

基因治疗技术

林宇轩 21301050297 临床医学（八年制）

一、基因治疗技术的原理

基因治疗（gene therapy）是指将外源正常基因导入靶细胞，以纠正或补偿缺陷和异常基因引起的疾病，以达到治疗目的的一种技术手段。其纠正的方式有两种，一是原位修复有缺陷的基因，二是用将正常基因转入人体基因组某一部位，以代替缺陷基因发挥作用。基因治疗也包括运用转基因技术将外源基因导入病人的受体细胞，令其制造的产物能治疗某种疾病。广义上说，基因治疗还包括从DNA水平采取的治疗某些疾病的新技术。

基因治疗的提出是疾病治疗理念上的重要突破，与以往的常规治疗方法相比，基因治疗针对的是异常的基因这一疾病根源，而非由基因异常而引发的各种症状，是釜底抽薪的治本之策。

（一）基因治疗技术的不同种类

1. 按基因操作分类

（1）基因修正（gene correction）和基因置换（gene replacement）

基因修正：矫正缺陷基因的异常序列，精确地原位修复异常基因，而不改变基因组其他位点。

基因置换：用正常基因通过体内基因同源重组，原位替换病变细胞内的致病基因，使细胞内基因组完全恢复正常。

（2）基因增强（gene augmentation）和基因失活（gene inactivation）

基因增强：保留异常基因，导入外源基因并使其表达正常产物，从而补偿缺陷基因的功能。

基因失活：将特定的反义核酸，包括反义RNA，反义DNA和核酶导入细胞，特异封闭某些基因转录或翻译，抑制异常基因的表达。

2. 按靶细胞分类

（1）生殖细胞基因治疗（germ cell gene therapy）

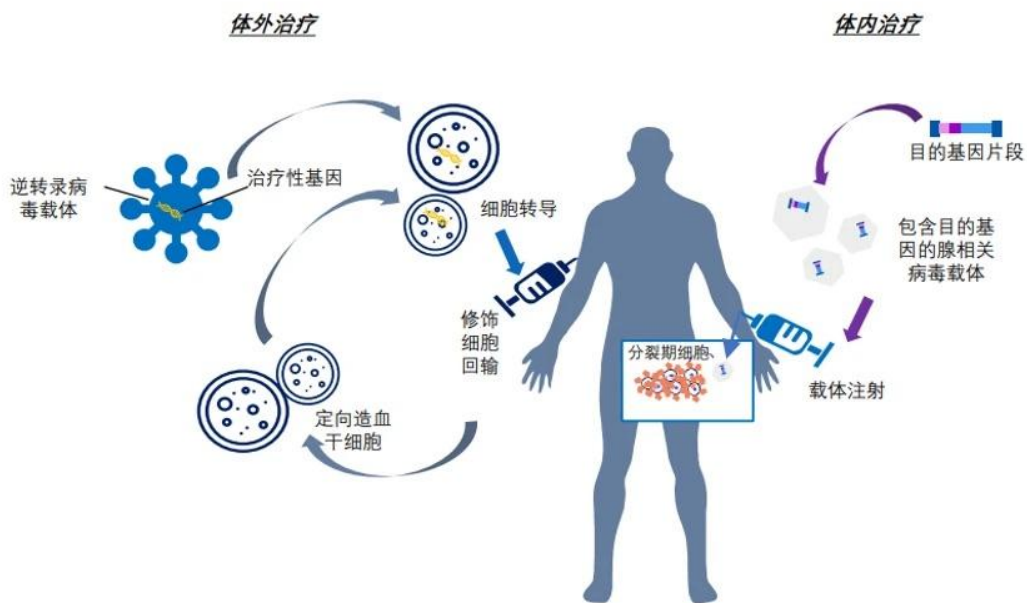
将正常基因导入患者生殖细胞（包括精细胞、卵细胞和早期胚胎）使患者后代获得正常性状。但实际上这项技术没有实质性进展，因为这种基因转移只能用显微注射，效率并不高，而且只适用排卵周期短、排卵次数多的动物，不适用于人

类。且在对人类生殖细胞进行转基因并世代遗传，也触犯伦理问题。

(2) 体细胞基因治疗 (somatic cell gene therapy)

将正常基因导入患者体细胞，使其表达基因产物而达到治疗目的。这种方法的理想措施是将正常基因导入靶体细胞内染色体特定基因座位，用正常基因准确替换异常基因，然而，在特定座位上的转基因还是一项很大的技术困难。一些反转录病毒载体在整合时都有插入基因等倾向，而且经常产生大片段的丢失和染色体重排，不过一种名为“睡美人 (Sleeping Beauty, SB) 的转座系统有望代替病毒，将目的基因安全稳定地整合到基因组，应用前景广阔。

3. 按给药途径分类



(1) 体外治疗 (ex vivo)

将整合了外源基因的载体在体外导入人自体细胞或异体细胞，经体外细胞扩增后输回人体。这种基因专题途径经典而安全，效果较易控制，但是步骤多，技术复杂，难度大，不易推广。

(2) 体内治疗 (in vivo)

将外源基因装配于特定真核细胞表达载体，直接导入患者体内，载体可以是病毒型、非病毒型甚至裸 DNA。这种基因转移途径操作简便，容易推广，但技术还在探索阶段，尚未成熟，且存在疗效持续时间短，免疫排斥及安全性等一系列问题。

(二) 基因治疗的基本程序

1. 目的基因的选择和制备

这是基因治疗的首要问题，可用于基因治疗的目的基因需满足的条件包括：

(1) 目的基因在体内少量表达就能显著改善症状，且目的基因的过量表达不会对机体造成危害。

(2) 在抗病毒和病原体的基因治疗中，靶基因在病毒和病原体的生活史中起重要作用且该基因序列具有特异性；在肿瘤治疗中针对的癌基因或抑癌基因应与肿瘤的发生和发展有明显相关性。

制备目的基因可用传统方法获取，如基因组文库、化学合成，也可用 PCR 技术进行体外扩增。

2. 载体的选择

要将外源基因导入细胞内，目前使用的载体有病毒载体和非病毒载体两大类，已被用作载体的病毒有逆转录病毒、腺病毒等，非病毒载体目前主要是脂质体。

常见基因转运载体的优缺点

载体	优点	缺点
逆转录病毒	基因组小且简单；可使近 100%受体细胞被感染，转化效率高；可稳定整合于宿主基因组；对宿主细胞无害；能感染广谱动物物种和细胞类型，无严格的组织特异性	仅整合分裂旺盛的细胞的染色体；随机整合可能导致突变
腺病毒	在不分裂细胞中可进行高效率低体内感染，尤其是在肺部；病毒滴度高	不与宿主基因组整合，只有短暂表达；载本基因组复杂；病毒蛋白可能引起免疫反应及炎症反应
脂质体	无感染能力；理论上无 DNA 大小限制；毒性低	无特异性靶细胞；转染效率低；仅有短暂表达；体内应用困难
受体介导的转运	无感染能力；特异性转染靶细胞；理论上无 DNA 大小限制；构建灵活	转染效率低；体内应用困难；可能有免疫原性；只有短暂表达

3. 靶细胞选择

目前基因治疗中禁止使用生殖细胞作为靶细胞，只能使用体细胞。通常要求靶细胞取材方便，含量丰富，容易培养，寿命较长，可选择低细胞包括淋巴细胞、

造血细胞、上皮细胞、角质细胞、成纤维细胞、肝细胞、肌肉细胞和肿瘤细胞等，实际应用时根据具体治疗目的进行选择。

4. 基因转移

将目的基因导入靶细胞的过程，这一过程可通过多种方法实现，大致可分为四类：物理方法、化学方法、融合法、病毒感染法。病毒感染法在前面载体的选择中已经有了介绍，在这里不再赘述。

向哺乳动物细胞中导入 DNA 片段的常用方法

名称	机制	转染效率	优缺点
电穿孔	高压在膜上形成微孔	效率较高	<ol style="list-style-type: none"> 1. 需精密仪器 2. 可用于动物、植物细胞和细菌 3. 可能使细胞受到严重损伤
显微注射法	直接注射	50-100%	<ol style="list-style-type: none"> 1. 需特殊仪器 2. 一次只能注射一个细胞，耗力费时 3. 用于生殖细胞有效率可达 10%，但很难直接用于体细胞
磷酸钙转染法	内吞作用	20%	<ol style="list-style-type: none"> 1. 简单有效 2. 适用于贴壁、非贴壁细胞 3. 效率低
DEAE 葡聚糖转染法	抑制核酸酶、内吞作用	在 BDC（脑部树突状细胞） -1, CV-1（非洲绿猴肾细胞） 和 COS（细胞瞬时表达系统） 细胞中较高	<ol style="list-style-type: none"> 1. 操作简单 2. 效率较低
原生质体融合	胞膜融合	50-100%，稳定子得率为 0.2-0.02%	<ol style="list-style-type: none"> 1. 操作复杂 2. 不能共转染 3. 仅适用于植物细胞

目前基因转染效率很难达到 100%，故而转染对细胞进行筛选，常用的筛选方法有通过基因表达产物筛选和通过基因探针进行分子杂交筛选，后者常用到 PCR 技术。

5. 外源基因的表达及检测

筛选出转染细胞后要鉴定细胞中外源基因的表达情况，可以检测的指标有外源基因转录出的 mRNA、外源基因翻译出的蛋白质。

6. 回输体内

二、基因治疗技术的应用

(一) 肿瘤的基因治疗

细胞凋亡途径的精确调节是细胞生存和增殖的基本前提，同肿瘤发生过程密切相关¹。针对凋亡相关因子的治疗策略对肿瘤的基因治疗有重要意义。

1. 促凋亡蛋白

Bcl-2 家族是一组至关重要的凋亡蛋白，它不仅在线粒体水平上控制凋亡因子的释放，从而调节包括凋亡、坏死和细胞吞噬作用等几乎所有类型的细胞死亡，而且还能影响内质网 Ca^{2+} 水平，改变线粒体外膜的渗透压，最终诱导细胞凋亡²。抗 *Bcl-2* 的反义寡核苷酸 oblimersen 已获 FDA 批准并与 dacarbazine 药物联合使用治疗恶性黑色素瘤³。此外，利用 RNA 干扰技术可以下调 Bcl-2 的表达，此技术与低剂量的紫杉醇联合处理人脑角质细胞瘤可以显著增加细胞的凋亡。

α -肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 是一种具有广泛生物学功能的多肽类细胞因子，既能直接杀死肿瘤细胞，又能通过激活免疫系统发挥抗肿瘤作用⁴。研究表明，利用重组人 p53 腺病毒联合 TNF- α 在体外对乳腺癌细胞 Ca761 的生长均有明显抑制和促凋亡作用⁵，这将成为临床乳腺癌综合治理的依据之一。

Fas 在大多数良性肿瘤中的表达类似正常组织，但在恶性肿瘤中的表达明显下降甚至丢失，故而 Fas 丢失逃避 Fas/FasL 系统的清除作用可能是恶性肿瘤发

¹ 冯真真, 夏海滨. 细胞凋亡相关分子与肿瘤基因治疗[J]. 生命的化学, 2009, 29(05): 705-710.

² Reed JC. Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood*, 2008, 111(7): 3322-3330

³ Tarhini AA *et al.* Oblimersen in the treatment of metastatic melanoma. *Future Oncol*, 2007, 3(3): 263-271

⁴ 冯真真, 夏海滨. 细胞凋亡相关分子与肿瘤基因治疗[J]. 生命的化学, 2009, 29(05): 705-710.

⁵ 张晓明, 戚晓东, 何时知, 王宇. 重组人 p53 腺病毒联合肿瘤坏死因子对乳腺癌 Ca761 细胞的抑制作用[J]. 现代肿瘤医学, 2008(02): 182-185.

生的原因之一。将 FasL 基因通过腺病毒载体转染肺癌细胞 A549 发现, FasL 基因对 A549 细胞的生长抑制率可以达到 84%, 并可明显抑制其集落形成能力⁶。

2. 抑凋亡蛋白

存活蛋白 (*survivin*) 具有调控细胞周期和细胞凋亡的作用, 在大多数肿瘤中均过度表达。Cdc2 激酶抑制剂 flavopiridol 通过阻断 Cdc2 对存活蛋白的磷酸化作用, 从而达到抑制肿瘤生长、诱导凋亡的目的⁷。目前该药物已用于肿瘤的临床治疗, 初步证明它能有效增强抗肿瘤活性⁸。

(二) 遗传病的基因治疗

1. 复合免疫缺陷综合症的基因治疗

1990 年 9 月 14 日, 美国批准了第一个对人类遗传病进行体细胞基因治疗的方案, 将腺苷脱氨酶 (ADA) 导入一个 4 岁的患有严重复合免疫缺陷综合症 (SCID) 的女孩体内。在正式开始基因治疗前, 用聚乙二醇 (PEG) 包被的牛 ADA 进行了补偿治疗, 以提高患儿外周血 T 淋巴细胞的数目。导入过程采用逆转录病毒介导, 即将含正常人腺苷脱氨酶基因的逆转录病毒载体培养患儿的 T 淋巴细胞, 并用白细胞介素 II (IL-2) 刺激其增殖, 经 10 天左右再输入患儿体内。约 1-2 月治疗一次, 8 个月后该患儿体内 ADA 水平达到正常值的 25%, 且治疗未见明显副作用。此后进行的第 2 例治疗也获得了类似效果。

2. 囊性纤维化 (CF) 的基因治疗

CF 是由于编码 CF 穿膜导电调节因子 (CFTR) 的基因突变导致的常染色体隐性遗传病。患者受损细胞的氯离子运转异常, 临床一肺部受累为多见, 多死于呼吸衰竭。1992 年 12 月美国 NIH 批准 3 项以复制缺陷型 AV 为载体, 用 *in vivo* 方式将 CFTR 基因转入患者呼吸道上皮细胞, 治疗后纠正了基因转移部位的氯离子转运缺陷, 且并未发现病毒复制等副作用。

3. 血友病的基因治疗

血友病是由于缺少 VIII 因子或 IX 因子导致的凝血障碍而发生的出血性疾病, 是一种 X 连锁隐性遗传病。复旦大学薛京伦等自 1987 年以来先后构建多个含人

⁶ 狄冬梅, 张晓膺, 蒋南青, 王志刚, 郑世营, 赵军, 葛锦锋, 仲宁. 腺病毒介导的 FasL 基因诱导肺癌细胞凋亡 [J]. 江苏医药, 2005 (03): 200-202. DOI: 10. 19460/j. cnki. 0253-3685. 2005. 03. 018.

⁷ 冯真真, 夏海滨. 细胞凋亡相关分子与肿瘤基因治疗 [J]. 生命的化学, 2009, 29 (05): 705-710.

⁸ Phelps MA et al. Clinical response and pharmacokinetics from a phase I study of an active dosing schedule of flavopiridol in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2009, 113 (12): 2637-2645

IX 因子 cDNA 等 RV，在血友病患者皮肤成纤维细胞表达量达 3420ng/ml，且无致畸、致瘤左右。1991 年 7 月与第二军医大学长海医院合作临床研究，对两例病人实施用胶原包埋的转 IX 因子基因成纤维细胞腹或背部皮下注射，结果患者体内 IX 因子上升 3 倍多，持续 6 个月以上，无毒副作用⁹。

（三）艾滋病的基因治疗

目前对艾滋病的治疗还停留在控制病毒病毒体内复制、阻断病毒体内传播等，但停药后潜伏的病毒会使病情反弹恶化。基因治疗则可以通过针对病毒或宿主的靶标来抑制病毒的入侵、复制以及病毒基因的表达，合理应用基因编辑技术还有望清除整合的前病毒 DNA，或者使宿主细胞获得长期抗 HIV 感染的抗性，从而尽可能得达成长期抑制病毒的目的¹⁰。

目前针对艾滋病的基因治疗的临床经验并不多，较有说服力的是彭爽等通过基因编辑技术修饰 CC 趋化因子受体 5（CCR5）对艾滋病的治疗，通过对 12 名患者的治疗发现，用基因编辑技术修饰的 CD₄⁺T 淋巴细胞比未经修饰的减少数量更少，形态也更稳定。总的来说，艾滋病基因治疗的临床效果还在试验中，但隐隐可见光明的前景。

三、基因治疗技术的局限和发展方向

基因治疗领域存在的主要问题还是其有效性和安全性，主要表现为以下两点：

（1）基因导入缺乏靶向性，导入效率也较低。（2）目前针对遗传性疾病的基因治疗大多采用逆转录病毒载体，其插入、整合到染色体位置的随机性增加了引发突变的风险。理想的基因治疗应是在原位进行基因的修正和置换，或者能控制将目的基因导入宿主细胞染色体上不致病的位置。

由此可以看出，基因治疗的核心问题还是靶向性，基因治疗的发展方向应包括优化基因导入的靶向性、提高基因导入的效率、构建新的基因定点整合载体、提高原位纠错效率等。

自 1995 年以来，全世界基因治疗领域的研究人员为改善基因导入的载体和系统方面作出了巨大努力。目前在基因导入载体方面出现了两大主流——非病毒载体系统和病毒载体系统。非病毒载体系统导入基因的效率相对较差，在基因治

⁹ 宋明浩, 于俊, 李麓芸. 遗传病基因治疗[J]. 基础医学与临床, 1995(05):14-18. DOI:10.16352/j.issn.1001-6325.1995.05.003.

¹⁰ 卢一洲, 相霞. 基因治疗方法治疗艾滋病的研究进展[J]. 吉林医学, 2021, 42(11):2777-2779.

疗临床试验中使用率不高。但其生物安全性好，特别是靶向性的脂质体、靶向性的多聚物以及脂质体/多聚物/DNA 复合物等产品结合电脉冲、超声技术，明显提高了导入效率和靶向性，是今后非病毒载体发展的重要方向。病毒载体在基因治疗临床应用最为广泛，多种病毒载体各有特点，也各自存在局限性。其中腺相关病毒（AAV）因为不致病、宿主范围广、能感染分裂与非分裂细胞、整合目的基因长期稳定表达等特点，在遗传病的基因治疗方面显示出优势。

在 DNA 水平的原位修复是基因治疗的理想措施，但治疗基因表达调控的研究相比基因治疗载体的研究相对滞后。但随着人类基因组计划的进展与完成，新的基因座控制区、隔离子、内含子、特异的启动子、增强子等的发现与分离，必定带动基因治疗向前发展。