

糖尿病基因治疗的新进展

李 鸿 苏本利*

(大连医科大学附属第二医院内分泌科, 大连 116023)

摘要 目前, 糖尿病的基因治疗主要分为替代基因治疗、免疫基因治疗和调节基因治疗三部分. 近年来, 随着人们对糖尿病本质的深层次揭示和现代分子生物学手段的发展, 糖尿病基因治疗的内容不断增加. 如: 对 K 细胞的新认识, 发现了胰腺十二指肠同源异形盒基因 1 (PDX-1) 的新价值及单链胰岛素类似物基因的构建成功等. 另外, 还利用各种方法来提高转染效率, 增加安全性. 如使用腺病毒 (HD) 载体, 应用电穿孔法 (electroporation) 等.

关键词 糖尿病, 基因治疗, 转染

学科分类号 R587.105

基因治疗糖尿病使人们看到了征服这一顽疾的曙光. 本文根据所导入基因种类的不同, 将其主要归纳为三类: 替代基因治疗, 免疫基因治疗和调节基因治疗.

1 替代基因治疗

将一段能分泌胰岛素的基因导入患病个体体内, 来弥补和纠正胰岛素的缺乏, 这就是糖尿病的替代基因治疗.

最初, 人们将精力集中在构建分泌胰岛素的细胞上 (β 细胞工程). 并首先解决了胰岛素加工、分泌的两个关键问题. 1994 年, Groszkrentz 将人胰岛素 cDNA 造成两个突变位点, 将 B-C, C-A 链的连接改造为 Lys-Thr-Lys-Arg 和 Arg-Gln-Lys-Arg 序列, 使之成为 Furin 酶的酶切位点, 使胰岛素基因表达产物的加工效率大大提高. 另外, 人们还发现, 葡萄糖转运子 2 (GluT2) 和葡萄糖激酶 (GK) 基因是细胞对葡萄糖调节的“感受器”. 将这两种基因导入成纤维细胞, 就可以使胰岛素基因在血糖的调节下进行表达. 至今, 人们已尝试应用了肝细胞等多种细胞作为靶细胞, 都获得了不同程度的短期胰岛素分泌和体内降糖效果. 但人们尚未阐明胰岛 β 细胞的分泌机制, 要想成功构建一种能够完全模拟人类胰岛 β 细胞生理功能的细胞, 在现阶段还是一件难以达到的事情.

相比之下, 将胰岛素基因通过载体携带或直接导入的方式导入动物体内就比较简单, 安全. 它回避了复杂的细胞调控、改造及异体细胞的排斥反应等诸多问题, 已成为近年来关注的方法和研究的重点. 肝脏和骨骼肌是摄取胰岛素基因的常用载体组织. 这主要因为: 肝细胞在结构上更接近胰岛 β 细

胞, 胰岛素基因可被更好地表达; 而骨骼肌的总体积较大, 供血丰富且易于操作. 通过门脉或肌肉注射的方式, 将胰岛素基因输入糖尿病动物体内, 可观察到血糖被控制在正常水平达数月, 动物的体重增加, 尿量减少, 症状明显改善.

无论是构建细胞还是直接转染活体动物, 胰岛素分泌的调控都是一个关键问题. 胰岛素基因的持续表达会造成动物低血糖死亡. 目前认为有效的生理性调控序列分别为: 磷酸烯醇式丙酮酸激酶 (PEPCK)、肝脏丙酮酸激酶 (L-PK) 和葡萄糖 6 磷酸酶 (G6Pase) 的启动子. PEPCK 启动子可同时受血糖和血浆胰岛素的反馈调控, 但它的作用在血糖明显升高时会受到抑制而使胰岛素的产量减少, 目前已不多用. L-PK 和 G6Pase 是相对理想的启动子, 但作用都不够强大, 基因表达效率不高, 影响了降糖的效果. 另外, 采用非生理性调控系统, 如四环素调控系统来调控胰岛素的分泌, 已有成功报道, 开辟了调控的新途径.

近年来, 人们进一步拓展思路. 2000 年, Lee^[1] 构建了一种能够表达单链胰岛素类似物的基因. 这种单链胰岛素类似物是将 C 肽由一段 7 个氨基酸的短肽替代, 直接连接 A, B 两链, 省去了传统的加工程序. 这种单链胰岛素类似物的作用要明显强于胰岛素原, 与人胰岛素的作用相近, 能有效降低糖尿病大鼠的血糖达 14 天. 这种基因构建的成功, 为替代基因治疗糖尿病又增添了新内容. 2000 年, Cheung^[2] 发现位于胃、十二指肠、空肠的 K 细胞具有较高的 GK 表达能力. K 细胞本身

* 通讯联系人.

Tel: 0411-4671291-3121, E-mail: mxxsu@sina.com

收稿日期: 2002-03-29, 接受日期: 2002-04-29

可以合成、分泌葡萄糖依赖的促胰岛素多肽 (glucose-dependent insulintropic polypeptide GIP), 来增加糖调节胰岛素的分泌. GIP 与胰岛素的分泌都受血糖浓度调控. Cheung 将人胰岛素基因导入小鼠的一种肠道细胞——STC-1 细胞中, 使之在 GIP 的调控下进行表达, 发现胰岛素的产量会根据血糖的浓度而发生改变. 在能够分泌人胰岛素的转基因小鼠中, 人胰岛素基因只限定在胃、十二指肠的 K 细胞中表达, 对于由链脲佐菌素 (STZ) 诱导的高血糖, 起到了满意的降糖效果. 口服葡萄糖耐量实验亦证实, 胰岛素的分泌很好地受到了血糖的调控, 符合生理要求. 这一发现使人们重新认识了 K 细胞的价值. 由于它位于胃肠道, 易于接近, 且数量较大, 有可能通过一种非创伤性方法, 如: 内窥镜或口服, 将胰岛素基因导入 K 细胞中使之表达. 因此, K 细胞被认为是 β 细胞工程的理想选择, 有望解决胰岛细胞移植中胰岛 β 细胞供体不足的问题.

但总体而言, 近年来在利用胰岛素基因治疗糖尿病这一领域中, 并没有取得让人为之一振的新突破. 人们更多是在寻找和改进能提高基因表达效率的分子生物学手段. 如: 采用完全删除病毒成分的腺病毒 (HD) 载体, 不仅大大提高了病毒载体的安全性, 也获得了较高的转染效率. 另外, 以低压脉冲电流介导的体内转染方法——电穿孔法 (electroporation) 能显著提高基因表达效率, 也被用于胰岛素基因的体内转染, 其安全、高效的特点正受到人们越来越多的关注, 成为一种很有前途的体内转染方法^[3].

2 免疫基因治疗

I 型糖尿病是一种与免疫有关的疾病. 1986 年, Feueren 首次采用环胞菌素 A, 通过免疫抑制的方法治疗糖尿病, 并收到一些疗效. 此后, 人们就设想通过导入某种基因来阻断导致糖尿病的某一免疫环节, 达到病因学上的治疗. 目前主要包括以下三方面:

2.1 细胞因子

将“有益因子”白介素 (IL) -4 或 IL-10 的基因导入小鼠体内, 可使小鼠的胰岛炎症明显减轻. 这种保护作用认为是与激活了辅助 T 细胞 Th2, 抑制了 Th1 有关. 另外, 封阻“有害因子”也是免疫基因治疗采用的常用手段. 如: 构建干扰素 (IFN) - γ 受体抗体——IFN- γ R-Ig 的基因和 IL-12 的抗体基因来削弱这两种因子的作用, 在动物体内

也可以起到减轻胰岛炎的作用. 上述结果已进一步为基因敲除小鼠所证实.

2.2 抗 T 细胞单克隆抗体

多种抗 T 细胞单克隆抗体, 如: CD3, CD4, CD8, CD45RB, CD40L, TCR $\alpha\beta$ 等的抗体可以封阻某一类 T 细胞亚群, 减少 T 细胞的浸润, 并可诱导胰岛 β 细胞对 T 细胞的主动耐受.

2.3 β 细胞抗体的耐受

谷氨酸脱羧酶自身抗体 (GAD65Ab) 是一种与 I 型糖尿病密切相关的自身抗体. 将 GAD65Ab 的 Fc 段基因与 IL-4 基因同时注入动物体内, 可以收到预防 NOD 小鼠发生糖尿病及减轻糖尿病患病个体病情的作用. 热休克蛋白 p277 (hsp p277) 是来源于热休克蛋白 hsp60 的“免疫调节肽”, 是一种重要的自身抗原的靶向抗原. 近 10 年的研究证实, hsp p277 能有效地减轻实验动物的胰岛炎. Raz^[4]将这一结论扩展到临床, 给 35 位 I 型糖尿病患者注射 hsp p277, 10 个月中, 与对照组比较, 患者外源胰岛素的用量没有增加, C 肽水平并没有下降. 这一结果说明 hsp p277 对糖尿病具有一定的缓解作用, 从动物实验又大大地向前跨进了一步.

免疫基因治疗在短短十余年时间里进行了大量的实验研究. 其中, CD3, hsp p277 已深入到临床阶段, 在一些病例中已得到一定疗效. 但总体而言, 其效果多是一过性的, 且不肯定, 有待进一步的证明.

3 调节基因治疗

与前两种方法相比, 调节基因治疗可以说是一种崭新的理论. 在胰岛 β 细胞发生、发育、分裂的过程中, 需大量因子进行调节. 各种基因的开启, 各种蛋白质的失活与激活都由一套精密的程序决定. 基于这一理论, 人们将胰岛 β 细胞发生、发育所必需的因子导入体内来促进 β 细胞的成熟. 虽然至今已发现几十种与胰岛 β 细胞生长发育调控相关的因子, 有些因子甚至已发现了三十余年, 但直到 2000 年, Ferber 首次单独利用胰腺十二指肠同源异形盒基因 1 (PDX-1) 进行糖尿病基因治疗的研究, 才写下了调节基因治疗的第一笔.

胰腺十二指肠同源异形盒基因 1 (PDX-1) 是调节胰腺发育、胰岛细胞功能和胰岛素基因表达的重要因子. 在胚胎发育过程中, 缺乏 PDX-1 基因将导致胰腺发育不全, 影响胰腺上皮的分化、增殖. 在成熟的胰腺细胞中, PDX-1 还与 GLUT2、GK 等因

子相互作用, 共同调节胰岛素的分泌. 2000 年, Ferber 等^[5]以腺病毒为载体使 PDX-1 基因体内转染糖尿病小鼠的肝脏细胞, 在转染后的 1 周内, 小鼠的血糖从 33.3 mmol/L 下降到 11.1 mmol/L, 显示了良好的治疗效果. 与对照组小鼠比较, 其肝脏胰岛素的含量是前者的 25 倍, 血液中的胰岛素水平是前者的 3 倍, 从肝脏中提取的胰岛素约 60% 是完全加工的. 人们推测 PDX-1 的作用可能与两种机制有关: 它可能激活了肝脏中的胰岛素基因, 表达出持续、低水平的胰岛素; 也可能是影响了肝细胞的发生和分化, 将肝细胞诱导转变为胰岛 β 细胞, 并根据体内血糖的水平而合成、释放胰岛素. 若假设成立, 人们就有可能在体内改造出符合生理要求的胰岛素分泌细胞, 从而省去了在体外构建调控序列的工作, 和胰岛细胞移植所带来的排斥反应及对免疫抑制剂的依赖. 虽就目前资料而言, PDX-1 基因的作用还不足以得到大家的公认, 但这一发现无疑将对糖尿病的治疗具有重大意义.

综观近年来糖尿病基因治疗的发展, 可概括为以下几点:

首先, 思路更加开阔. 人们不再局限于“给糖尿病补胰岛素”这一经典思路. 而是在病因学、细胞生物学等多方面进行研究, 所涉及的领域更加广泛. 另外, 探索对胰岛素基因的改造、多种基因的联合治疗以及将动物实验拓展到临床也使得糖尿病基因治疗在深度上又迈进了一步.

其次, 将 β 细胞工程与胰岛细胞移植联系起来. 不仅为前者找到新的出路, 也可能是解决胰岛

β 细胞来源问题的一个办法.

此外, 采用安全、高效的转染手段也使基因的表达效率大大提高.

目前仍存在的两大关键问题是: a. 胰岛素基因的调控问题. 理想的调控是在血糖调节下使胰岛素的分泌完全符合生理需要. 现有的调控无论在灵敏性和强度上都不能达到要求. b. 基因的转染手段是基因治疗的关键. 目前的转染手段在安全性和效率上都有待提高.

综上所述, 基因治疗糖尿病在近 20 年中已取得大量宝贵的资料. 但目前仍处于基础研究阶段, 距临床应用还有相当的距离. 它需要人们彻底阐明胰岛 β 细胞的生理机制和糖尿病的发病机制, 改进和创新有效的分子生物学技术. 随着这些问题的解决和突破, 基因治疗糖尿病一定会有光明的明天.

参 考 文 献

- 1 Lee H C, Kim S J, Kim K S, *et al.* Remission in models of type 1 diabetes by gene therapy using a single-chain insulin analogue. *Nature*, 2000, **408** (6811): 483~488
- 2 Cheung A T, Dayanandan B, Lewis J T, *et al.* Glucose-dependent insulin release from genetically engineered K cells. *Science*, 2000, **290** (5498): 1959~1962
- 3 Yin D, Tang J G. Gene therapy for streptozotocin-induced diabetic mice by electroporation transfer of naked human insulin precursor DNA into skeletal muscle *in vivo*. *FEBS Lett*, 2001, **495** (1~2): 16~20
- 4 Raz I, Elias D, Avron A, *et al.* Beta cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep277): a randomised, double-blind, phase II trial. *Lancet*, 2001, **24** (358): 1749~1753
- 5 Ferber S, Halkin A, Cohen H, *et al.* Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nat Med*, 2000, **6** (5): 568~572

Progress in Gene Therapy of Diabetes Mellitus

LI Hong, SU Ben-Li*

(The Second Affiliated Hospital of DaLian Medical University, Dalian 116023, China)

Abstract Several topics in gene therapy of diabetes mellitus are described as follows: 1) Insulin-producing plasmid or cell is a plausible target of gene therapy of diabetes mellitus. Development in this research includes construction of single-chain insulin analogue (SIA), which possesses biologically active insulin activity without enzymatic conversion, and new evaluation of K cells which can be engineered to secrete insulin and represent a viable mode of therapy for diabetes. 2) Immunotherapy of diabetes is now focusing on induction of tolerance to beta cell antigens using target cytokins or monoclonal anti-T-cell antibodies. Some have reached the clinical arena. 3) Very recently, PDX-1 was found to be an important factor to diabetes. Study on mice got to reveal the therapeutical effect of PDX-1.

Key words diabetes mellitus, gene therapy, transfection

* Corresponding author. Tel: 86-411-4671291-3121, E-mail: mxsusu@sina.com

Received: March 29, 2002 Accepted: April 29, 2002