DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.20.038

综述

文章编号:1000-5404(2003)20-1862-03

癫痫的基因治疗展望

Expectation of gene therapy for epilepsy

杨梅华[1],黄 轶[2] 综述,杨 辉[1],安 宁[1] 审校 ([1]第三军医大学附属新桥医院神经外科癫痫刀中心,重庆 400037;[2]第二军医大学南京军医学院生物基因工程中心,南京 210099)

癫痫是神经系统中由多种病因引起的脑功能障碍综合征。癫痫的家族聚集性暗示其具有遗传倾向;各种研究报道表明,遗传因素占到整个病因的40%。目前,该病主要依赖药物与外科治疗,虽然从治疗的方法和治疗的效果,较前已取得了一定的进步,但较大的副作用和部分仅能暂时控制癫痫发作的现实(尤其是遗传所致的癫痫)让国内外专家期待和寻求一种更新的解决办法。由此,基因治疗的出现可能为解决这些问题带来新的希望。成功的基因治疗必须解决下列问题:① 选择合适的病例;②具备该病分子缺陷的知识;③纠正遗传病的治疗(或正常)基因得到克隆并能有效调节与表达;④可利用的动物模型。

1 癫痫相关基因(Epilepsy Related Genes, ERG)的遗传学定位与克隆

1.1 遗传学基因定位

研究表明,癫痫的发生是致癫因素和抗癫因素失衡所致;因此,在基因水平研究则存在癫痫基因和抗癫痫基因两类,共同组成癫痫相关基因。夜间发作型额叶癫痫(ADNFLE)基因定位在20q13.2;良性家族性新生儿惊厥Ⅰ型(BFNC1)、Ⅱ型(BFNC2)基因分别定位在20q、8q24的D8S198与D8S274之间;伴进行性精神发育迟滞癫痫(EPMR)基因定位在8 pter→p22;原发性全身性癫痫(EGI)基因定位在8q24.1;青少年型肌阵挛性癫痫(JME)基因定位在6p12→p11上D6S272和D6S257之间7个CM区域或是15q14;肌阵挛性癫痫Lafora型(MELF)基因定位在6q24;肌阵挛性癫痫Unverviht-Lundborg型(EPM1)基因定位在21q22.3;良性家族性婴儿惊厥(BFIC)基因定位在19q[1]。

1.2 ERG的克隆

朱和民等[2]通过致痫剂马桑内酯诱发SD大鼠癫痫状态,抗痫剂地佐西平干预癫痫状态,利用mRNA差异显示技术成功地筛选、分离鉴定出了新的癫痫相关基因ERG8、ERG11和ERG12;经与基因库的已知序列比较,认为ERG8是一个新的候选癫痫基因,ERG11和ERG12则是新的候选抗癫痫基因。另外,BFNC基因之一KCNQ2以及少年型JME的基因已克隆成功[3]。

1.3 p53基因与癫痫

人及鼠癫痫病灶中P53基因mRNA及p53蛋白的免疫反应性均增高,拟谷氨酸毒物海人酸诱导的癫痫发作可在海马回神经细胞内有p53基因的表达,造成神经元的不可逆损害。用其注射缺失p53基因的大鼠诱导癫痫持续发作后,其神经元死亡明显减少,但p53基因对癫痫发作则无影响[4]。

1.4 HSP72与癫痫

Venari等[5]发现分子量为72×10³的热休克蛋白(HSP72)在用红藻氨酸处理制成癫痫模型鼠脑内的超量表达,能将鼠脑海马回齿状脑回的神经细胞的存活率由21.9%提高到64.4%,由此,刺激性毒素引起的癫痫发作,HSP72在提高神经细胞的存活率方面将会有一席之地。

2 基因导入与调节研究

2.1 单纯疱疹病毒(Herpes simplex virus, HSV)载体

脑神经元在出生后不久就停止分裂,在体外亦不能被诱导分裂,缺乏DNA复制的脑神经细胞常规载体难于转染。重组HSV载体的嗜神经元性体及比腺病毒或逆转录病毒具有更大的伸缩性,可适合更大和更复杂的外源基因的插入的特性,较适合神经细胞转染。用一种HSVUs3(缺失Us3基因的重组HSV)作载体,立体定向技术注射入脑中,可使这种减毒病毒在脑中建立长期潜伏状态,并能在脑中某一精确范围内表达[6]。

Marconid等[7]用人巨细胞病毒立即早期启动子,构建了载有FGF-2 cDNA的SH FGF-2(剔除了立即早期基因ICP4)和TH FGF-2(剔除了立即早期基因ICP4、ICP22和ICP27,将FGF-2基因插入到HSV的tk基因中)的HSV载体;另外又构建THLacz(Lacz基因插入到tk基因中)载体。将SH FGF-2和TH FGF-2分别对Vero细胞进行转染,发现:SH FGF-2转染的Vero细胞FGF-2水平在起初2 d逐渐升高,然后在4 d内迅速下降。TH FGF-2转染的Vero细胞FGF-2水平在起初4~5 d内升高,以后缓慢下降。并且FGF-2蛋白浓缩物能诱导PC12细胞产生神经单位上的差异,这表示新合成的FGF-2有生物活性。用TH FGF-2接种鼠脑海马回后,可以观察到强而短暂的FGF-2表达,但接种SH FGF-2或THLacz后,却没有。通过剔除3种立即早期基因突变的方法提高的基因表达可认为是减低了载体的细胞毒性所为。故认为TH FGF-2较适合神经系统疾病方面的研究。

Bregola等[8]用人巨细胞病毒立即早期启动子,用RNase的保护,用Marconid的方法构建成TH FGF-2载体,研究对BDNF和FGF-2在点燃产生癫痫发作的动物模型中的基因表达方式以及TH FGF-2在体内的表达。结果显示:单一的点燃刺激不能修饰BDNF基因的表达,但却能提高海马回、脑皮质和下丘脑

作者简介:杨梅华(1979-),女,湖北省孝感市人,技师,主要从事临床神经电生理方面的研究。电话:(023)65218204

收稿日期:2003-05-15;修回日期:2003-09-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的FGF-2基因的 mRNA 的水平; 在点燃的动物模型中, 如离开非刺激作用一周内, BDNF 和 FGF-2 基因表达也没有变化; 相比之下, BDNF 基因 mRNA 水平在点燃的癫痫发作动物模型的海马回、脑皮质部位却有很大的提高, 而 FGF-2 基因的 mRNA 的水平仅仅只在转染的同侧皮质部增长。用 TH FGF-2 接种到鼠的海马回可以观察到强而短暂的基因表达; 因此他们认为 TH FGF-2 载体较适合在点燃的产生癫痫发作模型中与 FGF-2 有关的方面的研究。

New 等[9] 构建了载有 GAD DNA 的双盒式缺陷型 HSV 载体(这种载体能够表达 GAD 同工酶 GAD65 或 GAD67), 通过转染小脑颗粒细胞(CGC 细胞), 发现: GAD 同工酶特定的表达、GABA 的合成及 GABA 刺激性的释放都有重大的增高。如先用这种载体转染CGC, 红藻氨酸的处理既不能阻止GAD 在体内的表达, 也不能抑制 GABA 的合成。

2.2　腺相关病毒(Adeno-associated virus, AAV)载体

Freese 等[11] 用 AAV 与 Lacz 整合成 AAVlacz, 微量注入某一些药物难治性癫痫病人颞叶切除的有癫痫发作的病灶中, 结果发现: AAVlacz 能指导 lacz 在组织中的表达并有功能活性; 形态学分析证实神经细胞被偏爱性的转导, 没有明显的细胞毒性。这一结果证实了 AAV 载体将目的基因转入人的中枢神经系统, 特别是神经细胞的可行性。如果用一种能调节海马回区神经生理的功能性基因取代 Lacz, 用立体定向技术或用合适的载体系统导入适当的局部脑组织, 利用在内胚层血管表达方法, 可对癫痫发作病灶进行遗传干预。

2.3　腺病毒(Adenovirus, Ad)载体

Robert 等[11] 用肉瘤病毒的长末端重复序列作启动子, 构建载有 GAD67 的复制缺陷的 Ad 载体, 发现能在原代培养的神经细胞和神经胶质细胞有表达, 新生小鼠海马回也有延续几个星期的大量表达, 有神经性疾病大脑的各个区域都能表达, 由此认为这种载体在癫痫的基因治疗领域会有使用价值。

O' Connor 等[12] 也从事了类似Freese 等人的研究, 但用的是 Ad 载体。证实了用 Ad 载体能够成功的进行基因转移、转录和翻译。但被转染的细胞是神经胶质细胞。实验结果支持 Ad 载体有将遗传信息转入产生癫痫发作的人脑, 并使基因翻译出功能性的蛋白质能力的观点。

然而, Peltekian 等[13] 对于 Ad 载体在癫痫基因治疗中的应用提出了置疑: 与其他器官相比, 在 CNS, 成人 Ad 的转染虽然不能系统地引起细胞大量死亡, 但还是有一定比例的细胞死亡; 此问题是受人关注。其机制可能包括免疫排斥以及与炎症有关的毒性作用。考虑到 Ad 作为载体是否有细胞毒性还不确定, 对于那些无生命威胁的或(和)可用药物或是外科手术能治疗的疾病(如 Parkinson' s 病或癫痫), 如果设想用 Ad 载体进行基因治疗, 可能是不明智的。如果在载体和治疗基因都已经被明确和最优化的情况下, 对于像恶性脑肿瘤、神经变性疾病这些有直接生命危险和丧失了合适治疗的疾病, Ad 载体介导的基因治疗可能还是较合适的。

目前, Ad 载体在癫痫基因治疗中的应用还有待进一步的研究。

2.4　脂质体

Zhang 等[15] 人用脂质体包裹的 pSV2-CCK 注射入 P77PMC 鼠(先天性听源性癫痫发作的一种动物模型)的大脑内室, 导致 P77PMC 鼠的听源性癫痫发作显著减少, 又用脂质体介导的 CCK 基因能在一周内矫正 AS 鼠增强的电易感性和痛感丧失的高反应性; Lacz 的脂质体质粒也能转导室管膜和软脑脊膜细胞; 由此认为脂质体载体的将会有益于 AS 行为的修正以及癫痫基因治疗。

2.5　其它技术

2.5.1　微粒子轰击法　　用微粒子轰击法可使荧光素酶基因在胚胎脑组织中得到高水平的暂时性表达。用该法能转染神经细胞及神经胶质细胞, 在暂时性表达方面比用其他转移方法高 100 倍。

2.5.2　微囊化技术[6]　　癫痫的基因治疗主要在脑部。脑部有一定的免疫反映性。为了解决异源细胞(包括细胞株)移植带来的免疫学问题, 可以应用微囊化技术。即用无免疫原性、无毒性的材料包埋这种细胞, 制成药囊, 再植入脑部。此时转基因细胞产生的基因产物可以透出药囊作用于靶细胞, 营养物质也可以进入囊中维持转基因细胞的生长, 其作用可以维持相当长一段时间; 国内已经有学者将这种技术进行了帕金森动物的基因治疗实验的应用, 效果明显。在癫痫的基因治疗方面, 这种微囊化技术将会有广泛的应用前景。

2.5.3　电脉冲介导裸 DNA 技术[6]　　最近改进的电脉冲介导裸 DNA 技术使许多基因, 尤其是分泌性蛋白基因在肌肉内维持相当长时间的表达, 其量有可能达到发挥药效的水平。随着进入细胞膜的寡肽(HIV TAT 转录因子的 N' 端十一肽)的融合, 今后有望通过融合基因形式的组建, 解决非分泌性蛋白的表达及进入细胞的问题。这将给癫痫的基础研究与基因治疗提供了技术基础。

2.5.4　细胞移植　　两种包含 GAD 酶, 能产生 GABA 的 M213-20 和 M213-1L 细胞系是 1994 年 Giordano 等从鼠的脑纹状体组织中分离, 建立的。Conejero-Goldberg 等[17] 他们用 pREP10 质粒载体将人的 GAD67cDNA 转入这两种细胞系, 并用潮霉素选择分离出了亚克隆。结果证实 pREP10 质粒至少能在体外培养的细胞中稳定的保持 12～15 个月。确定: 这种能产生大量GABA 而且在培养中有稳定保持相当长时期能力的细胞系, 可在癫痫的细胞移植治疗上有所发展; 用类似的方法, 也可以用人的体细胞制作出能移植入大脑产生 GABA 递质的细胞, 达到治疗的目的。

2.5.5　"旁观者效应"与癫痫治疗之间的研究　　旁观者效应(Bystander effect)最早是在 tk 自杀基因的研究中发现的, 是指表达自杀基因的细胞四周未转染基因的细胞也会被前体药物杀伤。CD 基因和 DeoD 基因也存在这种旁观者效应现象。Estin 等[18] 在那些有 connexin-43 高基础水平的细胞系, 通过连接蛋白 connexin-43 的超量表达能提高其旁观者效应。

在癫痫的基因治疗研究中, 许多学者认为, 即使非常成功的基因转移也只能使目的基因在 50% 的靶细胞表达。但剩余的 50%的神经元就足以引起癫痫[18]。如果类似旁观者效应在癫痫的基因治疗研究中有所突破的话, 我们就可以用转染率不

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

高的合适载体达到“事半功倍”的效果。

关键词：癫痫(Epilepsy EP)；基因治疗(Gene Therapy)
中图法分类号：R741.05；R742.1 文献标识码：A

参考文献：

[1] 李 权，唐北沙. 癫痫的分子遗传学研究进展[J]. 国外医学神经病学、神经外科学分册，1998，15(2)：74－77.
[2] 朱和明，朱长庚，孟祥文，等. 新的癫痫相关基因的筛选及部分cDNA序列的分离鉴定[J]. 同济医科大学学报，1997，26(6)：426－429.
[3] 吕建军，戚 豫. 家族性热性惊厥相关基因研究进展[J]. 国外医学遗传学分册，1999，22(4)：185－188.
[4] 王焕明. p53基因与癫痫[J]. 国外医学神经病学、神经外科学分册，1999，26(1)：6－9.
[5] Yenari M A，Fink S L，Sun G H，*et al*. Gene therapy with HSP72 is neuroprotective in rat models of stroke and epilepsy[J]. Ann Neurol，1998，44(4)：584－591.
[6] 顾健人，曹雪涛. 基因治疗[M]. 北京：科学出版社，2002. 75－82，256，270－273.
[7] Marconi P，Simonato M，Zucchini S，*et al*. Replication－defective herpes simplex virus vectors for neurotrophic factor gene transfer in vitro and in vivo[J]. Gene Ther，1999，6(5)：904－912.
[8] Bregola G，Frigati L，Zucchini S，*et al*. Different patterns of induction of fibroblast growth factor-2 and brain-derived neurotrophic factor messenger RNAs during kindling epileptogenesis，and development of a herpes simplex vector for fibroblast growth factor-2 gene transfer in vivo[J]. Epilepsia，2000，41(Suppl 6)：S122－S126.
[9] New K C，Gale K，Martuza R L，*et al*. Novel synthesis and release of GABA in cerebellar granule cell cultures after infection with defective herpes simplex virus vectors expressing glutamic acid decarboxylase[J]. Brain Res Mol Brain Res，1998，61(1－2)：121－135.
[10] Freese A，Kaplitt M G，O'Connor W M，*et al*. Direct gene transfer into human epileptogenic hippocampal tissue with an adeno-associated virus vector：implications for a gene therapy approach to epilepsy[J]. Epilepsia，1997，38(7)：759－766.
[11] Robert J J，Bouilleret V，Ridoux V，*et al*. Adenovirus-mediated transfer of a functional GAD gene into nerve cells：potential for the treatment of neurological diseases[J]. Gene Ther，1997，4(11)：1237－1245.
[12] O'Connor W M，Davidson B L，Kaplitt M G，*et al*. Adenovirus vector-mediated gene transfer into human epileptogenic brain slices：prospects for gene therapy in epilepsy[J]. Exp Neurol，1997，148(1)：167－178.
[13] Peltekian E，Parrish E，Bouchard C，*et al*. Adenovirus-mediated gene transfer to the brain：methodological assessment[J]. J Neurosci Methods，1997，71(1)：77－84.
[14] Conejero G C，Tornatore C，Abi Saab W，*et al*. Transduction of human GAD67 cDNA into immortalized striatal cell lines using an Epstein-Barr virus-based plasmid vector increases GABA content[J]. Exp Neurol，2000，161(2)：453－461.
[15] Estin D，Li M，Spray D，*et al*. Connexins are expressed in primary brain tumors and enhance the bystander effect in gene therapy[J]. Neurosurgery，1999，44(2)：361－368；discussion 368－369.

（编辑 王 红）

（上接1849页）

变，也就是所谓的肉眼全切。但Simpson Ⅰ级切除术式并没有切除范围的具体标准，实际术中切除的范围仅凭临床经验，文献[1]报道脑膜瘤行Simpson Ⅰ级切除术后复发率为4%～9%。近年来学者们也对Simpson Ⅰ级切除范围进行了大量的基础和临床探讨。有学者在研究脑膜和脑界面的关系中提出，虽然脑膜瘤很少侵及脑组织，但浸润型脑膜瘤常可见脑皮质血管分支进入瘤内，肿瘤沿血管间隙浸润致使瘤脑界面不清，手术如仅切除肿瘤将难以达到全切，故认为Simpson Ⅰ级切除的范围还应包括一定范围的脑皮质，但由于切除皮质将导致相关神经系统功能障碍，临床上采用较少。另有学者发现，在脑膜瘤附着之硬膜上，至少4 cm范围内，上皮细胞呈束状或小结节状改变者达100%，并有肉眼难以发现的瘤结节和镜下瘤细胞浸润。近年有学者提出Simpson 0级切除的概念，即在Ⅰ级切除的基础上，再扩大切除硬膜和颅骨范围2～4 cm，以尽量切除主瘤体及瘤细胞可能浸润的硬膜及瘤脑界限不清的部分皮质。Toshihiko报道了近37例按0级标准切除的病例，1年内未见复发，其中19例超过5年未复发[5]。

为减少术后复发率，术前影像学研究以明确肿瘤的硬膜是否浸润及是否恶变有重要意义，这有助于制定手术计划，力争达到Simpson Ⅰ级或0级切除[2]。李龄等[4]报道10例作包括硬脑膜“尾”的Ⅰ级切除，术后疗效满意。并提出对脑膜瘤术前MRI检查发现有无硬膜“尾征”(即硬脑膜浸润)以指导手术，意义较大。

然而，却很少有学者学者关注脑膜瘤邻近增厚之蛛网膜。这些增厚的蛛网膜有可能是肿瘤复发的来源。脑膜瘤是起源于脑膜及脑膜间隙的衍生物，它们可能来自硬膜成纤维细胞和软脑膜细胞，但大部分来自蛛网膜细胞，也可以发生在任何有蛛网膜成分的地方[1]。我们在术中注意到，所有8例患者肿瘤边缘和/或基底部蛛网膜均增厚，这些增厚的蛛网膜与肿瘤粘连不紧密，术中较易与肿瘤及脑组织分离。术中随访6个月至5年未见肿瘤复发。故我们认为在大脑凸面脑膜瘤行Simpson Ⅰ级切除中，切除范围应包括肿瘤周边和/或基底部增厚的蛛网膜，这可能有助于减少术后肿瘤的复发。然而我们前期的工作所做病例数目较少，有的病例随访时间较短，其与术后复发的关系有待于进一步探讨。

关键词：大脑凸面脑膜瘤；扩大蛛网膜切除；复发
中图法分类号：R739.45 文献标识码：B

参考文献：

[1] Yamasaki F，Yoschioka H，Hama S，*et al*. Recurrence of meningiomas[J]. Cancer，2000，89(5)：1102－1110.
[2] 高德宏，宁文德. “脑膜尾片”与脑膜瘤相关的MR强化表现[J]. 实用放射学杂志，2001，17(2)：102－104.
[3] 王忠诚. 神经外科学[M]. 第2版. 武汉：湖北科学技术出版社，1998. 456－464.
[4] 李 龄，王继缘. 突面脑膜瘤合并硬脑膜“尾征”的手术意义[J]. 中华神经外科杂志，1997，13：147－150.
[5] Kinjo T，al Mefty O，Kanaan I. Grade Zero removal of supratentorial convexity meningiomas[J]. Neurosurgery，1993，33(3)：394－399.

（编辑 王 红）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net