

椎间盘退变基因治疗的研究近况

赵 勇,王文波

(哈尔滨医科大学第一临床医学院骨二科 150001 哈尔滨市)

中图分类号:R681.5

文献标识码:A

文章编号:1004-406X(2005)-06-0365-03

椎间盘退变 (intervertebral disc degeneration, IDD) 引起的一系列脊柱退行性疾病及继发病变在临床上十分多见。非手术和许多手术治疗的效果尚不能令人满意^[1]。随着分子生物学、遗传学、免疫学的发展及在医学中的应用,在椎间盘退变的早期针对其分子水平改变的基因治疗逐渐显现出其优越性,国内外学者做了大量的探索。现就其研究近况综述如下。

1 椎间盘退变的生物学特性

椎间盘的退变过程是由于细胞因子的减少和致炎因子的增多,导致基质金属蛋白酶活性增加,椎间盘软骨样细胞分泌蛋白多糖和 I、II 型胶原能力下降,降解加速,进而使椎间盘软骨样细胞赖以生存的细胞外环境被破坏,髓核内水分丧失,不能维持椎间盘内应有的张力,加剧细胞退变,并且这种改变很难自行修复。

椎间盘的自身结构、理化特性,尽管在一定程度上限制了其自身修复的潜在性,但却提供了一个非常重要的优势:髓核是逃避在自身免疫系统以外的结构,对其它器官进行基因治疗起限制作用的免疫反应并没有发生在椎间盘组织中,这为椎间盘提供了一个适合于基因治疗的有利环境^[2]。近年来基因治疗也逐渐显露出其在分子水平对 IDD 进行治疗的可行性。

2 转入基因的选择

针对椎间盘退变,有学者^[3]应用能增加蛋白多糖合成的生长因子,如转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$),进行转基因治疗,使外源基因能有效地表达并发挥生物学作用,促进髓核细胞合成代谢功能的增强,从而使蛋白多糖含量增加。

Thompson 等^[4]报道了生长因子对成年狗椎间盘培养细胞的影响,是最早探索用生长因子诱导退变椎间盘修复的研究之一。其结果显示不同生长因子可以作用于不同的椎间盘区域或细胞,促进椎间盘细胞增殖和基质合成。Maeda 等^[5]证实白细胞介素-1 (interleukin-1, IL-1) 对不同年龄兔的椎间盘细胞蛋白多糖均有减少合成和促进降解的作用。应用白细胞介素-1 受体抑制剂 (interleukin-1

receptor antagonist, IL-1ra) 则抑制了 IL-1 的作用。椎间盘及其环境、细胞和其产物复杂的内部反应、髓核内合成和分解代谢失衡都直接导致椎间盘的退变,从而为椎间盘基因治疗提供了两条不同的途径,即主要选择细胞因子和致炎因子拮抗剂作为基因治疗的目的基因。前者主要为 TGF- β 、胰岛素样生长因子-1 (insulinlike growth factor-1, IGF-1)、成骨蛋白-1 (osteogenic protein-1, OP-1) 等;后者包括 IL-1ra、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α) 拮抗剂、基质金属蛋白酶 (matrix metallo proteinases, MMPs) 抑制剂等。

3 基因治疗的应用

生长因子在离体间接实验研究中能使胶原及蛋白多糖的合成增加^[6]。1998 年, Nishida 等^[7]用腺病毒介导的半乳糖苷酶 (Lac-Z) 基因进行了体内和体外实验。结果证明,腺病毒载体能高效地将 Lac-Z 基因转入髓核细胞,并在新西兰兔体内持续稳定表达 12 周以上,且在随后的研究中证明相应蛋白的表达可以持续达 1 年之久。在成功地导入标记蛋白之后不久,在体直接向椎间盘细胞中导入治疗基因 TGF- $\beta 1$ 也获得了成功^[8]。在体实验的成功促进了人的椎间盘髓核细胞培养的实验研究。Moon 等^[9]把来自不同患者的椎间盘细胞 (包括颈和腰椎间盘) 进行体外培养,利用 Ad/CMV-Lac-Z 载体直接转导,转导率达 100%。该实验证实,不论椎间盘是否退变,退变程度如何,以及患者的年龄、性别、原发病等,腺病毒介导的基因治疗都可以有效地将治疗基因转入椎间盘细胞中。腺病毒介导的 TGF- $\beta 1$ 在随后的研究中也成功地转入体外培养的人椎间盘细胞,其表达及蛋白多糖和胶原的合成得到增加^[10]。同时还发现,使蛋白合成有效增加所需的病毒剂量远远低于使细胞获得 100% 转导所需病毒的剂量,可能是由于被成功转染的细胞可以对它邻近的没有被转染的细胞发挥类似旁分泌的作用,这将使减少病毒的负荷并能获得满意的治疗效果成为可能,从而也避免了病毒潜在的毒性。

任何基因治疗的临床应用都必须致力于解决宿主对病毒载体的免疫反应这一关键性问题。虽然其它应用腺病毒介导对脊柱疾病的基因治疗实验表明,在基因表达过程中可以出现一过性的炎症反应。然而对于椎间盘,相对隔离的环境使得血循环中的抗体没有机会攻击靶细胞。当然,某种程度上载体的存在也刺激抗体的产生,但这些抗

第一作者简介:男 (1971-), 副主任医师,医学博士,研究方向:脊柱外科

电话: (0451) 55622355 E-mail: wangwenbozy@hotmail.com

体在数量上还无法对靶细胞发挥作用,也没有证据表明宿主在组织学上有免疫反应的发生,支持椎间盘是“免疫隔离区”的观点^[11]。椎间盘作为一个相对“免疫隔离区”的概念已经被研究了很多年,新的研究结果又进一步地揭示了这一现象可能存在的机制^[12,13]。“免疫隔离”的特性在视网膜膜和睾丸等其它组织已被明确证实是由于 Fas 配体(Fas ligand, FasL)的存在, Fas 配体主要是通过诱导有侵袭能力的 Fas 阳性的 T 细胞凋亡,从而限制免疫反应对靶细胞的攻击来发挥作用^[14,15]。Park 等^[12]在退变突出的椎间盘细胞中已经证实有 FasL 阳性染色的细胞存在, Takada^[13]在健康完整的椎间盘标本中也证实了 FasL 阳性细胞的存在,这些都支持是由于 Fas 配体的存在,从而使得椎间盘是一个相对的“免疫隔离区”的观点。另外,其它的载体因在椎间盘治疗中的潜力逐渐显现也正在被进一步地研究。腺相关病毒作为载体在离体间接和在体直接的实验中已经成功将标记基因转入兔椎间盘。尽管在转移基因的合成上不如腺病毒高效,但它仍然能够明显地增加蛋白的合成。它的另一个优点就是免疫原性比较小,从而使其更适合作为载体在今后来进行椎间盘转基因治疗的研究。

最近的研究表明,腺病毒介导的骨形态发生蛋白-2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)已明确地显示出能够按剂量依赖方式正向调节蛋白多糖的合成^[16]。直接向退变的兔椎间盘模型中注入 OP-1 可以明显恢复退变椎间盘的高度,并使其组织学和生化学方面的参数得到明显的改善^[17]。另外,多种生长因子的联合应用也会产生更好的效果,并且这些因子的生物学作用也不仅仅是简单地相加^[18]。生长因子对椎间盘细胞发挥作用主要是通过转录调节因子的激活,进而启动一系列相关的连续信号不断作用而产生的复合效果来实现的。

Sox9 基因是软骨形成过程中一个重要的转录调节因子。有研究表明,向退变的人椎间盘细胞成功转染腺病毒介导的 Sox9 cDNA 可以增加 II 型胶原的表达^[19]。也有资料表明, Sox9 基因的表达可以被 BMP-2 和 IL-1 有效地正、负向调控^[20,21]。进一步的研究显示, IL-1 调控 Sox9 基因的表达及其发挥的生物学作用主要是通过核转录因子 κ B(nuclear transcription factor kappa B, NF- κ B) 通路^[22]。另有报道称尼古丁可以直接作用于椎间盘细胞,抑制蛋白聚糖的合成及 II 型胶原基因的表达,它还可以明显地抑制 BMP-2 所引起的 Sox9 对细胞外基质的增量调节作用^[23]。

其它的软骨形成转录调节因子,如 c-Jun,作为一个能够再生修复退变的椎间盘很有希望的因子,目前也受到了一定的重视。Behrens 等^[24]的研究结果显示,敲除小鼠的 c-Jun,可以使其患上严重的中轴骨骼发育畸形和脊索细胞基因的突变,集中表现为细胞凋亡的增加,最终导致椎间盘细胞数目的急剧减少。骨诱导蛋白-1(LIM mineralization protein-1, LMP-1)是骨分化过程中一个必要的调节因子^[25],腺病毒介导的 LMP-1 cDNA 被转染至兔腰椎间盘细胞后,可以相应地使蛋白多糖的合成显著增加。而且,随着

LMP-1 蛋白的表达,被培养的椎间盘髓核细胞的表型也发生了相应的变化^[26]。LMP-1 已经得到了美国 FDA 的认证批准,成为可以临床应用的少数几种因子之一。另有研究表明,组织基质金属蛋白酶抑制因子-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1)可以作为一个有效的因子来对椎间盘退变的过程进行高效率的调节和修复^[27]。

在对调节因子研究的同时,学者们针对被转移的基因不能长期有效地得到表达也曾设想过对靶细胞进行重组质粒的重复注射,或者适当地辅以免疫抑制剂,使目的基因在靶细胞中得到长期有效的表达^[2]。有些学者也注意到最明显和最直接的基因治疗应该着重于对不正常或缺失的基因进行纠正或者代替,如在囊性纤维病中对跨膜电导调节基因缺失的治疗^[28]。有研究证实编码蛋白聚糖(aggrecan)和 IX 型胶原的基因更加适合作为向椎间盘中转移的候选基因,延缓或防止椎间盘退变的发生^[29]。随着高通量(如微点阵)技术的发展,越来越多的适合于椎间盘再生的候选基因也将被逐一揭示出来。Mwale 等^[30]发现,富含血小板的血浆(platelet-rich plasma, PRP)和连接蛋白的合成肽(synthetic peptide of link protein, Link-N)对椎间盘细胞都有明显的刺激蛋白多糖和胶原合成的作用。

4 未来的研究方向

利用转基因技术治疗椎间盘退变的实验室研究结果令人振奋,也展现了临床应用前景,但基因治疗要真正过渡到临床还有很多困难和需要解决的问题。学者们在对基因治疗椎间盘退变充分研究的基础上,大胆提出了椎间盘疾病未来的研究方向。Masuda 等^[31]提出将组织工程技术应用于椎间盘疾病的治疗,并已取得了一定的疗效。Ganey 等^[32]提出向退变的椎间盘中进行细胞移植,如自体的髓核细胞,来改善椎间盘退变后细胞数目的减少;Okuma 等^[33]也提出了通过同种异体细胞移植来治疗椎间盘退变;Sakai 等^[34]向兔的椎间盘退变模型中植入有生物学支架作用的干细胞,2 周后组织学上即可看出退变的椎间盘得到一定程度的修复。我们相信,随着各种途径不断被深入的研究和完善,开展椎间盘疾病基因治疗的条件将更加成熟。

5 参考文献

1. Diwan AD, Parvataneni HK, Khan SN, et al. Current concepts in intervertebral disc restoration [J]. Orthop Clin Nor Am, 2000, 31(3):453-464.
2. Kanaya K, Tsuchida Y, Inobe M, et al. Combined gene therapy with adenovirus vectors containing CTLA4Ig and CD40Ig prolongs survival of composite tissue allografts in rat model [J]. Transplantation, 2003, 75(3):275-281.
3. 金大地, 杨德鸿. 基因疗法治疗脊柱疾病——现状与展望 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2001, 11(1):9-11.
4. Thompson JP, Oegema TR Jr, Bradford D S. Stimulation of mature canine intervertebral disc by growth factors [J]. Spine, 1991, 16(3):253-260.

5. Maeda S, Kokubun S. Changes with age in proteoglycan synthesis in cells cultured in vitro from the inner and outer rabbit annulus fibrosus: responses to interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist protein[J]. Spine, 2000, 25(2):166-169.
6. 龙厚清, 李佛保, 胡有谷, 等. 腰椎间盘血管内皮生长因子的表达及其意义[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2002, 12(4):280-282.
7. Nishida K, Kang JD, J K, et al. Adenovirus-mediated gene transfer to nucleus pulposus cells: implication for the treatment of intervertebral disc degeneration [J]. Spine, 1998, 23(22):2437-2443.
8. Nishida K, Kang JD, Gilbertson LG, et al. Modulation of the biologic activity of the rabbit intervertebral disc by gene therapy: an in vivo study of adenovirus-mediated transfer of the human transforming growth factor beta-1 encoding gene[J]. Spine, 1999, 24(23):2419-2425.
9. Moon SH, Gilbertson LG, Nishida K, et al. Human intervertebral disc cells are genetically modifiable by adenovirus-mediated gene transfer: implications for the clinical manage of intervertebral disc disorders[J]. Spine, 2000, 25(20):2573-2579.
10. Wallach CJ, Gilbertson LG, Kang JD. Gene therapy applications for intervertebral disc degeneration [J]. Spine, 2003, 28(15S):S93-S98.
11. 詹子睿, 邵增务. 腰椎间盘退行性变基因治疗的研究进展[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2002, 12(3):227-229.
12. Park JB, Chang H, Kim KW. Expression of Fas ligand and apoptosis of disc cells herniated lumbar disc tissue[J]. Spine, 2001, 26(6):618-621.
13. Takada T, Nishida K, Doita M, et al. Fas ligand exists on intervertebral disc cells: a potential molecular mechanism for immune privilege of the disc [J]. Spine, 2002, 27(14):1526-1530.
14. Bellgrau D, Gold D, Selawry H, et al. A role of CD 95 ligand in preventing graft rejection [J]. Nature, 1995, 377(10):630-632.
15. Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, et al. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege [J]. Science, 1995, 270(11):1189-1192.
16. Wallach CJ, Sobajima S, Watanabe Y, et al. Gene transfer of the catabolic inhibitor TIMP-1 increases measured proteoglycans in cells from degenerated human intervertebral discs[J]. Spine, 2003, 28(20):2331-2337.
17. Masuda K, Imai Y, Okuma M, et al. Osteogenic Protein-1 (OP-1) Injection Into a Degenerated Disc Induced the Recovery of Disc Height in the Rabbit Annular Puncture Model[C]. International Society of the Study of Lumbar Spine. Porto Portugal:2004.
18. Walsh AJ, Bradford DS, Lotz JC. In vivo growth factor treatment of degenerated intervertebral discs[J]. Spine, 2004, 29(2):156-163.
19. Paul R, Haydon RC, Cheng H, et al. Potential use of Sox9 gene therapy for intervertebral degenerative disc disease[J]. Spine, 2003, 28(8):755-763.
20. Tim YS, Su KK, Li J, et al. The effect of bone morphogenetic protein-2 on rat intervertebral disc cells in vitro[J]. Spine, 2003, 28(16):1773-1780.
21. Lotz M. Cytokines in cartilage injury and repair[J]. Clin Orthop, 2001, 391(Suppl):S108-S115.
22. Sive JI, Baird P, Jeziorski M, et al. Expression of chondrocyte markers by cells of normal and degenerated intervertebral discs[J]. Mol Pathol, 2002, 55(2):91-97.
23. Kim KS, Yoon ST, Park JS, et al. Inhibition of proteoglycan and type II collagen synthesis of disc nucleus cells by nicotine[J]. J Neurosurg, 2003, 99(3):291-297.
24. Behrens A, Haigh J, Mechta-Grigoriou F, et al. Impaired intervertebral disc formation in the absence of Jun[J]. Development, 2003, 130(1):103-109.
25. Boden SD, Titus L, Hair G, et al. Lumbar spine fusion by local gene therapy with a cDNA encoding a novel osteoinductive protein (LMP-1)[J]. Spine, 1998, 23(23):2486-2492.
26. Yoon ST, Kim KS, Li J, et al. Gene Therapy with LMP-1 Increase Intervertebral Disc Cell Proteoglycan Production and Changes Cell Phenotype[C]. International Society for the Study of the Lumbar Spine. Cleveland, OH:2002.
27. Adam LS, Robert C, Lars G, et al. Gene therapy approaches for intervertebral disc degeneration [J]. Spine, 2004, 29(23):2770-2778.
28. Brennan AL, Geddes DM. Bringing new treatment to the bedside in cystic fibrosis[J]. Pediatr Pulmonol, 2004, 37(1):87-98.
29. Sobajima S, Kim JS, Gilbertson LG, et al. Gene therapy for degenerative disc disease[J]. Spine, 2004, 11(4):390-401.
30. Mwale F, Demers CN, Petit A, et al. A synthetic peptide of link protein stimulates the biosynthesis of collagens II, IX and proteoglycan by cells of the intervertebral disc [J]. J Cell Biochem, 2003, 88(6):1202-1213.
31. Masuda K, Sah RL, Hejna MJ, et al. A novel two-step method for the formation of tissue-engineered cartilage by mature bovine chondrocytes: the alginate-recovered-chondrocyte (ARC) method[J]. J Orthop Res, 2003, 21(1):139-148.
32. Ganey T, Libera J, Moos V, et al. Disc chondrocyte transplantation in a canine model: a treatment for degenerated or damaged intervertebral disc[J]. Spine, 2003, 28(23):2609-2620.
33. Okuma M, Mochida J, Nishimura K, et al. Reinsertion of stimulated nucleus pulposus cells retards intervertebral disc degeneration: an in vitro and in vivo experimental study [J]. J Orthop Res, 2000, 18(7):988-997.
34. Sakai D, Mochida J, Yamamoto Y, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells embedded in atelocollagen gel to the intervertebral disc: a potential therapeutic model for disc degeneration[J]. Biomaterials, 2003, 24(20):3531-3541.

(收稿日期:2004-06-03 修回日期:2005-02-16)

(本文编辑 卢庆霞)