

讲
座

医学分子遗传学

第十讲 基因治疗

薛京伦

(复旦大学遗传学研究所,上海)

基因治疗是人类征服遗传性疾病最有希望的手段。基因治疗是指通过遗传操作直接在基因水平上治疗由基因突变所引起的遗传性疾病。进行基因治疗有两个基本策略:(1)原位修复有缺陷的基因;(2)将有功能的正常基因转移到疾病细胞或个体基因组的某一部位上以替代缺陷基因发挥作用。目前条件下,后者是比较容易着手的一种基因治疗策略,也称为基因替代疗法。在早期进行基因治疗尝试时,最适合的对象应当是一些产物量无需精确调节,同时又经常开放的基因。首选对象有(1)次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HPR T),由于这种酶的缺乏,在人类中可引起自毁容貌症;(2)嘌呤核苷磷酸酶(PNP),此酶的缺乏可在人类中引起一种严重的免疫缺陷病;(3)腺苷脱氨酶(ADA),这种酶的缺乏可导致严重的联合型免疫缺陷症。上述三种病的临床症状都很严重,它们的纯合子缺陷型的骨髓细胞中都检测不出这些酶。人体对这些酶的需求量并不高,少量的酶就可以满足需要。同时,即便是产生过量一些酶,对细胞也没有什么有害效应。这意味着表达的调节需求并不严格。此外,这三种酶基因都已在体外克隆,并获得了cDNA,这就为实现基因转移打下了基础。然而,上述三种单基因病在人群中的发生率极低,均属罕见疾病。因此作为研究来说,选择这些病具有很大的优越性,但联系实际临床应用,则仍需选择更为合适的疾病。尤其是应当选择有一定发病率,危害较大,同时又符合基因治疗基本条件的疾病。我国已将血友病列为基因治疗的首选对象。实现基因治疗有三个基本步骤:(1)目的基因的转移;(2)目的基因的表达;(3)安全措施。基因治疗的靶细胞可分为两大类:体细胞和生殖细胞。将遗传物质引入体细胞进行基因治疗的方法称为体细胞基因治疗;以生殖细胞为对象的基因治疗称为生殖细胞基因治疗。从理论上说,进行生殖细胞基因治疗,能使生殖细胞中的缺陷基因得到矫正,使遗传性疾病不但能在当代得到治疗,而且还能将新基因传给患者的后代,使遗传性疾病最终得到根治。然而,生殖细胞的基因治疗涉及到一系列的伦理学问题,不易为人们所接受。同时,生殖细胞系统也更为复杂,一有差错,将给后代造成非常严重的后果。因此,目前的基因治疗只局限于

在体细胞中进行研究。目前供选择的体细胞有骨髓干细胞,皮肤成纤维细胞以及肝脏细胞等。

目的基因的转移

能适用于基因治疗的基因转移技术有4种方法:

1. 病毒方法是利用病毒作为基因转移的载体系统。有两种方法:(1)重组反转录病毒介导的基因转移;(2)重组DNA病毒介导的基因转移。一个理想的传递系统不仅是稳定的,而且还应具有组织特异性。当遗传病发生于造血系统时,可以考虑处理离体的骨髓。目前,除了皮肤细胞之外,还不能切除、处理的置换其他组织。由于许多病毒只能感染特异的组织,含有外膜糖蛋白的逆病毒颗粒(只识别人的造血干细胞),可以通过静脉注入患者体内。反转录病毒载体除了感染骨髓细胞之外,感染其他细胞的危险性很少。这种特异性使得能对诸如肝或大脑进行个别处理。此外,它可消除感染生殖细胞的危险性。但是,细胞复制看来是整合作用所必需的,所以反转录病毒也许不能感染不分裂的脑细胞。最好的系统不仅应能把载体送入所选择的细胞内,而且还应能使载体到达一个预定的染色体位点。在低等动物容易做到以同源重组法特异地插入染色体的一个选择位点,但在哺乳动物中要困难得多。现有的证据表明,哺乳动物同源特异位点的整合水平很低。DNA病毒介导的基因转移方法,还有许多问题有待进一步研究,即使在动物模型中的试用,也尚待研究。

2. 化学方法是利用高分子量DNA或纯化基因的磷酸钙微量沉淀法来转移遗传信息。优点是能引入高纯度的和特性明确的基因顺序。对于基因治疗来说,染色体介导的基因转移方法不是一种很有效的方法。

3. 膜融合方法进行基因转移常用的有:(1)原生质体融合;(2)微细胞融合;(3)脂质体融合;(4)血影红细胞融合。

1980年Walter Schaffner报道了插入新遗传信息的高效技术,把含有已插入病毒基因顺序的重组质粒引进大肠杆菌。这些质粒在每个细菌细胞内复制50—100个拷贝,随后用溶菌酶剥离细菌细胞壁,制成原生

质体球。再将这种含有重组质粒的原生质体球与哺乳动物靶细胞融合。因为原生质体球对靶细胞的比例是 10,000:1, 所以该法可将大量的新基因直接引入受体细胞的细胞质内, 用这一技术的转化效率可达 1—6%。

微细胞融合是指在核膜内只含有单个染色体或一小群染色体。用秋水仙素处理组织培养的细胞, 从而阻止有丝分裂, 就可制得微细胞。在细胞表面, 染色体聚集成似葡萄串样的微细胞, 在细胞松弛素 B 的作用下, 通过高速离心, 能与细胞质分开, 一旦分离得到微细胞, 就可通过仙台病毒促使它与受体细胞融合。单个染色体或有限数目的染色体在转化后可以在杂交细胞中保持下去。

脂质体融合是用磷脂或胆固醇与卵磷脂制成的小囊, 把 DNA 或染色体包在里面, 通过细胞的吞噬作用(或与细胞膜相融合)而把内含物转入受体细胞。脂质体制备方便, 比较稳定, 毒性低, 能保护被包住的核酸不被降解, 转移频率在 10^{-1} 左右。优点是可以把正常情况下无法进入细胞的物质送进细胞。例如, 有些细胞不属于某种病毒的宿主范围, 但可被脂质体包住的病毒感染。脊髓灰质炎病毒包在脂质体里, 就可感染没有脊髓灰质炎病毒专一性表面受体的非灵长类细胞。

血影红细胞融合是利用红细胞在低渗溶血开始后 12—25 秒内会出现直径为 200—500 Å 的小孔, 此时周围溶液中的待装载高分子物质可以通过小孔进入红细胞。外源物质进入的量, 取决于它的扩散速度。红细胞的质膜在低渗溶血后重新恢复其不可通透性, 使装入的外源物质不会释放出来。这样制成的血影红细胞可通过细胞融合, 把装载的物质转入受体细胞。从人体血液中可制备出无数个血影红细胞, 在装载需要转移的高分子物质后可重新注入这个人体内。血影红细胞与受体细胞间的融合率很高, 且不会产生免疫反应。利用血影红细胞转移基因治疗遗传病或装载药物等, 有着诱人的前景。

4. 物理方法是利用显微注射法和电击穿透法两种主要的物理技术。电击法是一种新技术, 它借助电流把 DNA 直接穿过细胞膜, 把各种基因转移到各种不同细胞。显微注射法已沿用多年, 其优点是效率高。缺点是一次只能注射一个细胞。转基因小鼠的育成是显微注射技术最成功的一个例子。但这种技术在人类遗传病的基因治疗中用途非常有限。

新基因的表达

评价人类基因治疗方案的第二个标准是, 新基因在目标细胞中的正确表达。当传递系统把一个外来基因转移到细胞 DNA 时, 最主要的问题是应使整合的 DNA 发挥功能。

1. 利用外源活性启动子增强表达 将目的基因与应答激素或重金属的启动子顺序连接。植入基因的转录, 可通过给予适合的激活素或重金属离子的浓度变化进行调节。

2. 反转录病毒载体的表达 用反转录病毒进行基因转移, 可以利用它本身的 LTR 转录信号。已有多个实验室用反转录病毒载体把外源基因转移到骨髓细胞内, 并得到表达。问题是这种传递表达系统的效率很低。如果有 15% 细胞被感染, 其中只有 4—23% 得到正常表达, 那么它们所合成的酶是否对患者有益? 另一个问题是, 经处理的细胞在患者体内是否具有选择生长优势。由于缺乏遗传病的动物模型, 这种选择生长优势是很难证明的。

3. 用增强子提高表达 增强子是长度为 50—150bp 的 DNA 顺序, 它能使邻近基因的表达提高 10—1000 倍。反转录病毒有它自己的增强子, 位于启动子之旁, 已知增强子具有种族特异性。对于为人类基因治疗而设计的反转录病毒载体来说, 人们需要的是灵长类动物的增强子顺序, 而不是现在使用的小鼠增强子顺序。除了增强子识别细胞因子之外, 无疑还有其他调节区段, 关于多基因的调节信号还需深入研究。

4. 质粒表达载体的表达 如果采用化学技术作为基因转移传递系统, 那么必须把外来基因插入一个适当的表达载体。这种表达载体把所需的 cDNA 与调节信号一起插入质粒内(常用的是 pBR322)。一个典型表达载体可能包含一个启动子(如小鼠金属硫基因, MT), 选择的 cDNA, 一个拼接位点和聚腺苷酸作用位点(这是正确的转录 RNA 过程所必需的)和增强子。

5. 基因组控制信号的调节 以质粒为基础的表达载体, 或者反转录病毒载体, 能不能用于转移那些受基因本身的基因组调节顺序控制的基因? 在某些情况下, 在转基因小鼠中, 以质粒为基础的表达载体, 确实能对正常生理控制信号发生反应。金属硫因启动的基因主要在肝脏表达(肝脏是金属硫基因合成的组织), 但它能被钙诱导而对类固醇(体内另一种生理诱导物)不发生反应。免疫球蛋白基因在脾脏表达, 在肝脏不表达。小鼠-人 β 球蛋白融合基因在造血组织表达。在组织培养细胞中, 许多以质粒为基础的表达载体有一定的正常调节作用。因此, 我们可以用基因组的调节信号(这是在目标细胞内正确控制表达所必须的)来组建载体。今后, 一个传递和组合系统可以利用反转录病毒的选择部分, 通过外源基因自身的基因组调节信号, 来控制其表达。

安全措施

在将基因治疗技术正式应用于人体试验之前, 必

须保证转移—表达系统绝对安全,使新基因在宿主细胞表达后不危害细胞和人体自身。特别是当将反转录病毒载体用于基因转移时,尤其要注意。一般在将上述技术应用于人体前必须首先进行以下3项试验,以确保治疗的安全性。

第一个试验,用人骨髓进行试管内研究。应检验被治疗载体感染的骨髓培养物在一定时间内产生重组病毒。应该研究任何离体的有感染力病毒的病原性。

第二个试验,用小鼠进行体内研究。由于许多反转录病毒载体是由小鼠反转录病毒组建的,以及由于把小鼠骨髓植入经致死辐射的小鼠体内研究其表达,所以应该随后研究这些动物,确定基因组重新排列(或者染色体组合的位置)是否会产生任何病毒现象,或者任何有感染力的病毒产生。

第三个试验,用灵长类动物进行体内研究,任何一项打算在人体上应用的治疗方案,都应该首先在灵长类动物上进行试验,因为灵长类动物DNA的内源原病毒顺序与小鼠的内源原病毒顺序不同。任何病毒重组体的性质也可能不同。把经处理的骨髓再植入灵长类动物体内,以证明完整载体DNA成功地转移到造血细胞,并检查基因的表达和有感染力重组病毒的存在。基因治疗的临床试验还必须靠立法来保证其安全性和可靠性。

基因治疗的其他途径

除了基因替代治疗以外,还有一些方法可以通过操纵人体基因,使有功能基因开放或使疾病基因关闭,从而达到治疗遗传性疾病的目的。其中研究得最多的是通过重新激活功能相似的胚胎基因来替代有缺陷的成年基因达到基因治疗的目的。

1. 重新开放有类似功能的基因以替代缺陷基因
在人体内,有一些基因在胚胎期是开放的,在机体发育中起着重要作用,以后随着进一步的发育,它们逐渐被关闭,而由另一些功能相似的基因继续发挥作用。这后一类基因在整个出生后阶段一直都开放。我们把前一类基因称为胚胎基因,后一类基因称为成年基因。这里所说的基因治疗方法是指,当成年基因由于基因突变而丧失正常功能时,可以设法用某种药物激活具有相似功能的胚胎基因,使胚胎基因重新开放,以替代缺陷的成年基因发挥作用。用这一方法进行治疗的最适对象便是血红蛋白病。

2. 利用反义RNA抑制疾病基因的表达
反义RNA(antisense RNA)是指一些能与被其调节的特定mRNA互补的RNA。这种反义RNA能互补的mRNA形成一个双链结构,从而阻止mRNA的翻译。因此,反义RNA能在翻译水平上调节基因的表达,这是一种特殊形式的翻译调控。同时,很快就联想到是否能在体外合成与某些疾病基因或肿瘤基因的mRNA

互补的反义RNA,将它们通过载体(如病毒)导入人体内部,借助这些反义RNA与相应的疾病基因或肿瘤基因的mRNA互补形成双链结构,从而抑制这些有害基因的表达。有人提出,将启动子放在一个克隆基因片段的3'端,以相反方向转录出RNA,这一RNA能与这一基因从5'端转录出的mRNA发生互补,从而抑制mRNA的翻译。最近Amini等将src基因的启动子放在src基因的上游3'端,构建成一个重组质粒,然后将这一重组质粒引入多瘤病毒转化的细胞中,通过分析这些细胞内的pp60^{c-src}含量后发现,由于这一重组质粒的引入,产生反义RNA,使细胞中的c-src表达水平显著降低。这说明,应用反义RNA可以抑制致癌基因的表达。关于反义RNA调节形成的确切机制现在还不清楚,可能是由于RNA-RNA双链结构的形成干扰了mRNA和核糖体的相互作用。最近又发现,反义RNA的诱导产生,能够使互补mRNA明显减少。因此,推测这一机制可能涉及不止一种调节过程。这一机制的最终阐明对基因治疗的发展将起重要作用。

基因治疗的前景

对基因疗法探讨的意义远远超出对遗传性疾病的治疗本身。

从实际情况来看,最早进行人体基因治疗试验是由美国一位科学家和几位医生在联邦德国进行的,病人是姐妹俩,分别为2岁和7岁。由于体内缺乏一种稀有酶——精氨酸酶,体内精氨酸累积,呈现明显的精神痴呆状。他们将肖普氏乳头瘤病毒(一种使兔生疣的病毒)施于患儿,由于这种病毒带有能分解精氨酸的精氨酸酶,结果使患儿病情得到缓解。但这种病毒的潜在危险性,使这一试验不能继续下去。

第二次试验是在1980年由美国医生M. Cline在以色列和意大利进行的,他用加工后的骨髓移植对两名地中海贫血症患者进行基因治疗,非但试验没有成功,还受到各方面的公开谴责。

目前,基因转移的主要目标是那些医生们对之寄予厚望的病症:这些患者应该是那些能在适宜的组织里生长出少量的所需基因的人,其基因产物可以在血液中循环。两种罕见的致死性免疫疾病——ADA缺乏症和PNP缺乏症,都是因患者体内未能产生一种必需的酶所致。生成这两种酶的正常人体基因已经克隆。ADA基因C在肝脏中转移成功,并得到表达,为基因治疗提供了另一条可行的路线。

大量的致病基因得到克隆,各种各样的基因转移手段广泛应用,各种有效载体的构建,各种转基因小鼠的育成,都为人体遗传病的基因治疗提供了坚实的实验基础。但是基因治疗进入临床试验的一个绊脚石是:迄今没有一个人能有把握地让由病毒载体带人人

的骨髓的基因发挥正常功能(表达)。把基因带入细胞,只要病毒载体供应充分是不成问题的,但是该基因得以表达而制造出来的酶太少,因此就在病人身上会无济于事。人们还不清楚,为什么外来基因可在组织培养细胞中表达,然而一旦该基因放入骨髓细胞则很少能表达。这些基因显然已进入细胞,并证明已整合到染色体上,但是什么原因阻碍它们发挥功能呢?

分子遗传学家正在探索如何使基因在新环境中起作用,他们在构造并试验具有不同增强子和启动子的中间寄主。他们认为,反转录病毒的基因顺序,特别是长链的启动因子,可能是在某些细胞中抑制基因表达的起关键作用的蛋白质。他们很想让基因具有自己的内在启动因子而不依赖反转录病毒的启动因子。当前的困难是当改变病毒的长链时,就很难产生该病毒的重组体,而如果由细胞系产生的病毒含量太低,那就很难感染骨髓细胞。

研究细胞的发育阶段可能有助于说明为什么基因在培养物细胞中和动物体内细胞中的遭遇如此不同。干细胞可发育成一系列特定细胞的任何一种,而培养物中的大部分细胞是在分化的较后阶段受阻的。它们已沿着某一途径更进一步发展,如红血细胞。重组体病毒与细胞相遇的阶段也可能影响到病毒把基因带入细胞的能力。反转录病毒原定要感染的是在迅速分裂的细胞,而干细胞可能此时比较沉寂并耐感染。在干细胞下一层的另一类细胞(祖先细胞)似乎分裂得更频繁而更易受感染。也许只有极少数的这类活泼细胞在一定时期内可增多分化的血细胞。如果在遗传上已纠正的这些细胞不先扩散而分化到血细胞,那么病人可能会有一阵好转而后再出现症状。

基因治疗对病人和大众的潜在危险性尚未完全查明,其中主要的问题是“插入突变”。反转录病毒载体是随机地将外来基因插入它所感染的细胞的基因组内,偶而这种插入会改变其他基因的功能。对于残余基因的失活,我们也许尚能耐受,但调节细胞生长式控制其他细胞的生长的基因一旦瓦解,就会带来损伤。重组体反转录病毒治疗的病人有一些可能以后会得癌症。举例来说,每5个人中就可能会有1人发生白血病。但最终将会通过控制重组体DNA对染色体的结合,使新基因到达染色体的正常位置来克服这类突变

的危险。另一个忧心是,该遗传工程处理过的病毒可能从细胞中逃脱而感染他人,甚至闹出像爱滋病之类的新的疾病。其实这种事情是不会发生的,因为这种病毒已事先动过手术,使之产生缺陷。构建出的载体能够去掉其进行繁衍的信息单位,而仅保留其控制结合功能的信息单位。我们还可利用两个缺陷型反转录病毒,构建成一个没有复制能力,类具整合能力的重组反转录病毒。但是,这两种缺陷型在一起时,也有可能重组产生野生型病毒。为减少这类事件的机率,可以把3个不同结构同时突变,然后再把它们转染到细胞系,于是,要产生一个野生型病毒必须要有4个而不光是1个重组事件才行,这样的机率是微乎其微的了。

基因治疗的展望

人类基因治疗的研究已在国际范围内展开。在不到十年的时间里,基因治疗从幻想逐渐走向现实。特别是最近三年的进展,与过去10年相比,又有了质的飞跃。体细胞基因治疗的基本路线已经形成,那就是采取患者的体细胞,在体外用反转录病毒转移目的基因,选择能产生相关蛋白的细胞,输回患者体内。我们有理由相信,这种类型的基因治疗可能在5年左右就会进入临床试验阶段。

然而,还有许多难题摆在我们面前。许多遗传病尚缺乏动物模型;基因的定位导入技术还远没有成熟;导入的基因表达水平还无法控制,甚至是否表达也存在一定的随机性;骨髓干细胞数量太少,并且某些干细胞已经定向分化,不再自身增殖,导入基因会随分化细胞的死亡而被淘汰;肝细胞和皮肤细胞的基因导入路线还没有确立;多基因遗传病和某些特殊组织的遗传病如何进行基因治疗;反转录病毒的安全性问题还没有彻底解决。这一系列问题都是必须先行解决的。

总之,遗传病的基因治疗目前仍如一个孕育中的胎儿,希望在即,但步履维艰,有待全世界科学家如此不懈努力。今天,这一造福全人类的宏大目标已越来越得到社会和广大科学家的支持。进一步加强基础研究和国际间的合作,一定会使人类遗传病基因治疗的目标早日实现。

(全文连载完)