

# 基因治疗新途径

张德礼 高步先 高显明

(北京军区后勤部卫生防疫队, 北京军区兽医防治中心  
病毒基因工程研究室, 北京 100071)

朱关福

(中国军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100850)

**[摘要]** 从三方面评述基因治疗新途径的研究进展、存在问题、发展对策和应用前景: (1) 腺病毒介导基因治疗; (2) 功能基因直接注射疗法; (3) 反义治疗——分子病毒学新领域。

**[关键词]** 基因治疗, 腺病毒介导疗法, 直接基因治疗, 反义治疗

80年代末以来, 人类基因治疗从基础研究步入临床试验, 预计本世纪末将成为一种新的常规治疗方法。迄今, 经美国国立卫生研究院 (NIH) 批准进入临床试验的方案已达 40 种以上, 治疗疾病种类涉及各种恶性肿瘤 (癌症)、心血管病、神经系统疾病、代谢病、遗传病及传染病 (如艾滋病) 等。当前, 基因治疗的定义或概念已经改变过去经典的基因治疗概念 (指针对遗传病某一种基因缺陷, 导入目的基因予以纠正), 已扩大到导入外源基因达到治疗效果的所有疗法, 既可应用自体细胞, 在体外导入外源基因后输回人体, 也可将含外源基因的重组病毒或重组质粒 DNA 等直接导入体内。随着人类基因组计划的实施, 基因表达调控机制的阐明, 以及转基因技术的发展和转基因方法的完善, 基因治疗必将成为人类攻克疑难病症的一种强有力的治疗途径。

## 1 腺病毒介导基因治疗

与逆转录病毒载体相比, 人类腺病毒 (Ad) 载体的独特优点在于其具有携带大片段外源 DNA (36 kb 基因组) 的潜力, 很高的体外培养增殖滴度 ( $10^{11}$  pfu/mL), 能感染分裂期后的非复制性细胞, 适于感染原位组织尤其是肺脏等。近年来, 以 Ad 为基因转移载体的研究进展表明, 这一载体系统即将成为基因治疗的重要工具。

研究表明, 通过气管内滴注将人肺囊性纤维化 (CF) 穿膜传导调节因子 (CFTR) 基因转入棉鼠气管上皮获得成功表达, 至少可持续 6 周<sup>[1, 2]</sup>。痘苗病毒、逆转录病毒和腺病毒载体分别介导的 CF 基因治疗的实验研究结果一致表明<sup>[2-5]</sup>, CFTR 基因在呼吸上皮的低水平表达, 即可达到治疗目的, 从而为腺病毒载体介导的 CF 基因治疗展现了光明前景。在临床研究方面, 美国 NIH 的重组 DNA 顾问委员会 (RAC) 批准了三项腺病毒载体介导的 CF

---

本文于 1995 年 10 月 19 日收到。

基因治疗方案,其中两项使用缺失 $E_1$ 区和 $E_3$ 区的重组 $Ad_5$ 载体;一项采用缺失 $E_1$ 区但保留 $E_3$ 区基因的重组 $Ad_2$ 载体。以上都是让患儿吸入携有CFTR基因的重组Ad载体,将基因转入肺和上呼吸道上皮。目前临床研究主要是观察重组Ad基因治疗载体的毒性。

在杜兴氏肌肉营养不良症(DMD)治疗方面,Quantin等(1992)<sup>[6]</sup>构建成功可以在肌肉组织中特异性表达选择性标记基因——LacZ的重组Ad,已在小鼠体内取得良好预试验结果。最近,Ragot等<sup>[7]</sup>法国研究人员构建了表达超短营养不良素(minidystrophin 220KDa)的重组Ad,并给10只“mdx”小鼠(此种小鼠有与人DMD相似的基因缺陷)肌肉内注射。结果,体内目的产物合成量明显增加,50%受注射部位的肌纤维膜上有此蛋白产物表达,且转染基因的稳定性表达在3个月以上。以上实验结果仅是开始,重组Ad能否感染体内所有肌细胞,尚待进一步试验确定。DMD的基因治疗何时进入人体试验阶段,目前仍不能预计。

在帕金森氏病(Parkinson's disease)等神经系统疾病治疗方面,Salle等<sup>[8]</sup>最先构建出含有选择性标记基因——LacZ基因的重组Ad,并在体外培养及大鼠脑内的神经原和神经胶质细胞中,高效转染并表达了LacZ,未观察到对细胞有毒性作用。用重组Ad感染大鼠神经原细胞培养物,所表达的足够量LacZ,无任何毒副作用。将重组Ad直接引入成年大鼠脑内的不同部位,24小时后脑细胞开始高效地表达选择性标记基因,且可持续2个月之久。重组Ad在注射部位浓度很高,但无毒性,这是基因治疗所需要的。另外,重组Ad在鼠脑内不复制,只感染注射点周围的细胞。这些结果表明,腺病毒载体介导的脑组织基因治疗的精确度高,特异性强。1993年3月的《Nature Genetics》专刊上又刊登了3篇利用重组腺病毒为载体,将不同外源基因直接导入小鼠或大鼠的中枢神经系统获得持续高效表达的报道<sup>[8]</sup>,进一步说明腺病毒在基因治疗中前景看好。过去神经系统疾病基因治疗的研究侧重采用缺陷型单纯疱疹病毒(HSV)载体,但感染效率低,且具有致病性,从而限制了使用;此外,实验证明逆转录病毒载体在应用中也有很大的局限性,它只能在分裂期细胞中发挥作用,而人出生后健康脑细胞几乎不再分裂<sup>[2,9]</sup>,可见,腺病毒是神经系统疾病基因治疗的重要载体。

腺病毒也是内皮细胞基因治疗的重要载体。Lemarchand等(1992)<sup>[10]</sup>以包含大肠杆菌LacZ基因或人 $\alpha$ 1AT(抗胰蛋白酶) $\alpha$ 1AT cDNA的复制缺陷型重组Ad载体,体外感染人脐静脉内皮细胞,结果表明,Ad载体将外源基因高效转移到体外培养完整人脐静脉内皮细胞里,并获得高效表达,且几乎没有AdDNA整合到靶细胞基因组中。这在基因治疗上可不必考虑会发生插入突变,这就可以灵活地逐剂使用治疗基因<sup>[11]</sup>。在血管内皮细胞上多剂使用重组Ad可能诱发免疫应答,但尚需进行体内研究。就人内皮细胞而言,体外研究表明,Ad载体转移入的人 $\alpha$ 1AT基因至少能稳定表达2周<sup>[10]</sup>。体内基因转移后,能否获得更长时间的表达,尚待进一步研究。然而,如果慢性表达主要依赖于细胞吞吐,那么内皮细胞的慢速吞吐就对Ad载体系统有利。内皮表面区域巨大, $\alpha$ 1AT基因直接转移到内皮细胞是治疗先天性 $\alpha$ 1AT缺陷的可行策略,尤其应在肺动脉和毛细血管实施基因转移以治疗疾病。而且,短片断血管可在24小时分泌高水平 $\alpha$ 1AT,故腺病毒介导的外源基因转移能适用于多种基因治疗人类疾病。

总之,Ad已广泛应用于基因治疗的临床和基础研究,目前成了基因治疗的重要载体。

鉴于 Ad 用作基因工程载体有一系列优越性, 正如其可用于开发多价重组载体口服活疫苗一样, 复制性和非复制性 Ad 重组活载体在传染病、遗传病、心血管病、肿瘤及癌症等的基因治疗及抗病育种上, 必将发挥重大作用, 尤其会在口服基因治疗上占一席之地。

一旦多价重组 Ad 载体口服活疫苗得到广泛应用, 基因治疗技术亦获得最终突破后, 复制性和非复制性 Ad 载体介导的基因治疗、基因预防及抗病动物新品系即可实现, 尤其是在基因防治上将会有十分光明的应用前景。

## 2 功能基因直接注射疗法

90 年代初以来, 国内外相继报道不用逆转录病毒载体, 将包含功能基因的非复制性重组质粒 DNA 序列直接注射动物体内而获得持续足量表达, 从而实现基因治疗。

早在 1979 年, Israel 等人将感染性多瘤病毒基因组注入小鼠腹腔中, 发现病毒基因组可在体内复制出感染性病毒颗粒。后来, 将 Rous 肉瘤病毒、肝炎病毒基因和 V-src 致癌基因经皮下或肝内注射受试动物, 也发现了体内的病毒复制或致癌作用。虽然这种感染性事件和致癌作用的发生率极低, 但却表明体内直接注射病毒基因组或致癌病毒基因后, 细胞能摄取外源基因片段并使其得到表达。

英国 (1993) Higgins 等<sup>[11]</sup> 把正常人 CFTR 基因包埋在脂质体内, 导入 CF 小鼠肺粘膜细胞, 结果盐运输恢复到正常水平。这说明基因直接注射疗法可恢复人工诱导的 CF 小鼠肺粘膜上皮细胞的正常功能。

我国汤健等<sup>[12]</sup> 给大鼠肌肉、心肌或血管腔内注射外源性重组基因, 证明这些基因都可转染肌肉、心肌和血管壁细胞, 一次注射可在体内维持 2—6 个月以上, 但表达效率低。他们最近用多聚赖氨酸将外源性重组基因结合至缝合线上, 制备成基因缝线, 缝合在肌肉组织或血管壁上, 可以提高表达效率 8—10 倍, 具有良好的应用价值。

已有研究表明, 对中枢神经系统疾病, 如帕金森氏综合症等, 可将酪氨酸脱氢酶基因直接注入脑内, 通过基因表达达到治疗目的<sup>[13]</sup>。大分子量的重组生长因子 (如胰岛素) 不能通过血脑屏障<sup>[13]</sup>, 将其编码基因直接导入脑内进行治理则是一种理想方法。中国 Zhang LX 等 (1992)<sup>[14]</sup> 将包含 CCK 基因的表达质粒注入一种对声音刺激十分敏感 (可诱发癫痫样发作) 的 P77PMC 大鼠脑内, 脑组织在一段时间内表达了外源 CCK 基因, 并在表达高峰时间 (第 3—4 天) 明显抑制了大鼠的发作。

肌肉内注射包含人类免疫缺陷病毒糖蛋白 120 (HIVgp120) 基因并带有巨细胞病毒 (CMV) 早期启动子 (EP) 的重组质粒, 结果导致产生高滴度的 IgG 抗体及针对 gp120 的细胞免疫<sup>[13]</sup>。最近, 我国将包含狂犬病毒糖蛋白 cDNA 的重组质粒肌注入小鼠体内亦诱生了抗糖蛋白抗体<sup>[14]</sup>。由此可见, 功能基因直接注射的重要用途之一将是作为疫苗使用。

令人欣喜的是, 直接基因治疗人体试验最近已取得成功。美国密歇根大学 Nabel G 等 (1993)<sup>[15]</sup> 向 5 位晚期 (IV 期) 黑色素瘤患者的肿瘤处直接注射包含称作 B7 的人淋巴细胞抗原 (HLA) 基因和启动子的质粒 DNA 的脂质体, 证实可用 HLA-B7 定靶癌肿, 此直接基因疗法切实可行。动物实验后又经人体试验证明, 直接基因疗法不仅可治疗黑色素瘤, 而且对远离处理位点的癌肿也有疗效 (其中一位病人的 5 个远端肿瘤完全消退), 这是转移瘤治疗方面的一大突破。虽然脂质体常有不能向靶细胞输送足量 DNA 的局限, 但此项人体试

验中受处理的肿瘤表达重组蛋白的量为1%—10%，而且5位患者活体检查表明均表达了HLA-7。患者血液中未检测到质粒DNA，也未测出抗DNA抗体，表明DNA在体内免疫原性低，从而消除了机体对质粒DNA会产生较强免疫反应的担心，此疗法的机理是，机体免疫系统识别B7，并相应地局部释放细胞因子，从而导致对未改变的肿瘤细胞部位和整个人体产生T细胞免疫反应。Nabel G等计划与有关机构合作，配合其它疗法进行更大规模的直接基因治疗实验。适于此疗法的基因还包括编码细胞分裂素、抗肿瘤蛋白、生长因子拮抗药和血管生成素抑制物的基因等。

功能基因直接注射疗法最大的优点是简便易行，目前已有肌肉注射、静脉注射和气管内灌输等方法，类似的皮下或体内包埋等直接基因治疗相继也有报道。尤其是近年出现一种高能微粒子轰击系统，其原理是亚微粒形态的钨和金能自发吸收DNA，采用高压放电，可将涂布有目的基因的这些微粒加速到很高的速度，然后直接轰击到体内、皮肤表层、通过小手术暴露后的真皮、肌肉、内脏器官（如肝脏和肠等）、乳腺组织或瘤体，均可直接转入外源基因并获得较长时间的表达。它的优点是迅速、简便，可以“指到哪里，打到那里”，目前已在动物实验中显示具有应用潜力。

DNA或mRNA的直接基因疗法走上临床指日可待。传统基因治疗总希望一劳永逸（治疗一次就能产生长期乃至永久效果），但上述进展说明，功能基因可象普通药物一样，反复按需要给药。当需要基因产物起治疗作用时，可导入适量基因，而当治疗不需要或产生副作用时，这种治疗就可以停止。

### 3 反义治疗——分子病毒学新领域

反义技术同基因工程的常规技术相反，走的是抑制基因表达的路线，它是近10年发展起来的反义核酸（RNA或DNA）技术、Ribozyme技术及反义Ribozyme技术（Antizyme）的总称<sup>[16, 17]</sup>。所谓反义技术，就是利用细胞核物质片段，即反义基因或反义寡核苷酸去和细胞中的DNA或RNA相结合，从而控制这些DNA或RNA的功能。反义技术的主要用途就是阻止细胞产生某一细胞基因所编码的特定蛋白质。

80年代发展起来的反义RNA技术，提供了特异性抑制某一基因的手段。使用人工合成的反义RNA在原核细胞和真核细胞中，均成功地抑制了多种基因的表达，其中包括病毒复制和增殖所必需的基因。反义RNA技术进而发展为反义核酸技术（包括反义寡核苷酸及其衍生物），并被用于抑制病毒的复制。为此，有人提出反义RNA是一种人工免疫系统，它将成为治疗病毒性疾病的有效手段。

反义RNA通过和相应的RNA互补而达到阻断其功能的目的。反义RNA在原核细胞中的作用形式主要是阻断了宿主细胞的核糖体与靶mRNA的结合过程而阻断了靶基因的表达。在真核细胞中，反义RNA除了与在原核细胞中有相似的作用形式外，其特点在于反义RNA还可与病毒基因组的增强子区域结合而降低靶基因的转录水平，或与靶mRNA结合而使mRNA无法穿过核壳到达胞浆，同样达到阻断病毒基因表达的目的。

应用反义RNA技术抑制病毒的感染日益受到重视。在真核细胞中，反义RNA作为人工的免疫系统，同样可以高效抑制病毒mRNA的翻译和病毒基因组的复制。Powell等建立了表达烟草花叶病毒（TMV）反义RNA的转基因植物，并能抵抗TMV感染。抗软化反

义番茄正待批准上市。与其它常规抗病毒治疗方法相比较，反义 RNA 技术具有明显的优点：反义 RNA 在宿主细胞内通过特异性地识别病毒核酸序列，在 RNA 水平上阻断病毒基因的复制和表达，对细胞几乎无损害；反义 RNA 与其它合成药物相比，由于药物剂量而引起的副作用可以忽略；尤其是将带有反义 RNA 基因的载体引入原代细胞，形成稳定持续感染的细胞系，可使动物的后代具有可遗传的抗病毒特性。Munir 等人已成功地在转基因鼠中表达了反义 RNA。国内外在应用反义 RNA 技术培育抗病（如抗猪瘟、抗鸡马立克氏病等）动物品系方面已取得比较明显的进展。目前国外已有很多公司开始应用反义 RNA 技术进行抑制病毒感染的研究工作。

如何将反义 RNA 基因导入体内？如何选择设计反义 RNA 基因使其在细胞内充分发挥作用？目前尚无明确的结论。实验经验表明，若要使反义 RNA 基因在体内充分发挥作用，其所在载体启动子的强弱是一个关键因素，启动子强，反义 RNA 的转录水平大于靶 RNA 的转录水平，则靶基因的表达或复制水平可望降低。但在体内，因受胞内各种作用因子的影响，具体到某一系统中，反义 RNA 作用的效果如何还需实验作出定论。在原核细胞中，互补于靶 RNA 5' 端区域的反义 RNA 的作用效果最好；在一些真核细胞中，互补于靶 RNA 其它某些区域，如 3' 端非编码区的反义 RNA 具有很强的作用效果；然而，在许多情况下证明，一般互补于靶 RNA 5' 端的反义 RNA 的作用效果最好。

应用反义 RNA 技术阻断病毒基因的复制和表达已成为可能。在上述研究进展的基础上，选择病毒复制的关键区域为反义 RNA 作用的靶区域，在细胞水平、动物模型乃至机体水平上抑制病毒的复制，将是一个现实的目标。当在基因治疗技术得到最终突破后，反义 RNA 技术作为治疗病毒性疾病的新手段，与现有常规治疗技术相比，将具有更为光明的应用前景。

Ribozyme 是新发现的一类基因调控 RNA，它能以序列特异性地催化切割靶 RNA<sup>[18-19]</sup>。实际上，它是一种具有酶的特性的 RNA 分子。从基因治疗角度看，Ribozyme 抑制基因表达的作用值得广泛深入研究并尽早得到临床应用。尽管具有催化功能的 RNA 分子的来源广泛，作用形式多种多样，但 Ribozyme 在无细胞蛋白存在的条件下，都有进行自身催化切割的特性，这是它们生命周期中的一个必需环节；另外，Ribozyme 都有一定的保守序列。在研究了几种具有自身切割功能的 RNA 分子的保守序列后，如苜蓿暂时性条斑病毒、烟草环斑病毒卫星 RNA、鳄梨日斑病类病毒等的 RNA 分子，发现它们都具有榔头状的二级结构（Hammerhead structure），认为这是维持其自身切割功能的结构基因。因此，澳大利亚学者 Hoseloff 等<sup>[10]</sup>提出了 Ribozyme 分子的反式（in trans）作用模型。这就使 Ribozyme 作为基因剪刀有可能在阻断病毒 RNA 功能进而抑制病毒复制方面发挥重要作用。原则上 Ribozyme 的靶子可以是自然界存在的任何一种 RNA，从动植物到病毒，关闭基因或阻止病毒感染，其应用前景十分诱人。

长期以来，病毒性疾病一直没有有效办法医治，因为病毒不同于细菌，它依赖于宿主而生存，它的复制和基因表达要借助宿主的某些功能。因此，抑制病毒复制的主要困难是，当阻断病毒功能时也同时对宿主产生不利影响，即使有些过程是病毒生活周期特有的，但当长期用药时也有毒性副作用产生。如核苷类似物 AZT 是人类免疫缺陷病毒（HIV）逆转录酶的强抑制剂，对细胞无作用，但 AZT 在高浓度下抑制细胞 DNA 多聚酶和 RNase H 的活

性,因而限制了药物的使用。Ribozyme 和反义 RNA 一样提供了特异性阻断某种 RNA 的手段,通过阻断病毒基因组和 mRNA,减少以至抑制病毒的复制。Cotton 使用在体内高效表达的 tRNA 的基因作为 Ribozyme 的表达载体,在反义密码环上插入 Ribozyme 基因,与靶 RNA 分子——组蛋白 mRNA 合成必需的 U7RNA 分子,同时注入蛙卵细胞中,利用 tRNA 基因在体内的高效表达,得到大量的 Ribozyme 分子,成功地切割了靶分子——U7RNA 分子。可见,Ribozyme 主要是通过和靶 RNA 作用、切割而使其失去生物功能。因为 Ribozyme 是在 RNA 水平上进行作用,有严格的序列特异性,长期使用对细胞无毒副作用,再加上它结构简单,可以人工设计,因此是一种很有希望的基因治疗手段。不过,目前使用 Ribozyme 作为抗病毒治疗的一种新技术还存在一些问题,比如如何选择敏感的靶位点?如何使 Ribozyme 进入细胞?这些问题都需要深入研究。与反义 RNA 技术所面临的问题一样,一旦基因治疗成为可能,Ribozyme 介导的治疗即可实现。据 Gibbons<sup>[19]</sup>在《Science》上报道,Ribozyme 日趋商业化,显示其应用前景广阔。

在阻断乙型肝炎病毒复制方面,可以选择乙肝病毒复制的关键区域作为 Ribozyme 的作用区域。如 3.5kb mRNA 的起始区域(DR<sub>1</sub>和 DR<sub>2</sub>),乙型肝炎病毒基因组 PreC 区,乙型肝炎病毒 DNA 聚合酶基因 5' 端,乙型肝炎病毒 DNA C 区和 S 区 5' 端等,寻找 Ribozyme 的特异识别位点 GTC(转录成 RNA 后即 GUC),然后根据榔头状 Ribozyme 基本结构设计出相应的 Ribozyme 基因,克隆到适当的病毒载体上,转录针对乙肝病毒复制关键区域的 Ribozyme,催化切断其 mRNA,从而在细胞和机体水平上阻断乙肝病毒复制及基因表达。对各型肝炎、艾滋病、狂犬病、流感、疱疹、带状疱疹、水痘、麻疹、流行性腮腺炎、马立克氏病、传染性法氏囊病、马传染性贫血、口蹄疫、猪瘟、阿留申病、新城疫等,都可以考虑研究应用 Ribozyme 技术抗病毒治疗,也可培育抗病动物品系<sup>[18, 19]</sup>。

目前关于反义 RNA 对病毒基因复制抑制的作用机理已有明确认识,但对 Ribozyme 的作用形式尚无充分了解。如何利用现有反义 RNA 技术引导、加强 Ribozyme 对病毒基因复制的抑制作用?如何联合应用反义技术与细胞因子技术治疗病毒病?如何联合应用反义 RNA 与 Ribozyme 技术?如果在反义 RNA 的基因中插入 Ribozyme 基因引入体内进行转录,其对靶基因转录的抑制是否比反义 RNA 或 Ribozyme 的作用效果更好?应用腺病毒载体或非复制性禽痘病毒载体作为重组活载体是否比现在的复制性痘苗病毒载体和逆转录病毒载体更有实践意义?这些都是值得探索的重要研究课题。

所谓反义 Ribozyme,即 Ribozyme 基因与反义 RNA 基因相连接,转录成具有 Ribozyme 和反义 RNA 双重功能的一类 RNA 分子。目前,它在转基因植物研究方面,应用比较广泛。

中国医学科学院副院长并中国协和医科大学副校长卢圣栋教授和中国预防医学科学院病毒学研究所形态学研究室主任并中华医学会病毒学会理事长洪涛教授审阅此文,谨此致谢!

## 参 考 文 献

- [1] Miller AD. Human gene therapy comes of age. *Nature*, 1992, 357 (6378): 455.
- [2] Rosenfeld MA, Yoshimura K, Trapnell BC et al. In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane

- conductance regulator gene to the airway epithelium. *Cell*, 1992, **68** (1) : 143.
- [3] Drum ML, Pope HA, Cliff WK et al. Correction of the cystic fibrosis defect in vivo by retrovirus-mediated gene transfer. *Cell*, 1990, **62**: 1227.
- [4] Rich DP, Anderson MP, Gregory RJ et al. Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Nature*, 1990, **347**: 358.
- [5] Gregory RJ, Cheng SH, Rich DP et al. Expression and characterization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature*, 1990, **347**: 382.
- [6] Quantin B, Perricauder LD, Tajbakhsh S et al. Adenovirus as an expression vector in muscle cells in vivo. *PNAS USA*, 1992, **89** (7) : 2581.
- [7] Ragot T, Vincent N, Chafey P et al. Efficient adenovirus-mediated transfer of a human minidystrophin gene to skeletal muscle of mdx mice. *Nature*, 1993, **361** (6413) : 647.
- [8] 吴旻. 基因治疗纵横谈. *中华医学杂志*, 1993, **73** (7) : 389—392.
- [9] Patel T, Brown P. Virus transports 'foreign' gene into rat's brain. *New Scientist*, 1993, **137** (1861) : 15.
- [10] Lemarchand P, Jaffe HA, Danel C et al. Adenovirus-mediated transfer of a recombinant human alpha-1-antitrypsin cDNA to human endothelial cells. *PNAS USA*, 1992, **89** (14) : 4382.
- [11] Higgins C. Gene therapy of Cystic fibrosis. *New Scientist*, 1993, (1865) : 7.
- [12] 汤健、周爱儒. 心血管病的基因治疗. *中华医学杂志*, 1994, **74** (6) : 331—332.
- [13] Felgner PL, Rhodes G. Gene therapeutics. *Nature*, 1991, **349** (6307) : 351—352.
- [14] 扈荣良、杜坚、涂长春等. 肌注狂犬病毒糖蛋白 cDNA 小鼠产生抗糖蛋白抗体. *中国兽医学报*, 1994, **14** (2) : 117 转 134.
- [15] Nabel G. Success in directive gene therapy. *Biotechnology News*, 1993, **13** (29) : 1—2.
- [16] 叶寅、刘怡之、赵丰等. 特异切割马铃薯纺锤形块茎类病毒的 Ribozyme 的体外活性测定. *中国科学 (B 辑)*, 1992, **22** (5) : 491.
- [17] 许政彪、李洁、张庆琪等. 核酶的体外合成及其对烟草叶病毒 RNA 靶的作用. *中国科学 (B 辑)*, 1992, **22** (1) : 47.
- [18] Hoseloff J, Gerlach WL et al. Simple RNA enzymes with new and highly specific endoribonuclease activities. *Nature*, 1988, **334**: 585—591.
- [19] Gibbons A. Molecular scissors: RNA enzymes go commercial. *Science*, 1991, **251** (4992) : 521.

## NEW WAYS FOR GENE THERAPY

Zhang Deli      Gao Buxian      Gao Xianming

(Chinese Army Laboratory of Molecular Virology & Genetic Engineering, Institute of Preventive Medicine & Veterinary Science in Beijing Military Area of Chinese PLA, Beijing 100071)

Zhu Guanfu

(Department of Virology, Institute of Microbiology & Epidemiology, Chinese Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)

**Abstract** The update important advances, existing questions, developing countermeasures & application prospects of new ways for gene therapy have been critically reviewed from the following three aspects: (1) Adenovirus-mediated gene therapy; (2) Direct gene therapy without using viral vectors; and (3) Antisense therapy—a new field in gene therapy.

**Key Words** gene therapy, adenovirus, direct gene therapy, antisense therapy