

# 以骨骼肌为靶组织的基因治疗研究进展

张 慧 综述 范乐明 审校

(南京医科大学动脉粥样硬化研究中心, 南京 210029)

**摘要** 以骨骼肌为靶组织的基因治疗具有操作简便、安全、易于在临床上推广等特点。通过质粒 DNA 载体、腺病毒和逆转录病毒载体的介导, 已获得肌性和非肌性蛋白的稳定表达, 不仅适用于感染性疾病的多核苷酸免疫接种及遗传性肌病、血浆蛋白缺乏症等单基因疾病的防治研究, 也为包括动脉粥样硬化在内的多基因疾病的治疗开辟了一个新的途径。

**关键词** 骨骼肌; 基因治疗; 动脉粥样硬化

选择合适的靶组织是实施基因治疗的重要环节。近几年来, 以骨骼肌为靶组织进行基因转移的方法受到广泛关注。肌肉组织介导的基因转移被认为是安全、

简便和有效的途径<sup>[1]</sup>, 其主要优点在于: ①骨骼肌位于体表, 便于操作, 比将目的基因转移至内脏器官更具简便性; ②肌肉组织体积大(约占体重 30%), 可容纳更多的外源基因, 且肌肉组织血流丰富, 外源基因在肌细胞表达的蛋白质易进入血液循环而发挥作用, 因此被认为是除表达肌细胞本身的基因外, 也是异位表达其他任何分泌性蛋白质基因的良好场所; ③由于骨骼肌不属于生命的重要器官, 当转入基因不适合或对机体产生有害影响时, 可随时切除, 增加了安全性; ④肌细胞的结构特征也十分适合于基因转移: 细长的肌纤维不仅表面积大, 而且具有多个细胞核, 其浆膜又形成特有的 T 管系统, 均有利于外源基因的高效转移; 肌纤维为

高度分化的静止期细胞,转入的基因不易丢失;当肌肉损伤时,存在于成熟肌纤维和基膜之间的少量肌母细胞活化增殖,分化为新生的肌纤维。这种具有较强增殖能力的干细胞可以分离培养,在体外接受基因转移,再移植回肌肉组织后可以相互或与原有肌纤维融合成为多核的成熟肌纤维,使外源基因稳定地存在于这些肌纤维中。上述优点和特征使以骨骼肌作为基因转移靶组织的研究十分活跃,已有不少利用骨骼肌合成肌性或非肌性蛋白的报导,现简要作一综述。

## 1 骨骼肌基因转移途径的研究进展及存在的问题

以骨骼肌为靶组织的基因转移通常采用两种途径:一种是间接法,即将体外培养的肌母细胞通过重组逆转录病毒载体转染后植入宿主骨骼肌;另一种是直接法,即将带有目的基因的质粒 DNA 或腺病毒载体直接注入骨骼肌中。

### 1.1 间接法

1991年 Barr 等<sup>[2]</sup>首次将带有人类生长激素的逆转录病毒转染的 C2C12 细胞移入免疫抑制的成年小鼠骨骼肌中,证实了采用肌母细胞移植表达目的基因的可行性。以后又相继报道了通过肌母细胞移植表达  $\beta$ -半乳糖苷酶( $\beta$ -galactokinase,  $\beta$ -gal)、凝血因子 IX、红细胞生成素等多种目的基因<sup>[3~6]</sup>。部分实验中分泌入血的重组蛋白质已达有效生理水平,表达时间最长持续六个月<sup>[6]</sup>。但这种方法目前尚难适用于人体基因治疗。因为动物实验中所用的肌母细胞通常来源于 C2C12 细胞株或原代培养的乳鼠肌母细胞,C2C12 细胞株可能有致肿瘤作用,不够安全。另外,人类要找到有核细胞表面的组织相容性抗原(HL-A 抗原)匹配的初生供体肌母细胞也很困难。1994年 Naffakh<sup>[3]</sup>将成年小鼠肌母细胞经带有  $\beta$ -gal cDNA 的重组逆转录病毒转染后,植入预先经过损伤的成年小鼠骨骼肌中,目的基因持续表达了 10 w。提示肌肉坏死和再生过程可为成熟肌细胞的植入与融合提供更合适的环境。人类骨骼肌特征与小鼠并不完全相同,此种方法是否适用还需进一步探讨。

### 1.2 直接法

一般认为直接将质粒 DNA 注入骨骼肌中可能是最简单、经济而又安全的方法。1990年 Wolff<sup>[9]</sup>首次将含  $\beta$ -gal 基因的质粒注入小鼠骨骼肌中,不仅在注射区域的细胞内检测到该基因的表达产物,而且分泌至血液循环,时间长达 19 个月<sup>[10]</sup>。但其表达效率较低,免疫

组织化学检测证实目的基因仅在注射部位附近约 1% 的肌纤维中表达。近几年来,许多学者采用化学或物理方法损伤肌肉,诱导肌细胞再生,以增加质粒 DNA 的吸收。1993年 Wells<sup>[11]</sup>发现用布比卡因或氯化钡诱导肌肉再生对目的基因的表达有促进作用。Danko 等<sup>[12]</sup>在此基础上通过实验证实成年小鼠骨骼肌中的干细胞大部分处于稳定状态,它们的分裂和融合依赖外界环境和肌肉自身状态的改变,而布比卡因或氯化钡可以增加细胞膜的通透性,使细胞内钙离子浓度增加,引起肌纤维强烈收缩而受损,从而产生大量激活因子,诱导干细胞分裂,其间大量核质发生转移,外源基因就更容易进入细胞。在转染技术方面,除使用常规注射器外,还可以多聚阳离子、阳离子脂质体为载体,基因枪进行 DNA 包被颗粒的轰击等。最近 Wells<sup>[13]</sup>通过实验指出,虽然质粒 DNA 不象病毒载体那样产生病毒蛋白,但仍可以激活机体的细胞毒性免疫反应,抑制质粒 DNA 的表达。因此,今后的研究不仅要改进转移技术,还应该在质粒吸收机制以及导入机体后诱发的免疫反应方面进一步探讨。

腺病毒载体也是近几年来被广泛应用的一个基因运载系统。与逆转录病毒相比具有繁殖滴度高、不整合及转染效率高等优点。曾有报导采用静脉内或心肌内注射时目的基因表达范围广泛,骨骼肌注射时目的基因表达局限于注射部位,但易于监控<sup>[14]</sup>。因此,基因治疗可根据不同的治疗目的选择不同的导入途径。目前已通过直接肌肉注射法获得肌细胞内 dystropin 基因和  $\beta$ -gal 的高水平表达,红细胞生成素等非肌性蛋白也可分泌至血液循环达有效生理水平,但存在以下问题<sup>[15~17]</sup>。首先,幼年和成年小鼠的骨骼肌细胞在腺病毒载体转染和表达效率上存在差异。1994年 Descamps 等<sup>[18]</sup>将高滴度的腺病毒载体注入成年小鼠骨骼肌中,仅有少量目的基因表达,而注射前物理损伤诱导骨骼肌细胞再生则有利于目的基因的表达。这一现象的原因可能是与腺病毒载体相关的同源  $\alpha v\beta 3/\beta 5$  受体在成熟肌纤维中被配基所占领,而未成熟的肌母细胞相对存在较多病毒受体<sup>[19]</sup>。另外,腺病毒载体导入肌细胞后可诱导机体产生免疫反应和炎症反应,使转基因的细胞数量减少,缩短外源基因表达的持续时间。有资料表明,腺病毒诱导机体产生免疫反应的主要抗原来自它所表达的晚期蛋白,而晚期蛋白的表达很大程度上受早期基因产物的调控,腺病毒本身还可以通过 E3 区调节早期蛋白 gP19k 的表达,降低宿主细胞组织相容性 I (major histocompatibility I, MHC I) 类分子在细胞膜上的表达,减少抗体对感染细胞的免疫监视<sup>[20]</sup>。目前研

究的热点是改造腺病毒载体,降低机体免疫反应,包括在腺病毒载体中插入 gP19k 蛋白组成性表达盒,使 E1 缺失的腺病毒载体能组成性表达 gP19k 蛋白;失活 E2a 区功能,减少结合蛋白 DBP 的表达,降低 CTL 细胞毒性反应;构建 E1+E4 联合缺失的载体,使 E4 区编码的晚期蛋白合成减少等。另外,在增加腺病毒载体的靶向性方面亦有所进展,Douglas<sup>[21]</sup>将骨骼肌受体配基与腺病毒纤维蛋白融合,使腺病毒载体与骨骼肌细胞受体特异性结合;通过叶酸盐与抗纤维蛋白单克隆抗体的 Fab 片段结合,再与含纤维蛋白的腺病毒载体连接,通过骨骼肌细胞表面的叶酸盐受体途径增加腺病毒载体的靶向性。总之,随着腺病毒载体的不断改进,在未来的基因治疗中将会发挥更重要的作用。

## 2 骨骼肌表达外源基因的临床应用前景

### 2.1 神经肌肉疾病

以骨骼肌为靶组织的基因治疗主要应用于单基因疾病,尤其是突变位点明确者,如遗传性肌萎缩(duchenne muscular dystrophy, DMD),它是由编码一种重要结构蛋白 dystropin 基因突变引起的,病变累及全身肌肉组织时,病人多因呼吸功能衰竭或心功能衰竭而死亡。这类疾病基因治疗的关键在于肌纤维能够表达 dystropin 基因。目前正常骨骼肌细胞移植法和带有 dystropin 基因的质粒 DNA 直接注射法表达效率低,腺病毒载体注射法表达时间短<sup>[22,23]</sup>,均不能有效地将目的基因导入足量量的骨骼肌细胞中,理想的基因转移方法尚待建立。

### 2.2 血清活性蛋白相关性疾病

利用骨骼肌合成非肌性蛋白且分泌至细胞外发挥作用的原理,通过直接法或间接法,已成功表达了  $\alpha$  因子、胰岛素及生长激素,在治疗血友病、糖尿病和垂体性侏儒症等动物实验中取得了较好的疗效<sup>[2,5,24]</sup>。近年来,高脂血症的基因治疗也引起人们的注意。大量的研究资料表明脂代谢异常与有关脂蛋白所含载脂蛋白的质和量异常密切相关。例如,载脂蛋白 E 主要存在富含甘油三脂的脂蛋白中,其主要功能是作为配基介导极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, VLDL)、乳糜微粒残体对细胞表面载脂蛋白 B 和载脂蛋白 E 受体的高亲和性结合。载脂蛋白 E 结构和功能的异常是 IV 型高脂血症形成必不可少的分子基础。其基因缺陷小鼠血浆总胆固醇水平比正常高 5 倍,甘油三酯水平约升高 68%,可自发产生动脉粥样硬化病灶。用腺病毒载体将人载脂蛋白 E 基因转入由饮食诱导的高脂血症小鼠的肝细胞,可使血浆胆固醇和甘油三酯水平明显

降低。将载脂蛋白 E 基因转入小鼠动脉壁内皮细胞,可防治动脉脂纹的形成<sup>[25]</sup>。因此,通过载脂蛋白 E 基因转导可增加全身或局部的表达,将成为动脉粥样硬化基因治疗的一个重要组成部分。1994 年 Fazio<sup>[26]</sup>将带有人载脂蛋白 E 由 CMV 启动子驱动的质粒 cDNA 直接注入骨骼肌,在载脂蛋白 E 免疫缺陷的 Yoshida 大鼠血液检测到载脂蛋白 E 的表达。目前国内和国外一些实验室正致力于利用骨骼肌表达与胆固醇逆转运密切相关的载脂蛋白 A I、载脂蛋白 E 及卵磷脂胆固醇酰基转移酶等,为高脂血症和动脉粥样硬化的治疗开辟了一个新的途径。

### 2.3 核酸疫苗

与神经肌肉疾病的治疗不同,多核苷酸免疫接种只要求局部且短暂的目的蛋白表达,再作为抗原刺激宿主产生长期的体液或细胞免疫反应,是一种简单、有效及安全的基因治疗方式。1993 年 Ulmer<sup>[27]</sup>首次将带有流感病毒核酸蛋白(NP)的质粒注入小鼠骨骼肌中,产生 NP 抗体,使小鼠获得对流感病毒的抵抗力。继而又研制出单纯疱疹病毒、B 型肝炎病毒、艾滋病病毒等核酸疫苗<sup>[28,29]</sup>。其中艾滋病病毒疫苗的研制引起了人们的重视,它是一种由反转录病毒 HIV 引起的免疫缺陷性疾病。由于 HIV 极易发生变异,因此改用 HIV 上具有免疫原性基因片段的蛋白质来替代整个 HIV 病毒研制疫苗。目前这些疫苗均已进入临床实验,较为看好的是 HGP30,它以各种 HIV 变株所共有的核心蛋白 P17 为基础,能避免变异与遗传漂移,引发特异杀伤 T 细胞的免疫反应,并能消除各种感染细胞。

总之,以骨骼肌为靶组织的基因治疗,经过一系列基础和应用研究之后,已逐渐显示出优越性。但目前还存在许多问题,尤其是外源基因表达的稳定性、安全性和可调节性。除了改进各种载体、研究肌细胞的生物特征和载体导入机体后诱发的免疫反应等,还应深入研究各种疾病发生和发展的分子机制。需要指出的是,基因治疗毕竟是一项十分复杂的工程,与临床应用还有一段很大的距离,但随着分子生物学技术的发展,基因治疗终将成为人类战胜包括动脉粥样硬化在内的各种疾病的重要手段。

### 参考文献

- 1 Svensson EC, Tripathy SK, Leiden JM. Muscle-base gene therapy: realistic possibilities for the future. *Molecular Medicine Today*, 1996, 2: 162~172.
- 2 Barr E, Leiden JM. Systemic delivery of recombinant

- proteins by genetically modified myoblasts. *Science*, 1991, **254**: 1 507~509.
- 3 Naffakh N, Pinset C, Montarras D, et al. Transplantation of adult-derived myoblasts in mice following gene transfer. *Neuromusc Disord*, 1994, **3**: 413~417.
  - 4 Thdmas A, Rando M, helen M, et al. Primary mouse myoblast purification, characterization, and transplantation for cell-mediated gene therapy. *J cell Biol*, 1994, **125**: 1 257~287.
  - 5 Yao SN, Kurachi K. Expression of human factor X in mice after injection of genetically modified myoblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 3 357~361.
  - 6 Dai Y, Roman M, Naviaux RK, et al. Gene therapy via primary myoblasts; long-term expression of factor X protein following transplantation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 10 892~895.
  - 7 Yao SN, Smith KJ, Kurachi K, et al. Primary myoblast-mediated gene transfer; persistent expression of human factor X in mice. *Gene Therapy*, 1994, **1**: 99~107.
  - 8 Naffakh N, Pinset C, Montarras D, et al. Transplantation of adult-derived myoblast in mice following gene transfer. *Hum Gene Ther*, 1996, **7**: 11~21.
  - 9 Wolff JA, Malone RW, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, 1990, **247**: 1 465~468.
  - 10 Wolff JA, Ludtke JJ, Acsadi G, et al. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum Mol Genet*, 1992, **1**: 363~369.
  - 11 Wells DJ. Improved gene transfer by direct plasmid injection associated with regeneration in mouse skeletal muscle. *FEBS Lett*, 1993, **28**: 164~168.
  - 12 Danko I, Fritz JD, Jiaio S, et al. Pharmacological enhancement of in vivo foreign gene expression in muscle. *Gene Therapy*, 1994, **1**: 114~121.
  - 13 Wells KE, Maule J, Kingston R, et al. Immune responses, not promoter inactivation, are responsible for decreased long-term expression following plasmid gene transfer into skeletal muscle. *FEBS Lett*, 1997, **28**: 164~168.
  - 14 Kass-Eiser A, Falck-Pedersen E, Elfenbein DH, et al. The impact of development stage, route of administration and the immune system on adenovirus-mediated gene transfer. *Gene Therapy*, 1994, **1**: 395~402.
  - 15 Pavlath GK, Rando TA, Blau HM, et al. Transient immunosuppressive treatment leads to long-term retention of allogeneic myoblast in hybrid myofibers. *J Cell Biol*, 1994, **127**: 1 923~932.
  - 16 Stratford-Perricaudet LD, Makeh I, Perricaudet M, et al. Widespread long-term gene transfer to mouse skeletal muscles and heart. *J Clin Invest*, 1992, **90**: 626~630.
  - 17 Tripathy SK, Goldwasser E, Lu MM, et al. Stable delivery of physiologic levels of recombinant erythropoietin to the systemic circulation by intramuscular injection of replication-defective adenovirus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 11 557~561.
  - 18 Descamps V, Blumenfeld N, Villeval JL, et al. Erythropoietin gene transfer and expression in adult normal mice; use of an adenovirus vector. *Hum Gene Ther*, 1994, **5**: 979~985.
  - 19 Acsadi G, Massie B, Huard J, et al. Cultured human myoblasts and myotubes show markedly different transducibility by replication defective adenovirus recombinant. *Gene Ther*, 1994, **1**: 395~402.
  - 20 程金科, 林晨, 吴雯. 腺病毒载体的应用及进展. 国外医学分子生物学分册, 1996, **4**: 145~149.
  - 21 Douglas JT, Curiel DJ. Strategies to accomplish targeted gene delivery to muscle cells employing tropism-modified adenoviral vectors. *Neuromuscul Disord*, 1997, **7**: 284~298.
  - 22 Morgan JE. Cell and gene therapy in Duchenne muscular dystrophy. *Hum Gene Ther*, 1994, **5**: 165~173.
  - 23 Karpati G, Ajdukovic D, Arnold D, et al. Myoblast transfer in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol*, 1993, **34**: 8~17.
  - 24 Stevenson SC, Marshall-Neff J, Teng B, et al. Phenotypic correction of hypercholesterolemia in apoE-deficient mice by adenovirus-mediated in vivo gene transfer. *Arterioscler thromb Vasc Biol*, 1995, **15**: 479~484.
  - 25 Simonson GD, Groskreutz DJ, Gorman CM, et al. Synthesis and processing of genetically modified human proinsulin by rat myoblast primary cultures. *Hum gene ther*, 1996, **7**: 71~78.
  - 26 Fazio VM, Fazio S, Rinaldi M, et al. Accumulation of human apoE in rat plasma after in vivo intramuscular injection of naked DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 1994, **200**: 298~305.
  - 27 Ulmer J, Donnelly J, Parker S, et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*, 1993, **259**: 1 745~749.
  - 28 Manickan E. Genetic immunization against herpes simplex virus protection is mediated by CD4 + T lymphocytes. *J Immunol*, 1995, **155**: 259~265.

- 29 Wang B. Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**: 4 156~160.

(此文 1998-04-21 收到, 1998-10-26 修回)

(此文编辑: 文玉珊)