

脑部重大疾病的基因治疗研究进展

范 丽, 蒋新国*

(复旦大学药学院, 上海 200032)

摘要: 近年来分子生物学与医学的共同发展促进了脑部疾病基因治疗的研究。本文通过查阅相关文献, 进行归纳总结, 综述了目前脑部重大疾病的基因治疗研究进展。针对脑部重大疾病, 包括脑肿瘤、帕金森病、阿尔茨海默病及脑血管病变等的发病机制, 均有较为有效的基因治疗策略。基因治疗作为脑部疾病的一种全新治疗手段, 无疑对于了解脑部疾病的病因及其全面治疗具有重要意义。

关键词: 基因治疗; 脑部疾病; 脑肿瘤; 帕金森病; 阿尔茨海默病; 脑血管病变

中图分类号: R971

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 09-1095-08

Development of gene therapy in major brain diseases

FAN Li, JIANG Xin-guo*

(School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract: In recent years, the development of molecular biology and medicine has prompted the research of gene therapy for brain diseases. In this review, we summarized the current gene therapy approaches of major brain diseases. Against the pathogenesis of major brain diseases, including brain tumors, Parkinson's disease, Alzheimer's disease and cerebrovascular disorders, there are several effective gene therapy strategies. It is no doubt that, gene therapy, as a novel treatment, is of great significance for understanding the causes, as well as comprehensive treatment for brain diseases.

Key words: gene therapy; brain disease; brain tumor; Parkinson's disease; Alzheimer's disease; cerebrovascular disorder

随着人类社会的老龄化, 脑部疾病的发病率逐年上升, 已成为危害人类健康的重大疾病之一。脑部疾病主要包括脑肿瘤、帕金森病、阿尔茨海默病以及脑血管病变等, 目前尚无有效的治疗药物, 因此, 寻找更有效的治疗方式和治疗靶点, 是当今脑部重大疾病治疗研究的重点。

基因治疗的原始定义, 是将遗传物质 (通常是 DNA) 导入患者靶细胞, 以其表达产物改变疾病的自然进程, 从而达到治疗疾病的目的^[1]。随着基因治疗相关研究的深入, 基因治疗的概念已扩展到反义核苷酸技术、RNA 干扰等。基于近年来对于脑部疾

病发生、发展的分子病理机制的进一步认识, 对脑部疾病的基因治疗作为从根源上改变基因、调控基因表达的一种治疗手段, 其可行性与有效性已经得到了初步证实。本文拟就脑部重大疾病的基因治疗研究综述如下。

1 脑肿瘤的基因治疗

目前, 国内外针对脑肿瘤的常规治疗包括手术治疗、放疗和化疗。由于脑肿瘤多数具有较强的侵袭性, 手术很难完全切除瘤体细胞; 由于肿瘤的迅速增殖, 肿瘤部位因缺氧而对放疗不敏感; 血脑屏障的存在, 阻碍了化疗药物的颅内递送。因此, 传统的治疗方案仅能延缓患者的生命, 而患者的预后较差。基因治疗作为一种全新的治疗方式成为脑肿瘤治疗研究的热点^[2, 3]。

收稿日期: 2010-03-17.

基金项目: 国家重大科学研究计划资助项目 (2007CB935800).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-21-51980067, E-mail: xgjiang@shmu.edu.cn

1.1 基因介导的酶/前体药物疗法 (gene directed enzyme prodrug therapy, GDEPT)

GDEPT 又称为自杀基因疗法, 其原理是将前体药物转换基因 (也称自杀基因) 直接或间接导入肿瘤细胞中, 该基因编码特殊的酶能催化无毒性的前体药物在肿瘤中代谢为毒性产物, 引起肿瘤细胞的死亡^[4]。

单纯疱疹病毒胸腺激酶基因/丙氧鸟苷系统 (HSVtk/GCV) 是最为广泛应用的自杀基因/前体药物系统。Immonen 等^[5]在 2004 年对 HSCtk/GCV 的治疗作用采用临床随机对照研究, 结果显示该系统对于脑胶质瘤患者的存活时间有较显著的延长; 大肠杆菌胞嘧啶脱氢酶基因/5-氟胞嘧啶系统 (Ec-CD/5-FC) 中的 CD 能将无毒性的 5-FC 脱氨基转换成有毒性的 5-FU, 从而导致肿瘤细胞死亡^[4, 6]; 细胞色素 P450/环磷酰胺 (P450/CPA) 或细胞色素 P450/异环磷酰胺 (P450/IFO) 系统能利用细胞色素 P450 将 CPA 或 IFO 转换成可将 DNA 烷化或者使之发生链内或链间交联继而断裂的物质, 从而阻碍正在分裂的细胞, 如肿瘤细胞中的 DNA 扩增^[4, 6]。另外, 硝基还原酶基因、羧肽酶 G2 基因及嘌呤核苷磷酸化酶基因均被用作自杀基因来增强前药的抗肿瘤能力^[4]。

1.2 抗肿瘤血管生成与肿瘤转移的策略

浸润性肿瘤的生长依靠血管的生成以维持肿瘤的代谢需要, 从而成为肿瘤治疗的靶点。血管生成依赖正负调节的精确平衡, 包括基底膜降解, 内皮细胞扩增, 对周围间质的侵袭及通过结构重组成新的功能性血管网络等一系列复杂的步骤, 整个进程涉及多种调节因子如生长因子、黏附分子及基质降解酶等^[7]。针对血管生成的不同步骤, 可设计出多种抗血管生成的基因治疗方法, 如下调包括血管内皮生长因子 (vascular endothelium growth factor, VEGF)、胎盘生长因子、血管内皮生长因子受体 (vascular endothelium growth factor, VEGFR)、成纤维细胞生长因子、血管生成素和 Tie 受体、血小板衍生生长因子等在内的血管生长因子基因表达, 增强内源性血管生成抑制剂血管抑素或内皮抑素 (endostatin, ES)、血小板因子-4、胶质瘤血管生成抑制因子等的表达^[3, 7, 8]。Ma 等^[9]通过单次肌肉注射载有血管抑素基因的腺相关病毒到人神经胶质瘤的裸鼠异种嫁接体中, 发现 40% 经腺相关病毒-血管抑素作用的动物存活期高达 10 个月, 而未经肌肉注射或注射腺相关病毒-GFP 的对照组荷瘤鼠因肿瘤过度生长在 6 周内死亡。Szentirmai 等^[10]分别构建了编码 VEGFR-2-Fc 融合蛋白、编码

ES、编码免疫球蛋白 1-Fc 的腺病毒载体 Ad-VEGFR2-Fc、Ad-ES 和 Ad-Fc, 并通过静脉注射分别将此 3 种载体以及 Ad-VEGFR2-Fc 复合 Ad-Fc 给予荷 U87 人恶性胶质瘤异种嫁接体的裸鼠。结果表明, 治疗后 3 周, Ad-VEGFR2-Fc、Ad-ES 及复合组的肿瘤抑制率分别为 69%、59% 及 74%, 且染色结果显示, 该 3 组肿瘤细胞扩增减少, 凋亡增加, 表明内皮抑素及 VEGFR2 融合蛋白的持续表达能减慢胶质瘤的生长。

1.3 肿瘤抑制基因的高表达

肿瘤抑制基因的高表达系指在细胞凋亡与细胞周期中所涉及的基因再活化与表达, 包括肿瘤抑制基因、生长抑制基因与促凋亡基因在内的基因高表达, 是脑肿瘤基因治疗中最常用的方法。

p53 是一种研究较为透彻的肿瘤抑制基因, 主要通过参与 DNA 修复机制与促进细胞周期阻断或者损伤细胞的凋亡来抑制肿瘤生长; 另外 p73 α (p53 的同源体) 能在低级别星形细胞瘤中产生较高水平的凋亡作用; 一些凋亡基因, 如 Apaf-1、caspase-9, 不仅能增加凋亡, 也能促进野生型的肿瘤抑制基因如 p53、Bax、p21/WAF1 与 Fas 基因的表达; 肿瘤坏死因子相关配体 TRAIL 能诱导多数肿瘤细胞发生广泛的凋亡。研究表明, 由于正常细胞中“诱骗”受体的存在, TRAIL 仅诱导肿瘤细胞、转化细胞或病毒感染细胞凋亡, 而不诱导正常细胞凋亡, Lu 等^[3, 11]将 TRAIL 基因包载于阳离子白蛋白修饰的纳米粒中构建脑靶向递药系统 CBSA-NP-hTRAIL, 通过静脉注射到大鼠 C6 脑胶质瘤模型中, 取得了较好的肿瘤抑制效果; PTEN 基因是第 1 个被发现的具有磷酸酶活性的抑癌基因, 其缺失及突变与多种肿瘤有关, 约有 30%~40% 的恶性神经胶质瘤均表现出 PTEN 的突变^[12]。Abe 等^[13]发现, 向表现 EGFR 活性而 p53 失活的胶质瘤模型中转导 PTEN 基因, 肿瘤模型仍然表现出血管生成抑制效果; Gas1 基因是与 p53 作用类似的肿瘤抑制基因, Benitez 等^[14]采用反转录病毒与腺病毒介导 Gas1 到接种了大鼠星形胶质细胞 C6 的裸鼠胶质瘤模型中, 能抑制肿瘤的生长; IDH1 基因被发现与脑肿瘤的发生有着密切关系, 尤其是近两年来对该基因的功能分析, 为其作为肿瘤抑制基因提供了有力证据。Zhao 等^[15]发现, IDH1 的突变会诱导转录蛋白 HIF-1 α 的产生, 而 HIF-1 α 能在低氧环境中促肿瘤生长; Dang 等^[16]的研究表明, IDH1 的突变能将 α -酮戊二酸还原为 2-羟戊二酸, 而 2-羟戊二酸的过度积累促使神经胶质瘤的形成和恶性进展。

1.4 下调或阻断原癌基因的表达

肿瘤的发生发展与许多原癌基因的激活有关。原癌基因是细胞内与细胞增殖相关的基因,是维持机体正常生命活动所必需的,在进化上高度保守。当原癌基因的结构或调控区发生变异,基因产物增多或增强时,使细胞过度增殖,从而形成肿瘤。原癌基因的产物主要包括生长因子、生长因子受体、蛋白激酶及其他信号转导组分、细胞周期蛋白、细胞凋亡调控因子和转录因子等。如 *EGFR*、*Bcl*、*c-myc*、*ras*、*Met*、*GLI*、*myb* 等基因与细胞凋亡最为密切^[17]。利用反义核酸技术或当今迅速发展的 RNA 干扰技术,可以定向阻断或下调其异常表达,在体内与体外明显抑制肿瘤增殖。Saydam 等^[18]构建了分别携带针对 *EGFR* 两个外显子位点以及针对 *EGFR* 的 shRNA 的 3 种纯疱疹病毒载体,分别称为 siEGFR I、siEGFR II 和 siEGFR 组,然后从细胞增殖数目、溴苷的插入及细胞集落形成能力等增殖参数,周期分析与凋亡细胞染色,对裸鼠胶质瘤模型的肿瘤生长抑制等方面评估了肿瘤细胞被 3 种 siRNA 处理后的存活及增殖能力,表明 siEGFR II 能明显抑制肿瘤细胞的增殖。Julien 等^[19]设计了针对 *bcl-2* 的反义寡核苷酸,以无意义的寡核苷酸序列为对照,于体外分别转染恶性胶质瘤细胞 Jon52 与 Roc。结果显示,反义 *bcl-2* 能增加胶质瘤细胞坏死率,且细胞中 *bcl-2* 蛋白表达水平下降。Chu 等^[20]的研究表明,反义 *c-Met* 寡核苷酸能使多个胶质瘤细胞系的 *c-Met* 蛋白表达下降,且于体内并未检测到反义 *c-Met* 寡核苷酸的毒性。

1.5 端粒、端粒酶与脑肿瘤

肿瘤主要发生机制之一是细胞正常的有限生命周期的缺陷,使细胞永生,端粒酶能以自身的 RNA 组分为模版从头合成端粒,使得在染色体复制过程中端粒的长度不被减短,端粒酶的激活是细胞永生化的关键^[21]。研究者多采取破坏端粒酶中的 RNA 模板或者抑制人端粒酶逆转录酶 hTERT 来达到抑制肿瘤的目的,具有潜在的临床应用价值^[22-24],然而采取这两种策略抑制端粒酶活性会引起丙氨酸转氨酶机制的发生,而丙氨酸转氨酶机制在很多端粒酶阴性的人肿瘤细胞中被发现。因此,有研究者尝试从第三种途径,即阻止端粒酶逆转录酶到细胞核的易位以及与端粒的结合。研究表明,端粒酶逆转录酶的易位以及与端粒的结合主要与端粒酶逆转录酶的羧基末端有关。Ng 等^[25]用携带表达端粒酶逆转录酶的羧基末端蛋白的基因腺病毒载体,治疗 U87 裸鼠恶性胶质瘤模型,取得了较显著的肿瘤抑制效果,

治疗组的细胞凋亡明显增加而血管密度明显减小。

1.6 免疫疗法

细胞因子免疫疗法旨在通过激活肿瘤特异性 T 淋巴细胞与自然杀伤细胞来抑制肿瘤细胞。细胞因子基因包括 *IL-2*、*IL-4*、*IL-7*、*IL-12*、*IFN-α*、*IFN-β*、*IFN-γ*、*GM-CSF*、*TNF-α* 等。*IL-12* 是一种重要的免疫调节因子,能增强肿瘤特异性 T 淋巴细胞与自然杀伤细胞等免疫细胞的功能及增加 *IFN-γ* 的释放。Ren 等^[26]采用 SFV 病毒载体装载 *IL-12*,并将其包裹在阳离子脂质体中,构建了 LSFV-IL12 系统,检验了其在脑胶质瘤患者中的安全性;*IFN-β* 的抗肿瘤机制包括,诱导凋亡,活化并产生 *IL-1β*、*IL-6* 等细胞因子以及诱导肿瘤坏死因子 *TNF-α* 等。Yoshida 等^[27]用阳离子脂质体将 *IFN-β* 转染到 5 名脑胶质瘤患者进行临床试验,其中两名患者病情部分缓解,两名患者在治疗开始 10 周后病情变得稳定。

1.7 RNA 干扰 (RNAi)

RNAi 技术与传统的反义寡核苷酸技术相比,特异性更高,并具有放大效应,因此更有应用前景。RNAi 能针对脑肿瘤发生相关的多种基因发挥作用,血管生成相关基因、癌基因、端粒酶基因以及细胞周期调控基因等都能作为理想的 RNAi 作用靶点。徐丰等^[28]采用阳离子白蛋白修饰的纳米粒介导针对 *c-myc* 基因的 siRNA 构建 CBSA-NP-siRNA 脑内递药系统,治疗小鼠脑胶质瘤模型,通过免疫组化,流式细胞仪检测细胞凋亡等在药效学水平证明了 siRNA 对脑胶质瘤有较好的治疗效果。

1.8 联合基因治疗

脑肿瘤的发生是多基因相互作用与网络调控的结果,因此采用多种基因治疗策略联合的方式能取得更好的治疗效果。脑肿瘤的基因治疗可以从以下几个方面进行:① 抑制胶质瘤细胞的恶性增殖;② 促进抗肿瘤免疫;③ 诱导瘤细胞凋亡;④ 促进瘤细胞分化;⑤ 抑制肿瘤血管的形成与新生;⑥ 降低肿瘤的微侵袭性;⑦ 抑制抗耐药基因的表达;⑧ 增加放疗化疗的敏感性。相关的研究,如 *PTEN* 基因与反义端粒酶逆转录酶核苷酸的联合^[29]、*PTEN* 基因与反义 *EGFR* 核苷酸的联合^[30]等,都证明基因的联合治疗较某个基因单独治疗效果更佳。

2 帕金森病的基因治疗

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是一种常见的中老年神经退行性疾病,其病理特征是中脑黑质纹状体系统多巴胺能神经元变性死亡,导致脑内多巴胺神经递质减少,出现静止性震颤、肌僵直和运动

迟缓等临床症状^[31]。目前治疗 PD 的传统药物只能减缓症状而不能阻止病情的发展,且会引起药物副作用。近年来基因治疗帕金森病显示了良好的潜力和发展前途,其主要从3条途径入手:① 转染多种多巴胺合成途径中的相关基因;② 转染能合成神经因子的基因;③ 转染分子通路调节基因。多基因的联合可提高疗效,siRNA 也逐渐应用于帕金森病^[32]。

2.1 转染多巴胺合成途径中相关基因

2.1.1 酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) 基因 脑黑质致密部的多巴胺能神经元从血液摄入左旋酪氨酸,在细胞内 TH 的作用下,经过一系列的反应生成多巴胺,故转染 TH 基因可增加多巴胺合成量。多巴胺能神经元的变性和丢失是帕金森病的直接原因,所以补充多巴胺可作为 PD 的替代治疗。周政等^[33]将 TH 基因转染入神经干细胞,神经干细胞自身能分化出多巴胺神经元,且能表达 TH,并显著减少了 PD 模型小鼠的旋转行为。

2.1.2 芳香左旋氨基酸脱羧酶 (aromatic L-amino acid decarboxylase, AADC) 基因 在多巴胺合成过程中需要由 AADC 将左旋多巴胺脱羧基生成神经递质多巴胺,转染 AADC 可以增加多巴胺的合成量。Bankiewicz 等^[34]将转染 AADC 基因的腺相关病毒转入 PD 恒河猴模型的纹状体中,同时给予左旋多巴,使得治疗的敏感性明显增加,AADC 的表达显著且平稳,可持续2年以上,极大降低了动物对左旋多巴的需要量,具有诱人的临床应用价值。

2.1.3 GTP 环水解酶 I (GTP cyclohydrolase I, GCH I) 基因 GCH I 是合成四氢生物喋呤 (tetrahydrobiopterin, BH4) 的限速酶,而 BH4 是合成 TH 的辅酶,所以 GCH I 在多巴胺的合成中同样具有重要作用。目前 GCH I 在基因治疗中的应用主要是联合转染,增加多巴胺的合成量^[32]。Muramatsu 等^[35]将 GCH、AADC 和 TH 基因的混合物注射到猴 PD 模型的一侧纹状体,与仅注射其中一种基因的对照组相比较,其多巴胺合成明显增多,且其 PD 行为的改善所持续的时间更长。

2.2 转染具有神经保护作用的基因

2.2.1 神经胶质源性神经营养因子 (glial-derived neurotrophic factor, GDNF) 基因 GDNF 是源自神经胶质的一种糖基化蛋白,它能增强中脑多巴胺能神经元的存活。Huang 等^[36]用乳铁蛋白修饰的纳米粒携带人 GDNF 基因构建给药系统,通过多剂量静脉注射给药,治疗鱼藤酮诱导的大鼠 PD 模型。结果显

示,多剂量给药较单次给药能提高 GDNF 的表达量,且 GDNF 的表达持续时间延长;乳铁蛋白修饰的携带 GDNF 的纳米粒能显著提高模型鼠的活动能力,降低多巴胺能神经损伤,并增强单胺神经递质的水平,显示出强有力的神经保护疗效。

2.2.2 脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 基因 BDNF 属于神经营养因子家族,且在大脑内分布广泛,但 Sun 等^[37]的研究表明,BDNF 无论是在纠正行为缺陷还是保护黑质多巴胺能神经元的效果都不如 GDNF,且两个神经营养因子的共表达效果不如 GDNF。

2.2.3 Nurrl (nuclear receptor related-I) 基因 Nurrl 基因属于孤儿核受体家族,目前认为它对中脑多巴胺能神经元的发育、存活和成熟后表型的维持都有重要作用。Nurrl 基因可以增加多巴胺转运体基因和 TH 基因的转录。敲除 Nurrl 基因可导致黑质多巴胺能神经元发育不良。Kim 等^[38]将 Nurrl 基因用巨细胞病毒转入小鼠胚胎干细胞,使野生型胚胎干细胞成为 Nurrl 胚胎干细胞,并在体外诱导其分化,然后将诱导的多巴胺神经元植入 PD 大鼠模型,Nurrl 胚胎干细胞组阿朴吗啡诱导的旋转行为较野生型组有显著减轻,受体动物组织用免疫组织化学染色发现大量 TH 阳性细胞。

2.3 转染分子通路调节相关基因

Parkin 是泛素蛋白酶系统的一种泛素连接酶,细胞内 Parkin 表达增加可以降低氧化应激反应程度,而氧化应激在黑质多巴胺能神经元变性死亡中起重要作用。Parkin 对于很多毒性损伤具有神经保护作用,且在基因治疗中,具有减缓多巴胺神经元丢失的潜能,其还可以对抗 Tau 来保护多巴胺神经元,并用在 Parkin 基因突变引起的 PD^[32]。

2.4 基因转导重建兴奋性和抑制性神经递质平衡

近年来研究发现,纹状体内多巴胺的缺失并不是 PD 的唯一病理基础,脑内其他神经递质如谷氨酸、天冬氨酸、 γ -氨基丁酸和甘氨酸等4种氨基酸类神经递质也可能参与 PD 的发病过程。谷氨酸与天冬氨酸为兴奋性氨基酸,具有兴奋毒性,其过量分泌与 PD 临床症状的发生有关,而谷氨酸在经谷氨酸脱羧酶作用后转化为抑制性递质 γ -氨基丁酸,能作用于基底神经节,拮抗谷氨酸的兴奋作用,减缓 PD 临床症状^[39]。

3 阿尔茨海默病的基因治疗

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是以

进行性记忆障碍、失语和失认等认知障碍为特征的中枢神经系统退行性疾病。AD 的主要神经病理改变有老年斑、神经纤维缠结、神经元凋亡并丢失及炎症反应。关于 AD 的发病机制有诸多学说, 如: 中枢神经递质代谢障碍学说、 β 淀粉样肽级联反应学说、细胞骨架学说、钙代谢紊乱学说、自由基学说和神经凋亡学说等^[40]。其中, 以 β 淀粉样肽级联反应学说占主导地位, 该假说认为, AD 是一种临床病理综合征, 可能是由于不同的基因缺陷直接或间接导致 β 淀粉样蛋白前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 的表达或切割过程的改变, 或使 β 淀粉样蛋白 (amyloid protein β , A β) 的稳定性和聚集性发生变化, 最终导致 A β 的生成和清除之间失去平衡, 而逐渐加剧的 A β 聚集启动了一种复杂的、多级联的过程, 包括胶质细胞变性、炎症改变、神经突触改变、纤维缠结和神经递质丢失。

AD 的治疗目前以药物为主, 包括 β 淀粉样蛋白药物、拟乙酰胆碱和促乙酰胆碱释放药物、抗炎药物等。但由于这些药物治疗的作用主要集中在维持退化的胆碱能神经元功能及疾病的早期, 并不能真正治愈晚期 AD 患者。基因治疗针对 AD 的发病机制主要包括神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 基因治疗、沉默 APP 的基因治疗、以端粒酶为靶点的基因治疗及靶向载脂蛋白 E (apolipoprotein E, ApoE) 的基因治疗等。

3.1 NGF 基因治疗

NGF 是神经系统一种重要的营养生长因子, 它能防止疾病或衰老引起的基底前脑胆碱能神经元的损害。近年来随着人们对其研究的逐渐深入, 尤其是神经生长因子基因转移技术的应用, 为人类治疗 AD 带来新的希望。Chen 等^[41]用 NGF 基因修饰成纤维细胞, 使其分泌 NGF, 然后将此细胞移植至老年鼠基底核, 观察到 NGF 基因修饰的成纤维细胞在脑内存活 6 周并且持续表达 NGF mRNA, 大鼠的空间记忆障碍得到明显改善, 基底前脑中 NGF 低亲和力受体阳性细胞数明显增多, 显示 NGF 基因修饰的成纤维细胞能使残存的胆碱能神经元产生一种代偿能力, 从而改善宿主的记忆学习能力。Tuszynski 等^[42]采用 NGF 基因对 AD 患者进行了 I 期临床试验研究, 对 8 名轻微 AD 患者前脑植入了能够表达人 NGF 的成纤维细胞, 治疗结果显示患者的认知能力下降的情况得到了改善。

3.2 沉默 APP 基因

A β 是 AD 的主要病理特征老年斑的主要成分,

是各种原因诱发 AD 的共同通路。而 APP 是 A β 的前体蛋白, 目前认为 APP 经过酶切割所产生的 A β 和 APP 的 C 末端在 AD 病理机制中起重要作用, APP 基因突变或过表达能够引起 AD 的发生。因此, 阻断 APP 基因的表达是改善或治疗 AD 的一种可行策略。有研究者针对突变型的 APP 基因设计了对其起特异性沉默作用的 siRNA, 证明了 siRNA 对突变型 APP 有较好的沉默作用而不影响野生型的 APP^[43]。因此, 采用 RNAi 技术或反义核酸技术下调 APP 的基因表达, 是一种具有发展前景的治疗 AD 的方式。

3.3 以端粒酶为靶点的基因治疗

研究表明端粒酶同其相关蛋白在防止细胞衰老中起着关键作用, 可以保护神经元, 阻止其发生细胞凋亡。如果可以激活 AD 患者神经元端粒酶活性, 有望给 AD 的防治带来一定的意义。端粒酶在神经元内的作用机制还在进一步研究之中, 若能弄清端粒酶的特性及其活化条件, 重建端粒酶及其相关酶活性, 延缓细胞衰老, 抵抗细胞凋亡, 或许能为 AD 的防治开创一片新天地^[44]。

3.4 以 ApoE 为靶点的基因治疗

ApoE 的生理功能主要为参与胆固醇的转运及血浆蛋白的代谢, 同时还具有神经元修复、树突生长、维持突触可塑性及抗炎等作用。目前关于 ApoE 与 AD 关系的研究很多, 认为 ApoE 基因是 AD 发病的危险因子。因此, ApoE 有望成为 AD 早期诊断的标记和特异性基因治疗的靶点^[45]。

4 脑血管病变的基因治疗

广义上脑血管病变包括由于栓塞和血栓形成导致的血管腔闭塞、血管破裂、血管壁损伤或通透性发生改变、血黏度增加或血液成分异常等。尽管在诸如阿尔茨海默病等神经性退化疾病领域, 基因治疗已经进入临床阶段, 脑血管病变的基因治疗研究仍然处于实验阶段。

4.1 脑缺血的基因治疗

迄今为止, 脑缺血的基因治疗相对于其他脑血管病变疾病进展较为深入, 这在很大程度上得益于合适的动物模型。动物模型能够模拟包括中枢动脉、双侧颈总动脉闭塞在内的多种疾病, 以此为基础开展的治疗通过过量表达参与防护途径的特定基因, 旨在修复因缺血而损伤的大脑组织^[46]。

4.1.1 利用神经营养因子和生长因子调节细胞死亡
利用神经营养因子和生长因子促进神经发生是治疗脑局部缺血引起中风的一种策略。这类因子包括

NGF、GDNF、BDNF、神经营养素及表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 等, 能够抑制发病区域的细胞凋亡并有助于组织重生^[46]。EGF 是一类调控细胞生长、繁殖和分化过程的因子, 包括肝素结合 EGF 样生长因子 (heparin-binding EGF-like growth factor, HB-EGF)、神经胶质生长因子、转化生长因子 α (transforming growth factor- α , TGF- α) 等。向大鼠的大脑注射腺相关病毒载体介导的 HB-EGF 有助于神经生长、血管生成和相关区域的功能恢复^[47]。BDNF 是一种神经营养因子, 控制中枢神经系统的神经形成及细胞凋亡。对大鼠中枢动脉闭塞模型给予 BDNF 后, 功能恢复加快, 凋亡细胞数减少。GDNF 也有相似的作用^[48, 49]。

4.1.2 调节细胞凋亡和组织坏死的基因治疗 脑卒中后, 由于机体对神经细胞提供的氧气、葡萄糖和其他营养物质减少, 进一步的活性氧形成、细胞骨架崩溃和蛋白质错误折叠等过程会加剧细胞凋亡和组织坏死。高表达抗凋亡基因已成为当前有关脑卒中基因治疗的研究热点^[46]。研究最多的是 Bcl-2 家族的成员。通过 HSV 载体介导的 Bcl-2 基因高表达有助于抑制细胞色素 c 的释放, 从而抑制下游细胞凋亡的发生。在细胞凋亡途径中, TNF- α 起激活作用, A20 抑制 TNF- α 作用。虽然具体机制尚不明了, 但已有高表达 A20 进行成功基因治疗的报道^[50]。值得注意的是, 这些不同于上述生长因子治疗方法的新思路, 而激活一种抑制性因子的方法明显优于过量表达生长因子, 因为过量表达的结果始终是不可预测的, 易产生副作用。

4.1.3 以抗炎症为目的的基因治疗 受脑卒中诱导产生的炎症反应对细胞造成损害, 这种损害在急性中枢神经系统缺血中尤为明显。因此, 抑制环氧合酶 2 (cyclooxygenase-2, COX-2)、白细胞介素 1 (interleukin-1, IL-1)、单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemotactic, MCP-1) 和基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 等一系列炎症相关因子的基因治疗受到关注。在前人的研究基础上找到一系列因子, 通过特定的载体介导, 抑制特定的炎症因子表达。如 IL-1 受体拮抗蛋白特异抑制 IL-1, TGF- β 1 特异抑制 MCP-1^[51], 组织金属蛋白酶抑制因子特异抑制 MMP^[52]等。

4.2 脑血管痉挛的基因治疗

脑血管痉挛是蛛网膜下腔出血致死的主要原因。向小脑延髓池注射血液的手段构建了一种合适的动物模型, 基于此展开的研究主要关注蛛网膜下腔出

血后脑血管痉挛的控制。一氧化氮 (NO) 活性在脑血管痉挛时降低, 而该物质能够扩充血管。高表达重组型 NO 合成酶有助于增加血液中 NO 的含量, 起到对抗蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的目的^[53]。另一个脑血管痉挛的原因是氧化应激。因此, 与氧化应激密切相关的活性氧成为基因治疗的又一靶点。腺病毒载体介导的细胞外 SOD 转运入脑显著降低了动物模型的蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛, 过量表达细胞外 SOD 也起到了相似的作用^[54]。

4.3 其他脑血管病变疾病的基因治疗

其他脑血管病变疾病包括动静脉畸形毛细血管扩张、海绵状血管畸形、脑动脉瘤、血管瘤等。迄今为止, 对这些疾病的基因治疗研究进展不深, 主要是由于缺少合适的动物模型所致。因此, 建立合适的动物模型是当今研究的重点。这一领域目前也取得了一些进展, 如使用内皮因子杂合子小鼠作为遗传性出血性毛细血管扩张症动物模型^[55], KRIT1 基因杂合子动物被用于脑海绵状血管畸形的研究等^[56]。这些实验结果为进一步探究脑血管病变的发病机制及基因治疗手段构建了技术平台, 将极大促进相关研究工作的开展。

5 总结与展望

脑部疾病在现代社会越来越得到人们的关注并成为研究的热点。神经系统的特性决定了常规方法在治疗脑部疾病中的局限性, 而基因治疗能从脑部疾病的发病根源, 即基因水平入手, 具有其特殊的优势, 并且随着近年来各种脑部疾病在分子水平上的发病机制逐渐明了, 基因治疗作为一种全新可行的治疗策略, 已经从实验室研究阶段进入到临床阶段, 其治疗范围不断扩大。若以基因治疗结合当今药剂学领域研究重点之一, 即脑靶向递药系统, 将基因靶向递释到其需要发挥作用的部位, 则基因治疗在脑部疾病的治疗中将会发挥更加出色的作用。

References

- [1] Engelhard HH. Gene therapy for brain tumors: the fundamentals [J]. Surg Neurol, 2000, 54: 3–9.
- [2] Cutter JL, Kurozumi K, Chiocca EA, et al. Gene therapeutics: the future of brain tumor therapy [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2006, 6: 1053–1064.
- [3] Benitez JA, Dominguez-Monzon G, Segovia J. Conventional and gene therapy strategies for the treatment of brain tumors [J]. Curr Med Chem, 2008, 15: 729–742.
- [4] Portsmouth D, Hlavaty J, Renner M. Suicide genes for cancer

- therapy [J]. *Mol Aspects Med*, 2007, 28: 4–41.
- [5] Immonen A, Vapalahti M, Tynnelä K, et al. AdvHSV-tk gene therapy intravenous ganciclovir improves survival in human malignant glioma: a randomised, controlled study [J]. *Mol Ther*, 2004, 10: 967–972.
 - [6] Wang XL, Zhang X. Development of suicide gene therapy in brain glioma [J]. *J Fourth Mil Med Univ (第四军医大学学报)*, 2003, 24: 2110–2112.
 - [7] Jansen M, de Witt Hamer PC, Witmer AN, et al. Current perspectives on antiangiogenesis strategies in the treatment of malignant gliomas [J]. *Brain Res Brain Res Rev*, 2004, 45: 143–163.
 - [8] Zhou HY, Shen JK, Luo QZ. Angiogenesis and angiogenesis therapy in brain tumor [J]. *Foreign Med Sci (Neurol Neurosurg) (国外医学神经病学神经外科学分册)*, 2001, 28: 135–138.
 - [9] Ma HI, Guo P, Li J, et al. Suppression of intracranial human glioma growth after intramuscular administration of an adeno-associated viral vector expressing an angiostatin [J]. *Cancer Res*, 2002, 62: 756–763.
 - [10] Szentirmai O, Baker CH, Bullain SS, et al. Successful inhibition of intracranial human glioblastoma multiforme xenograft growth via systemic adenoviral delivery of soluble endostatin and soluble vascular endothelial growth factor receptor-2: laboratory investigation [J]. *J Neurosurg*, 2008, 108: 979–988.
 - [11] Lu W, Sun Q, Wan J, et al. Cationic albumin-conjugated pegylated nanoparticles allow gene delivery into brain tumors via intravenous administration [J]. *Cancer Res*, 2006, 66: 11878–11887.
 - [12] Li P, Zhong XY, Qin YF. Expression of PTEN gene in human glioma cell lines U251 and SHG-44 and its effect on cell proliferation [J]. *Chin J Cancer (癌症)*, 2007, 26: 247–251.
 - [13] Abe T, Terada K, Wakimoto H, et al. PTEN decreases *in vivo* vascularization of experimental gliomas in spite of proangiogenic stimuli [J]. *Cancer Res*, 2003, 63: 2300–2305.
 - [14] Benitez JA, Arregui L, Vergara P, et al. Targeted-simultaneous expression of Gas1 and p53 using a bicistronic adenoviral vector in gliomas [J]. *Cancer Gene Ther*, 2007, 14: 836–846.
 - [15] Zhao S, Lin Y, Xu W, et al. Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1 α [J]. *Science*, 2009, 324: 261–265.
 - [16] Dang L, White DW, Gross S, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate [J]. *Nature*, 2009, 462: 739–744.
 - [17] Batra SK, Rasheed BKA, Bigner SH, et al. Oncogenes and anti-oncogenes in human central nervous system tumors [J]. *Lab Invest*, 1994, 71: 621–637.
 - [18] Saydam O, Glauser DL, Turkeri G, et al. Herpes simplex virus 1 amplicon vector-mediated siRNA targeting epidermal growth factor receptor inhibits growth of human glioma cells *in vivo* [J]. *Mol Ther*, 2005, 12: 803–812.
 - [19] Julien T, Frankel B, Longo S, et al. Antisense-mediated inhibition of the bcl-2 gene induces apoptosis in human malignant glioma [J]. *Surg Neurol*, 2000, 53: 360–369.
 - [20] Chu SH, Zhang H, Ma YB, et al. c-Met antisense oligodeoxynucleotides as a novel therapeutic agent for glioma: *in vitro* and *in vivo* studies of uptake, effects, and toxicity [J]. *J Surg Res*, 2007, 141: 284–288.
 - [21] Zhang T, Wang XM. Discovery and significance of telomere and telomerase—Introduction of Nobel Prize in physiology or medicine 2009 [J]. *J Cap Med Univ (首都医科大学学报)*, 2009, 30: 718–722.
 - [22] Kondo Y, Koga S, Komata T, et al. Treatment of prostate cancer *in vitro* and *in vivo* with 2-5A-anti-telomerase RNA component [J]. *Oncogene*, 2000, 19: 2205–2211.
 - [23] Mukai S, Kondo Y, Koga S, et al. 2-5A antisense telomerase RNA therapy for intracranial malignant gliomas [J]. *Cancer Res*, 2000, 60: 4461–4467.
 - [24] Komata T, Kondo Y, Kanzawa T, et al. Treatment of malignant glioma cells with the transfer of constitutively active caspase-6 using the human telomerase catalytic subunit (human telomerase reverse transcriptase) gene promoter [J]. *Cancer Res*, 2001, 61: 5796–5802.
 - [25] Ng SS, Gao Y, Chau DH, et al. A novel glioblastoma cancer gene therapy using AAV-mediated long-term expression of human TERT C-terminal polypeptide [J]. *Cancer Gene Ther*, 2007, 14: 461–472.
 - [26] Ren H, Boulikas T, Lundstrom K, et al. Immunogene therapy of recurrent glioblastoma multiforme with a liposomally encapsulated replication-incompetent Semliki forest virus vector carrying the human interleukin-12 gene—a phase I/II clinical protocol [J]. *J Neurooncol*, 2003, 64: 147–154.
 - [27] Yoshida J, Mizuno M, Fujii M, et al. Human gene therapy for malignant gliomas (glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma) by *in vivo* transduction with human interferon beta gene using cationic liposomes [J]. *Hum Gene Ther*, 2004, 15: 77–86.
 - [28] Xu F. Cationic Albumin Conjugated PLGA Nanoparticles for c-Myc siRNA Gene Therapy Curing C6 Glioma (阳离子白蛋白结合 PLGA 纳米粒介导 c-Myc 基因 siRNA 治疗 C6 脑胶质瘤的研究) [D]. Shanghai: Fudan University, 2009.
 - [29] You Y, Geng X, Zhao P, et al. Evaluation of combination gene therapy with PTEN and antisense hTERT for malignant glioma *in vitro* and xenografts [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2007, 64: 621–631.
 - [30] Tian XX, Zhang YG, Fang WG, et al. Effects of cotransfection of antisense-EGFR and wide-type PTEN cDNA on human

- glioblastoma cells [J]. Neuropathology, 2006, 26: 178–187.
- [31] Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and model [J]. Neuron, 2003, 39: 889–909.
- [32] Wang L, Guo JF, Yan XX. The new progress in gene therapy for Parkinson's disease [J]. J Int Neurol Neurosurg (国际神经病学神经外科学杂志), 2008, 35: 2327–2331.
- [33] Zhou Z, Yin JB, Yang H, et al. Intracerebral transplantation of TH-gene modified neural stem cells for Parkinson's disease. Chin J Neurosurg (中华神经外科杂志), 2003, 19: 375–379.
- [34] Bankiewicz KS, Forsayeth J, Eberling JL, et al. Long-term clinical improvement in MPTP-lesioned primates after gene therapy with AAV-hAADC [J]. Mol Ther, 2006, 14: 564–570.
- [35] Muramatsu S, Fujimoto K, Ikeguchi K, et al. Behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease by triple transduction of striatal cells with adeno-associated viral vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes [J]. Hum Gene Ther, 2002, 13: 345–354.
- [36] Huang RQ, Ke WL, Liu Y, et al. Gene therapy using lactoferrin-modified nanoparticles in a rotenone-induced chronic Parkinson model [J]. J Neurol Sci, 2009, doi:10.1016/j.jns.2009.09.032.
- [37] Sun M, Kong L, Wang X, et al. Comparison of the capability of GDNF, BDNF, or both, to protect nigrostriatal neurons in a rat model of Parkinson's disease [J]. Brain Res, 2005, 1052: 119–129.
- [38] Kim JH, Auerbach JM, Rodríguez-Gómez JA, et al. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease [J]. Nature, 2002, 418: 50–56.
- [39] Luo HQ, Liu CW. Progress about role of amino acid neurotransmitters in pathogenesis of Parkinson's disease [J]. Med Recapit (医学综述), 2009, 15: 1304–1307.
- [40] Zhang W, Wu N, Zhao XD. Alzheimer's disease and its gene therapy research [J]. Mod Med J China (中国现代医药杂志), 2006, 8: 144–145.
- [41] Chen KS, Gage FH. Somatic gene transfer of NGF to the aged brain: behavioral and morphological amelioration [J]. J Neurosci, 1995, 15: 2819–2925.
- [42] Tuszynski MH, Thal L, Pay M, et al. A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease [J]. Nat Med, 2005, 11: 551–555.
- [43] Qiu X. Induction of Silencing Effect of APP of Alzheimer's Disease by Small Interference RNA (小分子干扰 RNA 诱导阿尔茨海默病淀粉样前体蛋白基因的沉默作用) [D]. Wuhan: Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology. 2005.
- [44] Zhang J, Wang HQ. Telomerase and Alzheimer disease [J]. Int J Intern Med (国外医学内科分册), 2005, 32: 180–184.
- [45] Wang ZQ, Cheng ZH, Cai DL, et al. The relevance of ApoE gene and Alzheimer's disease and its progress in diagnostic value and specific gene therapy [J]. Chin J Behavioral Med (中华行为医学与脑科学杂志), 2009, 18: 478–480.
- [46] Gabriel RA, Yang GY. Gene therapy in cerebrovascular diseases [J]. Curr Gene Ther, 2007, 7: 421–433.
- [47] Sugiura S, Kitagawa K, Tanaka S, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor enhances neurogenesis and angiogenesis after focal cerebral ischemia in rats [J]. Stroke, 2005, 36: 859–964.
- [48] Kurozumi K, Nakamura K, Tamiya T, et al. BDNF gene-modified mesenchymal stem cells promote functional recovery and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model [J]. Mol Ther, 2004, 9: 189–197.
- [49] Kurozumi K, Nakamura K, Tamiya T, et al. Mesenchymal stem cells that produce neurotrophic factors reduce ischemic damage in the rat middle cerebral artery occlusion model [J]. Mol Ther, 2005, 11: 96–104.
- [50] Miao HS, Yu LY, Hui GZ, et al. Antiapoptotic effect both *in vivo* and *in vitro* of A20 gene when transfected into rat hippocampal neurons [J]. Acta Pharmacol Sin, 2005, 26: 33–38.
- [51] Pang L, Ye W, Che XM, et al. Reduction of inflammatory response in the mouse brain with adenoviral-mediated transforming growth factor- α expression [J]. Stroke, 2001, 32: 544–552.
- [52] Baker AH, Sica V, Work LM, et al. Brain protection using autologous bone marrow cell, metalloproteinase inhibitors, and metabolic treatment in cerebral ischemia [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104: 3597–3602.
- [53] Khurana VG, Smith LA, Baker TA, et al. Protective vasomotor effects of *in vivo* recombinant endothelial nitric oxide synthase gene expression in a canine model of cerebral vasospasm [J]. Stroke, 2002, 33: 782–789.
- [54] McGirt MJ, Parra A, Sheng H, et al. Attenuation of cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in mice overexpressing extracellular superoxide dismutase [J]. Stroke, 2002, 33: 2317–2323.
- [55] Bourdeau A, Faughnan ME, Letarte M. Endoglin-deficient mice, a unique model to study hereditary hemorrhagic telangiectasia [J]. Trends Cardiovasc Med, 2000, 10: 279–285.
- [56] Kehler-Sawatzki H, Wilda M, Braun VM, et al. Mutation and expression analysis of the KRIT1 gene associated with cerebral cavernous malformations (CCM1) [J]. Acta Neuropathol, 2002, 104: 231–240.