

· 综 述 ·

AIDS 的基因治疗

方厚华¹ 侯志军² 田凤华³

一、AIDS 基因治疗的可能性: 近些年来, AIDS 基因治疗的研究取得了一些进展, NIH 重组 DNA 顾问委员会 (RAC) 已先后批准多个 HIV 感染的基因治疗的临床研究方案——1993 年 7 月批准 Nobel G 等人把插入 Rev₁₀ 基因的 CD₄⁺ T 细胞用于临床研究; 当年 9 月又批准了 Greenberg PD 的临床实验计划, 把针对 HIV-1 抗原特异性的携带自杀基因的 CD₈⁺ T 细胞用于过继转移治疗 HIV 感染; 于此前后, Wang SF 等人采用 LNL₆ 载体将 HIV-1 先导序列 hairpin 核酶基因导入 CD₄⁺ T 细胞以研究转化细胞在患者体内的行踪方法也获批准。将表达 gp160 的反转录病毒重组体直接注入患者体内的基因治疗已进入 I 期临床试验阶段^[1]。这些结果展示了 AIDS 基因治疗的光明前景。

所谓基因治疗是将抗病毒基因导入患者的细胞内, 赋予患者新的抗病机能, 它包括目的基因的选择与克隆、载体的构建与包装及受体的选择与转入等。Weatherall^[2] 提出基因治疗的五个基本条件, 即了解基因型和某些表型的变异性; 熟悉“持家基因”的特异性; 选好受体细胞(原则是易限定的和常见的); 寻找稳定而有效的载体; 受转染细胞要有生长优势和稳定而高效表达的水平。把 AIDS 做为基因治疗的对象是因为它有如下一些特征: ① AIDS 是 HIV 的基因整合到染色体后所引起的后天性遗传性疾病, 如果能够抑制这种整合作用则可阻止其成为 AIDS; ② AIDS 基本属于淋巴细胞疾病, 这为基因治疗限定了靶细胞; ③ 采用基因治疗技术产生的抗-HIV 淋巴细胞较之 HIV 破坏的细胞更具有增殖能力, 即使向其中一部分淋巴细胞导入抗-HIV 基因也可望获得疗效。

二、抗-HIV 基因: 对病毒感染的基因治疗最重要的问题是找出特异性抑制病毒增殖的抗病毒基

因。目前研究最多的是反义核酸和核酶。

1. 反义核酸: 反义核酸是互补于 mRNA 的 RNA 或 DNA, 在细胞内形成部分双链, 阻碍 mRNA 的剪接、运送和翻译, 降低 mRNA 的稳定性, 从而影响基因的构成。可利用反义核酸分子与 mRNA 特异性互补的特点来调控细胞中的 mRNA 的量, 按剂量来调节特定基因的表达。无论在细胞水平还是在个体水平, 它的调节作用都已得到证实^[3,4]。Zamecnik^[5] 和 Matsukura^[6] 发现把合成的反义核酸加在培养基上能够抑制新培养的细胞的 HIV 增殖。在反转录病毒中, mRNA 的代谢和 RNA 的复制以及对病毒粒子的包裹都受反义核酸的影响, 但这种反义调控仅限于原核细胞水平。岛田隆氏^[7] 用反义 RNA 在淋巴细胞内表达, 制做出带有各种反义核酸序列的反转录病毒载体, 并将其导入 CD₄⁺ T 细胞。在这些细胞中反义核酸做为来自 LTR 和内部启动子的 RNA 而被大量表达。但对这些细胞进行感染实验却未见有抑制效果。究其原因是反义 RNA 的量不足, 至少需提高 10 倍反义 RNA 的量才有可能抑制 HIV 基因的表达。同时, 新培养的 T 细胞的不均一性也是抑制 HIV 失败的原因。Chatterjee S 等把与 HIV-1 LTR 序列互补的 63bp 的寡核苷酸与腺病毒构建重组体, 导入人的 T 细胞, 可使转化细胞在 HIV-1 感染后病毒滴度下降 1 000 倍左右, 这提示我们利用反义核酸对 AIDS 基因治疗有很大的研究价值。需要解决的问题是反义核酸的专一性转移和进入靶细胞之前的降解。

2. 核酶: 核酶由 Ribozyme 一词译来。核酶最初由 Haseloff 在研究烟草病毒时发现的, 它最大的特点是做为一个酶发挥作用, 具有催化 RNA 切割反应的能力。目前已有使用核酶在培养细胞上干预 HIV 基因表达的报道。Yu M^[8] 发现 hairpin 型核酶可裂解 HIV-1 RNA 的 5' 一端引导序列, 并可抑制 HIV 在 HeLa 细胞中的复制。Sarver 等^[9] 设计了 4 种针对 HIV gag 基因和 5' - LTR 的核酶, 结果见 4 种核酶都可在体外培养的细胞中有效地切割 HIV-1 的

1 中国人民解放军农牧大学 吉林长春 130021

2 中国科技馆

3 中华预防医学会

RNA, 其中针对 gag 的核酶在 CD₄ HeLa 细胞中灭活了 gag 的 RNA, 阻止了 P 24 gag 的抗原表达, 抑制了病毒的复制。Chen Zh 还发现 hammerhead 型核酶也可降低 HIV 感染细胞 CD₄⁺ HeLa 的表达, 而且还可通过整合酶或引导序列的作用使 HIV 的表达延迟。

核酶的稳定性较低, 生理条件下反应速度缓慢是其用于抗-HIV 的不足之处, 同时对它在机体内是怎样被转录的和转录后抗 RNase 的能力还需做进一步的探索。

三、诱捕作用和反式显性突变: 诱捕作用 (Decoy) 是通过竞争分子来阻抑反式作用子 (Trans-acting factor) 和顺式作用元件 (cis-acting element) 之间的结合。HIV 的 Tat 与 mRNA 的 TAR 序列结合是基因表达所必需的, 如果让有 TAR 序列的 RNA 分子在细胞内大量表达的话, HIV 的 Tat 就被用于与这个 TAR 序列的结合, 从而减少与 mRNA 的结合。Gilboa 利用反转录病毒载体, 让 TAR 在 CD₄⁺ T 细胞中表达, 成功地培养出抗-HIV 感染的克隆细胞; Sullenger BA 将 HIV-1 的 Tar 或 RRE 基因插入到带有 Pol III 启动子的反转录病毒载体上, 再用其转染 CEM_{ss} T 细胞系, 获得了 Tar 和 RRE 超表达, HIV 的基因表达受抑^[10]。美国研究人员改变疱疹病毒基因组, 用编码人 T 细胞受体 CD₄ 和 fusin 序列代替为其被膜蛋白编码的基因, 诱骗 HIV 与其融合, 从而解脱对正常 T 细胞的作用, 用这种方法使体外培养的细胞 HIV 负荷降低到极低水平。

有抗病毒特性的蛋白质中还有反式显性突变 (Trans dominant mutant) 蛋白质, 它是在细胞内发生突变的病毒蛋白质, 可抑制有感染力的病毒的增殖。把突变了 Tat 和 Rev 导入细胞内可抑制 HIV 基因的表达。在由突变反式作用子产生的竞争抑制中, 需要大量的突变分子, 但由结构蛋白 Gag 分子突变产生的反式显性抑制, 在病毒粒子形成之际把突变的 Gag 和正常的 Gag 同时组装进去, 以此来抑制病毒的成熟或产生不具感染力的粒子, 用很少的分子数就可得到理想的效果, 但目前还难以找到高效表达 Gag 的载体。

近几年有报道, 可溶性 CD₄ 分子 (sCD₄) 和 sCD₄ 与免疫球蛋白的杂化分子可在体外抑制 HIV 和 T 细胞表面 CD₄ 分子的结合。把 sCD₄ 的表达载体导入 T 细胞可使之在血液中持续分泌 sCD₄。将重组的 sCD₄ 注射到 HIV-1 感染的患者体内的治疗方法曾进入 I 期临床试验。将 sCD₄-Ig 融合蛋白基因插入 HIV-1 LTR 下游, 通过 Tat 可诱导该基因表

达, 并可见明显的抑制 HIV-1 感染的效应。

四、AIDS 基因治疗的载体和靶细胞: AIDS 基因治疗的另一重要问题是要找出能把抗-HIV 的基因高效地导入 T 淋巴细胞并使之表达的载体。反转录病毒载体是基因治疗中应用最多的载体。构建反转录病毒载体时, 用目的基因取代病毒结构基因, 保留病毒信号和两端的 LTR, 再转移到包装细胞中。现常用小鼠反转录病毒 (MoMLV) 构建重组病毒载体, 可以用它将基因导入多种细胞内, 被导入的基因可被高效率地、稳定地组装进染色体中。但载体构建有可能导致具有传染性的新病毒的出现, 基因的表达效率也低。岛田氏^[7]发现在淋巴细胞中人的 B₁₉ 细小病毒的启动子具有高于 SV₄₀ 启动子 5 倍以上的活性, 他进行了由 tRNA 的 Pol III 启动子参与的抗 HIV-RNA 的表达试验。Gilboa 使用 tRNA 启动子能够使 TAR decoy 的表达达到全部 Poly A RNA 量的 5%。

基因治疗中应根据不同疾病选择靶细胞。做为 AIDS 基因治疗的靶细胞是 CD₄⁺ T 细胞及其先驱细胞。由于现在对血液干细胞的导入技术还不成熟, 所以主要把末梢 T 细胞当做靶细胞。岛田构建出带有 HIV 基因的重组病毒载体, 这个重组体的最大特点是保持了原 HIV 的一些重要特性, 能够以相同的机制进入靶细胞, 仅能够导入表面有 CD₄ 受体的细胞 (即组织特异性基因导入), 所以不必为了基因的导入而去纯化 CD₄⁺ T 细胞。理论上说也可以将这个重组病毒载体直接注入患者体内 (in vivo 基因导入), 但需要在安全性方面进行改进。

基因治疗是一个崭新的领域, 把 AIDS 基因治疗付诸实施还存有许多问题, 特别是高效抗-HIV 基因的认定更是困难, 迄今为止所报道过的抗-HIV 基因只是在某些特定条件下才有某些效果。另一问题是没有适宜的检测体系, 现在用的体外检测方法不能判定体内感染的实际情况。

参 考 文 献

- 1 Wang B. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90:4156-4160.
- 2 Weatherall D. Nature, 1991, 349:275.
- 3 Ding R. J Biol Chem, 1992, 267:12804.
- 4 Theologis A. Plant Physiol, 1992, 100:549.
- 5 Zamecnik PC, Goochild J, Taguchi Y, et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83:4143-4146.
- 6 Matsukura M, Zon G, Shinozuka K, et al. Proc Natl Acad

- Sci USA, 1989, 86:4244-4288.
- 7 岛田隆. 细胞工程学, 1996, 11:191-197.
- 8 Yu M. Proc Acad Natl Sci USA, 1993, 90:6340.
- 9 Sarver N, Cantin EM, Chang PS, et al. Science, 1990, 247:1222-1225.
- 10 Sullenger BA, Gallardo HF, Gilboa E. Cell, 1990, 63:601-608.
- (收稿: 1999-01-20 修回: 1999-02-02)

吡嗪酰胺治疗腮腺淋巴结结核致药物热一例报告

陈 光 王道富 石子英

我科于 1998 年 7 月 8 日收治一名腮腺淋巴结结核患者, 在治疗过程中口服吡嗪酰胺出现药物性高热不良反应, 报告如下。

病例报告: 患者, 男 19 岁, 战士, 因右耳垂下肿痛 30 天, 在外院经肌注青霉素治疗, 无效, 肿痛继续加重, 怀疑为腮腺肿瘤, 于 1998 年 7 月 3 日转我院就诊。检查见: 右腮腺尾叶及上颈部膨隆, 表面皮色微红, 皮温稍高, 可触及数个大小不等的肿物, 相互融合, 最大的约 3.0cm×2.5cm×2.5cm, 表面光滑, 质中等, 压痛明显, 活动。初步诊断腮腺淋巴结结核菌素试验呈阳性, 经口服雷米封抗痨治疗 3 天, 右腮腺肿物疼痛减轻, 于 1998 年 7 月 8 日以右腮腺淋巴结结核入院治疗, 口服雷米封 0.3g, 每日一次, 利福平 0.45g, 每日一次, VitB6 10mg, 每日三次, 治疗一周后, 局部肿物明显缩小, 疼痛基本消失。为了增强疗效, 从 1998 年 7 月 13 日起加服吡嗪酰胺片 0.25g, 每日三次, 5 天后, 患者每日下午 3 时出现寒战, 继之体温升高, 最高达 39.2℃。查全身情况及血

常规化验均正常。给予消炎痛栓 50mg 纳肛, 头枕冰袋, 输液等对症治疗后体温 1 小时后降至正常。以上高热反复发生三天, 仍查不出原因, 怀疑药物不良反应, 停用吡嗪酰胺后体温恢复正常。患者于 1998 年 7 月 29 日出院, 转某部疗养院继续治疗。

讨论:

1. 该病治疗过程中应用吡嗪酰胺后产生高热, 怀疑为药物不良反应, 经查有关文献得知, 吡嗪酰胺毒性反应“可引起寒战、发热、血液尿酸增加和关节疼痛”。故停用该药。停药后体温恢复正常。

2. 结核治疗过程中出现的药物不良反应, 应引起医师们的注意, 吡嗪酰胺也是一种治疗结核病较为传统的药物, 其副作用有些文献报道得不够明确, 用该药治疗结核病引起高热等副作用, 医师不易发现其原因, 从而拖延停药时间, 给患者造成不必要的痛苦。

3. 第三次全国结核病流行病学调查结果提示, 我国结核病疫情仍很严重, 部队战士多来自边远的农村, 对结核菌有易感性, 应引起部队医疗部门的重视。

作者单位: 解放军第三〇五医院 北京 100017

(收稿: 1999-03-22)

《中国人畜弓形体病调查研究》成果应用 研讨会在杭州举行

1998 年 10 月 25~27 日《中国人畜弓形体病调查研究》成果应用研讨会在杭州举行, 收到论文 19 篇, 有 7 位专家作了大会学术报告, 广西卫生厅原副厅长王树声教授亲临指导并作了艾滋病报告, 原杭州市人民政府副主席, 现杭州市政协副主席、市优生优育协会会长徐兆骥教授作了讲话, 中华流行病学学会主任委员北京医科大学教授魏承毓来信表示祝贺。《中国人畜弓形体病调查研究》由广西卫生防疫站崔君兆主任医师(传统医学博士)领导的一个受国家自然科学基金会资助的大型项目, 有 50 个单位 158 人参加协作的跨地区、跨学科的项目, 经何观清等专家评审, 于 1989 年获省级医药卫生一等奖, 对促进我国弓形虫病的研究和开发起到了很大作用, 其成果得到了和继续得到推广和应用, 与会者回顾过去, 以新的成果来纪念项目获奖 10 周年, 倍感亲切, 在即将进入 21 世纪的时候, 弓形虫病的研究已由过去的冷门发展成现在的热门, 它在医学界、兽医学界日益受到重视, 特别是与优生优育关系密切, 希望弓形虫病的研究有助于提高我国人口先天素质, 发挥更大的作用。

(本刊编辑部)