 DNA 病毒载体。不过, 这些载体在结构、基因产物生成和载体纯化方面还是有比较明显的差异。

2.2.2.1 腺病毒 Ad 是无被膜线性双链 DNA 病毒, 在自然界分布广泛, 至少存在 100 种以上的血清型, 人类腺病毒家族超过 50 种血清型。DNA 每条链上都有重叠的转录单位。病毒基因组通过核孔进行转运, 使初始转录的启动更容易。腺病毒基因组在感染细胞核的分散复制中心进行转录和复制, 病毒 DNA 通常并不整合到宿主基因组中。作为基因治疗的载体, 腺病毒载体优点较显著 (见表 2)。与第一、二代 Ad 相比, 第三代 Ad 可插入的外源基因更大, 病毒蛋白表达引起的细胞免疫反应进一步减少, 载体中引入核基质附着区基因可使得外源基因保持长期表达, 并增加了载体的稳定性。

表 2 腺病毒优缺点比较

优点	缺点
1. 载体容量大。可携带高达 35kb 的外源基因;	1. 安全性问题 Ad 可导致人体免疫反应, 如何避开人体免疫机制是 Ad 载体设计的重要问题;
2. 感染宿主范围广。可感染分裂和不分裂细胞;	2. 外源基因只能作短暂表达;
3. 感染效率几乎可达 100%;	3. 特异性差 宿主范围广泛使得腺病毒难以针对某一特定组织进行基因治疗。修正病毒与其受体的作用部分, 以提高载体的靶向性, 是当今研究的另一个重要方向。
4. 可经呼吸道和消化道感染, 因而可有多种基因治疗途径;	
5. 不整合到染色体中, 无插入致突变性;	
6. 能同时表达多个基因。	
7. 能有效进行增殖, 滴度高。腺病毒系统可产生 $10^{10} \sim 10^{11}$ VP/mL, 浓缩后可达 10^{13} VP/mL。	

腺病毒感染可致特异的针对病毒感染的 T 淋巴细胞反应。另外, B 细胞和 CD4⁺ T 细胞活化, 出现体液免疫反应。血清学研究表明, 在 40% ~ 60% 的儿童中可找到腺病毒 1, 2, 5 型的抗体。腺病毒宿主免疫反应是腺病毒载体高效而安全应用的主要障碍。

大多腺病毒载体源于血清 5 型。通过取代关键的腺病毒编码区可设计复制缺陷型病毒载体。第一代腺病毒载体中, E1 区被目的基因取代。有研究者研制出带有极少病毒序列并与 E1 区互补的细胞, 有助于降低载体与宿主基因组间同源重组的机率,

从而避免具有自我复制能力的腺病毒产生^[32,33],病毒滴度可高达 10^{13} VP/mL。尽管 E1 区缺失的病毒不能自我复制,但在某些细胞中他们仍能生成病毒蛋白,诱导细胞免疫反应。第二代腺病毒载体额外缺失其它病毒转录单位(如 E2, E4)来降低载体的免疫原性。理论上讲,除反向重复末端(IIRs)和 cis 作用的包装信号外,可以将病毒基因减少到最低程度,构建不携带任何病毒序列的“无内脏”载体^[29],此所谓第三代腺病毒。尽管病毒生成比较费时费力,而且也可能刺激产生有害的免疫反应,但这此载体仍具有较大的用于高效基因转移和长期表达的潜能^[34,35]。

近年来对靶向性腺病毒载体的研究也发展迅速。腺病毒定向感染宿主的机制至今仍不清楚,因此组织特异性表达是采用宿主细胞自身的启动子/增强了如肌球蛋白轻链-1启动子,平滑肌 SM22a 启动子。另外通过对腺病毒载体的纤维外壳蛋白的改造亦可增加腺病毒新的亲嗜性;或将重组腺病毒颗粒与靶向分子如受体特异高亲和的配基或特异抗体分子相连,可使得腺病毒载体特定靶向地亲和并内吞到某种类型的组织细胞中。

2.2.2.2 腺相关病毒 AAV 是一种非致病性人类小 DNA 病毒。只有依赖于辅助病毒通常为腺病毒才可能增殖。AAV 可感染分裂期及静止期细胞;也可在处于应激状态的细胞中复制。当辅助病毒不存在时,AAV 能整合到宿主细胞基因组的特定区域(如人的第 19 号染色体短臂上),但构建的载体实际应用时则很难达到定向整合。

目前已有许多 AAV 的血清型分离出来,而且还有增加^[36,37]。AAV 系统通过外源基因取代病毒 REP 和 CAP 基因得到。通过减少载体和包装质粒间的重叠结构,采用同源重组的方式将野生型病毒降低到最少程度。

AAV2 是最常用于基因治疗研究的载体,应用于许多细胞类型和实验模型。此种载体可转导非分裂细胞,可用于肌肉,视网膜,脑,肝和肺。体内给药后数周,基因表达有一个缓慢的上升,然后达到一个平台期。基因表达延迟的确切原因尚不明确。AAV 转导可独立于细胞周期,不过,细胞增殖 S 期载体转导效率明显提高。

不同 AAV 进入细胞的方式不同,造成宿主范围也不同。与其受体结合后,病毒通过受体介导的胞饮作用进入细胞,之后转运到胞核。在胞核脱壳的病毒释放单链基因组,用于转变成双链 DNA 形式使能进行基因表达。

腺相关病毒载体虽然存在着不能插入较大的外

源基因(<4.7 kb),缺少高效的包装细胞,制备过程复杂,制备滴度低($<10^4$ VP/mL)等缺陷,但 AAV 载体不含有任何病毒编码区,实验证明其可以有效地转导脑、骨骼肌、肝脏等许多类型的细胞,抗原性及毒性很小,不致病,可感染非分裂细胞等优点,而被许多科学家所采用。不过,单次注射 AAV 载体可引发较强的体液免疫反应,从而影响此种载体的再次给药。2000 年 12 月,王冰等使用 AAV 将“微型基因”介导入 DMD 症的模式小鼠中,外源基因在大部分肌纤维中稳定、高效地表达,发现在肌细胞膜上存在肌细胞增强蛋白和其相关蛋白的复合物,引起新闻界、科学界等的普遍称赞与关注。另一项临床研究采用可表达人类因子的 AAV 载体通过肌肉注射对 B 型血友病人进行治疗^[38]。尽管在病人血浆中仅能检测到非常低水平的因子,但病人已表现出较好的治疗效果。此外,未观察到与载体有关的毒性。

2.2.2.3 单纯疱疹病毒载体 (Herpes Simplex Virus, HSV) 人 HSV 是大分子量双链 DNA,可容纳大片段外源 DNA。1 型单纯疱疹病毒(HSV-1)属于人嗜神经病毒,可在神经元细胞内建立潜伏感染^[39]。基于此原因,研究人员希望把 HSV-1 改造成为可定向导入神经系统的载体。1 型单纯疱疹病毒基因组为 152kb 的线性双链 DNA 分子,已鉴定了 80 个以上的基因,其中一半左右为非必需基因。野生型病毒感染神经元细胞后,通常处于潜伏感染状态,且不被人体免疫系统所识别,潜伏期可持续终生。当受到生理或周围神经损伤等刺激后,潜伏的人单纯疱疹病毒可被激活,而进入裂解性感染期。HSV 载体不仅感染神经元细胞,亦可感染非神经元细胞如上皮细胞,目前 HSV 载体已用于恶性间皮瘤、帕金森症等疾病的治疗研究中。

HSV-1 可被改造成两类载体:一是扩增子载体(amplicon)。即仅把 HSV 的复制起点和包装信号序列插入到细菌质粒中;当其转染至包装细胞,用 HSV 辅助病毒超感染,便可获得含有扩增子的假病毒;另一类为重组载体,即删除了与复制相关及非必需基因,以减少细胞毒性,可插入高达 30kb 的外源基因,用于宿主神经元细胞中长期表达外源治疗基因^[40]。重组 HSV-1 的主要不足是会引起细胞病变和免疫反应,扩增子载体及无辅病毒包装系统的出现已有效地解决了此项问题^[41]。如果宿主神经元已经潜伏了野生型单纯疱疹病毒,这就很可能重新激活病毒而进入裂解期。姚丰等^[42,43]构建了一种可抑制自身病毒和野生型病毒复制的重组病毒。此病毒可以作为新型、安全性单纯疱疹病毒载体,用于

临床实验的研究。

3 载体转导的靶向性和特异性

非病毒载体由于其转导效率低,在临床上使用率不到 20%,但其安全性高,将靶向性高的脂质体或多聚物与电脉冲、超声等技术结合,提高外源基因转移效率及靶向性是今后非病毒载体发展的重要方向^[44]。

目前临床上超过 70%的基因治疗方案采用了病毒载体。重组载体的宿主范围较广,但对系统性基因治疗也是其缺陷。另外,某些细胞内源性受体的表达较低,也难以转导。研究者^[45,46]运用多种策略来改变宿主范围,方法之一即构建假病毒载体。尽管可以在体外通过化学方式特异地作用于细胞,但复合物在体内的稳定性却不足以进行靶向作用。直接的基因修饰可较好地介导靶向配体,通过病毒与胞内受体结合。主要的问题还在于保持修饰后载体的高感染效力。

不同来源的重组腺病毒表现出多样的细胞靶向性。有研究者^[47]将病毒改造成带嵌合纤维蛋白的假型病毒载体来改变其靶向性。靶向腺病毒载体更适用于基因转移,其免疫原性和毒性更低,安全性增高^[48]。

AAV2也具有较广泛的宿主范围,但某些细胞仍对 AAV2感染具有抗性,可能是由于 AAV2缺乏适当的受体所致。在肌肉和肝中,AAV1表现出最强的感染效力。AAV3对造血干细胞有向性,而造血干细胞对 AAV2的转导具有抗性。AAV5对视网膜具有较高的靶向性,此外,AAV5还能转导气道上皮细胞。有研究发现腺相关病毒 AAV8是目前最有效的基因传递载体,可高效地将外源基因传递到肌肉和心脏^[49]。

病毒载体研究的最新方向可能是构建融多种病毒优点于一身的嵌合型病毒载体。如 Dubensky 等将 HPV 的复制子和反式激活因子 E1 的序列组装入重组腺病毒载体,重组腺病毒载体感染细胞后,依照 HPV 的一套复制子,游离在细胞染色体之外的载体基因组能复制并产生有感染力的病毒颗粒。

4 基因治疗的临床实践

1990年 5月,美国批准世界上第一例基因治疗临床试验,截止 2005年 7月 [http://www.wiley.co.uk/wileychi/genmed],在被批准的 1 076 例基因治疗试验中,与肿瘤相关疾病的治疗占了 66%,说明目前的基因治疗研究仍倾向于肿瘤;血管疾病占 8.6%。采用的载体以逆转录病毒和腺病毒居多,各

占约 25%,转移的外源基因多为细胞因子,占 25%。进入 期临床的所占比例较大,占有 63%,但进入 期临床的仅有 14%,其余大多数被淘汰,真正进入 期临床的少之又少,仅占 1.9%。值得关注的是,2004年,我国拥有自主知识产权的重组人腺病毒 p53注射液作为世界上第 1个基因治疗药物正式上市,这是世界基因治疗产业化里程碑式的进展^[50],也标志着我国取得了世界性的科技突破,也证明我们完全有能力抢占世界生物高技术产业化制高点。

基因治疗最早是希望利用病毒载体将致死性基因导入癌症细胞,或增强免疫系统功能以识别外源肿瘤细胞。采用 RNA 或 DNA 病毒载体(如 Ad, HSV-1)均可实现肿瘤溶解^[51]。肿瘤细胞可与治疗性或毒性基因结合,另外,Ad 的免疫原特性能导致间接的自发免疫作用。 期临床试验采用瘤内给予肿瘤溶解病毒并结合化疗取得了较好的效果。人们对与基因治疗有关的临床试验关注密切,严密监测不良反。

世界上第一例真正意义的临床基因治疗是通过逆转录病毒转移 T 淋巴细胞治疗因腺苷脱氨酶(ADA)缺乏导致的重度复合性免疫缺陷病(severe combined immunodeficiency disease, SCID)^[52]。遗憾的是,此项研究未能发现导入基因的长效作用,尽管 T 细胞数量及功能处于正常范围,但 ADA 生成不足^[53]。1999年,宾西法尼亚大学启动了一项 1 期临床试验,治疗鸟氨酸转氨甲酰酶缺乏疾病。该项试验被用于测试 E1/E4 缺失的重组腺病毒的安全性,试验中一名接受高剂量的 18 岁志愿者于载体导入后 4 天死亡^[54,55],他是作为基因治疗死亡宣布的。这对基因治疗无疑是一次重大打击,但同时也激励着科研工作者解决难题的信心和决心。2000年,法国对数名 SCID-X1 儿童成功实施了基因治疗,恢复了患儿正常的免疫功能,引起全世界极大的关注,可以说取得了基因治疗开展十年来最大的成功^[56]。不幸的是,其中 2 名儿童出现白血病症状^[57],这可能暗示基因治疗可能具有潜在的、延迟性的副作用。上述结果再次点燃了关于基因治疗安全性问题的争论。

5 基因治疗存在的问题与展望

目前,除了伦理道德的争议外,基因治疗存在的主要问题是:

5.1 用于治疗基因过少 目前在已用于临床实验的治疗基因仅集中于少数基因,对大多数疾病致病基因有待阐明。这不仅限于致病基因的发现,同

时也包括已知和目前未知功能基因的表达调控序列的确定,以及其相互作用规律的阐明,这将有赖于人基因组计划、尤其是功能基因组学的发展。

5.2 基因治疗缺乏靶向性 基因治疗的关键中的首要问题是能将治疗基因输送到并进入特定靶细胞,从而要能在该细胞中得到高效表达。

5.3 载体转移基因的效率,导入基因的持续表达及表达效率的问题 目前基因治疗没有获得满意的结果,目的基因在体内不能持续表达和表达水平不高是其重要的影响因素之一。构建转移效率和表达水平均高的载体是今后基因治疗研究的一个重要方向。

5.4 受体细胞的研究 目前采用的基因标记或基因治疗计划多数采用体外基因转移动方法,但是人体细胞在体外进行长期培养和繁殖,细胞的生物行为是否改变是值得研究的问题。1991年,Rosenberg等采用肿瘤浸润淋巴细胞(tumor-infiltrating lymphocytes, TL)基因转移技术治疗肿瘤,这些加工后的TL并不像想象那样聚集在肿瘤组织附近,识别并杀伤肿瘤细胞,却大量集结在肝脏和肾脏中,所携带的细胞因子 TNF的表达也只有预期的 1/4。由此可见,尽管目前可用于基因治疗的受体细胞的种类很多,但在临床应用于中还存在不少问题,必须进一步加强对受体细胞的研究。

5.5 导入的基因表达缺乏可控性 要使外源基因能按需表达,最理想的方法是使导入的外源基因在人体特异组织和细胞中进行长期有效的表达,并能受生理信号的调控。这是今后长期追求的目标,这需要全基因或包括上下游的调控区及内含子。从近期来说,可以期待实现的是在 cDNA 水平加上部分内含子及调控元件,应用诱导的形式达到一定程度的可控性,这样部分基因,导入体内后,可通过诱导来控制表达。

5.6 基因治疗的安全性 这是目前基因治疗争论最为激烈的问题,比较典型的是 1999年美国一位 18岁的患鸟氨酸转甲酰酶缺乏症的病人死于基因治疗,主要是由于基因治疗对象选择有误及用药剂量过大;尽管 RV 载体进入细胞后是随机整合至宿主细胞染色体的,但其仍具有潜在的插入突变可能性。法国几名儿童因采用 RV 载体进行治疗而患上白血病,再次引起人们对基因治疗安全性产生怀疑。AAV 能优先整合至人 19号染色体长臂区段的 DNA 上,若能弄清楚这种定点整合的机制并证明这种定点整合无害处,这就可以避免随机整合引起插入突变。还要充分估计外源基因产物对宿主的危害性,当患者体内引入外源基因后,表达出大量原来缺乏

的蛋白质,这可能为引起严重免疫反应,甚至导致有害的自身免疫,这一点也是值得引起重视的。因此,未来如何改造基因治疗载体,特别是解决逆转录病毒的安全性问题,使之更为安全有效可能是未来基因治疗研究和临床试验的一大热点问题。

尽管基因治疗存在诸多问题有待解决,公众和学术界对其也褒贬不一,但我们相信,作为一种对人类健康影响宽广而深远的药物或治疗方式,基因治疗——这个年轻的领域——正朝着治愈更大范围人类疾病迈进,为人类带来了希望,它在遗传性疾病,肿瘤等疾病的治疗上,将产生深远的意义。

参考文献:

- [1] Recchia A, Mavilio F. Tracking Gene-Modified T Cells In Vivo [J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 506: 391.
- [2] Check E. Gene-therapy trials to restart following cancer risk review [J]. *Nature*, 2005, 434 (7030): 127.
- [3] Alici E, Sutlu T, Sirac Dilber M. Retroviral Gene Transfer into Primary Human Natural Killer Cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 506: 127.
- [4] Sio FS, Naldini L. Short-Term Culture of Human CD34⁺ Cells for Lentiviral Gene Transfer [J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 506: 59.
- [5] Pan D. In Situ (In Vivo) Gene Transfer into Murine Bone Marrow Stem Cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 506: 159.
- [6] Nishikawa M, Huang L. Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer [J]. *Hum Gene Ther*, 2001, 12 (8): 861.
- [7] Yoshida S, Kashiwamura SI, Hosoya Y, *et al* Direct immunization of malaria DNA vaccine into the liver by gene gun protects against lethal challenge of *Plasmodium berghei* sporozoite [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 271: 107.
- [8] Zhang GH, Tan XF, Shen D. *et al* Gene expression and antitumor effect following in electroporation delivery of human interferon alpha 2 gene [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, 24 (9): 891.
- [9] Liu F, Huang L. A syringe electrode device for simultaneous injection of DNA and electrotransfer [J]. *Mol Ther*, 2002, 5 (3): 323.
- [10] Taniyama Y, Tachibana K, Hiraoka K, *et al* Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound [J]. *Circulation*, 2002, 105 (10): 1233.
- [11] Hodges BL, Scheule RK. Hydrodynamic delivery of DNA [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2003, 3 (6): 911.
- [12] Song E, Lee SK, Wang J, *et al* RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis [J]. *Net Med*, 2003, 9 (3): 347.
- [13] Ishiwata H, Suzuki N, Ando S, *et al* Characteristics and biodistribution of cationic liposomes and their DNA complexes [J]. *J Control Release*, 2000, 69 (1): 139.
- [14] Allison SD, Molina MC, Anchordoquy TJ. Stabilization of lipid DNA complexes during the freezing step of the lyophilization process: the particle isolation hypothesis [J]. *Biochim Biophys*

- Acta, 2000, 1468 (1-2): 127.
- [15] Fukuhara H, Hayashi Y, Yamamoto N, *et al* Improvement of transduction efficiency of recombinant adenovirus vector conjugated with cationic liposome for human oral squamous cell carcinoma cell lines[J]. *Oral Oncol*, 2003, 39 (6): 601.
- [16] Brown MD, Schatzlein A, Brownlie A, *et al* Preliminary characterization of novel amino acid based polymeric vesicles as gene and drug delivery agents[J]. *Bioconjug Chem*, 2000, 11 (6): 880.
- [17] Lee M, Ko KS, Oh S, *et al* Prevention of autoimmune insulinitis by delivery of a chimeric plasmid encoding interleukin-4 and interleukin - 10[J]. *J Control Release*, 2003, 88 (2): 333.
- [18] Wightman L, Kircheis R, Rossler V, *et al* Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo[J]. *J Gene Med*, 2001, 3 (4): 362.
- [19] Koping-Hoggard M, Tublekas I, Guan H, *et al* Chitosan as a nonviral gene delivery system. Structure-property relationships and characteristics compared with polyethylenimine in vitro and after lung administration in vitro [J]. *Gene Therapy*, 2001, 8 (14): 1108.
- [20] Kukowska-Latallo JF, Raczka E, Quintana A, *et al* Intravascular and endobronchial DNA delivery to murine lung tissue using a novel, nonviral vector [J]. *Hum Gene Ther*, 2000, 11 (10): 1385.
- [21] Collard WT, Evers DL, McKenzie DL, *et al* Synthesis of homogeneous glycopeptides and their utility as DNA condensing agents [J]. *Carbohydr Res*, 2000, 323 (1-4): 176.
- [22] Bennis JM, Choi JS, Mahato RI, *et al* pH-sensitive cationic polymer gene delivery vehicle: N-Ac-poly (L-histidine)-graft-poly (L-lysine) comb shaped polymer[J]. *Bioconjug Chem*, 2000, 11 (5): 637.
- [23] 常津, 刘海峰, 许晓秋, 等. 一种新型纳米基因载体的制备及体外实验 [J]. *中国生物医学工程学报*, 2002, 21 (6): 515.
- [24] Kneuer C, Sameti M, Bakowsky U, *et al* A nonviral DNA delivery system based on surface modified silica-nanoparticles can efficiently transfect cells in vitro [J]. *Bioconjug Chem*, 2000, 11 (6): 926.
- [25] Roy I, Ohulchanskyy TY, Bharali DJ, *et al* Optical tracking of organically modified silica nanoparticles as DNA carriers: A nonviral, nanomedicine approach for gene delivery [J]. *PNAS*, 2005, 102 (2): 279.
- [26] Fukuhara H, Hayashi Y, Yamamoto N, *et al* Improvement of transduction efficiency of recombinant adenovirus vector conjugated with cationic liposome for human oral squamous cell carcinoma cell lines[J]. *Oral Oncol*, 2003, 39 (6): 601.
- [27] Oku N, Yamazaki Y, Matsuura M, *et al* A novel non-viral gene transfer system, polycation liposomes[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 52 (3): 209.
- [28] May C, Rivella S, Chadburn A, *et al* Successful treatment of murine beta - thalassemia intermedia by transfer of the human beta-globin gene[J]. *Blood*, 2002, 99 (6): 1902.
- [29] Pawliuk R, Westerman KA, Fabry ME, *et al* Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy[J]. *Science*, 2001, 294 (5550): 2368.
- [30] Kordower JH, Emborg ME, Bloch J, *et al* Neurodegeneration prevented by lentiviral vector delivery of GDNF in primate models of Parkinson's disease[J]. *Science*, 2000, 290 (5492): 767.
- [31] Consiglio A, Quattrini A, Martino S, *et al* In vivo gene therapy of metachromatic leukodystrophy by lentiviral vectors: correction of neuropathology and protection against learning impairments in affected mice[J]. *Nat Med*, 2001, 7 (3): 310.
- [32] Fallaux FJ, Kranenburg O, Cramer SJ, *et al* Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors[J]. *Hum Gene Ther*, 1996, 7 (2): 215.
- [33] Inler JL, Chartier C, Dreyer D, *et al* Novel complementation cell lines derived from human lung carcinoma A549 cells support the growth of E1-deleted adenovirus vectors [J]. *Gene Ther*, 1996, 3 (1): 75.
- [34] Kochanek S, Schiedner G, Volpers C. High-capacity 'gutless' adenoviral vectors[J]. *Curr Opin Mol Ther*, 2001, 3 (5): 454.
- [35] Muruve DA, Cotter MJ, Zaiss AK, *et al* Helper-dependent adenovirus vectors elicit intact innate but attenuated adaptive host immune responses in vivo[J]. *J Virol*, 2004, 78 (11): 5966.
- [36] Gao GP, Alvira MR, Wang L, *et al* Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy [J]. *PNAS*, 2002, 99 (18): 11854.
- [37] Chiorini JA, Kim F, Yang L, *et al* Cloning and characterization of adeno-associated virus type 5 [J]. *J Virol*, 1999, 73 (2): 1309.
- [38] Kay MA, Manno CS, Ragni MV, *et al* Evidence for gene transfer and expression of factor X in haemophilia B patients treated with an AAV vector[J]. *Nat Genet*, 2000, 24 (3): 257.
- [39] Burton EA, Fink DJ, Glorioso JC. Gene delivery using herpes simplex virus vectors[J]. *DNA Cell Biol*, 2002, 21 (12): 915.
- [40] Burton EA, Bai Q, Goins WF, *et al* Replication-defective genomic herpes simplex vectors: design and production [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2002, 13 (5): 424.
- [41] Sena-Esteves M, Saeki Y, Fraefel C, Breakefield XO. HSV-1 amplicon vectors-simplicity and versatility[J]. *Mol Ther*, 2000, 2 (1): 9.
- [42] Yao F, Eriksson E. novel anti-herpes simplex virus type 1-specific herpes simplex virus type 1 recombinant[J]. *Hum Gene Ther*, 1999, 10 (11): 1811.
- [43] Christoph FP, Theopold, Daniela Hoeller, Feng Yao. A Trans-Dominant Negative and Replication Defective HSV-1 Vector for In Vivo and Ex Vivo Gene Transfer[J]. *Molecular therapy*, 2004, 9 (suppl 1): s302.
- [44] El-Aneed A. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy[J]. *J Control Release*, 2004, 94 (1): 1.
- [45] Nicklin SA, Baker AH. Triplex modified adenoviral and adeno-associated viral vectors for gene therapy[J]. *Curr Gene Ther*, 2002, 2 (3): 273.
- [46] Peng KW, Russell SJ. Viral vector targeting[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1999, 10 (5): 454.
- [47] Von Seggern DJ, Huang S, Fleck SK, *et al* Adenovirus vector pseudotyping in fiber-expressing cell lines: improved transduction of Epstein-Barr virus-transformed B cells[J]. *J Virol*, 2000, 74 (1): 354.

表 1 山楂叶中的主要化学成分

峰号 (peak No.)	t _R /min	[M-H] ⁻ m/z	max/nm	鉴定 (identify)
1	10.8	451.1	225	熊果酸 (Ursolic acid)
2	21.7	755.3	260 350	芦丁-4 "O-鼠李糖苷 (rutin-4 "O-rhamnoside)
3	30.2	611.1	225	去乙酰山楂纳新 (Deacetylcratenacin)
4	31.9	609.2	250 350	巢菜素- (Vicenin-)
5	33.5	593.4	260 330	牡荆素 [4 "O-葡萄糖苷 (vitexin-4 "O-glucoside)
6	38.7	577.3	260 330	牡荆素-2 "O-鼠李糖苷 (vitexin-2 "O-rhamnoside)
7	40.9	431.2	240	牡荆素 (Vitexin)
8	42.2	628.1	254	槲皮素-3-鼠李糖-半乳糖苷 (Quercetin-3-rhamnosyl-galactose)
9	45.2	609.2	254 350	芦丁 (Rutin)
10	49.1	463.4	254 350	金丝桃苷 (Hyperoside)
11	53.9	623.1	254 350	牡荆素-4 "O-乙酰-2 "O-鼠李糖苷 (vitexin-4 "O-acetyl-2 "O-rhamnosyl)

参考文献:

- [1] 郭永学,李楠,仇燕峡,等.大孔吸附树脂纯化山楂叶总黄酮工艺研究[J].中成药,2006,28(1):23.
- [2] 龚青,张叶萍,祝明.RP-HPLC法测定山楂叶中牡荆素鼠李糖苷及牡荆素葡萄糖苷的含量[J].中草药,2005,36(3):23.
- [3] 权迎春,关丽萍.山楂叶提取物的抗炎与镇痛作用研究[J].时珍国医国药,2006,17(4):566.
- [4] 张培成,徐缓绪.山楂叶化学成分研究[J].药学报,2001,36(10):754.
- [5] 斯建勇,陈迪华.云南山楂叶化学成分的研究[J].中国中药杂志,1998,23(7):422.
- [6] 王威,周增辉,崔妍,等.山楂叶黄酮物质提取方法的研究及结构分析[J].中国食品添加剂,2006,4(9):7.
- [7] 张培成,徐缓绪.山楂叶化学成分研究[J].药学报,2001,36(10):754.
- [8] 任凤莲,吴梅林,谷芳芳.高效液相色谱法测定山楂叶中熊果酸含量的研究[J].天然产物研究与开发,2007,19:303.
- [9] 刘荣华,余伯阳.山楂叶 HPLC 指纹图谱研究[J].中成药,2007,29(1):7.
- [10] 江爱龙,刘荣华,邵峰,等. LC-MS法测定山楂叶中多元酚类成分的含量[J].武警医学院学报,2007,16(5):533.
- [11] Cuyekens F, Claeys M. Optimization of a liquid chromatography method based on simultaneous electrospray ionization mass spectrometric and ultraviolet photodiode array detection for analysis of flavonoid glycosides[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2002, 16: 2341.
- [12] Beck MA, Häberlein H. Flavonol glycosides from *Eschscholtzia californica* [J]. Phytochemistry, 1999, 50: 329.
- [13] Abebe E, Bemd K, Tsige G. Quantitative determination of the group of flavonoids and saponins from the extracts of the seeds of *Glinus lotoides* and tablet formulation thereof by high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr A, 2005, 1083: 32.
- [14] Rosa T, Rodolfo M, Eduardo N. Isolation of ursolic acid from apple peels by high speed counter-current chromatography[J]. Food Chemistry, 2008, 106: 767.
- [15] Rayyan S, Fossen T, Solheim NH. Isolation and identification of flavonoids, including flavone rotamers, from the herbal drug *Crataegi folium cum flore* (hawthorn) [J]. Phytochem Anal, 2005, 16: 334.

收稿日期:2008-04-09

(上接第 10 页)

- [48] Wickham TJ. Ligand-directed targeting of genes to the site of disease[J]. NatMed, 2003, 9(1): 135.
- [49] Wang Z, Zhu T, Qiao CP. Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart[J]. Nat Biotechnol, 2005, 23(3): 321.
- [50] Pearson S, Jia H, Kandachi K. China approves first gene therapy [J]. Nat Biotechnol, 2004, 22(1): 3.
- [51] Nettelbeck DM. Virotherapeutics: conditionally replicative adenoviruses for viral oncolysis [J]. Anticancer Drugs, 2003, 14(8): 577.
- [52] Anderson W F, Blaese R M, Culver K, et al. The ADA human gene therapy clinical protocol: points to consider response with clinical protocol[J]. Hum Gene Ther, 1990, 1: 33.
- [53] Blaese R M, Culver K W, Miller A D, et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years[J]. Science, 1995, 270(5235): 475.
- [54] Raper SE, Yudkoff M, Chimule N, et al. A pilot study of in vivo liver-directed gene transfer with an adenoviral vector in partial ornithine transcarbamylase deficiency[J]. Hum Gene Ther, 2002, 13(1): 163.
- [55] Raper SE, Chimule N, Lee FS, et al. Fatal systemic inflammatory response syndrome in an ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer[J]. Mol Genet Metab, 2003, 80(1-2): 148.
- [56] Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease[J]. Science, 2000, 288(5466): 669.
- [57] Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency[J]. N Engl J Med, 2003, 348(3): 255.

收稿日期:2009-01-25