

“863” 生物高技术丛书

基因治疗

顾健人 曹雪涛 主编

科学出版社

2001

内 容 简 介

本书是“863”生物高技术丛书之一。全书共分19章，系统介绍基因治疗的基本原理、研究方法及临床应用，内容包括：基因治疗的各类病毒载体和病毒载体的构建、特点、制备和应用，基因治疗的各种应用途径、原理与效果，特别是深入介绍肿瘤、遗传性疾病、心血管病、神经系统疾病，以及HIV感染等的基因治疗的现状、存在问题及研究前景。本书既反映当前国际上基因治疗研究的前沿进展，又展现了我国学者在基因治疗研究领域所取得的成绩。

本书可供生物学、基础与临床医学、药学等方面的教学、科研人员、研究生和临床医生参考。

图书在版编目(CIP)数据

基因治疗/顾健人,曹雪涛主编. —北京:科学出版社,2001.2
(“863”生物高技术丛书)

ISBN 7-03-009076-4

I.基… II.①顾…②曹… III.基因治疗-研究 IV.R394

中国版本图书馆CIP数据核字(2000)第84722号

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

中国科学院印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2001年2月第一版 开本:787×1092 1/16

2001年2月第一次印刷 印张:00 0/0 插页:0

印数:1—0 000 字数:000 000

定价:0.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈科印〉)

《基因治疗》编著者

主 编:

顾健人 中国工程院院士 上海市肿瘤研究所
曹雪涛 教授 中国人民解放军第二军医大学

编 者 (按姓氏笔画排序):

于益芝 中国人民解放军第二军医大学
毛 宁 中国人民解放军军事医学科学院
任常山 中国医科大学
伍志坚 中国预防医学科学院
刘德培 中国医学科学院基础医学研究所
汤 健 北京大学医学部
何 龙 中国人民解放军第二军医大学
吴 旻 中国医学科学院肿瘤研究所
吴小兵 中国预防医学科学院
张 毅 中国人民解放军军事医学科学院
杨安钢 中国人民解放军第四军医大学
陈诗书 上海第二医科大学
林 晨 中国医学科学院肿瘤研究所
郑仲承 中国科学院上海生物化学研究所
娄永华 中国人民解放军第二军医大学
郭子宽 中国人民解放军军事医学科学院
钱关祥 上海第二医科大学
顾健人 上海市肿瘤研究所
曹雪涛 中国人民解放军第二军医大学
薛京伦 复旦大学
鞠佃文 中国人民解放军第二军医大学

前 言

本书由我和曹雪涛教授共同负责主编，由承担我国生物高技术领域基因治疗有关研究项目的科学家们负责各章节的撰写。他们长期以来在基因治疗研究中辛勤耕耘，做出了重要贡献。其中一批青年科学家也参加了编写，反映了新世纪的希望。

全书共分 19 章，系统介绍基因治疗的基本原理、研究方法与临床应用。内容包括：基因治疗的各类病毒载体的构建、特点、制备和应用，基因治疗的各种应用途径、原理及其效果，特别是深入介绍肿瘤、遗传性疾病、心血管病、神经系统疾病，以及 HIV 感染等的基因治疗的现状、存在问题和研究前景。

本书保持了各位作者各自的写作风格，既反映出当前基因治疗研究领域的前沿和进展，又体现了十多年来我国科学家的辛劳成果。我国基因治疗研究虽然起步晚，但起点不低，某些研究方面有特色和创新之处。我深信，我国科学家在新世纪中一定会在基因治疗领域做出更高水平的工作，为人民造福，为世界做出贡献。

兹草数行，与同事们共勉

百草园中，嫩蕊初放；
不畏风雨，不惧寒霜；
华夏儿女，吾与自强；
试看来日，满庭飘香。

顾健人

2000 年 11 月 15 日

目 录

前言

第一章 基因治疗概论	顾健人 (1)
一、基因治疗与基因工程的异同	(1)
二、基因治疗的途径	(2)
(一) <i>ex vivo</i> 途径	(2)
(二) <i>in vivo</i> 途径	(2)
三、基因治疗经历的几个历史阶段	(2)
(一) 准备期 (1980~1989)	(3)
(二) 狂热期 (1990~1995)	(3)
(三) 理性期 (1996 年至今)	(3)
四、基因治疗临床试验的现状	(3)
(一) 基因治疗临床方案	(4)
(二) 基因治疗的基因导入系统	(4)
(三) 基因治疗所用的治疗基因	(5)
五、基因治疗中有待解决的关键问题	(6)
(一) 高效的、靶向性基因导入系统	(6)
(二) 外源基因表达的可控性	(9)
(三) 治疗基因过少	(10)
六、展望与结束语	(11)
第二章 病毒载体概述	吴小兵 (13)
一、病毒载体产生的原理	(13)
(一) 重组型病毒载体	(14)
(二) 无病毒基因的病毒载体	(14)
二、病毒载体的包装系统	(15)
(一) 宿主细胞	(15)
(二) 病毒复制和包装所必需的顺式作用元件和外源基因的表达盒	(15)
(三) 辅助元件	(16)
三、病毒载体的纯化方法	(17)
(一) 初始物的收集或制备	(17)
(二) 初始物的浓缩	(18)
(三) 目标病毒的分离纯化	(18)
四、病毒载体在基因治疗中的应用	(18)

五、安全性检测	(19)
(一) 有复制能力的病毒	(19)
(二) 辅助病毒	(19)
(三) 其他成分的污染	(20)
六、病毒载体的发展方向	(20)
(一) 简便、高效的病毒载体包装系统	(20)
(二) 无病毒基因的病毒载体	(20)
(三) 可调控表达外源基因的病毒载体	(20)
(四) 自我扩增型载体	(21)
(五) 特异性复制型病毒载体	(21)
(六) 嵌合型病毒载体	(21)
(七) 靶向性病毒载体	(21)
(八) 用各种其他病毒构成新型病毒载体	(22)
第三章 反转录病毒载体	娄永华 (24)
一、反转录病毒的分子生物学	(25)
(一) 反转录病毒的结构	(25)
(二) 反转录病毒的基因组	(25)
(三) 反转录病毒的生活周期	(26)
(四) 反转录病毒的宿主专一性	(27)
二、反转录病毒载体的构建	(27)
(一) 反转录病毒载体的基本结构元件	(28)
(二) 外源基因在反转录病毒载体中的表达调控	(28)
(三) 反转录病毒载体	(30)
三、重组反转录病毒的产生	(33)
(一) 包装细胞	(34)
(二) 重组反转录病毒的生产	(37)
四、重组反转录病毒基因转移系统	(37)
(一) 反转录病毒载体介导基因转移的一般过程	(37)
(二) 反转录病毒介导基因转移的靶组织细胞	(38)
(三) 基因转移的方法与途径	(38)
(四) 基因转移效率	(39)
(五) 基因转移的准确性: 重组反转录病毒载体靶向性基因转移	(40)
(六) 外源基因在转移后的表达	(43)
(七) 反转录病毒载体介导基因转移的安全性问题	(44)
(八) 反转录病毒载体基因转移系统需要解决的问题	(45)
第四章 腺病毒载体	吴小兵 (48)
一、腺病毒的分子生物学	(48)
(一) 腺病毒的结构	(48)
(二) 生活周期	(49)

(三) 腺病毒基因的转录和表达	(49)
(四) 腺病毒的细胞转化作用	(50)
二、腺病毒载体的发展	(50)
(一) 第一代腺病毒载体	(51)
(二) 第二代腺病毒载体	(52)
(三) 新型腺病毒载体	(52)
三、腺病毒载体在基因治疗中的应用	(53)
第五章 腺相关病毒载体	伍志坚 吴小兵 (56)
一、腺相关病毒的生活周期	(56)
二、AAV 病毒基因组的结构和功能	(57)
(一) ITR 的结构和功能	(57)
(二) <i>rep</i> 基因的结构和功能	(58)
(三) <i>cap</i> 基因的结构和功能	(59)
三、重组 AAV 的产生原理及常规制备、检测方法	(59)
(一) 重组 AAV 的产生原理	(59)
(二) 重组 AAV 的常规制备及纯化方法	(60)
(三) 重组 AAV 的滴度测定方法	(61)
四、重组 AAV 生产策略及纯化方法的新进展	(61)
(一) rAAV 生产策略的新进展	(62)
(二) rAAV 纯化方法的新进展	(64)
五、重组 AAV 的大规模制备及纯化的新技术	(65)
(一) 用“一种病毒感染一株细胞”的策略生产 rAAV	(65)
(二) rAAV 的纯化	(67)
六、重组 AAV 对细胞的转染	(67)
七、重组 AAV 在基因治疗中的应用	(69)
(一) 遗传性疾病	(69)
(二) 慢性难治性疾病	(70)
(三) 肿瘤	(71)
(四) 其他	(71)
第六章 单纯疱疹病毒载体	吴小兵 (75)
一、HSV - 1 的生活周期	(75)
二、HSV 的潜伏感染	(76)
三、单纯疱疹病毒载体	(76)
(一) 缺损性 HSV - 1 载体	(76)
(二) 扩增子载体	(78)
(三) 潜伏型 HSV 载体	(80)
(四) HSV 载体在基因治疗中的应用	(81)
第七章 非病毒载体	何 龙 曹雪涛 顾健人 (83)
一、概述	(83)

二、非病毒载体的分类及其特点	(84)
(一) 裸 DNA	(84)
(二) 脂质体/DNA 复合物	(85)
(三) 多聚物/DNA 复合物	(88)
(四) 其他非病毒载体	(88)
三、非病毒载体的优化策略	(90)
(一) 分子耦联体	(90)
(二) 转运入核问题	(91)
(三) 基因及其表达调控问题	(93)
四、新型受体介导的靶向性非病毒型载体	(94)
五、非病毒载体应用简述	(95)
六、小结与展望	(96)
第八章 造血干细胞与基因治疗	毛宁 郭子宽 张毅 (99)
一、造血干/祖细胞的分离纯化、体外扩增及定向分化诱导	(99)
(一) 造血干/祖细胞及其检测技术	(99)
(二) 造血干/祖细胞的分离纯化与体外扩增	(101)
(三) 造血干/祖细胞的定向分化诱导	(104)
(四) 造血干/祖细胞的体外扩增及定向诱导分化的应用前景	(106)
二、造血细胞作为基因导入靶细胞的基因治疗	(107)
(一) 造血细胞基因治疗的临床应用	(107)
(二) 造血细胞基因治疗存在的问题、改进措施和应用前景	(114)
第九章 抑癌基因治疗	林晨 吴旻 (119)
一、抑癌基因治疗原理	(119)
(一) 抑癌基因	(120)
(二) <i>P53</i> 基因与肿瘤	(120)
(三) <i>RB</i> 、 <i>PI6</i> 基因与肿瘤	(121)
二、抑癌基因治疗的实验研究	(122)
(一) <i>P53</i> 基因治疗	(122)
(二) <i>PI6</i> 基因治疗实验研究	(123)
(三) <i>RB</i> 、 <i>BRCA1</i> 基因治疗	(124)
三、抑癌基因治疗的临床试验	(124)
(一) 基因 <i>P53</i> 治疗临床试验研究	(125)
(二) 基因 <i>BRCA1</i> 治疗临床试验	(126)
四、反义癌基因治疗	(127)
五、基因治疗与放疗、化疗联合应用研究	(128)
第十章 基因修饰瘤苗	陈诗书 钱关祥 (133)
一、基因修饰瘤苗的背景	(133)
二、基因修饰瘤苗抗肿瘤作用的实验研究	(134)
(一) 细胞因子基因修饰瘤苗的抗肿瘤效应	(134)

(二) 细胞因子基因与其他基因联合修饰瘤苗的抗肿瘤效应	(135)
三、细胞因子基因修饰人体肿瘤细胞的建立	(136)
(一) 细胞因子基因的克隆	(136)
(二) 重组反转录病毒载体的构建	(137)
(三) 缺陷型重组反转录病毒的包装	(138)
(四) 肿瘤细胞的转染及 RCR 的检测	(138)
四、细胞因子基因修饰人体肿瘤细胞的鉴定及性质	(138)
(一) 外源基因在转染肿瘤细胞中的整合和表达	(138)
(二) 细胞因子基因修饰人肿瘤细胞的生物学行为	(139)
(三) 细胞因子基因修饰肿瘤细胞的基因表达图谱变化	(140)
五、 ⁶⁰ Co 照射及冻存对基因修饰肿瘤细胞的影响	(141)
(一) 照射对导入的外源基因的影响	(141)
(二) 对生物学行为的影响	(141)
(三) 辐射后的瘤苗应符合的国家规定生物制品标准	(142)
六、基因修饰瘤苗的临床实验	(142)
(一) 细胞因子基因修饰瘤苗临床试验草案	(143)
(二) 细胞因子基因修饰瘤苗临床试验的初步结果	(144)
(三) MHC 肿瘤原位注射	(145)
(四) 重组抗原瘤苗	(145)
第十一章 抗原提呈细胞与肿瘤基因治疗	曹雪涛 (149)
一、树突状细胞与肿瘤基因治疗	(150)
(一) 树突状细胞的特性	(150)
(二) 以树突状细胞为基础的肿瘤免疫治疗	(151)
(三) 以树突状细胞为基础的肿瘤基因治疗	(152)
二、巨噬细胞与肿瘤基因治疗	(156)
(一) 以巨噬细胞为基础的肿瘤免疫治疗	(156)
(二) 以巨噬细胞为基础的肿瘤基因治疗	(157)
第十二章 肿瘤的免疫基因治疗	于益芝 曹雪涛 (162)
一、肿瘤的细胞因子基因治疗	(162)
(一) 免疫效应细胞介导的细胞因子基因治疗	(162)
(二) 肿瘤细胞靶向的细胞因子基因治疗	(165)
(三) 成纤维细胞等载体细胞介导的细胞因子基因治疗	(169)
(四) 以抗原提呈细胞为基础的细胞因子基因治疗	(171)
(五) <i>in vivo</i> 途径的细胞因子基因治疗	(171)
(六) 肿瘤细胞靶向的细胞因子受体基因治疗	(173)
(七) 细胞因子基因治疗研究存在的问题	(173)
二、肿瘤的 MHC 基因治疗	(175)
(一) 肿瘤的 MHC 基因治疗的实验研究	(175)
(二) 肿瘤 MHC 基因治疗的临床应用	(178)

(三) MHC 基因治疗存在的问题	(179)
三、肿瘤抗原靶向的基因治疗	(179)
(一) 重组腺病毒载体介导的肿瘤免疫基因治疗	(179)
(二) 重组痘苗病毒载体介导的肿瘤免疫基因治疗	(181)
(三) 其他病毒载体介导的肿瘤抗原免疫基因治疗	(183)
(四) 成纤维细胞介导的肿瘤抗原基因治疗	(183)
(五) 肿瘤抗原基因免疫	(184)
四、肿瘤的共刺激分子基因治疗	(185)
(一) 共刺激分子及其配体	(186)
(二) 共刺激分子基因疗法的研究	(187)
五、抗体介导的肿瘤免疫基因治疗	(189)
(一) 抗体增强免疫基因治疗的靶向性	(189)
(二) 抗体作为免疫基因治疗的效应分子	(189)
六、综合性肿瘤免疫基因治疗	(190)
(一) 细胞因子基因治疗与细胞因子基因治疗的联合	(190)
(二) 细胞因子基因治疗与 B7 基因治疗的联合	(190)
(三) 细胞因子基因治疗与 MHC 基因治疗的联合	(190)
(四) 细胞因子基因治疗与抗原基因治疗的联合	(191)
(五) 细胞因子基因治疗与自杀基因治疗的联合	(191)
(六) 细胞因子基因治疗与化疗的联合	(191)
(七) 细胞因子基因治疗与骨髓移植的联合	(192)
(八) 细胞因子基因治疗与过继免疫治疗的联合	(192)
第十三章 自杀基因治疗	鞠佃文 曹雪涛 顾健人 (196)
一、自杀基因系统简介	(196)
(一) <i>tk</i> -GCV 系统	(196)
(二) <i>CD</i> -5-FC 系统	(197)
(三) 其他自杀基因系统	(197)
二、自杀基因的作用机制	(198)
(一) 旁观者效应	(198)
(二) 机体的免疫反应	(200)
三、自杀基因治疗的新进展	(202)
(一) 靶向性的自杀基因治疗策略	(202)
(二) 自杀基因与其他基因治疗联合应用	(206)
(三) 其他综合疗法	(207)
四、自杀基因的应用前景	(208)
(一) 自杀基因用于脑恶性肿瘤治疗的研究	(208)
(二) 自杀基因用于其他恶性肿瘤的基因治疗	(208)
(三) 自杀基因用于心脑血管疾病治疗的研究	(209)
(四) 自杀基因用于同种异体骨髓移植的研究	(209)

(五) 自杀基因用于病毒感染的治疗	(209)
(六) 自杀基因的预先导入	(209)
(七) 自杀基因作为安全装置	(210)

第十四章 血友病的基因治疗 薛京伦 (213)

一、血友病 B 基因治疗	(214)
(一) 凝血因子 IX 及其基因的结构特征	(214)
(二) 凝血因子 IX 基因治疗研究	(214)
二、血友病 A 基因治疗	(220)
(一) 凝血因子 VIII 的结构及其基因特征	(220)
(二) 凝血因子 VIII 基因治疗	(221)
三、结语	(224)

第十五章 地中海贫血的基因治疗 刘德培 (228)

一、珠蛋白基因表达调控	(228)
(一) 珠蛋白基因结构与功能	(228)
(二) 珠蛋白基因表达调控机制与其模型	(230)
(三) α 与 β 两类基因表达终产物的平衡	(232)
二、珠蛋白基因表达异常	(233)
(一) 珠蛋白基因表达产物异常	(233)
(二) 与胎儿珠蛋白基因持续表达相关的突变	(233)
(三) 珠蛋白基因表达平衡失调	(234)
三、地中海贫血的流行概况与治疗现状	(235)
四、地中海贫血的基因治疗策略与基因转移系统	(235)
(一) 地中海贫血基因治疗策略	(235)
(二) 珠蛋白基因转移系统	(236)
五、地中海贫血基因治疗的实验研究	(237)
(一) 转移的 β -珠蛋白基因表达所需的关键调控元件	(237)
(二) 病毒载体介导的珠蛋白基因转移	(238)
(三) 用嵌合寡核苷酸介导的定点纠正	(240)
六、问题与展望	(244)

第十六章 帕金森病的基因治疗 郑仲承 (249)

一、目前治疗帕金森病的主要方法	(250)
(一) 药物治疗	(250)
(二) 手术治疗	(250)
(三) 细胞或组织的脑内移植	(251)
二、帕金森病基因治疗概况	(251)
(一) 治疗基因的选择	(251)
(二) 治疗基因表达的控制	(255)
(三) 治疗基因的给予	(256)
三、展望	(256)

(一) 寻找新的治疗基因	(256)
(二) 改进治疗基因的给予技术	(257)
(三) 建立新的治疗思路	(259)

第十七章 阿尔茨海默病的基因治疗

任常山 (263)

一、阿尔茨海默病研究概要	(263)
二、阿尔茨海默病的分子生物学	(264)
(一) β 淀粉样蛋白	(264)
(二) APP 的代谢过程	(264)
(三) APP 的基因结构和其转录的调节	(265)
(四) APP 基因的突变	(265)
(五) APP 基因的表达及其变化	(266)
(六) APP 和 β A4 对神经细胞的作用	(266)
(七) APOE 蛋白及其基因	(266)
(八) 神经纤维缠结与 Tau	(267)
三、神经传递物质的异常和神经生长因子	(267)
(一) 胆碱能神经元	(267)
(二) 神经生长因子	(267)
四、阿尔茨海默病动物模型	(268)
(一) 转基因鼠动物模型	(269)
(二) 中枢胆碱能损害动物模型	(269)
(三) 自然衰老动物模型	(269)
五、阿尔茨海默病基因治疗原理	(270)
六、阿尔茨海默病基因治疗的策略	(271)
(一) 基因治疗的目的基因	(271)
(二) 基因治疗的载体	(271)
(三) 选择基因转移的方式	(272)
七、展望	(273)

第十八章 心血管病的基因治疗

汤 健 (278)

一、心血管病基因治疗的一些特点	(278)
二、心血管系统的基因转移	(280)
(一) 基因缝线	(280)
(二) 基因球囊和支架	(281)
(三) 血管外膜的基因转移	(281)
(四) 基因针和电脉冲基因转移	(281)
(五) 阳离子脂质体	(282)
(六) 受体介导的基因转移	(282)
(七) 病毒脂质体	(283)
(八) 病毒介导的基因转移	(283)
三、遗传性心血管病的基因治疗	(284)

(一) 扩张型心肌病的基因治疗	284
(二) 肥厚性心肌病的基因治疗	285
(三) 长 Q-T 综合征的基因治疗	285
(四) 家族性高胆固醇血症的基因治疗	285
四、复杂性心血管病的基因治疗	286
(一) 梗塞性血管病的基因治疗	286
(二) 高血压病的基因治疗	288
(三) 高脂血症和动脉粥样硬化的基因治疗	289
(四) 再狭窄的基因治疗	291
(五) 血栓症的基因治疗	293
(六) 心功能不全的基因治疗	294
五、基因转录调节的治疗	296
(一) 反义寡聚核苷酸	296
(二) 肽核酸	297
(三) Decoy 转录因子的治疗	297
(四) 核酶	298
(五) 转录调节药物	298
六、问题与展望	298
(一) 大力加强心血管病发病的分子生物学机理的研究	299
(二) 大力发展心血管系统的基因转移体系	299
(三) 大力发展可控性的基因表达载体	300
(四) 大力发展多基因的综合治疗	301
(五) 大力加强外源基因在体内“命运”的研究	301
第十九章 HIV 感染的基因治疗	杨安钢 304
一、HIV 的分子生物学特性	304
(一) HIV-1 的基因结构	304
(二) HIV-1 基因编码的蛋白	305
(三) HIV 的受体和细胞亲嗜性	306
(四) HIV 的生活周期	307
二、HIV 感染的基因治疗	308
(一) HIV-1 基因治疗的靶细胞	308
(二) 目的基因的导入技术	308
(三) HIV-1 基因治疗的策略	309
(四) 今后的研究重点和发展前景	312

基因治疗概论

人类疾病,除单基因遗传病外,许多常见疾病,如恶性肿瘤、高血压、糖尿病、冠心病等的发生,都是环境因子如化学物质、病毒或其他微生物、营养,以及体内的各种因素,包括精神因素、激素、代谢或中间产物等内外因素作用于人体基因的最后结果。至于传染病,是由外源病原体如病毒、细菌及其他微生物引起的疾病,而这些病原体是通过它们的遗传物质及其表达产物作用于人体而致病。同时,这些病原体的遗传物质还可在人体内不断复制。所以,人的疾病的发生,都是人细胞本身的基因改变或由外源病原体的基因及产物与人体相互作用的最后结果。

为此,长期以来科学家们想像人类能否最终依靠遗传物质,无论是人本身的或外源的,来治疗疾病,包括纠正人自身基因的结构或功能上的错乱,阻止病变的进展,杀灭病变的细胞,或抑制外源病原体遗传物质的复制,从而达到治病目的。这就是基因治疗的含义。

一、基因治疗与基因工程的异同

20世纪70年代,随着基因操作及DNA重组技术的成熟,诞生了基因工程。这是当时分子生物学发展的必然结果。基因工程是将基因装配于特定的具有表达必备元件的载体中,在体外通过细胞如原核细胞或真核细胞进行扩增并表达其蛋白质产物。

通过对蛋白质产物分离与纯化,最终获得某一种基因所编码的蛋白质纯品。这是生物高新技术在20世纪的重大突破,创造了巨大的经济与社会效益。基因治疗自French Anderson于1989年进行了基因标记物在人体内试验的准备后,于1990年9月进行了第一例应用腺苷脱氨酶基因(ADA),经反转录病毒导入人自身T淋巴细胞,经扩增后输回患儿体内,获得了成功。患儿5年后体内10%造血细胞呈ADA基因阳性,除了还须应用部分剂量的ADA蛋白外,其他体征正常。这一成功标志着基因治疗的时代已经开始。

基因治疗为什么具有诱人的前景?它和基因工程有什么异同?

1) 基因工程是将具有应用价值的基因,即“目的基因”,装配在具有表达所需元件的特定载体中,导入相应的宿主细胞,如细菌、酵母或哺乳动物细胞,在体外进行扩增。经分离、纯化后,获得其表达的蛋白产物。基因治疗是将具有治疗价值的基因,即“治疗基因”,装配于能在人体细胞中表达所必备元件的载体中,导入人体细胞,直接进行表达。它毋须对其表达产物进行分离纯化,因为人细胞本身可以完成这一个过程。

2) 正由于以上原因,在基因工程中耗资最大的一部分器材与材料及其费用,在基因

治疗中可以省却,从而使今后工业化的成本明显降低。

3) 基因工程的“目的基因”产物迄今为止尚限于可分泌的蛋白,如生长因子、多肽类激素、细胞因子、可溶性受体等。对于非分泌性蛋白,如受体、细胞内酶、转录因子、细胞周期调控蛋白、原癌基因及抑癌因子等,由于不能有效地进入细胞而不能应用于基因工程。但基因治疗不受以上限制。几乎所有的细胞基因,只要它具有治疗作用,理论上均可应用于基因治疗。因此,基因治疗具有更巨大的潜力。当然,随着蛋白质结构与功能的研究,今后对非分泌性蛋白,通过加上某些肽段或进行某些加工,使其同样能进入细胞。例如,最近应用 HIV 的 N 端十一肽,可使许多蛋白质能进入细胞就是一个例子。所以,今后基因工程的应用潜力也是无可估量的。

4) 基因工程的操作全部在体外完成。基因治疗则必须将基因直接导入人体细胞。这不仅在技术上具有很大难度,而且对其有效性与安全性方面提出了苛刻的要求。基因工程的技术已经有近 30 年的历史,技术已比较成熟;基因治疗还仅有 10 年经历,不少技术还不够成熟。所以,它所遇到的风险性更大。

二、基因治疗的途径

基因治疗有两种途径:即 *ex vivo* 及 *in vivo* 方式。

(一) *ex vivo* 途径

这是指将含外源基因的载体在体外导入人体自身或异体细胞(或异种细胞),这种细胞被称为“基因工程化的细胞”,经体外细胞扩增后,输回人体。这种方法,易于操作,由于细胞在扩增过程中,对外源的添加物质经大量稀释并易于清除;同时,人体细胞,尤其是自体细胞,加工后应用于人体自身,一般来说,易于解决安全性问题。但是,这种方法,在工业化方面,除载体系统外不易形成规模,而且必须有固定的临床基地。

(二) *in vivo* 途径

这是将外源基因装配于特定的真核细胞表达载体,直接导入体内。这种载体可以是病毒型或非病毒型,甚至是裸 DNA。这种方式的导入,无疑有利于大规模工业生产。但是,对这种方式导入的治疗基因以及其载体必须证明其安全性,而且导入体内之后必须能进入靶细胞,有效地表达并达到治疗目的。因此,在技术上要求很高,其难度明显高于 *ex vivo* 模式的导入途径。

以上两种途径,宜按不同疾病和导入基因的不同性质予以选择。

三、基因治疗经历的几个历史阶段

从 20 世纪 80 年代起至世纪末,已经历了三个阶段:

（一）准备期(1980~1989)

自 1980 年至 1989 年,这是基因治疗的“禁锢时代”。20 世纪 80 年代初,从学术界到宗教、伦理、法律各界,对基因治疗能否进入临床,存在很大争议。直到 1989 年,FDA 才同意基因治疗先将载体导入作为“基因标记”的临床试验,1990 年才批准正式临床试验。这个阶段中,科学家们在临床前研究进行了大量工作,同时也在舆论上做了很多准备。其中,French Anderson 与 Steve Rosenberg、Michael Blease 等,对基因治疗的问世起了重要的历史作用。

（二）狂热期(1990~1995)

自 1989 年后,基因治疗进入临床试验,带来了医学生物学领域的一片狂热。在短短的数年,有 100 多个临床方案,经 FDA 批准进入临床试验。从专业刊物至一般媒体,给人的印象是基因治疗即将成为临床治疗的一种成熟的治疗方法。这里既有科学家本身的盲目乐观,又有企业界参与以后媒体的炒作。一方面在 1980~1989 年期间,科学家所作的储备,在这时候几乎倾囊而出,其中一些还没有成熟到可以取得临床疗效的方案也过早地进入了临床试验,在报道中也有某些不实与夸张之词。这种狂热性从国外也传到了国内。由于一些关键技术没有解决,在临床应用中必然会碰壁。

（三）理性期(1996 年至今)

1995 年美国 NIH,主持了对过去几年基因治疗临床试验的初步评估,证明一百几十个方案中确证有疗效的方案仅几个。从而提出了必须对基因治疗中的关键问题组织研究。从而,基因治疗从狂热转入理性化的正常轨道。必须指出,从 1995 年以后,基因治疗在研究方面决不是冷却。美国成立了三个研究基因导入系统与载体的研究机构;从 1996 年至 1999 年,全世界的基因治疗临床方案增加了一倍,治疗病人数也增加了一倍。从投资来看,除国家投资以外,企业界的热情有增无减,仅 1996 年一年企业界的投资等于 1990~1995 年的总和。目前每年的总投资仍在 10 亿美元左右。基因治疗的专业杂志从 1 种增加到 3 种,美国癌症研究协会还成立了以基因治疗为主的“分子治疗”协会。在研究成果方面,以电脉冲 DNA 导入为代表的新技术于 1999 年发表,标志着基因导入系统的重要突破。凡此种种,都说明目前基因治疗研究正在以稳健的步伐跨入 21 世纪。

四、基因治疗临床试验的现状

到 1999 年 9 月 10 日为止,收集到不完整的资料(<http://www.wiley.co.uk/gen-med>),对基因治疗的现状可归纳如下:

(一) 基因治疗临床方案

迄今已有 387 个方案进入临床试验,病例数达 3278(见表 1-1)。其中美国占 299 个方案,病例数 2263;欧洲国家 68 个方案,病例数 529。中国已进入临床方案(未全部统计在表内)2 个,病例数为 14。

表 1-1 基因治疗临床试验(截至 1999 年 9 月 1 日)

种类	临床方案数		病例数	
	No.	%	No.	%
癌	252	63.6	2269	69.2
基因标记	41	10.4	227	6.9
* 健康志愿者	2	0.5	6	0.2
传染病(HIV)	33	8.3	412	12.6
** 单基因疾病	53	13.4	298	9.1
其他	15	3.8	66	2.0
总数	396	100	3278	100

* 健康志愿者:检测对基因导入系统的免疫反应。

** 单基因疾病:单基因遗传病。

上述方案中,癌症居首位,方案数 252 个(中国仅有 1 个),病例数达 2269(中国 10 例未统计在内);HIV 方案数 33 个,病例数 412;单基因疾病(遗传病)方案数 53 个,病例数 298。其中血友病 B 为我国复旦大学薛京伦实验室首次进入临床试验。

上述疾病中,癌症覆盖了几乎大多数恶性肿瘤,包括神经、妇科、消化道、肺、皮肤、头颈部癌以及造血系统恶性疾病。传染病主要是 HIV 感染。单基因疾病是指单基因遗传病,除血友病 B 以外,包括 ADA 缺陷的 SCID(严重合并型免疫缺陷症)、囊性纤维化病、Gaucher 病、黏液多糖病 I 型(Hunter 综合征)及 II 型(Hurler 综合征)、家族性高胆固醇血症、Fanconi 贫血等。

表 1-1“其他”类包括侧束性硬化病(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)、冠心病、外周性动脉疾病,硬化症(restenosis)、风湿性关节炎。基因标记是指将载体导入后,观察其安全性及表达(耐药基因)分布情况,是基因治疗临床试验的临床预初试验。

(二) 基因治疗的基因导入系统

表 1-2 列举了目前临床试验所用的载体系统。其中反转录病毒仍居首位(158 个方案,病例数 1217);脂质体占第二位,方案数 73 个,病例数 735;腺病毒为第 3 位,方案数 71,病例数 437;产生反转录病毒的包装细胞 20 个方案,病例数 408;Poxvirus 方案数 26,病例数 130;裸 DNA 方案数 16,病例数 69;腺相关病毒方案数 4,病例数 36。

表 1-2 基因治疗临床试验采用的载体系统

载体系统	临床方案		病 例*	
	No.	%	No.	%
腺相关病毒	4	1.1	36	1.1
腺病毒	71	17.9	437	13.3
电穿孔	2	0.5	20	0.6
基因枪	4	1.0	35	1.1
疱疹病毒	1	0.3	0	0
脂质体	73	18.4	735	22.4
脂质体/腺相关病毒	2	0.5	0	0
脂质体/腺病毒	1	0.3	3	0.1
裸 DNA	16	4.0	69	2.1
痘病毒	26	6.6	130	4.0
反转录病毒包装细胞	20	5.1	408	12.4
反转录病毒	158	39.9	1217	37.1
反转录病毒/基因枪	1	0.3	6	0.2
RNA 转移	1	0.3	30	0.9
其他转染	7	1.8	101	3.1
总数	387	100	3227	100

* 其中有 9 种方案(51 例)未统计在内,未加说明。

以上仅代表已进入临床试验所用的载体,并不能完全反映今后的趋势。例如腺相关病毒最近在病毒包装及制备技术上的突破,对遗传病的治疗将会成为重要的导入系统。裸 DNA 则由于电脉冲导入技术的突破,预期很快将会有一批新的治疗方案进入临床。非病毒型的载体将大有可为。

(三) 基因治疗所用的治疗基因

目前已用于临床的治疗基因见表 1-3。

表 1-3 基因治疗所应用的治疗基因

基因类型	临床方案数	%	病例数	%
抗体(antibody)	3	0.8	5	0.2
抗原(antigen)	63	15.9	882	26.9
抗原+2 个 HIV 抑制物(antigen + 2 HIV inhibitors)	1	0.3	0	0
抗原+细胞因子(antigen + cytokine)	1	0.3	9	0.3
抗原+标记基因(antigen + marker)	1	0.3	0	0
反义(antisense)	4	1	3	0.1
反义+药物抗性(antisense + drug resistance)	1	0.3	0	0
反义+显性负选择基因(antisense + negative transdominant)	6	1.5	17	0.5

基因类型	临床方案数	%	病例数	%
反义+抑制物(antisense + tumor suppressor)	1	0.3	9	0.3
抗肿瘤(antitumoral EIA)	2	0.5	16	0.5
细胞因子(cytokine)	76	19.2	724	22.1
细胞因子+标记(cytokine + marker)	7	1.8	66	2
细胞因子+受体(cytokine + receptor)	2	0.5	0	0
细胞因子/趋化因子(cytokine / chemokine)	2	0.5	0	0
诱饵(decoy)	1	0.3	0	0
诱饵+标记物(decoy + marker)	2	0.5	5	0.2
缺陷(deficiency)	51	12.9	289	8.8
缺陷+标记基因(deficiency + marker)	2	0.5	9	0.3
抗药基因(drug resistance)	11	2.8	55	1.7
抗药基因+标记基因 drug resistance + marker	1	0.3	10	0.3
标记基因(marker)	40	10.1	215	6.6
标记基因+其他(marker + other)	2	0.5	18	0.5
标记基因/自杀基因(marker / suicide)	1	0.3	6	0.2
多种基因(multiple)	3	0.8	16	0.5
N/C	3	0.8	0	0
显性负选择基因(negative transdominant)	1	0.3	0	0
癌基因调节物(oncogene regulator)	1	0.3	0	0
其他(other)	11	2.8	48	1.5
受体(receptor)	17	4.3	102	3.1
受体+抗原(receptor + antigen)	1	0.3	0	0
核酶(ribozyme)	5	1.3	19	0.6
自然基因(suicide)	50	12.6	543	16.6
自然基因+标记基因(suicide + marker)	4	1	29	0.9
肿瘤抑制物(tumor suppressor)	19	4.8	183	5.6
合计	396	100	3278	100

五、基因治疗中有待解决的关键问题

基因治疗要取得突破,必须解决三个关键问题:即基因导入系统、基因表达的可控性及更多更好的治疗基因。

(一) 高效的、靶向性基因导入系统

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的靶细胞,从而要

能在该细胞中得到高效表达。这对于恶性肿瘤治疗尤为重要。如果一个治疗基因不能导入大多数肿瘤细胞,至少要求它尽可能不进入或较少进入正常细胞。当然,针对免疫系统的体内基因治疗可以是例外,但也必须尽可能靶向地或相对地更多进入免疫系统的细胞,同样也有一个靶向导入问题。目前,针对恶性肿瘤的免疫基因治疗仍按 *ex vivo* 形式操作,很少有体内直接导入的治疗模式。

迄今为止,病毒型载体中,如反转录病毒、腺病毒在体内肿瘤基因治疗时,除直接注射入瘤体外,若用全身给药,在肿瘤中分布极低,很难期望达到治疗的作用。因此,只能用于 *ex vivo* 或 *in vivo* 直接注射入靶位,如恶性肿瘤的瘤内注射。*ex vivo* 方面,AAV 导入的基因可期持续表达的作用,明显优于反转录病毒、腺病毒。此外,文献上把反转录病毒视为可区别肿瘤与非肿瘤细胞的载体,这种看法并不正确。以上观点是基于反转录病毒仅在细胞分裂过程才得以整合,但从细胞动力学观点来看,肿瘤在某一特定时间内进入分裂的细胞数仅占其中一部分而已,而非肿瘤细胞中仍可能有相当比例的分裂细胞(如肝再生的细胞、造血系统及肠黏膜细胞等)。因此,仅凭这一特征,不能认为反转录病毒对肿瘤细胞具有特异性。所以,当务之急,尤其对恶性肿瘤的体内形式的基因治疗,是建立靶向性导入系统。国外曾有过许多尝试,尤其是以受体靶向的非病毒载体系统。应用针对靶细胞表面的受体,以它相应的配体,如转铁蛋白、去唾液糖蛋白(asiialoglycoprotein,)与多聚阳离子(如多聚赖氨酸)连接,通过后者与基因的质粒 DNA 形成复合物,携带基因到达靶细胞。

近 10 年来,应用的配体分子见表 1-4。由于非病毒型载体进入细胞后,内吞小泡很快被胞质溶酶体融合,最后被溶酶体释放的各种降解酶系所破坏,从而严重影响表达及疗效。国外所用的对策是,同时应用缺陷性腺病毒或 CELO 病毒,通过腺病毒的内吞小泡裂解功能区或组分(endosomolytic element),将内吞小泡裂解。亦有应用氯喹(chloroquine),起同样的作用。但是,以上体系存在的共同问题是:

- 1) 配体分子大,易于产生抗原性问题;
- 2) 内吞小泡溶解剂中,病毒分子过大,具有很强抗原性,并可能由此产生毒性作用;小分子氯喹无靶向性,若要求在体内进入靶细胞达到必需的浓度而发挥作用,将给予极高的剂量,临床的实用性存在问题。

自 1996 年,作者等曾设计了新型的受体靶向性基因载体系统,其要点是:

- 1) 设计配体寡肽(ligand oligopeptide, LOP),以取代大分子配体。其功能是识别并与受体结合。
- 2) 多聚阳离子多肽(PCP)为骨架,借此与 DNA 结合,形成稳定的复合物;PCP,可用鱼精蛋白或多聚赖氨酸。鱼精蛋白属药用试剂,但其相对分子质量较小。但二者均同样具有与 DNA 形成复合物的功能。
- 3) 以流感病毒的血凝素功能区 20 肽(HA20)作为裂解内吞小体的寡肽(endosome release oligopeptide, EROP)。
- 4) 将 LOP 与 PCP 及 EROP 与 PCP 分别连接,形成 LOP-PCP 及 EROP-PCP 复合多肽;或由 LOP、PCP、EROP 直接连接成 LOP-PCP-EROP 复合多肽。

5) LOP-PCP 与 EROP-PCP 在 1:1 的分子量配比条件下,与 DNA 形成静电结合的复合物。复合多肽与 DNA 因所用 PCP 的分子质量及 DNA 的长度而须达到一定分子比例。

表 1-4 国外受体介导非病毒载体所用的配体

受体	配体	多聚阳离子	靶细胞	内吞小泡溶解剂	文献
去唾液酸酞蛋白 (ASGP)受体	ASGP	* PL	HepG2, HUH-7、原代肝细胞	无,腺病毒、 白喉毒素片段	Wu 1987,1988,1994; Chowdhury 1996; Chris- tiano 1993; Fisher 1994
去唾液酸酞蛋白 (ASGP)受体	合成半乳糖配 体	PL、OL、Bisac- ridine	Hep G2、BNL Cl.2、 HUH-7	无,氯喹、腺病毒	Plank 1992; Haensler 1993; Midoux 1993; Merwin 1994; Wadhwa 1995; Perales 1994
转铁蛋白受体	转铁蛋白	PL,Protamine、 * PEI、Ethidi- um dimer	K562、F-MEL、HeLa、 CFT-1、MRC-5、 NIH/3T3、黑色素 瘤、神经母细胞瘤、 纤维母、细胞、内皮 细胞,上皮细胞	无,氯喹、腺病 毒、CELO病毒、 Rhinovirus、肽、甘 油	Cotten 1990; Wagner 1990; Zenke 1990; Tax- man 1993; Kircheis 1997
胰岛素受体	胰岛素	阳离子修饰的 白蛋白,PL,	肝癌细胞、PLC/ PRF/5	无	Hockett 1990; Rosenkranz 1992
纤维母细胞生长 因子 2(FGF2)受体	FGF2 (碱性 FGF)	PL	Cos-1, 3T3, BNK, B16	无,氯喹	Sosnowski 1996
叶酸受体	叶酸	PL	KB、HeLa、Caco-2、 SW620、SKOV	氯喹、腺病毒	Mislick 1995; Gottschalk 1994
酞类	凝集素	PL	呼吸道细胞、肌细 胞	无,腺病毒、 CELO病毒	Batra 1995; Cotten 1993; Yin 1994
Integrin	RGD 肽	OL	Caco-2	氯喹、PEI、腺病 毒	Harbottle 1998; Hart 1995
甘露糖受体	合成配体,糖基 化/甘露糖化	PL	原代巨噬细胞	无 氯喹	Ferkol 1996; Erbacher 1996
未知	疟疾 Circum- sporozoite 蛋白 Circumsporozoite	PL	HepG2、原代肝细 胞、NIH/3T3、K562、 HeLa、CHO	腺病毒	Ding 1995
PIG 受体	反分泌组分	PL	HT29, 支气管上皮	无	Fekol 1995
未知	表面活性剂蛋 白 A, B	PL	H441 (肺腺癌细胞)	无 腺病毒	Baatz 1994; Ross 1995
Tn 碳水化合物	Anti-Tn	PL	Jurkat	氯喹、腺病毒	Thurnher 1994;
CD3	Anti-CD3	PL PEI	Jurkat、H9、CCRF、 CEM、PBL、CIK	氯喹、肽、 腺病毒	Buschle 1995; Finke 1998; Ebert 1997; Kircheis 1997
CD5	Anti-CD5	PL	—	腺病毒	Merwin 1995
CD117	Steel factor Anti CD117	PL	MBO2、MO7e、 TF1、HEL	腺病毒	Schwarzenberger 1996; Zauner 1998
EGF R	EGF, Anti- EGF	PL	NA、A549	无,腺病毒	Chen 1994; Christiano 1996
Her 2	Anti-HER2	PL	—	—	Foster, 1997
Thrombomodulin	Anti-thrombo- modulin	PL	肺内皮细胞	无,脂质体	Turbetzky 1992
神经母细胞瘤 细胞表面 Ig	抗体 Ch CE7 Anti-IgG, Anti-idiotypic	PL	B-LCL、B 细胞淋巴 瘤	无,腺病毒	Coll 1997 Curiel 1994; Schachtsch- abel 1996
Fc R	IgG	PL	B-LCL、肺泡巨噬细 胞	无,腺病毒	Curiel 1994; Rojanasakul 1994

* PL:多聚赖氨酸; OL:寡聚赖氨酸; PEI:聚乙烯亚胺(polyethylimine)。

本表引自 E. Wagner. 1999. Ligand-Polycation Conjugates for Receptor-Targeted Gene Transfer. In: Nonviral Vectors for Gene Therapy, Edited by L. Huang, M-C. Hung and E. Wagner, USA: Academic Press. 207~227.

6) LOP-PCP-EROP 同样可以与 DNA 形成复合物。

以上系统的优点是：

1) 以 LOP 取代大分子配体，减少了配体分子与 PCP 之间的构型干涉；

2) EROP 以 EROP-PCP 形式，与 DNA 结合。所以 LOP-PCP 及 EROP-PCP 与 DNA 形成 LOP-PCP/DNA/EROP-PCP 的基因导入系统，解决了单独的 EROP 不能到达靶细胞的问题。

3) LOP-PCP/DNA/EROP 以 100~150nm 的颗粒形式存在。这种颗粒既具有三种功能：一是识别受体，二是携带外源基因的 DNA，三是进入细胞形成内吞小泡后，从小泡释放，防止小泡与溶酶体融合而引起的降解，从而大大提高表达的效率。

4) 这种导入系统根据靶细胞所表达的受体，不仅在体外可高效导入靶细胞，而且可在动物体内，通过静脉给药，将外源基因带入靶细胞而发挥作用。

5) 根据不同受体，可以设计不同的 LOP。因此，可以形成平台技术的潜力。

6) 上述系统，同一 LOP 的系统，可以携带至少两种外源基因的 DNA；同样，具有应用两种或两种以上 LOP 系统，携带同一种外源基因 DNA 以增强其体内转染效率。

以上系统将在“非病毒载体”章节中详述。

1999 年 4 月，法国 Mir 等报道了应用电脉冲结合肌内注射裸 DNA，可使外源基因在骨骼肌内高效表达。若基因编码分泌性蛋白，可释入血液并达到相当高的水平，而且持续相当长的时间。这种导入方法，虽然不是靶向性的，但对于导入分泌性蛋白的基因，无疑是技术上的重要突破。人们预期在 21 世纪的前 10 年，对某些基因来说，有可能出现以 DNA 药物取代基因工程多肽药物的可能性，即进入“基因药物”的时代。

(二) 外源基因表达的可控性

这是目前基因治疗中十分关键的问题。尤其是，最近电脉冲介导裸 DNA 技术的改进，使许多基因，如分泌性蛋白的基因(包括生长因子、激素、细胞因子，可溶性受体)可导入肌肉并可维持相当时间的表达，其量有可能达到发挥药效的水平。随着进入细胞膜的寡肽(HIV TAT 转录因子的 N'端十一肽)的融合(Schwarze *et al.* 1999)，今后有望通过融合基因形式的组建，解决非分泌性蛋白的表达及进入细胞的问题。预期有一天，许多基因可以在人体中表达。但如果这些基因导入后表达处于无调控状态，将会造成严重后果。因此，基因导入后，在体内的可调控性或可诱导性将成为关键。

最理想的可控性是模拟人体内基因本身的调控形式。这是今后长期的追求目标，但其难度极大，一是需要全基因或包括上下游的调控区及内含子。对于导入基因的载体系统将面临严峻的挑战。因为，目前的质粒及一般噬菌体很难达到以上要求。今后设计的载体须有几十个 kb 甚至上百 kb 的包装能力，同时又涉及存在重复序列时的 DNA 重排及丢失问题。二是一个长片段进入细胞及其整合，涉及整合的位点。最终的理想是实现定点插入(knock in)。预期，可能首先在 *ex vivo* 获得成功；但在 *in vivo* 要达到这一目的，将有一个漫长的过程。

从近期来说，可以期待实现的，仍然是在 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，这将是较为现实的估计。这样，部分(或小部分)基

因,导入体内后,可通过诱导来控制表达。

表 1-5 基因表达诱导系统

诱导系统	诱导剂	应用	诱导效率
热激	热	细胞培养(Wurm <i>et al.</i> 1986)	低
甲基硫蛋白	重金属	组织培养(Mayo <i>et al.</i> 1982)	低
甾体受体	雌激素及 糖皮质激素	组织培养(Hunes <i>et al.</i> 1981; Lee <i>et al.</i> 1991; Braselmann <i>et al.</i> 1993; Hu and Davidson 1987)	高
Lac repressor 操纵子	IPTG	组织培养(Hu and Davidson, 1987; Brown <i>et al.</i> 1987; Deuschle <i>et al.</i> 1989; Labow <i>et al.</i> 1990; Baim <i>et al.</i> 1991)	高
四环素	四环素及 衍生物	组织培养(Gossen and Bujard 1992; Gossen <i>et al.</i> 1994,1995; Shockett <i>et al.</i> 1995) 转基因小鼠(Shockett <i>et al.</i> 1995) 植物(Weinmann <i>et al.</i> 1995; Roder <i>et al.</i> 1994)	
蜕皮激素(ecdysone)	Muristerone	组织培养(Christopherson <i>et al.</i> 1992)	很高
Gal4 DNA 结合区- VP16-孕酮受体配体结 合区(突变)融合蛋白	RU486 (孕酮拮抗剂)	Tsai 等(Burch and Wang <i>et al.</i> 1998) 组织培养 转基因小鼠	很高 多种用途

本表引自:Chua *et al.* 1999。

20 世纪 90 年代已有不少尝试,表 1-5 中列举了已经应用过的诱导系统,其基本原理见图 1-1。其中大部分仅在体外有效,包括热激蛋白、金属硫蛋白、甾体激素受体、Lac 阻遏物/操纵子、蜕皮激素(ecdysone)系统等。四环素系统,在体外系统中已被广泛应用,并已应用于转基因动物系统(Shoekette *et al.* 1995)。最值得重视的是 Tsai 等所建立的酵母 *gal 4* 系统。该系统在目的基因上游区接上 *gal 4* 的顺式元件,所应用的激活蛋白是一个孕酮受体的变体/疱疹病毒 VP16/*gal 4* DNA 结合区。

上述融合基因的产物(蛋白)中,孕酮受体的变体(PR-LBD Δ)为 819 个氨基酸,它只能被孕酮的拮抗剂(RU486)所结合而不与孕酮或其他衍生物结合。VP16 为 HSV VP16 蛋白中具有很强激活能力的功能区。*gal 4* 的 DNA 结合区可结合于治疗基因上游区 *gal 4* 顺式元件。在不存在 RU486 的条件下,该系统中治疗基因的表达本底达到最低水平;而给予 RU486 后,RU486 与 PR-LBD Δ 结合使 VP16 激活,融合的激活蛋白形成双体并通过 *gal 4* DNA 结合区与治疗基因上游区的 *gal 4* 顺式元件结合而启动治疗基因的表达。近年来该系统又有不断改进。如在 N'端加上 10~34 个谷氨酰胺(polyQ),或将 VP16 移至 C 端,或将 PB-LBD Δ 延长了 23 个氨基酸等均可进一步增强其活性。

尤其值得提出的是,该系统在人生长激素(hGH)转基因小鼠中,以 100 μ g/kg 体重剂量的 RU486 可诱导小鼠 hGH 表达。此外,VP16 尚可用其他组织专一性转录因子如肾脏转录因子 Kid-1 的 kruppel 相关 box KRAB,或其他因子如组蛋白去乙酰化酶代替,具有抑制某些基因表达的潜在可能性。

(三) 治疗基因过少

目前,在已用于临床试验的治疗基因仅集中于少数基因。尤其是,对极大部分多基因

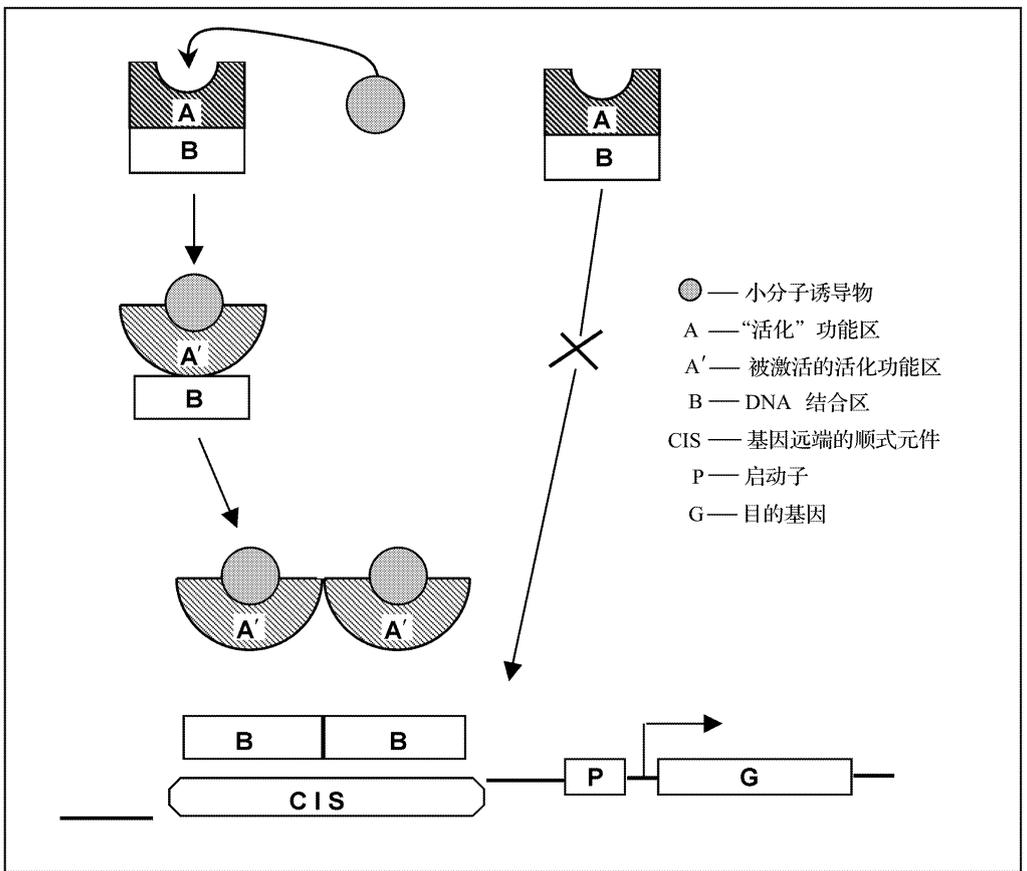


图 1-1 导入基因的表达诱导框架图

疾病,如恶性肿瘤、高血压、糖尿病、冠心病、神经退行性疾病的致病基因还有待阐明。这将有赖于人基因组计划,尤其是功能基因组学的发展。这不仅限于这些致病基因的发现,同时也包括已知和目前尚未知功能的基因的表达调控序列的确定,以及其相互作用规律的阐明。可以预期,21 世纪以上方面将会有十分重要的进展和突破。

六、展望与结束语

从前文所述,对 21 世纪的基因治疗的发展,大体上可作以下推测:

1) 在 21 世纪的前 10 年,将会有少数临床试验方案取得疗效。第一批基因治疗的产品可能上市。

2) 在今后 20 年中,随着基因导入系统、表达调控元件以及新的治疗基因的发现,在恶性肿瘤等疾病中,基因治疗将会成为综合治疗的一员,对防止转移、复发可能会有它重要的地位。

3) 随着以电脉冲技术的完善和表达调控系统的突破。基因药物,即基因 DNA 通过肌内导入而表达并分泌其蛋白质产物,将成为基因工程多肽药物的重要竞争者和基因治

疗延伸的重要疆域。

4) 随着进入细胞的寡肽的发现(肯定不会只限于 HIV 的 TAT N'端十一肽),不少非分泌性蛋白,也将可以组建融合基因,从而通过基因工程表达,形成新的基因工程多肽药物。届时,基因治疗和基因工程的相互竞争局面将会出现。最后的结果,可能以各种基因的具体情况来判断孰优孰劣。其后果对现有的企业和投资者将会造成最大动荡,但最后得益者都是临床和病人,这毕竟将令人欣慰。

我国基因治疗研究,起步虽然较晚,但起点不低。只要扎实苦干,少说空话,多做实事,一定会大有可为,造福于人类。

参考文献

- 田培坤,任圣俊,顾健人. 1998. 一种新的以细胞表面受体为靶向的基因导入系统. 中国科学 C 辑, 28(6):554~560
- 任常春,田培坤,顾健人. 1997. 细胞周期素依赖的蛋白激酶抑制剂诱导肝癌细胞凋亡. 科学通报, 42(22):2428~2432
- 顾健人. 1995. 我国基因诊断与治疗的前景及有关问题. 中华医学杂志, 75(9):517~518
- 顾健人. 1996. 论肿瘤生物治疗研究中的若干问题. 中华医学杂志, 76(9): 643
- Anderson W F. 1992. Human gene therapy. Science, 256:808~813
- Chua S S, Burcin M M, Wang Y *et al.* 1999. A novel gene regulatory system. In: Huang L, Hung M-C and Wagner E, ed Nonviral vectors for gene Therapy. USA:Academic Press, 409~426
- Culver K W, Berger M, Miller A D *et al.* 1992. Lymphocyte gene therapy for adenosine deaminase deficiency. *Pediatr. Res.* 31, 149A
- Mir L M, Bureau M F, Gehl J *et al.* 1999. High efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci USA*,96: 4262~4267
- Rosenberg S A, Aebersold P, Cornetta K *et al.* 1990. Gene transfer into human; Immunotherapy of patients with advanced melanoma using tumor infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *New Engl J Med*, 323:570~578
- Schwarze S R, Ho A, Vecero-Akbani A *et al.* 1999. *In vivo* protein transduction; delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science*, 285: 1569~1572
- Wagner E. 1999. Ligand-polycation conjugates for receptor-targeted gene transfer. In: Huang L, Hung M-C and Wagner E ed. *Noviral Vectors for Gene Therapy*. USA:Academic Press, 207~227
- Wu G Y and Wu C H. 1988. Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J Biol Chem*, 262: 4429~4432
- Wu Y, Zhan P, Sze L L *et al.* 1994. Incorporation of adenovirus into a ligand-based DNA carrier system results in retention of original receptor specificity and enhances targeted gene expression. *J Biol Chem*, 269:11542~11546

(顾健人)

病毒载体概述

基因导入系统(gene delivery system)是基因治疗的核心技术,可分为病毒载体系统和非病毒载体系统。本章主要论述用于人类基因治疗的病毒载体系统。

用于基因治疗的病毒载体应具备以下基本条件:

- 1)携带外源基因并能包装成病毒颗粒;
- 2)介导外源基因的转移和表达;
- 3)对机体不致病。

然而,大多数野生型病毒对机体都具有致病性。因此需要对其进行改造后才能用于人体。原则上,各种类型的病毒都能被改造成病毒载体。但是由于病毒的多样性及与机体复杂的依存关系,人们至今对许多病毒的生活周期、分子生物学、与疾病发生及发展的关系等的认识还很不全面,从而限制了许多病毒发展成为具有实用性的载体。近 20 年来,只有少数几种病毒如反转录病毒(包括 HIV 病毒)、腺病毒、腺病毒伴随病毒、疱疹病毒(包括单纯疱疹病毒、痘苗病毒及 EB 病毒)、甲病毒等被成功地改造成为基因转移载体并开展了不同程度的应用。

一、病毒载体产生的原理

病毒载体的产生建立在对病毒的生活周期和分子生物学认识的基础之上。研究病毒载体首先要对病毒的基因组结构和功能有充分的了解,最好能获得病毒基因组全序列信息。病毒基因组可分为编码区和非编码区。编码区基因产生病毒的结构蛋白和非结构蛋白;根据其对病毒感染性复制的影响,又可分为必需基因和非必需基因。非编码区中含有病毒进行复制和包装等功能所必需的顺式作用元件。

各种野生型病毒颗粒都具有一定的包装容量,即对所包装的病毒基因组的长度有一定的限制。一般来说,病毒包装容量不超过自身基因组大小的 105%~110%。

基因重组技术的发展使病毒载体的产生成为可能。最简单的做法是,将适当长度的外源 DNA 插入病毒基因组的非必需区,包装成重组病毒颗粒。比如,本实验室曾将 4.5kb 的 *lacZ* 基因表达盒(CMV-*lacZ*-polyA)插入 HSV-1 病毒的 *UL44*(编码糖蛋白 C)基因的 *Xba* I 位点中,病毒基因组的其余部分不改变,构建成重组病毒 HSV1-*lacZ100*(吴小兵等 1998)。由于 *UL44* 基因产物对于 HSV 病毒在培养细胞中产毒性感染是非必需的,因此,该重组病毒可以在细胞中增殖传代。用这种重组病毒感染细胞,能将 *lacZ* 基因带入细胞并高效表达。用同样的方法,将 AAV-2 病毒的 *rep* 和 *cap* 基因片段

(4.3kb)插入 HSV-1 病毒的基因 *UL2*(编码尿嘧啶 DNA 糖基化酶)或 *UL44*(编码糖蛋白 C)中,构建成具有提供重组 AAV 载体复制和包装所需的全部辅助功能的辅助病毒 rHSV-rc(伍志坚等 1999)。

然而,这样的重组病毒作为基因转移载体有许多缺点。首先,许多野生型病毒通过在细胞中产毒性复制而导致细胞裂解死亡;或带有病毒癌基因而使细胞发生转化。因此必须经过改造使其成为复制缺陷性病毒并且删除致癌基因后才能用于基因治疗。其次,插入外源 DNA 的长度受到很大限制,尤其对于基因组本身较小的病毒如腺病毒伴随病毒(AAV,4.7kb)、反转录病毒(8~10kb)、腺病毒(36kb),如果不去除病毒基因,可供外源 DNA 插入的容量就十分小。因此,必须删除更多的病毒基因以腾出位置插入较大的外源 DNA。为了增加病毒载体插入外源 DNA 的容量,除了可以删除病毒的非必需基因外,还可以进一步删去部分或全部必需基因,这些必需基因的功能由辅助病毒或包装细胞系反式提供。

病毒载体大体上可分为两种类型:

(一) 重组型病毒载体

这类载体是以完整的病毒基因组为改造对象。一般的步骤是选择性地删除病毒的某些必需基因尤其是立早基因或早期基因,或控制其表达;缺失的必需基因的功能由互补细胞反式提供;用外源基因表达单位替代病毒非必需基因区;病毒复制和包装所需的顺式作用元件不变。这类载体一般通过同源重组方法将外源基因表达单位插入病毒基因组中。如在传统的重组腺病毒构建方法中,将外源基因表达盒(exogenous gene expression cassette)插入穿梭质粒(如 pXCX2 或 pFGdX1)的腺病毒同源序列中,与辅助质粒(含有腺病毒基因组的质粒如 JM17 或 pBHG)共转染 293 细胞,通过细胞内的同源重组获得含有外源基因的重组腺病毒(Graham and Prevec 1995)。

(二) 无病毒基因的病毒载体

无病毒基因的病毒载体(gutless vectors)在不同的病毒载体系统中的称谓不同。对于腺病毒,一般称为 mini-Ad;在 HSV 载体系统,一般称为扩增子(amplicon)载体或质粒型载体。重组 AAV 载体也属于无病毒基因的病毒载体。这类载体系统往往由载体质粒和辅助系统组成。重组载体质粒主要由外源基因表达盒、病毒复制和包装所必需的顺式作用元件及质粒骨架组成。辅助系统包括病毒复制和包装所必需的所有反式作用元件。在辅助系统的作用下,重组载体质粒(包含或不包含质粒骨架)以特定形式(单链或双链, DNA 或 RNA)被包装到病毒壳粒中,其中不含有任何病毒基因。这类病毒载体的优点在于载体病毒本身安全性好,容量大。缺点在于往往需要辅助病毒参与载体 DNA 的包装,而辅助病毒又难以同载体病毒分离开来,造成最终产品中辅助病毒污染,从而严重影响其应用。实际上,无病毒基因的病毒载体可以看作是重组病毒载体的一种极端减毒情况。

表 2-1 列举了几种常见的病毒载体的顺式作用元件和经典的包装方式。

表 2-1 病毒载体的顺式作用元件和经典包装方式

载体	顺式作用元件	经典包装方式
反转录病毒载体	1) 两个长末端重复序列(LTR):含有整合和调节转录的必需序列;含有转录增强子和启动子; 2) tRNA 引物结合位点 p; 3)包装信号序列 ψ	载体质粒转染整合了所有必需基因(<i>gag</i> , <i>pol</i> , <i>env</i>)的包装细胞系如 PA317,经选择培养获得产病毒细胞系(VPC);细胞不裂解,病毒不断分泌至培养上清中
腺病毒载体	两个末端反向重复序列(ITR); 包装信号序列	载体质粒与辅助质粒共转染 293 细胞获得重组腺病毒。重组腺病毒感染 293 细胞而扩增;细胞每次被感染后发生裂解
腺病毒伴随病毒载体	两个末端反向重复序列(ITR);其中包括了病毒复制起点、包装信号及整合和拯救所必需的顺式元件	AAV 载体质粒和辅助质粒共转染 293 细胞,并加辅助病毒(腺病毒或单纯疱疹病毒)感染
单纯疱疹病毒载体	HSV 病毒复制起点 <i>ori</i> ; 病毒包装信号 <i>pac</i>	重组病毒在互补细胞上传代;扩增子病毒在辅助病毒存在下传代

二、病毒载体的包装系统

将外源基因包装到病毒壳粒中,是病毒载体生产的核心技术。一般来说,病毒载体的制备包括以下要素:

(一) 宿主细胞

虽然现在已有可能对有些病毒载体(如 AAV 载体)进行体外(无细胞)包装(Zhou *et al.* 1998; Ding *et al.* 1997),但是这种包装系统仍然需要细胞提取物,并且包装效率相当低,远远达不到可生产水平。至今为止,病毒载体的包装主要是在对该病毒敏感的宿主细胞中进行的。宿主细胞不但提供了病毒复制和包装的环境条件,它的许多细胞成分还直接参与了病毒的复制和包装过程。

(二) 病毒复制和包装所必需的顺式作用元件和外源基因的表达盒

一般来说,病毒复制和包装所必需的顺式作用元件和外源基因的表达盒,由细菌质粒携带并组成病毒载体质粒,是被包装的对象。由于病毒复制方式的不同,有些病毒载体如单纯疱疹病毒扩增子(HSV amplicon)载体在包装时,整个载体质粒都被包装进入病毒颗粒中;而有些病毒载体如反转录病毒、腺病毒伴随病毒载体的质粒骨架部分并不被包装到病毒颗粒中,只有病毒复制和包装所必需的顺式作用元件和外源基因表达盒被包装到病毒颗粒中。

构建重组型病毒载体时,病毒复制和包装所需的顺式作用元件存在于病毒基因组中(病毒基因组可以由具有感染性的病毒颗粒提供,也可以质粒形式提供)。先将外源基因表达盒插入穿梭质粒携带的病毒同源序列中,将重组穿梭质粒转染至细胞中,再用辅助病

毒超感染;或将重组穿梭质粒与病毒基因组质粒共转染细胞;重组质粒与病毒基因组在细胞中进行同源重组而产生表达外源基因的重组病毒。重组腺病毒(Graham and Prevec 1995)和重组单纯疱疹病毒(Pyles *et al.* 1997;Kramm *et al.* 1997)的传统制备方法都是采用这种方式。

为了使病毒载体的生产更为方便,病毒复制和包装所必需的顺式作用元件和外源基因的表达盒除了可以用质粒携带以外,也可以用另一种病毒(往往是辅助病毒)或生产细胞来携带。

(三) 辅助元件

包括病毒复制和包装所必需的所有反式作用元件。这些元件一般包括病毒基因转录调控基因、病毒 DNA 合成和包装所需的各种酶类的基因、病毒的外壳蛋白基因等。辅助元件的表现形式可以多种多样。常用的形式有:

- 1) 辅助质粒(helper plasmid),如用于产生重组腺病毒的质粒 JM17,用于重组 AAV 包装的辅助质粒 pAAV/Ad(Rolling and Samulski 1995)等;
- 2) 辅助病毒(helper virus),如用于 HSV 扩增子载体包装的辅助病毒 HSV1 tsK 株;
- 3) 包装细胞系如用于反转录病毒载体包装的 PA317 细胞。

这些表现形式之间可以相互转化或合并。例如,辅助病毒可以转化为辅助质粒:传统的 AAV 载体生产系统常用腺病毒作为辅助病毒。研究发现,并非腺病毒的所有基因对 AAV 病毒的产生都是必需的,只需要腺病毒 *E1a*、*E1b*、*E2a*、*E4* 和 *VA RNA* 5 种基因就行了。因此,将这 5 种基因置于同一个质粒中,构建成的这种新的辅助质粒就完全可以替代原来的辅助病毒(Xiao X *et al.* 1998; Grimm D *et al.* 1998),不但提高了包装效率,而且避免了产品中腺病毒污染的问题。

上述几种要素的不同组合,便产生了各种各样的病毒载体包装策略。根据病毒载体生产系统的组成因素的多少,可将其分成以下几种:

1. 单组成因素生产系统

单组成因素生产系统(one-component system)的组成成分都集中在生产细胞中。经典的反转录病毒生产系统就是由产病毒细胞(VPC)组成,重组反转录病毒由 VPC 细胞不断分泌至培养上清中。系统操作最为简单,但是往往产量不高或不稳定。采用这种策略,需要将重组病毒产生所需要的所有元件都稳定地置于生产细胞中。由于许多病毒基因产物本身对细胞有破坏作用或不能在细胞中稳定表达,因此这种策略在许多病毒载体的生产中难以实施。

2. 双组成因素生产系统

双组成因素生产系统(two-component system)一般由“一株病毒/一株细胞”组成。典型的例子是重组腺病毒生产系统。先用共转染的方法获得重组腺病毒毒种,再由该毒种和生产细胞(如 293 细胞)组成一个双组成因素的生产系统使病毒大量扩增。

3. 多组成因素生产系统

多组成因素生产系统(multi-component system)是由两种以上的组成因素组成的生产系统。传统的 AAV 载体生产系统就是由载体质粒、辅助质粒、辅助病毒和生产细胞 4 种因素组成。这种策略的缺点是影响因素多,操作复杂,产量不容易稳定,不利于大规模生产。

以上各种生产系统也可以相互转化。我们实验室通过将上述 AAV 载体生产系统的 4 种因素进行两两合并,即将辅助质粒和辅助病毒合并成一种重组的辅助病毒,将载体质粒和生产细胞合并成 AAV 前病毒细胞株,成功地将其转化成一种双组成因素的新型高效生产系统(伍志坚等 1999)。

一般来说,发展新的包装策略主要是为了以下几种目的:

- 1) 减少生产系统中的组成因素,简化操作过程;
- 2) 提高生产效率,降低生产成本;
- 3) 避免或降低野生型病毒的产生;
- 4) 避免使用难以与产品病毒分离的辅助病毒。

三、病毒载体的纯化方法

重组病毒的纯化与基因工程产品的纯化既有许多共性,又有显著的不同之处。病毒可以看作是一个具有特定结构的生物大分子,一般都由位于中心的核酸和包裹于其外的蛋白质外壳组成。有些病毒还具有脂质膜和糖蛋白或糖脂。许多分离纯化蛋白质的方法如离心和梯度离心、盐析、柱层析、超滤、透析等方法都可用于病毒的纯化。然而,由于病毒结构的复杂性,纯化时不能采用蛋白质变性和复性的方法,因为一旦病毒蛋白发生变性,或病毒结构发生破坏,在体外就很难再重建成有感染性的病毒颗粒。因此,在病毒的纯化过程中必须保持病毒的结构不受破坏,并且监测其感染活性。

病毒的纯化一般分为以下几个步骤:

(一) 初始物的收集或制备

根据病毒产生方式的不同而采取不同的方式。对于不导致细胞病变和死亡的病毒如反转录病毒,可不断收集产毒细胞(VPC 细胞)的培养上清作为初始物(start material);对于在生产病毒过程中宿主细胞发生病变和死亡的病毒如腺病毒,在病毒产生达到高峰时,收集培养上清,并裂解细胞以释放细胞内的病毒。

培养上清和细胞裂解液都可作为纯化的初始物。在实验室的小规模制备中,往往采用将培养上清与细胞一起反复冻融 3~4 次的方法制备细胞裂解液作为初始物。对于初始物体积大于 500ml 的较大规模的制备,则需要考虑采用不同初始物的损益率。如果收集时大部分(90%以上)目标病毒仍存在于细胞中,为了减少操作大体积初始物带来的不便,可以考虑放弃上清中含有的目标病毒,而通过低速离心收集细胞,重悬于较小体积的缓冲液中进行细胞裂解制备细胞裂解液。对于腺病毒和 AAV 病毒的大规模制备都可以