

的光荣使命。

致谢 本文在美国威斯康星麦迪森大学 Smith 实验室合作研究期间完成, 作者对 L. M. Smith 教授和陈丹华博士热情提供资料及帮助谨此致谢。

参 考 文 献

- 1 Roberts L. Science, 1993; **262**: 20
- 2 Collins F, Galas D. Science, 1993; **262**: 43
- 3 Huang X H, Quesada M A, Matheis R A. Anal Chem, 1992; **64**: 967
- 4 Clark S M, Matheis R A. Anal Biochem, 1993; **215**: 163
- 5 Karbara H, Takahashi S. Anal Chem, 1994; **66**: 1021
- 6 Taylor J A, Yeung E A. Anal Chem, 1993; **65**: 956
- 7 Ueno K, Yeung E S. Anal Chem, 1994; **66**: 1424
- 8 Kostichka A J, Brumley R L, Smith L M. Nucl Acids Res, 1993; **21**: 4350
- 9 Ansorge W, Voss H, Wiemann S *et al.* Electrophoresis, 1992; **13**: 616
- 10 Ruiz-Martinez M C, Berka J, Karger B L *et al.* Anal Chem, 1993; **65**: 2851
- 11 Karger B L, Foret F. In: Guzman N A ed. Capillary electrophoresis technology. New York: Dekker, 1993: 42
- 12 Wu K J, Steding A, Becker C H. Rapid Commun Mass Spectrom, 1993; **7**: 142
- 13 Lin Z, Smith L M. Rapid Commun Mass Spectrom, 1993; **7**: 895
- 14 Drmanac R. Science, 1993; **260**: 1694
- 15 Lindsay S M, Philipp M. Genet Anal Tech Appl, 1991;

8: 8

- 16 Hansma H G, Vesenska J, Siegerist C *et al.* Science, 1992; **256**: 1180
- 17 Keller R A, Davis L M, Fairfield F R *et al.* Genet Anal Tech Appl, 1991; **8**: 1
- 18 Tellinghuisen J, Goodwin P M, Keller R A *et al.* Anal Chem, 1994; **66**: 64
- 19 Guttman A, Cohen A S, Karger B L. Anal Chem, 1990; **62**: 72

High-Speed DNA Sequence Analysis. Cheng Jieke (*Department of Chemistry, Wuhan University, Wuhan 430072, China*).

Abstract High-speed DNA sequence analysis is a central technology in biological and biomedical research. The progress in high-speed DNA sequencing such as the ultrathin slab gel electrophoresis, capillary array electrophoresis, mass spectrometry, sequencing by hybridization, atomic probe microscopy (scanning tunneling or atomic force microscopy), and single molecule fluorescence detection in flowing sample streams are reviewed.

Key words DNA sequencing, DNA electrophoresis, capillary array electrophoresis, ultrathin slab gel electrophoresis

基因治疗研究进展

周 辰 徐 铃

(第一军医大学生物化学教研室, 广州 510515)

摘要 基因治疗研究的最新成就是非常鼓舞人心的, 但是还有许多问题等待解决. 首先回顾了近年来有关基因治疗的重要基础研究, 包括基因导入技术的研究. 后者是基础研究中最重要的课题之一, 包括逆转录病毒载体和 DNA 病毒载体的应用, 以及非病毒学方法. 其次叙述了实验模型建立的研究. 最后着

重讨论了遗传病,癌症和其疾病的基因治疗的策略,特别着重在爱滋病和心血管疾病基因治疗的一些策略.

关键词 基因治疗,遗传病,癌症,爱滋(AIDS)病,基因转移,心血管疾病

许多 DNA 病毒的感染最终可导致肿瘤. 对其致病机理的研究发现,肿瘤病毒的基因组可长期稳定地整合到靶细胞的染色体 DNA 中,从而使靶细胞转化成肿瘤细胞. 基于对肿瘤病毒致病机理的以上认识, Friedmann 等于 1972 年提出模拟其致病途径对人类疾病(遗传病)进行基因治疗的可能性,但是当时由于许多技术性的问题还不能解决,尚无从谈起临床试验的可能性. 随着分子生物学研究的进展,特别是重组 DNA 技术的迅速发展,已有可能大量分离纯化所需的基因序列,将外源性基因导入哺乳动物细胞的效率也大大提高. 80 年代初, Anderson 等^[1,2],再次提出何时可以开展人类疾病基因治疗的问题. 经过将近 10 年的努力,80 年代末,人类疾病的基因治疗揭开了一个新的里程碑,第一个临床试验计划已获得批准并于 1989 年 5 月实施. 随后 4 年多的时间里,向世界各国有关部门提出的试验计划已超过 40 个,有 30 个以上的计划获得批准,大多已进入实施,包括标志基因的导入研究以及针对遗传病、癌症、爱滋病以及其它疾病的治疗性探索,取得的近期结果是令人鼓舞的,当然也有许多问题,尚待解决.

1 基因治疗的基础研究

基因治疗的第一步首先要解决的是如何将目的基因高效率地导入到特定的靶细胞内,所以基因导入方法的研究是基础研究中的重要方面,有许多新的探索^[3].

迄今研究最多的导入方法是病毒学方法,尤其是以逆转录病毒为载体的导入方法已进入应用. 获得批准的治疗计划,除一个是利用脂质体包裹进行直接导入外,其余都是利用逆转录病毒为载体的. 常用的逆转录病毒载体是以莫洛尼小鼠白血病病毒为骨架构建的,利用其原有的启动子或插入的外源性启动子控制外源

性基因的表达. 这一类载体的最大特点是可以整合进入宿主细胞的基因组,长期表达外源性基因. 结合已经建立的与之相配套的包装细胞系统,可以产生高滴度的病毒液,从而高效率地将外源性基因导入靶细胞. 其不足之处是整合是非位点特异的,而且只整合进入处于分裂状态的细胞. 由于包装细胞产生的病毒子非常容易失活,不能经受浓缩过程,所以不能直接用于体内实验,只能将靶细胞取出体外,将载体导入靶细胞后再将细胞输回给病人.

为了弥补逆转录病毒载体的不足,有许多研究者尝试应用腺病毒作为载体,它可以有效地感染处于非分裂期的细胞,大量地表达基因产物,而且病毒子稳定,可以经受浓缩纯化过程,因而有可能直接用于体内实验,即直接将病毒载体输给病人(*in vivo*)而不必取出靶细胞在实验室完成导入工作(*ex vivo*). 但此类载体也有其不足,即整合效率很低,因为整合过程并不是其生命周期的必经阶段,因而只能适用短期实验,或只能获短期疗效,需要长期效果的则需要反复治疗过程.

除了以上两类外,也有人试用腺相关病毒(AAV)作为基因转移载体^[4,5]. AAV 是一种单链 DNA 病毒,其基因组约长 4600bp. 它是一种缺陷病毒,其完整的生命周期需要腺病毒或单纯疱疹病毒作为辅助病毒. 所以其宿主范围较广,仅受这些辅助病毒宿主范围的限制. AAV 能稳定地感染非分裂相细胞,并定点整合至宿主细胞 19 号染色体某一固定区域. 由于 AAV 没有致病性,又具有上述优点,故作为载体近来受到许多人的欢迎. 例如 Walsh 等^[6]为了尝试治疗重症血红蛋白病,以 AAV 为载体将人 $\alpha\gamma$ 珠蛋白基因转染预先用腺病毒感染过的人 293 细胞中,获得的重组病毒可稳定地导入人红白血病细胞,并表达 $\alpha\gamma$ 珠蛋白,其水平和天然染色体 $\alpha\gamma$ 珠蛋白基因的表达水平相当.

Zhou 等^[7]构建了带有 neo 基因的重组人 AAV 病毒, 用来转染小鼠原代骨髓细胞, 结果发现小鼠造血祖细胞所形成的髓系和红系细胞集落有对 G418 的抗性, 提示以 AAV 为基础的载体系统在动物模型中的应用是可行的. Flotte 等^[8]则用 AAV 为载体转移正常 CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) 的 cDNA, 企图作为囊性纤维变性 (CF) 的基因治疗. 他们将 AAV-CFTR 载体用支气管纤维光镜直接导入家兔肺叶, 发现在导入后 6 个月还可检测到受感染肺叶中不但有载体 DNA, 而且还有 CFTR 的 mRNA 和蛋白质存在.

疱疹病毒, 甚至 HIV, 也有人研究用以作为载体. 特别是后者, 在爱滋病的治疗中可能有其特点: 受 HIV 的 LTR 控制的外源性基因的表达受到 HIV 的 tat 蛋白的正调节. 如果载体中插入的是抗 HIV 的基因, 当靶细胞受 HIV 感染表达 tat 蛋白时, 即可激活抗 HIV 基因的表达从而抑制 HIV 的复制等.

虽然许多载体都各有特点, 但是相应的包装细胞系统, 除逆转录病毒载体以外, 都尚在研究之中, 还没有达到可以应用的程度.

在非病毒学导入方法的研究中, 主要利用受体介导的细胞摄入或直接注入. 经批准的基因治疗计划中有一个即是利用直接注入法的. 含有 I 类组织相容性抗原的基因载体 DNA 被包裹在脂质体内, 然后直接注入到肿瘤内. 当表达此类正常细胞通常不表达的抗原时, 即可激活免疫系统, 杀死肿瘤细胞. 由于注入的 DNA 也可能进入非肿瘤细胞, 因此此计划只限于晚期肿瘤病人, 有限的资料表明, 直接导入法只能获得短期效应.

基础研究的另一个重要方面是建立实验模型, 这一方面同样有许多有意义的进展.

要利用基因治疗的手段治疗一个疾病, 需要在所有的靶细胞内有目的基因的适当表达. 随着细胞分化、分裂, 此基因将可存在于所有的子代细胞中. 造血干细胞通常处于静止状态, 而常用的逆转录病毒载体, 又不能整合到静止

细胞的染色体中. 研究表明, 应用 5' 氟尿嘧啶和生长因子 (如 IL-3、IL-6 等) 可刺激小鼠造血干细胞分裂, 从而将载体导入到骨髓细胞 (造血干细胞中) 的效率可超过 50%, 有的几乎达到 100%, 许多不同的基因都在造血干细胞内获得表达. 小鼠是这一类实验的常用动物, 此外也选用狗及猴, 但是后者造血干细胞的导入效率甚低 (~1%). 利用人的造血干细胞则多处于实验室工作阶段, 虽然可达 50%, 但并不清楚在体内的实际效果^[8].

体细胞方面的研究范围甚广, 包括肝细胞, 纤维母细胞, 外周血淋巴细胞, 肌肉细胞, 神经细胞, 以至肿瘤细胞等, 都是基因治疗的靶细胞, 以探讨治疗相应组织器官的疾病.

2 遗传病的基因治疗

最早针对遗传病的基因治疗尝试是由一位美国医生在 80 年代初进行的^[9]. 他试图治疗 β -地中海贫血, 但没有成功, 主要原因在于血红蛋白的表达调节甚为复杂, 即使迄今也尚未清楚. 因此, 当条件具备尝试人类疾病的基因治疗时, 首选的是重度联合免疫缺陷症之一: 腺苷脱氨酶缺乏的患者, 因此酶的表达调控相对比较简单, 外周循环中有足够的酶活性即可治疗此类患者. 治疗计划于 1990 年得到批准进入实施, 将表达 ADA 的逆转录病毒载体导入外周血淋巴细胞中, 对一患有 ADA 缺乏症的 4 岁女孩进行基因治疗^[10], 迄今所报道的结果是令人鼓舞的: 患者的免疫功能获得明显改善, 外周循环中见到缺陷基因已得到矫正的 T 细胞, 血液中 ADA 的活性水平已达其父亲的 50%. 但是由于靶细胞是外周血细胞, 间隔数月需重复治疗. 1993 年 5 月洛杉矶儿童医院的 Kohn 领导的研究小组经批准实施了一个全新的治疗计划, 即试图将 ADA 基因导入造血干细胞中. 一个在胎儿阶段已确诊为 ADA 综合症的患儿, 在分娩时取脐带血, 分离所含的 CD34, CD38 的细胞 (包含有造血干细胞), 在实验室将含 ADA 基因的逆转录病毒载体导入, 然后输回给出生仅数天的婴儿, 然后定期检测 ADA

基因的整合与表达. PCR 检测表明, 在所试验的 3 例患者的外周血淋巴细胞中均检测到 ADA 基因整合在染色体中, 两例检测到 RNA 的表达, 实验观察正在继续中. 另外两个针对遗传病的治疗计划也已进入实施: 一个是针对低密度脂蛋白受体基因缺陷的^[11], 另一个是针对凝血因子Ⅱ的基因缺陷的. 后者由复旦大学薛京伦教授领导的小组进行. 将因子Ⅱ的基因导入从患者身上获得的成纤维细胞内, 然后再输回给病人, 观察到临床症状, 凝血指标的明显改善.

另一个遗传病, CF 的基因治疗也已进入临床试验. 引起疾病的基因 (CFTR) 4 年前才被分离确定, 3 年以后即在基因治疗中获得应用. 实验用腺病毒载体表达 CFTR 基因, 将载体通过呼吸道直接导入到患者的鼻粘膜细胞内, 未观察到任何毒性效应. 收集鼻粘膜细胞进行检测, 发现 3 个病人的细胞的氯转移功能的缺陷均获得矫正, 不过效应只能维持数星期. 此外也有人利用动物模型探索用脂质体导入, 实验正在进行中.

高雪氏病 (Gaucher disease) 的基因治疗计划也获得批准, 即将进入实施. 体外实验表明, 逆转录病毒载体可在靶细胞内高水平地表达缺陷酶.

进行性肌营养不良症也可能是基因治疗的目标, 其基因已被克隆, 实验性探索正在进行之中^[12].

3 癌症的基因治疗

第一个获得批准的基因治疗计划并不是治疗性的, 而是为了导入一个标志基因到 TIL 细胞内, 以便追踪输回给病人的 TIL 细胞在患者体内的行踪以及生存期限等, 分析评估 TIL 的治疗效果. 另一重要目的是观察导入的逆转录病毒载体是否有病理效应, 结果表明是相当安全的. 因此第一个癌症的基因治疗计划就是由标志基因试验发展而来的: 在载体内又插入一个 TNF (肿瘤坏死因子) 的表达结构. TNF 是抗癌制剂, 但整体投入, 人体并不能耐受杀死肿瘤

细胞所需的治疗剂量 (小鼠实验要 $400\mu\text{g}/\text{kg}$, 而对人体, $8\mu\text{g}/\text{kg}$ 即表现毒性). 如在肿瘤局部表达 TNF, 有可能达到肿瘤细胞的致死剂量而对正常人体并无毒性. 第一个治疗计划于 1991 年 1 月实施, 将含有 TNF 表达结构的载体导入 TIL 细胞再输回给病人. 第一阶段的工作主要是观察是否有毒性, 结果表明, 没有观察到 TNF 的毒副作用. 真正治疗性的第二阶段工作正在进行之中.

动物实验表明 TNF、IL-4、IL-2、INF- γ 、GM-CSF 等, 进入肿瘤细胞内都可抑制肿瘤细胞的致瘤能力, 因此如果与 TIL 细胞结合, 有可能发生抗肿瘤效应. 经批准实施的抗癌基因治疗计划就是尝试将 TNF 或 IL-2 导入 TIL 细胞或肿瘤细胞, 间接获得抗肿瘤效应 (如 IL-2). 治疗计划还在实验中, 尚难评价结果.

另一个在肿瘤基因治疗中应用的抗肿瘤基因是单纯疱疹病毒的胸腺嘧啶核苷激酶 (tk) 基因. 此基因产物可分解 Ganciclovir, 产生毒性产物, 杀死细胞, 所以被称为 Suicide gene. 动物实验表明, 当将携带 tk 基因的载体注入脑部肿瘤后可杀死 80% 的肿瘤细胞, 临床试验计划已获批准^[13].

针对突变的 K-ras 基因的反义核酸基因及肿瘤抑制基因 p53 也已被用于肺癌的基因治疗^[13]. 此外 MDR (multi-drug resistance) 基因也可能应用于癌症的基因治疗, 如导入造血干细胞, 则可以提高造血系统对大剂量化疗的抗性, 提高癌症的治疗效果.

4 爱滋病、心血管病等的基因治疗

爱滋病的基因治疗研究, 进展迅速, 许多针对爱滋病的基因治疗方案正在深入探讨中, 基本的战略可分为三个方面: a. 将爱滋病毒抗原基因导入靶细胞, 激活机体的免疫系统提高对爱滋病毒的免疫能力; b. 在靶细胞内表达类似物 (decoy) 基因, 如 HIV 在靶细胞表面的受体蛋白 CD4, 突变的 rev 蛋白 (M10) 和 tat 蛋白, TAR 序列, RRE 序列等. 目的在于结合进入机体的 HIV (如 CD4 蛋白), 降低病毒进入

靶细胞的机会;或竞争性地与 HIV 的 TAR 或 RRE 序列结合,降低野生型蛋白的结合机会,从而降低 HIV 的复制增殖(如突变的 rev 蛋白和 tat 蛋白);或竞争性与野生型 rev 蛋白和 tat 蛋白结合,阻止后者与 TAR、RRE 结合,同样可降低 HIV 的复制增殖;c. 在靶细胞内表达反义核酸或者核酶(ribozyme),从而直接阻断 HIV 的复制增殖或破坏 HIV 基因组,以治疗爱滋病患者. 体外实验证实各自都表现出不同强度的抗爱滋病功能,其中以 M10 及核酶效应最强. 黄以静博士领导的研究小组的结果证实针对 HIV5' 端引导序列的发夹式核酶可抑制 HIV-1 在靶细胞复制达 95%,我们的结果(周辰,未发表资料)也证实,针对调节基因 tat 和 rev 的锤头型核酶可显著抑制 HIV-1 在人 T 淋巴细胞内的复制. 利用核酶进行爱滋病基因治疗的临床试验计划已获批准,即将进入实施^[14,15].

心血管疾病是严重危害人类健康的疾病. 近两年来对心血管病的基因治疗进展非常迅速.

纯合子家族性高胆固醇血症患者易于引发动脉粥样硬化和冠心病,这种患者在青春期就有心肌梗塞的危险. Neufeld^[16]已对此进行临床基因治疗试验,即将编码正常 LDL 受体的 cDNA 导入肝细胞(*ex vivo*),恢复患者有缺陷的 LDL 受体基因的功能. Williams 发表的综述^[17]认为缺血性心脏病发生的病理生理学中的每一个阶段几乎均可用基因疗法进行治疗. 冠心病患者在施行球囊血管成形术(balloon angioplasty)后,往往发生重新狭窄(restenosis),这对医生是一个难题. 现在认为,这是因为经球囊损伤后,血管内膜平滑肌增生之故. 据报道^[18,19],Nabel 等为猪髂股动脉作球囊血管成形术,并用 HSV-tK 基因(以腺病毒为载体)和 Ganciclovir 阻断平滑肌的增生以防止重新狭窄. 结果发现基因治疗组(与对照组相比)其血管壁增厚度要减低 50%—90%之多. 后经 Finkel, Epstein 等(NIH/LB)用大鼠作类似实验加以证实. 其他研究者还应用另一

些基因疗法,例如导入 NO 合成酶基因产生 NO,以松弛血管;用反义核酸阻断某些调节细胞增殖的基因的表达等,来防止重新狭窄. 有人认为这些方法的综合应用可能在将来收到良好的效果.

在其它疾病方面,目前认为有可能应用基因治疗的首推风湿性关节炎. 此病的发生发展与机体内的白介素-1 有关,后者通过与特异受体结合而发挥效应. 动物实验表明,将白介素-1 受体拮抗剂蛋白(IRAP)的基因导入滑膜细胞,可以降低白介素-1 的炎性效应达 70%—80%. 不过目前所用的载体,表达只能持续两周,有待建立长期的表达系统.

综上所述,可以看出,虽然尚有许多理论和技术的问题有待解决,但基因治疗已不再是梦想,从第一个临床计划批准至今将近 4 年已表现出广阔的应用前景,随着研究的不断深入,基因治疗将真正造福于人类.

参 考 文 献

- 1 Anderson W F, Fletcher J C. New Engl J Med, 1980; **303**: 1293
- 2 Anderson W F. J Am Med Assoc, 1981; **246** (23): 2737
- 3 Mulligan R C. Science, 1993; **260**: 926
- 4 Lebikowski J S, McNally M M, Okarma T B *et al.* Mol Cell Biol, 1988; **8** (10): 3988
- 5 McLaughlin S K, Collis P, Hermonat P L *et al.* J Virol, 1988; **62** (6): 1963
- 6 Walsh C E, Liu J M, Xiao X *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1992; **89** (15): 7257
- 7 Zhou S Z, Broxmeyer H E, Cooper S *et al.* Exp Hematol, 1993; **21** (7): 928
- 8 Flotte T R, Afione S A, Conrad C *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1993; **90** (22): 10613
- 9 Wade N. Science, 1980; **210**: 509
- 10 Anderson W F. Science, 1992; **256**: 808
- 11 Wilson J M, Grossman M, Raper S E *et al.* Hum Gene Ther, 1992; **3**: 179
- 12 Blau H M. Nature, 1993; **364**: 673
- 13 Thompson L. Science, 1992; **258**: 744
- 14 Thompson L. Science, 1992; **258**: 745
- 15 Yu M, Ojwang J, Yamada O *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1993; **90** (13): 6340
- 16 Neufeld E J. Curr Opin Pediatr, 1993; **5** (6): 707

- 17 Williams R S. Am J Med Sci, 1993; 306 (2): 129
18 Barinaga M. Science, 1994; 265: 738
19 Ohno T, Gordon D, San H *et al.* Science, 1994; 265: 781

Recent Advances in the Study of Gene Therapy. Zhou Chen, Xu Qian (*Department of Biochemistry, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China*).

Abstract The recent results in the research of gene therapy have been encouraging, in spite of numerous problems still remaining to be solved. The basic studies on gene therapy and the study on the techniques of the gene introduction are reviewed. The latter is one of

the most important topics in basic studies, including retrovirus vectors, DNA virus vectors as well as non-viral techniques. The recent advances in the establishment of the experimental models are also described. Then the recent advances in the gene therapy of hereditary diseases, malignant tumors and other diseases are briefly discussed, especially emphasizing the strategies of the gene therapy of AIDS and cardiovascular diseases.

Key words gene therapy, genetic diseases, cancer, AIDS, cardiovascular diseases, gene transfer

固体载体支承的双层膜系统*

韩 兴 李 刚**

(北京医科大学生物物理系, 北京 100083)

摘要 固态载体支承的双层膜的各种制备过程都简便易行, 较脂质体等系统有重复性好、其物化性质可严格控制等优越性, 并可膜蛋白质分子镶嵌其中, 是研究生物膜的良好模型。由于其研究方法日益成熟, 固态载体支承的双层膜系统越来越成为研究生物膜与膜蛋白的有利工具之一。对固态载体支承的双层膜的制备技术和研究方法进行了系统的综述, 并列举了一些在膜生物物理化学领域的应用。

关键词 固态载体, 双层膜, 磷脂, 膜蛋白

固态载体支承的双层膜系统 (solid supported bilayer system) 可分为平面支承双层膜系统和球面支承双层膜系统。这些膜系统与黑脂膜 (black lipid membranes)、气-水界面单层膜 (monolayer at air-water interface)、脂质体 (liposome) 等人工膜系统的主要差别在于其整个双层膜由一固态载体支承。固态载体 (substrate, 以下简称载体) 可以用硅片、石英片、石墨、云母等, 从而构成平面支承; 也可以为玻璃珠、硅珠等, 构成球面支承。所用固体表面可先进行化学处理, 使其具有亲水性或疏水性, 然后进行双层膜的铺展, 其优越性在于所载双

层膜的组分、分子密度及取向等都可得到严格的控制, 且样品的均一性范围可达到宏观尺度。

载体支承的双层膜系统的一个重要应用是将具有生物活性的膜蛋白分子, 如细胞膜的受体、膜通道或细胞表面标记抗原等吸附或整合到所支承的脂双分子层中, 然后在此基础上进行膜蛋白结构与功能的研究。研究载体支承双层膜的方法众多, 但大致可归为波谱分析方法和显微成象方法。前者主要是用于研究双层膜

* 国家自然科学基金和教委启动基金资助。

** 通讯联系人。

收稿日期: 1994-06-18, 修回日期: 1994-09-02