

炎症肠病的基因疗法

【作者】 吕超蓝 智发朝
南方医科大学南方医院消化科 (广州市 510515)

【摘要】 炎症肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 包括溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 和克罗恩病 (Crohn's disease, CD), 其致病原因尚不清楚。目前常用的药物治疗伴有明显不良反应而且无法完全治愈疾病。最近几年 IBD 基因治疗引起关注。通过抑制炎症因子基因以及上调免疫调节因子基因表达来恢复肠道细胞因子的平衡是一种有前途的治疗 IBD 的方法。本文简要介绍几个可以用于 IBD 基因治疗的分子 (如 TNF- α 、IL-10、NF- κ B 和 IL-22 等) 以及它们相应的动物临床试验结果和未来展望。

【关键词】 炎症肠病; 溃疡性结肠炎; 克罗恩病; 基因治疗

【中图分类号】 R574.62; R394

【文献标识码】 A

【文章编号】 1672-3384 (2011) -02-00026-07

炎症肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 包括溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 和克罗恩病 (Crohn's disease, CD)。目前病因尚不十分清楚, 可能与基因、环境、免疫因素有关^[1]。众多研究表明 CD 与 Th1 细胞介导的免疫反应关联较大, 而 UC 与 Th2 有关。参与致病的相关因子包括 α 肿瘤

坏死因子 (tumour necrosis factor alpha, TNF- α), γ 干扰素 (interferon gamma, IFN- γ), 白细胞介素 12 (interleukin-12, IL-12) 和白细胞介素 18 (interleukin-18, IL-18), 抗炎因子包括白细胞介素 10 (interleukin-10, IL-10) 和 β 转化生长因子 (transforming growth factor - beta, TGF- β) 等。通过抑制炎症因子

[23] Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, et al. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+ - derived and monocyte - derived dendritic cells [J]. J Immunol, 2006, 177: 2080-2087.

[24] Duijvestein M, Vos AC, Roelofs H, et al. Autologous bone marrow - derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study [J]. Gut, 2010, 59: 1662-1669.

[25] Osiris Therapeutics I. Evaluation of PROCHYMAL [tm] Adult Human Stem Cells for Treatment - Resistant Moderate - to - Severe Crohn's Disease. www.clinicaltrials.gov NCT00482092 ed. 2007.

[26] Taupin P. OTI - 010 Osiris Therapeutics/JCR Pharmaceuticals [J]. Curr Opin Investig Drugs, 2006, 7: 473-481.

[27] Lazebnik LB, Konopliannikov AG, Kniazev OV, et al. Use of allogeneic mesenchymal stem cells in the treatment of intestinal inflammatory diseases [J]. Ter Arkh, 2010, 82: 38-43.

[28] Garcia - Olmo D, Garcia - Arranz M, Garcia LG, et al. Autologous stem cell transplantation for treatment of rectovaginal fistula in perianal Crohn's disease: a new cell - based therapy [J]. Int J Colorectal Dis, 2003, 18: 451-454

[29] Garcia - Olmo D, Garcia - Arranz M, Herreros D, et al. A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation [J]. Dis Colon Rectum, 2005, 48: 1416-1423.

[30] Garcia - Olmo D, Herreros D, Pascual I, et al. Expanded Adipose - Derived Stem Cells for the Treatment of Complex Perianal Fistula: a Phase II Clinical Trial [J]. Dis Colon Rectum, 2009, 52: 79-86

[31] Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft - versus - host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells [J]. Lancet, 2004, 363: 1439-1441

[32] Le Blanc K, Ringden O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2005, 11: 321-334.

[33] Studeny M, Marini FC, Champlin RE, et al. Bone marrow - derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon - beta delivery into tumors [J]. Cancer Res, 2002, 62: 3603-3608.

[34] Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis [J]. Nature, 2007, 449: 557-563.

[35] Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, et al. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long - term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms [J]. Cancer Res, 2007, 67: 9142-9149.

以及上调免疫调节因子表达来恢复细胞因子的平衡可以治疗 IBD。常规的药物治疗包括 5-氨基水杨酸、类固醇激素以及免疫抑制药。5-氨基水杨酸对轻中度 UC 有效,对 CD 效果欠佳,尤其对小肠 CD 基本无效;皮质类固醇是在短期内有效,但不足以维持缓解,糖皮质激素依赖性常见的。免疫抑制药(嘌呤抗代谢物和甲氨蝶呤)起效慢,对诱导缓解中度至重度 CD 能力有限。此外,这些传统疗法较难使肠道黏膜完全愈合,且长期使用不良反应较大,会引起严重感染或者继发肿瘤。最近一些针对细胞因子的单克隆抗体如抗 TNF- α 在临床应用,虽然取得一定的疗效,但是治疗费用昂贵,且不良反应也不可避免,这就使其应用受限^[1]。

基因治疗是一种新的治疗方法,最早始于治疗单基因疾病。人们发现单基因损伤导致的疾病可以通过替换受损的基因来治疗。随着科技的发展,通过下调炎症趋化因子基因或上调免疫调节因子基因的表达,基因治疗开始涉及自身免疫性疾病、慢性炎症疾病等领域。目前肠道慢性炎症的基因治疗仍然处于初级阶段。IBD 涉及多基因突变。但肠道有其独特的优势适合治疗基因的转运,如肠道的黏膜表面积巨大、可经口或直肠实现局部给药;同时还可以在内镜下可以行原位基因转移,肠隐窝内干细胞存在的位置已知,肠细胞可以分泌蛋白到循环中。基因治疗与所选基因及载体有关,而载体又决定转导基因的特异性、效率、转基因持续时间以及不良反应^[2]。

1 基因载体

1.1 病毒载体

以病毒为载体的基因转移是目前最常用的也是最有效的体内基因转运系统,常用的载体病毒有以下几种。

1.1.1 腺病毒(adenoviral, Ad) 目前用于临床基因治疗的病毒载体 25% 为腺病毒,它是双链 DNA 病毒,转导细胞类型广泛、易操纵,效率高且不会整合到宿主基因组中,减少插入突变的可能性。容纳转基因的量可以长达 30kb。血清 2 型和 5 型常被

用来治疗肿瘤。但因为宿主针对病毒基因表达的蛋白质部分可能会引起较为强烈的免疫反应,所以一般用于短期治疗,限制了其在临床治疗慢性疾病上的广泛应用^[3]。

1.1.2 腺相关病毒(adeno-associated viral, AAV)

AAV 是单链 DNA 病毒,属于人类非致病性细小病毒,可以有效的转染分裂细胞和非分裂细胞。因为可与宿主基因组整合,所以能够长期(长达 6 个月)稳定表达转染的基因。AAV 对 pH、温度和溶剂的改变有很强的耐受力,很适合口服给药。因为它缺少病毒阅读框,缺少很多腺病毒的免疫原性,只会引起非常微弱的免疫反应,且致癌风险极其小,但容纳转基因的量较少(<5kb)。虽然 AAV 基因转导效率不如 Ad,但是因为可以较长久表达转基因,所以在治疗慢性疾病方面占有优势^[3]。

1.1.3 复制缺陷型重组人 5 型腺病毒(replication-deficient recombinant human type 5 adenovirus, Ad5) Ad5 由于自身复制缺陷,不能在细胞内存存,也不会稳定整合进入宿主基因组内。因此 Ad5 研究瞬时转染较为理想^[4]。

1.1.4 日本血凝病毒(hemagglutinating virus of Japan, HVJ) HVJ 是一种包裹病毒,属于粘病毒科,是副粘病毒科家族的一员。它有 15 384 个核苷酸的非分段负链 RNA 基因组。HVJ 的复制与 DNA 无关,所以它不会整合到宿主基因组中。可以有效的转染分裂细胞和非分裂细胞^[5]。

1.2 乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*, L. lactis)

L. lactis 是一种非致病性、无侵袭性革兰阳性菌,它依靠胸苷或胸腺嘧啶生长及生存,主要用于生产发酵食品^[6]。

1.3 脂质体(lipofectamine)

脂质体的一端有 1~2 条由 12~18 个碳原子组成的疏水链,使其在水性介质中形成单层磷脂或由数层可溶性物质隔开的呈同心圆状排列的连续多层磷脂所组成的脂质小囊,内含水相空间,另一端为亲水性的 N⁺ 头部,通过静电力与 DNA 结合以形成脂质复合物。它的安全性很好,脂质体既无毒

性,又无免疫原性,并且在体内有可能降解性^[7]。

1.4 纳米粒子(nanoparticles, NPs)

NPs 因为体积小,较容易被巨噬细胞和树突状细胞吞噬,而炎症部位的巨噬细胞和树突状细胞明显较非炎症部位多,所以用 NPs 包裹运载治疗基因,可以选择性地集中到炎症部位,转移效率显著提高,并减少了药物对正常组织的刺激,从而减少药物不良反应。目前,可用于临床的是微球内纳米粒子口服系统(nanoparticles-in-microsphere oral system, NiMOS),NiMOS 是由 NPs 包裹在矩阵微球形成,具有生物相容性与可降解性,对人体无毒不良反应。矩阵微球常用聚 ϵ -己内酯(polyepsilon-caprolactone, PCL)。NPs 常用的是明胶,由于胃内缺少脂肪酶,PCL 在胃内可以阻止明胶纳米颗粒被蛋白水解酶水解,进而保护基因,NiMOS 只在肠道特异性转染。在肠道内,脂肪酶引起 PCL 的降解,包裹 DNA 或者 RNA 的明胶 NPs 从(聚 ϵ -己内酯)矩阵中被释放,从而 NPs 被肠腔细胞内吞,保证高效转染和基因表达。因为 PCL 的降解速度较慢,NiMOS 在肠道内停留的时间长,所以转染效率更高。有研究证明,微球直径 $<5\mu\text{m}$ 则能提高到达肠道的概率^[8]。

1.5 其他

1.5.1 诱饵核苷酸(decoy oligonucleotide, DODN)

DODN 是模仿转录因子结合序列的双链 DNA,竞争结合到原生转录因子上,阻止它与基因组 DNA 的结合^[9]。

1.5.2 反义寡核苷酸(antisense oligonucleotides, ASO) 单链分子(15~25 碱基)能与 mRNA 杂交,阻止目的蛋白的表达^[9]。

1.5.3 小干扰 RNA(small-interfering RNA, siRNA) siRNA 介导的在 mRNA 水平抑制炎症因子生成可以用来治疗某些炎症疾病,但主要难点是裸 siRNA 易降解。现已开始研究一些转运系统来克服这个难题,并且一些利用合成试剂来转运核酸到靶组织的转运系统的研究已取得可喜成果^[10]。

2 基因治疗

2.1 核因子- κB (Nuclear factor- κB , NF- κB)

NF- κB 是炎症级联反应中的限速因子。不论是 Th1 细胞介导炎症反应依赖的 IL-12 和 IL-23 还是 Th2 细胞介导炎症反应依赖的 IL-4 和 IL-13 均受 NF- κB 转录因子的调节。已有很多通过抑制 NF- κB 治疗 IBD 的研究成果,其中最著名的抑制药是 5-氨基水杨酸相关化合物,如美沙拉嗪、巴柳氮钠、柳氮磺胺吡啶、蛋白酶抑制药,以及过氧化物酶体增殖物激活受体 C 配体、丝裂素活化蛋白激酶、Rho 激酶、TNF- α 抑制药和类固醇信号传导抑制药。

NF- κB 家族转录因子包括 5 个成员(c-Rel、p65、RelB、p50 和 p52),它们在编码关键炎症反应蛋白的基因启动子区域有非常相似的结合位点,这样才可能使用一个 NF- κBD 序列与它们都结合阻止多种形式的 NF- κB 活性。以 HVJ 做载体,用 NF- κBD 治疗 IBD 小鼠模型,不论是直肠内给药还是全身给药,均能抑制炎症细胞的产生,促进 CD4⁺T 细胞凋亡,改善急性肠道炎症,即使在慢性肠道炎症后期给药,也能阻止并发症如纤维化的发生,疗效持久。用 NF- $\kappa\text{Bp65ASO}$ 治疗三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的肠炎小鼠模型也可以阻止肠道纤维化的发生。但无法完全阻止 NF- κB 其他家族成员转录^[5]。

因为肠道纤维化与 TGF- β_1 有关,而诱导 TGF- β_1 分泌的 IL-13 依赖 NF- κB 形成,由此推测这可能是因为抑制了 NF- κB 而间接阻止纤维化过程。直肠内给予 NF- κBD 治疗 TNBS 诱导的肠炎小鼠模型药物作用范围仅仅局限于结肠,不会抑制肠外器官 NF- κB 水平。已经用 NF- κBD 治疗许多其他炎症动物模型取得成效,但因使用的是病毒做载体,如果在人体内反复使用可能会引起免疫反应。

De Vry^[9]将 NF- κBD 完全硫代化。硫代化学技术已经在运输其他一些肠道反义分子上取得成功,其中就包括已经进入治疗 UC II 期临床实验的 Alicaforsen。硫代化 NF- κBD 稳定性大为提高,在没有辅助载体的情况下,NF- κBD 经直肠注入肠炎动物模型,结果发现 NF- κBD 被运输到炎症部位,主要被巨噬细胞、CD4⁺T 细胞和中性粒细胞吞噬,

对 Th1 细胞介导和 Th2 细胞介导的小鼠结肠炎模型治疗有效,肠道炎症改善且呈剂量依赖性。有意思的是,NF- κ B 除了降低 NF- κ B 及各类炎症因子的水平、促进结肠组织愈合外,还能迅速恢复杯状细胞功能以及黏膜上皮细胞及平滑肌细胞层的增殖模式。

2.2 TNF- α

TNF- α 在 IBD 中起着核心作用,且使用抗 TNF- α 抗体治疗病人疗效显著,但抗 TNF- α 多在真核细胞内产生,需要大规模纯化,费用昂贵并可能有严重的不良反应,已发现约有 25% 的病人因为全身性 TNF- α 遭到抑制而出现肺炎、癌症、急性炎症等严重不良反应。结肠中巨噬细胞和树突状细胞是分泌 TNF- α 的主要细胞,肠道局部抑制 TNF- α 的分泌能减少全身不良反应。所以解决方法的关键在于炎症局部用药。

Kriegel 等^[10]用 B 型明胶纳米粒子包裹 TNF- α siRNA,然后置于 PCL 微球内形成 NiMOS,这样的 NiMOS 直径大约 2.4 μ m。给 DSS 小鼠胃内灌注这种 NiMOS,肠道组织内 TNF- α 、一些炎症趋化因子(如 GM-CSF、MIP-1 α 、MCP-1)和髓过氧化物酶的活性水平降低。但 NiMOS 本身好像也有免疫调节作用,能减低 IL-1 β 、IL-5、MIP-1 α 和 GM-CSF 的水平。而且 NiMOS 对细胞没有选择性,既可以进入肠道炎症细胞又可以进入正常的肠细胞。

因为炎症部位活性氧(reactive oxygen species, ROS)较多,Wilson^[11]设计了一种酮缩硫醇纳米粒子(thioetal nanoparticles, TKNs)来运输 TNF- α siRNA。TKNs 在酸和蛋白酶存在的条件下稳定,但 ROS 会引起 TKNs 降解,从而释放 TNF- α siRNA。因为肠道炎症处 ROS 最多,而其他地方少,所以 TNF- α siRNA 可以特异性在炎症部位从 TKNs 中释放。将这种 NPs 设计成直径约 600nm,由于这种大小的粒子一般不会被肠上皮细胞吞噬,可以提高 TNF- α siRNA 被主要产生 TNF- α 的吞噬细胞吞噬的效率。在 DSS 小鼠模型中,TKNs 包裹 TNF- α siRNA 形成的 NPs 可以特异性的减少肠道炎症处巨噬细胞产生 TNF- α ,有效抑制小鼠肠道炎症,无

全身不良反应,安全有效。所以 TKNs 是治疗肠道炎症很有意义载体。

Myers^[12]设计了一种抗 TNF- α 反义寡核苷酸(ISIS25302),可以与 TNF- α mRNA 结合,引起其降解,并且阻止其翻译成蛋白质。ISIS25302 是第二代的甲氧基化的磷酸化寡核苷酸。给 DSS 小鼠静脉注射 ISIS25302,ISIS25302 会分布到全身各个系统,虽然对肠道慢性炎症均有一定治疗效果,但是效果不明显。Zuo^[13]设计了一个低分子量壳聚糖半乳糖(galactosylated low molecular weight chitosan, gal-LMWC)作为 ISIS25302 的载体,gal-LMWC 与 ISIS25302 结合可以形成稳定的纳米复合体,从而保护 DNA,防止其降解。gal-LMWC 的半乳糖残基可以特异性的与巨噬细胞上的半乳糖/N-乙酰氨基半乳糖凝集素(macrophage galactose/N-acetyl galactosamine-specific lectin, MGL)结合,所以 gal-LMWC/ISIS25302 复合体可以通过 MGL 受体介导的内吞被巨噬细胞吞噬。Zuo 对 TNBS 小鼠肠内灌注 gal-LMWC/ISIS25302,结果发现 gal-LMWC/ISIS25302 特异性地进入肠道黏膜巨噬细胞内,有效降低小鼠肠道组织 TNF- α 及其相关炎症细胞因子水平,小鼠临床症状和肠道组织炎症病理均缓解,而其他系统受到的影响较小。

2.3 CD154/CD40

CD40 是一种细胞表面受体,属于肿瘤坏死因子家族的一员,除了在抗原呈递细胞如 B 细胞、单核巨噬细胞、树突状细胞表达外,内皮细胞,成纤维细胞,平滑肌细胞上也有表达。CD40 的配体,CD154 主要表达在活化的 CD4⁺T 细胞上。不论是 CD40 还是 CD154 突变,都会引起严重的免疫缺陷病。CD40 在树突状细胞和巨噬细胞的活化,可以促进炎症因子的释放,提高树突状细胞和巨噬细胞抗原呈递的能力。CD40 同样还可以促进血管内皮细胞表面的细胞间黏附分子(intracellular adhesion molecule, ICAM-1、血管细胞黏附分子 1 (vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1) 和 E 选择素的表达。反过来可以促进炎症部位淋巴细胞的聚集。CD154 转基因小鼠可引起自发性 IBD。CD 病人肠

道黏膜固有层 CD154⁺T 细胞和 CD40⁺单核(巨噬细胞、B 细胞)增加。虽然临床上已经抗 CD154 抗体实验性治疗 IBD 有效,但因 CD154 在血栓稳定方面起重要作用,所以拮抗 CD154 会引起血栓栓塞。另一方面,抗 CD40 抗体会刺激 CD40 表达细胞,而且现在也没有低分子质量的 CD40 拮抗药。以脂质体为载体给 TBS 肠炎大鼠模型注入 CD40 反义核苷酸链(oligonucleotides, ODN),不论是诱导前还是诱导后给药,均抑制了抗原呈递细胞表面 CD40 的表达,引起肠道炎症黏膜 VCAM-1、IL-12p40 表达降低,反过来减少了淋巴细胞在黏膜内的浸润,减轻大鼠肠道炎症。CD40 反义 ODN 治疗有很多优点,如无血栓栓塞并发症,易于操作、稳定性更高、成本低、可局部给药^[14]。这些结果显示 CD40 反义 ODN 治疗可能用于 CD 病人。

2.4 激活蛋白-1(activated protein-1, AP-1)

转录因子激活蛋白-1(activated protein-1, AP-1)是区域亮氨酸拉链蛋白,由 Jun、Fos 和 ATF 几个同型或者异型二聚体组成,AP-1 与一些调控炎症、细胞生长和分化的 DNA 序列特异性结合。已经有一些抑制 AP-1 的药物用来治疗炎症和肿瘤。AP-1 诱饵 ODN 的作用效果已经在其做疾病中进行了研究。最近研究发现 AP-1 是 IBD 中某些上调基因的关键转录因子,AP-1 介导的巨噬细胞迁移炎症因子参与激素抵抗 UC 病人的炎症过程,结肠上皮肌成纤维细胞内 IL-22 诱导表达炎症基因主要受 AP-1 调控。因为 IBD 肠道炎症恢复过程中发挥着重要作用的上皮细胞再生和迁移受 AP-1 调控,所以抑制 AP-1 介导的信号可能作为治疗 IBD 的一个潜在靶点^[15]。

2.5 细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)

ICAM-1 是免疫球蛋白诱导的跨膜糖蛋白家族成员,主要表达在血管内皮细胞和部分白细胞表面。现在认为 ICAM-1 在白细胞从血液向炎症部位迁移的过程中发挥重要作用。编码 ICAM-1 的基因位于第 19 号染色体上,已经有研究证明 ICAM-1 基因多态性与 IBD 有关。TNF- α 和 IFN- γ 均会引起

ICAM 表达,ICAM 还参与嗜酸性粒细胞活化。IBD 患者肠道黏膜组织和血液中 ICAM-1 表达量均增高,并且与病情活动度成正比。

Alicaforsen (ISIS 2302) Alicaforsen 是一个 20 个碱基组成的硫代反义 OGN,可与人 ICAM-1 信使 RNA 的 3'端非编码区域杂交,水解 RNA 链,降低 ICAM-1 RNA 水平进而抑制蛋白的合成。van Deventer^[16]用 Alicaforsen 灌肠来治疗活动性 UC,选取了 40 例左半结肠有轻、中度炎症的 UC 患者,患者耐受性好,无毒不良反应,不论是长期还是短期疗效均是鼓舞人心的。Alicaforsen 2mg·kg⁻¹或者 4mg·kg⁻¹灌肠治疗,很多病人获得内镜下完全缓解并维持疗效长达 6 个月。Miner^[17]也有类似发现,他还比较 alicaforsen 和美沙拉嗪治疗肠道炎症的疗效,发现 UC 缓解时间 Alicaforsen(128~146d)明显长于美沙拉嗪(54d)。Alicaforsen 的 III 期临床试验正在进行中。

有大量 Alicaforsen 治疗 CD 的临床试验,最早使用静脉内给药,发现结肠 ICAM-1 水平降低,而外周淋巴结和外周血循环中的 ICAM-1 水平不变,使用 Alicaforsen 可以降低患者激素的剂量,并对激素依赖症患者有效。最近的 III 期临床试验共纳入 331 例 CD 病人,每周给药 3 次,第一阶段维持 4 周,第二阶段维持 12 周,结果显示不论是第 1 次还是第 2 次治疗完之后与对照组相比均无显著改变^[18]。分析这些病人 ICAM-1 和 TNF- α 的表达,有 3 例 TNF- α 的 SNP 与疗效有关,而 ICAM-1 与疗效无关。经皮下给予 Alicaforsen 治疗 CD 无效,静脉内给药后 2~4h 后可能会引起发热、咳嗽、头痛、恶心或关节痛,早期研究中输液反应高达 23%。

2.6 IL-10

IBD 患者血浆中 IL-10 表达量增高,而肠道 IL-10 较低或者在正常水平;IL-10 基因敲除小鼠和 IL-10 受体-2 缺陷小鼠会引起 Th1 细胞介导的肠道炎症。提示 IL-10 在肠道黏膜免疫调节系统中发挥着重要的作用。体内外实验证明 IL-10 兼有抗炎及免疫调节的作用,并且是炎症因子 IL-12 下游强有力的调节器,既可以促进抗原特异性调节性 T 细

胞的分化,也可增强它的活性,IL-10 还能抑制巨噬细胞产生一氧化氮合酶和环氧化酶-2 的产生。

临床上使用重组 IL-10 皮下注射治疗轻、中度 CD 患者有一定的疗效,但是激素敏感型患者效果较差,对激素耐受病人无效,这可能与 rIL-10 半衰期短(1.5 ~ 2.5h)有关,或局部 rIL-10 的量太少,不足以抑制黏膜 Th1 反应。

Lothar^[6]对 *L. lactis* 进行基因重组,使其可以分泌小鼠 IL-10。DSS 小鼠胃内灌注 LL-mIL-10 后,发现 LL-mIL-10 在盲肠、回肠、空肠和胃里都能检测到,但 mIL-10 只在结肠中被发现,可能是因为 mIL-10 只有在这里才不会被降解,并且结肠运动缓慢,所以 mIL-10 有足够的时间在此聚集。*L. lactis* 可能在肠腔内产生 mIL-10,然后 mIL-10 作用于上皮组织或固有层的靶细胞上,或者 *L. lactis* 被 M 细胞摄取并在肠道淋巴组织中产生 mIL-10。然后 mIL-10 直接下调炎症反应,或者通过淋巴细胞的自分泌,促进肠道黏膜组织愈合。

2.7 IL-22

IL-22 属于 IL-10 家族炎症细胞因子,IL-22 受体在先天免疫细胞如上皮细胞、角质形成细胞、肝细胞上表达,而在获得性免疫细胞(如 T/B 细胞)上不表达,所以 IL-22 主要参与的是先天性免疫。IL-22 有双重功能,既可以促进调节细胞的表达,如 SOCS3、IL-10、STAT3 介导的炎症抑制因子,又有促进炎症物质(如 CRP 和 IL-8)表达的功能。CD 患者 IL-22 在肠道黏膜固有层细胞和外周血液中表达量均增加。最近有研究证明,IL-22 在 CD 中的表达较 UC 要高。

最近发现 IL-22 可以促进脂多糖结合蛋白的表达,从而减轻 IBD 的炎症。IL-22 在 CD 中起到全身保护作用,而在 UC 中起到局部保护作用。

Ken^[19]使用阳离子脂质(1,2-二油酸-3-三甲基丙烷胆固醇[脂质胆固醇]/DNA 冷凝-2 + 20nmHEPES)为载体传递 IL-22 局部加压显微注射 DSS 小鼠肠道黏膜,结果未注射的部位无 IL-22 过量表达,基因瞬时表达(时间 < 4w),载体相对更安全。IL-22 刺激黏液增加、恢复肠道黏膜杯状细胞

比例,进而减轻肠道炎症。这种方法应用于 IBD 临床试验时可以通过肠镜下注射 IL-22。

2.8 IL-18

IL-18 是与 IL-1 细胞因子家族结构相似的具有多重功效的细胞因子,主要由肠上皮细胞、组织细胞和树突状细胞产生,参与 Th1 和 Th2 介导的免疫反应。IL-18 可以促进 NK 细胞活化,促进 T 淋巴细胞表达 IL-2、IL-1、IL-6、IFN- γ 、TNF- α 和 GM-CSF 扩大炎症反应,IL-18 在 CD 病人肠道黏膜固有层单核细胞和肠上皮细胞中上调。Wirtz^[4]以 Ad5 为载体传递 IL-18 反义 RNA,体外实验证明 IL-18 反义 RNA 可以抑制结肠细胞和 RAW264.7 巨噬细胞 IL-18 的表达,给 CB-17 SCID 结肠炎小鼠模型注入 Ad5-IL-18 反义 RNA,不论是内镜评分还是组织学评分均显示 C. B-17 SCID 小鼠肠道炎症的水平显著改善,且肠道固有层单核细胞产生的 IL-18、IFN- γ 的水平下降,脾脏细胞产生这些分子的能力却不受影响,说明肠道局部使用反义 IL-18 治疗后对全身免疫没有影响。

2.9 肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF)

HGF 最初发现可以促进肝脏细胞再生,后来发现对很多上皮细胞都起作用,其中就包括胃肠道上皮,在上皮细胞受到损伤时,HGF 促进上皮细胞生长以及上皮组织重建。在 UC 患者肠上皮 HGF 高表达,肠炎动物模型血浆中 HGF 浓度增高。

Koushi^[20]给 DSS 小鼠肌内注射以 HVJ - liposome 为载体的 HGFcDNA,结果发现 IL-12、INF- γ 、TNF- α 在肠道黏膜中的表达量减少,组织学显示 HGF 促进损伤肠道黏膜再生和修复、延缓细胞凋亡。Tomoyuki 给 TNB 小鼠静脉内注射以腺病毒为载体的 HGF,可减轻肠道炎症,促进黏膜愈合。Kanbe^[21]给 DSS 小鼠肠道内注入裸 HGFcDNA,发现 HGF 在肠道表面上皮、固有层和黏膜肌层表达量增高,黏膜损伤减轻。肠道黏膜组织基因芯片结果分析显示,HGF 促进增殖和凋亡基因的表达。

2.10 其他

还有一些分子如 IL-4、IL-1、TGF- α 、TGF- β 1、

Smad17、Map4k4 的治疗也有所研究,但不深入,这里不做详细介绍。

3 小结

综上所述,IBD 基因治疗的临床前期实验研究取得重大成就,通过动物实验,也已发现很多具有潜在治疗潜能的分子。但是临床研究较少,所以 IBD 基因治疗依然存在诸多挑战。为实现基因治疗的高效转导、减少免疫反应以及保持转导的基因持续稳定表达,达到最佳治疗效果,仍需综合深入研究缺陷基因、靶向细胞,选择并改良载体,提高载体的基因容量,减少载体对人体的毒性,增强基因表达时间。IBD 的基因治疗一定会有美好的明天。

【参考文献】

- [1] Korzenik JR, Podolsky DK. Evolving knowledge and therapy of inflammatory bowel disease[J]. Nat Rev Drug Discov, 2006, 5: 197-209.
- [2] Prieto J, Herraz M, Sangro B, et al. The promise of gene therapy in gastrointestinal and liver diseases[J]. Gut, 2003, 52 (Suppl II): ii49-ii54.
- [3] Adriaansen J, Vervoordeldonk MJ, Tak PP, et al. Gene therapy as a therapeutic approach for the treatment of rheumatoid arthritis: innovative vectors and therapeutic genes[J]. Rheumatology (Oxford), 2006, 45: 656-668.
- [4] Wirtz S, Becker C, Blumberg R, et al. Treatment of T cell - dependent experimental colitis in SCID mice by local administration of an adenovirus expressing IL-18 antisense mRNA[J]. J Immunol, 2002; 168: 411-420.
- [5] Fichtner - Feigl S, Fuss IJ, Preiss JC, et al. Treatment of murine Th1 - and Th2 - mediated inflammatory bowel disease with NF - kappaB decoy oligonucleotides[J]. J Clin Invest, 2005, 115: 3057-3071.
- [6] Steidler L, Hans W, Schotte L, et al. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin - 10[J]. Science, 2000, 289: 1352-1355.
- [7] Li S, Rizzo MA, Bhattacherya S, et al. Characterization of cationic lipid - proramine - DNA (LPD) complexes for intravenous gene delivery[J]. Gene Ther, 1998, 5: 930-937.
- [8] Bhavsar D, Amiji M M. Gastrointestinal distribution and in vivo gene transfection studies with nanoparticles - in - microsphere oral system (NiMOS) [J]. Journal of Controlled Release, 2007, 119: 339-348.
- [9] De Vry CG, Prasad S, Komuves L, et al. Non - viral delivery of nuclear factor - kappaB decoy ameliorates murine inflammatory bowel disease and restores tissue homeostasis[J]. Gut, 2007, 56: 524-533.
- [10] Krieger C, Amiji M. Oral TNF - gene silencing using a polymeric microspheres delivery system for the treatment of inflammatory bowel disease[J]. J Control Release, 2011, 150: 77-86. 2010 Oct 17.
- [11] Wilson DS, Dalmasso G, Lixin Wang, et al. Orally delivered thio-ketal nanoparticles loaded with TNF - siRNA target inflammation and inhibit gene expression in the intestines[J]. Natuer materials, 2010, 9: 923-928.
- [12] Myers KJ, Murthy S, Flanagan A, et al. Antisense oligonucleotide blockade of tumor necrosis factor - alpha in two murine models of Colitis[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2003, 304: 411-424.
- [13] Longsheng Z, Zhen H, Lei D, et al. Targeting delivery of anti - TNF oligonucleotide into activated colonic macrophages protects against experimental colitis[J]. Gut, 2010, 59: 470-479.
- [14] Gao D, Wagner AH, Fankhaenel S, et al. CD40 antisense oligonucleotide inhibition of trinitrobenzene sulphonic acid induced rat colitis[J]. Gut, 2005, 54: 70-77.
- [15] Ishiguro Y, Yamagata K, Sakuraba H, et al. Macrophage migration inhibitory factor and activator protein - 1 in ulcerative colitis[J]. Ann N Y Acad Sci, 2006, 1029: 348-349.
- [16] van Deventer SJ, Tami JA, Wedel MK, et al. A randomised controlled double blind escalating dose study of alicaforsen enema in active UC[J]. Gut, 2004, 53: 1646-1651.
- [17] Miner P, Wedel M, Bane B, et al. An enema formulation of alicaforsen antisense inhibitor of intracellular adhesion molecule - 1 in the treatment of chronic unremitting pouchitis[J]. Aliment Pharmacol Ther, 2004, 19: 281-286.
- [18] Yacyshyn B, Chey WY, Wedel MK, et al. A randomized, double - masked, placebo - controlled study of alicaforsen, an antisense inhibitor of intercellular adhesion molecule 1, for the treatment of subjects with active Crohn's disease[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2007, 5: 215-220.
- [19] Ken S, Atsuhiko O, Emiko M, et al IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis[J]. J, Clin, Invest, 2008, 118: 534-544.
- [20] Oh K, Jimuro Y, Takeuchi M, et al. Ameliorating effect of hepatocyte growth factor on inflammatory bowel disease in a murine model[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005, 288: 729-735.
- [21] Kanbe T, Murai R, Mukoyama T. Naked gene therapy of hepatocyte growth factor for dextran sulfate sodium - induced colitis in mice[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2006, 345: 1517-1525.