

## 家族性高胆固醇血症的基因治疗

黎 健

(卫生部北京老年医学研究所 北京医院, 100730)

家族性高胆固醇血症(FHC)是一种 LDL 受体缺失的遗传性疾病,根据 LDL 受体两个等位基因缺失的程度不同,分为杂合子和纯合子型。在杂合子型病人,由于一个等位基因的异常而引起血清胆固醇含量升高,易患早发性冠心病。纯合子型则系两个等位基因异常,往往在儿童时期因患冠心病而死亡。治疗 FHC 的策略是降低血清 LDL 水平。对于杂合子型,可以通过药物来刺激 LDL 受体的表达,使 LDL 水平下降。但对纯合子型,仅用药物难以达到治疗目的。目前,常用反复的换血来降低患者血清 LDL 水平。另一个策略是通过肝脏移植使患者恢复正常的 LDL 受体功能,虽已有成功的例子,但由于器官排斥等问题,使其应用受到限制。近年来,分子克隆、人基因组图谱及基因转运技术的发展,为遗传性疾病的基因治疗奠定了基础,短短的 2~3 年,科学家已建立了 FHC 基因治疗的动物模型,并已初步用于临床试验。笔者在美国 Baylor 医学院学习工作期间,主要从事基因治疗的研究工作,在此对 FHC 基因治疗的研究进展作一个简单介绍,以期达到抛砖引玉的作用。

### 1 基因转运技术的发展

基因治疗的关键是需要一个基因转运系统把某个基因有效地转运到缺失这个基因的器官或细胞中去。目前,已建立了许多基因转运系统,最常用的是病毒系统,其中的逆转录病毒(Retrovirus)和腺病毒(Adenovirus)载体已成功用于 FHC 的基因治疗研究(见表 1)<sup>[1]</sup>。

#### 1.1 逆转录病毒载体<sup>[2]</sup>

该病毒是从鸡中分离出来的 RNA 病毒,经适当改造后成为有效的转载体。带有外源基因的逆转录病毒载体,经转染进入包装细胞,经过整合、复制、包装等步骤而成为完整的病毒颗粒。当病毒感染靶细胞时,外源基因便可整合到细胞的基因组,靶细胞便可表达该基因。作为载体,逆转录病毒具有一定的优点:①广泛性,可作用于不同种类的细胞;②可携带大到 7 kb 的外源基因;③外源基因整合到细胞染色体上后,可以持续稳定地表达。但它也有一些缺点而使应用受限:①产

生的病毒滴度较低;②外源基因在细胞中表达水平较低;③只作用于分裂细胞;④在体内能被补体灭活。

#### 1.2 腺病毒(Adenovirus)载体<sup>[3]</sup>

腺病毒主要由 E<sub>1</sub>、E<sub>2</sub>、E<sub>3</sub> 和 E<sub>4</sub> 部分组成,是无外壳的双链 DNA 病毒。当构建载体时,除去 E<sub>1</sub> 部分。将此载体与另一个含有外源基因的载体共转染到含有 E<sub>1</sub> 基因的人肾 293 细胞。两个载体在细胞内重组并借助于 293 细胞中的 E<sub>1</sub> 基因而产生完整的病毒。这些病毒通过受体途径感染靶细胞,使其表达外源基因。与逆转录病毒相比,腺病毒具有诸多优点:①可以感染非分裂细胞;②可以高水平表达外源基因;③感染的细胞种类多且效率高,可用于体内、体外试验。但也有一些缺点,例如不能把外源基因整合到靶细胞基因组中,故外源基因的表达只是短暂的,经过几次细胞分裂后会丧失表达外源基因的能力。

### 2 家族性高胆固醇血症基因治疗的动物模型及临床试验

早在七十年代,Watanabe 建立了一个类似于人 FHC 的动物模型,称为 Watanabe 兔,它的 LDL 受体基因在配体结合区域缺失了 12 个核苷酸,结果表达一种无功能的受体蛋白,不能与 LDL、VLDL 结合,导致严重的高胆固醇血症及动脉粥样硬化。九十年代初,Wilson 等<sup>[4]</sup>利用逆转录病毒载体把人的 LDL 受体基因运送到 Watanabe 兔的肝细胞,使肝细胞表达人的 LDL 受体,降低了血清胆固醇含量。Herz 等<sup>[5]</sup>利用胚胎干细胞 Knock out 技术建立了 LDL 受体缺失的小鼠模型,通过静脉注射把含有人 LDL 受体基因的腺病毒载体转运到小鼠肝脏组织,注射后 4 天,便可测到功能性 LDL 受体的出现。其它几个实验室也证实腺病毒载体能有效地把 LDL 受体转运到肝细胞。这些动物实验为临床试验奠定了基础。

Wilson 等<sup>[4]</sup>建立了 *ex vivo* 基因治疗方法,并已应用于临床试验。他们从病人身上取出一小块肝脏,分离培养肝细胞,用含有 LDL 受体基因的病毒感染肝细胞,然后将那些已能表达 LDL 受体的肝细胞通过导管注入肝静脉,治疗三个月后,再取出小部分组织,分析

LDL 受体的 RNA 和 DNA 水平。同时分析病人的血清 胆固醇含量,证实治疗效果。

Table 1. Methods for delivering genes into mammalian cells and likely applications in gene therapy.

| Method                           | application in<br>gene therapy |                | transient<br>(T) or stable<br>(S)expression |
|----------------------------------|--------------------------------|----------------|---------------------------------------------|
|                                  | <i>ex vivo</i>                 | <i>in vivo</i> |                                             |
| Viral                            |                                |                |                                             |
| Retrovirus                       | +                              | ?              | S                                           |
| Adenovirus                       | +/-                            | +              | T                                           |
| Adeno-associated virus(AAV)      | +                              | ?              | S                                           |
| Herpes virus                     | +/-                            | +              | ?                                           |
| Vaccinia virus                   | +/-                            | +              | T                                           |
| Polio virus                      | +/-                            | +              | T                                           |
| Sindbis and other RNA viruses    | +/-                            | +              | T                                           |
| Nonviral                         |                                |                |                                             |
| Ligand-DNA conjugates            | -                              | +              | T                                           |
| Adenovirus-ligand-DNA conjugates | -                              | +              | T                                           |
| Lipofection                      | +/-                            | +              | T                                           |
| Direct injection of DNA          | -                              | +              | T                                           |
| CaPO <sub>4</sub> precipitation  | +/-                            | -              | S                                           |

(+); Major application; (+/-); Some application; (-); little or no application; T; only transient expression S; stable expression

### 3 问题与展望

目的基因在靶细胞中表达的有效性及持续性对于基因治疗是至关重要的。正如以上所述,应用逆转录病毒可以使靶细胞持续表达目的基因,但效率低。腺病毒载体的效率高,但不能持久,由于正常人肝细胞不常分裂,故腺病毒载体仍不失为一种有效的方法。目前已发展一种称为腺相关病毒(Adeno-Associated virus)的载体作为人基因治疗的载体<sup>[7]</sup>,它具有逆转录病毒载体能把外源基因稳定有效地整合到细胞基因组这一优点,同时又具备腺病毒载体的高效率,可望不久将用于 FHC 的基因治疗。

在 FHC 基因治疗中的另一个问题是肝组织的特异性。带有 LDL 受体基因的载体,通过肝静脉注入,不但分布到肝脏,可能也分布到其它组织,这就会引起 LDL 受体基因在其它组织的异常表达。有人<sup>[8]</sup>曾尝试利用肝脏独特的受体把载体特异性引入肝细胞,但肝细胞只短暂地表达外源基因。目前一种新的策略是利用肝细胞特异的启动子来控制外源基因只在肝脏表达<sup>[9]</sup>。许多已知肝特异的基因都具有这种启动子,预计不久的将来这种启动子将用于 FHC 基因的治疗。

### 参考文献

- Muligan RC. The basic science of gene therapy. *Science*, 1993, **260**: 926.
- Jolly D. Viral vector systems for gene therapy. *Cancer Gene Therapy*, 1994, **1**(1): 51.
- Gavin WG. et al. Introduction of gene transfer, viral vectors. *Gene Therapy*, 1994, **1**(suppl): 51.
- Chowdhury JR. et al. Long term improvement of hypercholesterolemia after ex vivo gene therapy in LDLR deficient rabbits. *Science*, 1991, **254**: 1802.
- Ishibashi S. et al. Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knock out mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest*, 1993, **92**: 883.
- Michael Straus. Liver-directed gene therapy: prospects and problems. *Gene Therapy*, 1994, **1**: 156.
- Kotin RM. Prospects for the use of adeno-associated virus as vector for human gene therapy. *Human Gene Therapy*, 1994, **5**: 793.
- Wu GY. et al. Receptor-mediated gene delivery in vivo. *J Biol Chem*, 1991, **266**: 14338.