



## 基因治疗研究中动物模型的应用

基因治疗是指在基因水平上把功能基因导入病人靶细胞以纠正先天缺陷或补充新功能的一种全新的治疗手段[1]。自1990年第1例人体基因治疗试验开展以来,基因治疗已取得了长足的进步。它广泛应用于遗传病、恶性肿瘤、艾滋病等领域的治疗研究中。人类疾病动物模型在基因治疗的发展和评估中发挥了重要作用,而且动物模型可作为检测系统,评价基因治疗方案的可行性、有效性、安全性以及进行免疫反应评估等。本文着重介绍动物模型在基因治疗研究中的应用。

### 1 在实验室研究中的应用

基因治疗研究一般分为实验室研究、临床前研究和临床研究。而研究的重点在于发现理想的载体、靶细胞和基因转移技术。在实验室研究阶段,通过应用动物模型模拟人类疾病病理表现,发展相关的基因治疗策略、技术,提出可行方案。

基因治疗早期常选择单基因遗传病作为治疗对象,但由于动物模型不能模拟人类疾病的病理表现,所以其应用价值就大大降低。如Kuehn等[2]运用同源重组等技术,将HGPRT基因插入失活,筛选到Lesch-Nyhan综合症的基因工程小鼠,未表现出类似人类智力障碍的特征,可见HGPRT基因治疗没有实际意义。随着动物模型制备技术(如胚胎操作、生殖细胞基因操作等)的发展和应用,已成功地为基因治疗复制出许多能准确模拟人类疾病病理表现的动物模型,如低密度脂蛋白受体(LDLRs)缺乏引起的家族性高胆固醇血症(Familial hypercholesterolemia, FH)研究中建立的WHHL家兔模型,其类似皮肤黄瘤的爪子损害、冠状动脉粥样硬化以及异常的代谢等症状与人类FH非常接近。对探索胆固醇代谢调节、FH基因诊断及ex vivo基因治疗等均有重要的应用价值[3]。而目前基因治疗中常用的转基因动物模型系统[4],SCID小鼠、SCID-hu小鼠模型[5]等模型的制备,使科学工作者可以在动物模型上进行各种实验,探讨疾病的发病机制,发展基因治疗的策略。

### 2 在临床前研究中的应用

通过在动物模型整体水平上进行基因治疗实验,对基因治疗方案的可行性、有效性、安全性以及治疗中出现的免疫反应作出评价,因此大大提高了临床试验的安全性和可靠性。

#### 2.1 可行性、有效性评价

杜氏肌营养不良症(Duchene muscular dystrophy, DMD)是抗肌萎缩蛋白基因突变引起的一种X连锁隐性疾病。小鼠抗肌萎缩蛋白基因定点突变,导致抗肌萎缩蛋白(Dystrophin)缺失,从而构建了DMD的动物模型mdx小鼠。该小鼠表现出与人DMD相似的渐行性肌纤维退化和纤维变性症状。Cox等[6]将全长的抗肌萎缩蛋白基因导入mdx小鼠时发现,该转基因小鼠的肌肉中表达了dystrophin,其组织、形态和免疫性状的改变消失。这为DMD基因治疗的可行性提供了有力证据。Quillien等[7]在大鼠脑内尾核注入9 L胶质肉瘤细胞,构建了

脑肿瘤的动物模型，然后分别注入含大肠杆菌 $\beta$ -半乳糖苷酶( $\beta$ -gal)基因、单纯疱疹病毒脱氧胸苷激酶(tk)基因的腺病毒载体。结果都证实了腺病毒介导基因治疗的有效性。Batshaw等[8]的实验表明，spf /Y小鼠可作为鸟氨酸氨基甲酰转移酶缺陷症基因治疗有效性研究的一个有用模型。

## 2.2 安全性评价

最大限度地提高治疗效率和降低毒性是基因治疗研究中一个关键问题，动物模型的建立有助于解决这个问题。Kramm等[9]设计了核糖核苷酸还原酶和神经毒力因子 $\gamma$ 34.5双缺陷的、第二代单纯疱疹病毒I型载体(MGH-1)，首先在同一品系大鼠上注入胶质肉瘤细胞来构建模型，然后注入MGH-1，以检测其应用于基因治疗的安全性和效率。结果表明，与只注射有RR缺陷的HSV载体(hrR3)比较，MGH-1载体在大鼠体内存活时间并没有明显延长；但用MGH-1处理的动物模型的死亡率比注射hrR3的低。因此，建立良好的动物模型能够准确评价治疗的安全性。

## 2.3 免疫反应评估

随着重组腺病毒载体的广泛应用，基因治疗领域朝着体内的方向发展。但基因转移治疗中也出现了转基因表达衰减以及炎症反应等问题。Wilson等[10]在肺定向基因转移研究中，建立去除特异细胞因子的小鼠模型。而这种小鼠模型中转基因的表达很稳定。这一研究表明，转基因表达衰减的原因在于宿主对病毒抗原和转基因产物产生了细胞、体液免疫反应。病毒抗原特异性激活宿主的细胞毒性T淋巴细胞(CTLs)和T辅助(T helper, TH)细胞亚组的TH1细胞，CTLs直接破坏遗传矫正的靶细胞。TH1分泌IL2和IFN- $\gamma$ 两种细胞因子，加强CTLs的作用；此外，病毒外壳蛋白激活TH和B细胞，产生中和抗体，有效地防止重组病毒载体的再感染，从而阻断基因转移效应。目前以瞬时免疫封锁为基础的策略要进行修改，同时要修饰载体以降低病毒蛋白的表达，从而提高基因治疗的效果。

# 3 基因治疗研究中应用动物模型的几个问题

## 3.1 遗传背景和生活环境对病理模型的影响

在囊性纤维化(Cystic fibrosis, CF)的基因治疗研究中，许多研究小组在小鼠胚胎干细胞的囊性纤维化跨膜传导调节因子(CFTR)基因中插入特异突变，而得到CFTR缺陷的动物模型。但它们在评价肺定向基因治疗时毫无意义，因为它们在断奶后不久由于胎粪的肠梗阻而致死，但其肺部并未发生病理变化。所以通过对模型进行环境和遗传修饰以增加其效用。有人为CF小鼠种系引入一个从肠启动子开始特异表达的人CFTR转基因，使动物有选择地在肠上皮表达CFTR而防止了肠梗阻的发生[11]。并且，把动物从无病原体的环境中转移出来，置于含有与CF疾病相关的细菌病原体如假单胞杆菌属和金黄色葡萄球菌的环境中培养，以便更精确地模拟CF病人的生活环境。在这些条件下，CF小鼠肺部的病理变化与病人的很相似。这个CF小鼠模型的研究证明了环境和遗传背景对表型表达的影响，且表明可以通过控制这些因素而得到对基因治疗更有用的表型。

## 3.2 动物模型实验与人体基因治疗试验的差异

腺苷脱氨酶缺乏引起的重症联合免疫缺陷症的两例患儿，接受自身的、带有矫正基因的T淋巴细胞回输治疗后，两者免疫系统的重建程度存在显著差异[12]。在FH家兔模型上进行肝脏指导的ex vivo基因治疗中，全部动物的血清胆固醇显著降低[3]；而在患者体内进行时，尽管患者肝脏中都有遗传矫正细胞，但仅有两例病人的血脂得到了改善[13]。以腺病毒介导的基因转导呼吸道上皮细胞来治疗CF，其疗效在各种动物模型上取得一致结果[14]，而人体试验的结果却相当多样[15]。这些早期遗传病病人基因治疗的经验表明，人体基因治疗和动物模型的治疗存在差异。在动物模型上无法模拟人体的遗传背景及生活环境。因此，动物模型基础上发展的基因治疗策略，要在人体试验中加以检验，以确保临床治疗的可靠性和一致性。

(责任编辑：吴锦雅)

参考文献：

- [1] 苏国富. 基因治疗[A]. 见:谷志远. 现代医学分子生物学[M]. 北京:人民军医出版社, 1998. 251-81.
- [2] Kuehn MR, Bradley A, Robertson EJ, et al. A potential animal model for Lesch-

Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice[J]. Nature, 1987, 326 (6110):295-8.

[3] Chowdhury JR, Grossman M, Gupta S, et al. Long-term improvement of hypercholesterolemia after ex vivo gene therapy in LDLR-deficient rabbits[J]. Science, 1991, 254(5039):1802-5.

[4] 成国祥, 徐少甫. 转基因小鼠模型与生命科学研究[J]. 上海实验动物科学, 1994, 14(3):135-9.

[5] 张建忠. SCID小鼠的生物学特性及在基因治疗研究中的应用[J]. 国外医学·输血及血液学分册, 1996, 19(5):269-71.

[6] Cox GA, Cole NM, Matsumura K, et al. Over expression of dystrophin in transgenic mdx mice eliminates dystrophic symptoms without toxicity[J]. Nature, 1993, 364(6439):725-9.

[7] Quillien V, Heeresbach LBN, Dufour T, et al. Gene therapy of a model of glioblastoma in rats using adenovirus vector encoding the HSV tk gene[J]. Bull Cancer, 1997, 84(11):1047-52.

[8] Batshaw ML, Yudkoff M, McLaughlin BA, et al. The sparse fur mouse as a model for gene therapy in ornithine carbamoyl transferase deficiency[J]. Gene Ther, 1995, 2(10):743-9.

[9] Kramm CM, Chase M, Herrlinger U, et al. Therapeutic efficiency and safety of a second-generation replication-conditional HSV1 vector for brain tumor gene therapy[J]. Hum Gene Ther, 1997, 8(17):2057-68.

[10] Wilson JM. Gene therapy for cystic Fibrosis: challenges and future direction[J]. J Clin Invest, 1995, 96(6):2547-54.

[11] Zhou L, Dey CR, Wert SE, et al. Correction of lethal intestinal defect in a mouse model of cystic fibrosis by human CFTR[J]. Science, 1994, 266(5191):1705-8.

[12] Blaese MR, Culver KW, Miller AD, et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years[J]. Science, 1995, 270(5249):475-80.

[13] Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, et al. Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolemia[J]. Nat Genet, 1994, 6(3):335-41.

[14] Yang Y, Nunes F, Berencsi K, et al. Inactivation of E2a in recombinant adenovirus improves the prospect for gene therapy in cystic fibrosis[J]. Nat Genet, 1994, 7(3):362-9.

[15] Crystal RG, McElvaney NG, Rosenfeld MA, et al. Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis[J]. Nat Genet, 1994, 8(1):42-51.

#### 参考文献:

[1] 苏国富. 基因治疗[A]. 见:谷志远. 现代医学分子生物学[M]. 北京:人民军医出版社, 1998. 251-81.

[2] Kuehn MR, Bradley A, Robertson EJ, et al. A potential animal model for Lesch-Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice[J]. Nature, 1987, 326 (6110):295-8.

[3] Chowdhury JR, Grossman M, Gupta S, et al. Long-term improvement of hypercholesterolemia after ex vivo gene therapy in LDLR-deficient rabbits[J]. Science,

1991, 254(5039):1802-5.

- [4] 成国祥, 徐少甫. 转基因小鼠模型与生命科学研究[J]. 上海实验动物科学, 1994, 14(3):135-9.
- [5] 张建忠. SCID小鼠的生物学特性及在基因治疗研究中的应用[J]. 国外医学·输血及血液学分册, 1996, 19(5):269-71.
- [6] Cox GA, Cole NM, Matsumura K, et al. Over expression of dystrophin in transgenic mdx mice eliminates dystrophic symptoms without toxicity[J]. Nature, 1993, 364(6439):725-9.
- [7] Quillien V, Heeresbach LBN, Dufour T, et al. Gene therapy of a model of glioblastoma in rats using adenovirus vector encoding the HSV tk gene[J]. Bull Cancer, 1997, 84(11):1047-52.
- [8] Batshaw ML, Yudkoff M, McLaughlin BA, et al. The sparse fur mouse as a model for gene therapy in ornithine carbamoyl transferase deficiency[J]. Gene Ther, 1995, 2(10):743-9.
- [9] Kramm CM, Chase M, Herrlinger U, et al. Therapeutic efficiency and safety of a second-generation replication-conditional HSV1 vector for brain tumor gene therapy[J]. Hum Gene Ther, 1997, 8(17):2057-68.
- [10] Wilson JM. Gene therapy for cystic Fibrosis: challenges and future direction[J]. J Clin Invest, 1995, 96(6):2547-54.
- [11] Zhou L, Dey CR, Wert SE, et al. Correction of lethal intestinal defect in a mouse model of cystic fibrosis by human CFTR[J]. Science, 1994, 266(5191):1705-8.
- [12] Blaese MR, Culver KW, Miller AD, et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years[J]. Science, 1995, 270(5249):475-80.
- [13] Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, et al. Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolemia[J]. Nat Genet, 1994, 6(3):335-41.
- [14] Yang Y, Nunes F, Berencsi K, et al. Inactivation of E2a in recombinant adenovirus improves the prospect for gene therapy in cystic fibrosis[J]. Nat Genet, 1994, 7(3):362-9.
- [15] Crystal RG, McElvaney NG, Rosenfeld MA, et al. Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis[J]. Nat Genet, 1994, 8(1):42-51.