

综述

椎间盘退变疾病的基因治疗研究进展

吴剑宏, 王德利, 辛洪奎, 阮狄克

(海军总医院骨科 100084 北京市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2010.02.14

中图分类号: R681.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2010)-02-0156-04

椎间盘退变是受诸如年龄、机械物理、细胞、基因以及生化因子等多种因素影响的复杂的病理生理改变^[1,2]。目前各种手术及保守治疗手段仅仅是针对椎间盘退变引起的各种临床症状的治疗,而不是从恢复椎间盘细胞功能的角度上去逆转椎间盘的退变。基因治疗作为一种新的治疗手段,由于能够改变和持续影响细胞的生理功能,而成为生物学治疗研究领域中的一个新热点,近年来,在这一领域已经取得了一些可喜的研究成果^[3]。笔者就椎间盘退变疾病的基因治疗研究现状及进展综述如下。

1 基因治疗的概念

基因治疗是通过转入一段核酸序列(目的基因)改变细胞成分使细胞表达特定的基因,从而达到治疗或者预防疾病的目的^[4]。通过改变细胞的遗传学性状,使细胞成为一个“蛋白加工厂”,不仅影响转基因细胞的代谢,还影响周围细胞的代谢^[5]。在对椎间盘退变进行临床基因治疗之前,必须做两步工作^[6]:(1)必须在体内外的实验中证实椎间盘组织对目的基因转染是易感的;(2)需证实治疗基因对椎间盘组织有确切的生物效应,并且在动物模型中得到验证。

2 目的基因的选择

综合近年的文献报道,目前研究较多的目的基因主要分为以下几类:(1)增加合成代谢的基因。转化生长因子- β (TGF- β)编码基因^[6]、转化生长因子的超家族成员骨形态生成蛋白(BMPs)家族编码基因^[7]、生长分化因子-5(GDF6)编码基因、胰岛素样生长因子(IGF-1)编码基因、表皮样生长因子(EGF)编码基因和成纤维生长因子(FGF)编码基因。目前研究较多的是骨形态发生蛋白2(BMP2)、骨形态发生蛋白7(BMP7)、GDF6及EGF。Li等^[8]研究了BMP-2对体外椎间盘细胞的影响,结果发现应用外源性的BMP-2可以明显增加体外鼠椎间盘细胞蛋白多糖和Ⅱ型胶原的含量。An等^[9]研究了BMP-7对活体兔椎间盘细胞的影响,结果发现BMP-7注射组能明显增加椎

间盘组织含水量及蛋白多糖含量,能较好地维持椎间盘的高度。Walsh等^[10]比较了GDF6、TGF- β 1、IGF-1、FGF等4种因子对鼠椎间盘退变模型的治疗作用,结果显示只有GDF6与对照组相比能增加椎间盘高度,而且还发现它能使内纤维环和移行带的细胞数目增加。Thompson等^[11]研究了体外条件下IGF-1、EGF及FGF等因子对成年狗椎间盘细胞蛋白多糖合成能力的影响,结果三种因子均有促进作用,但EGF的作用最明显。(2)减少分解代谢的基因。金属蛋白酶组织抑制剂(TIMPs)家族的编码基因如TIMP-1、TIMP-2可以减少基质的降解^[12]。白细胞介素1受体抗体(IL-1Ra)基因可阻止IL-1介导的椎间盘降解作用^[13]。(3)多效能基因。骨矿化蛋白1(LMP-1)编码基因^[14]能够刺激粒细胞和成骨细胞分泌多种BMPs,通过转染此目的基因可以影响多种生长因子而产生效应;Sox9编码基因^[15]是软骨形成和Ⅱ型胶原表达的转录因子,它在细胞当中的表达缺失有可能是导致椎间盘退变的原因之一。有研究^[16]发现,从颈椎间盘来源的髓核细胞的Sox9含量明显高于腰椎间盘细胞,这可能提示在颈椎间盘退变过程中Sox9的异常可能反应了一种特异的病理生理过程,使Sox9有可能成为治疗颈椎病独特的目的基因。(4)细胞永生生化基因。猿猴病毒40(SV40)和端粒酶逆转录酶(HTERT)基因,目前对SV40和HTERT基因都有成功构建髓核细胞永生化的报道^[17,18],为获得大规模的髓核细胞提供了更为理想、功能更加强大的种子细胞选择。

3 基因治疗的载体

理想的基因治疗载体能在不同组织高效传递基因,并且不具致病性,一个好的载体系统也是治疗成功与否的关键。载体系统可分为非病毒与病毒两种。非病毒载体主要包括以下几类^[19]:(1)裸质粒DNA载体,由于裸质粒载体缺乏靶向识别的特异性,使其很容易被核酸酶降解。为了提高质粒的转染效率,近年来发展了很多的物理方法,主要包括:电穿孔、基因枪、超声波、激光束以及利用高压原理转导DNA(包括粒子轰击、瞬间注射、机械按摩及动力进样等)。(2)阳离子聚合物,主要包括聚乙烯亚胺、聚左旋赖氨酸、富精氨酸蛋白、聚乙二醇以及阳离子共聚体等。(3)组蛋白类,基于抗体的靶向基因传递系统。(4)脂质体或脂质复合物,是目前使用最为普遍的非病毒载体,用于

第一作者简介:男(1978-),在读博士后,研究方向:脊柱外科
电话:(010)68780323 E-mail:wujianhong1978@hotmail.com
通讯作者:阮狄克 E-mail:ruandike@yahoo.com.cn

基因治疗的多为阳离子型脂质体。最近, Morrey 等^[20]对 17 种脂质相关非病毒载体作了筛选研究, 对它们在体外对椎间盘细胞的毒性、转染效率以及最适转染条件进行了观察, 得出结论, LT1(一种组蛋白和脂质的复合体, 目前已商品化)可能成为基因治疗椎间盘退变一种比较好的非病毒载体。非病毒载体的优点在于可以有效避免病毒基因转移的潜在危险, 缺点是转基因表达时效较短, 细胞毒性较高, 转染率较低, 在外源基因需要持续和高水平表达的疾病中缺陷尤其突出, 因此如今的大部分研究仍集中在病毒载体的研究上。

目前基于病毒的载体系统有多种, 主要是逆转录病毒(RV, 包括慢病毒载体)、腺病毒(AV)、腺相关病毒(AAV)、单纯疱疹病毒(HSV)及痘病毒。椎间盘细胞目前实验中应用较多的为腺病毒及腺相关病毒载体。有学者报道^[21]患者注射腺病毒后产生了严重的过敏反应, 此外, 腺病毒对中枢神经系统也有明显的毒性作用。腺相关病毒的免疫原性要低于腺病毒, 到目前为止, 在人类和哺乳动物当中, 还没有发现和腺相关病毒相关的疾病。Levicoff 等^[22]对腺病毒和腺相关病毒这两种载体对椎间盘基因治疗的安全性作了对比研究, 结果发现, 腺病毒转染组大多出现了明显的临床、组织学及病理学改变, 而腺相关病毒组则未出现明显的副反应。Liu 等^[23]以杆状病毒为载体, 建立了一种稳定有效的基因表达模型, 而且, 没有发现杆状病毒的细胞毒性作用。杆状病毒作为一种非复制的基因转染载体有一些特殊的优点: 适合大多数的哺乳动物细胞, 容易进行总量调节, 无细胞毒性作用, 这些优点使它成为基因治疗一个很有潜力的载体。Miyazaki 等^[24]成功构建了以慢病毒为载体转染 BMP-2 基因的兔骨髓间充质干细胞, 他将细胞与胶原支架结合, 结果胶原支架在 8 周时消失了, 成功诱导了 L4~L5 横突间的连接骨形成, 在研究中, 并没有发现严重的副反应。慢病毒是以 HIV-1(人类免疫缺陷 I 型病毒)为基础发展起来的基因治疗载体, 区别于一般的逆转录病毒载体, 其优点在于能感染分裂细胞及非分裂细胞, 同时保留了整合到宿主染色体上的特点, 可转移较大的基因片段、目的基因表达时间长、不易诱发宿主免疫反应, 也是近年来研究较多的一种病毒载体^[25]。

4 基因治疗的方式

基因治疗要发挥治疗作用必须通过靶细胞来实现。按照给药途径不同, 可将基因治疗分为两种方式: (1)直接基因疗法, 把带有目的基因的载体直接转导至靶细胞内, 其优点在于转移途径操作简便, 容易推广, 但存在疗效持续时间短, 免疫排斥及安全性等一系列问题。(2)间接基因疗法, 将靶细胞取出进行体外培养, 体外基因转导后, 再植入靶组织中, 其优点在于转移途径比较经典、安全, 而且效果较易控制, 但是步骤多、技术复杂、操作难度比较大。

据文献报道, 在椎间盘退变的基因治疗研究领域, 应用较多的还是间接基因疗法。对退变椎间盘进行基因治

疗, 必须要有一定数量的椎间盘细胞接受并且表达治疗基因, 促进椎间盘细胞分泌细胞外基质, 从而阻止或者延缓椎间盘的退变进程。Kuh 等^[26]使用腺病毒载体, 将 LMP-1 基因转入兔纤维环细胞及关节软骨细胞, 结果明显刺激了细胞基质合成及 LMP-1、BMP-2、BMP-7 等成分的增加, 得出结论, 经体外 LMP-1 基因修饰的纤维环及关节软骨细胞可能会成为椎间盘退变较好的治疗细胞来源。最近, Moon 等^[27]用基因的“鸡尾酒”疗法将 TGF- β 1、IGF-1 和 BMP-2 三种基因通过腺病毒载体转染入人椎间盘细胞, 结果发现, 这种基因的“鸡尾酒”疗法能在刺激椎间盘细胞最大限度分泌基质的同时, 减少病毒载体的用量, 减少免疫以及局部的毒性反应, 为椎间盘退变的基因治疗提供了一种新的思路。

近年来, 髓核细胞的永生化由于能提供大量的种子细胞来源而成为了基因治疗研究领域一个新的热点。Sakai 等^[17]使用腺病毒为载体转染猿猴病毒 40(SV40)到人的椎间盘髓核细胞, 结果成功建立了一种人的髓核细胞永生化体系, 细胞在体外培养繁殖 5 个月, 还保持了髓核细胞的表型和特征, 并且在注入兔椎间盘体内 6 个月, 虽然存在核型的不稳但是没有出现致瘤作用。端粒酶逆转录酶基因(hTERT)是另一个研究较多的细胞永生化基因。Toouli 等^[28]对 SV40 和 hTERT 两种基因建立的永生化乳腺上皮细胞进行了比较, 结果发现, SV40-永生化细胞的核型不稳增加了, 而且失去了对 DNA 的正常损伤反应, 而 hTERT 的永生化细胞能够较好地保留正常细胞的功能。最近, Chung 等^[18]使用阳离子脂质载体将 hTERT 基因转入羊椎间盘髓核细胞, 结果到培养的第 493 天, 转染 hTERT 基因的髓核细胞仍保持了较好的髓核细胞表型, 并且 hTERT 转染的髓核细胞保留了 P53 基因的表达和正常的 DNA 损伤反应。成功的建立了转染 hTERT 基因的永生化髓核细胞系, 为椎间盘退变疾病的生物治疗提供了一个很有潜力的细胞来源。

5 基因治疗的调控

对于椎间盘退变疾病的基因治疗来说, 合适的剂量及治疗部位可产生积极的治疗效果, 但是, 如果将治疗基因注入错误的部位, 或发生渗漏, 或剂量有误都将会导致破坏性的副作用^[29]。因而, 寻找一种理想的能在时间和空间上对基因表达进行控制的调控系统成为基因治疗中的一个重要环节。为此, 研究者们作了很多的尝试, 早期研究者尝试应用热休克蛋白、金属硫蛋白、类固醇类物质作为调节因子^[30-32], 尽管取得了一定的调节效果, 但这些调节系统都有比较多的局限性: 包括局部的泄漏、诱导剂的毒性作用、表达水平的低下及作用的非特异性等。Vadalà 等^[33]报道了一种通过四环素调节控制的基因治疗调控系统, 它可以关闭转染基因的表达, 并且在去除四环素后, 蛋白的表达可以得到恢复, 因而, 当治疗基因注入到错误的部位时, 可以用这个控制系统来关闭基因的表达, 以避免毒性

反应。

RNAi 干扰技术作为一种新的基因阻断技术,具有特异、有效的基因沉默效应,能够简单、高效地下调特定基因的表达,适用于所有生物^[34]。最近, Suzuki 等^[35]利用此项技术对 SD 鼠椎间盘髓核细胞 Fas 蛋白配体的基因表达进行了研究,结果发现,在体内 RNAi 干扰效应能够持续 24 周,进一步证实了这项技术在活体内使用的有效性,提示可以使用此项技术来下调导致椎间盘退变的有害基因的表达,从而使之成为治疗椎间盘退变一种有效的局部基因治疗手段。

6 基因治疗存在的问题及发展方向

目前椎间盘退变的基因治疗研究大多集中在使用单一目的基因通过病毒或非病毒载体转入椎间盘细胞以发挥治疗作用,它也有明显的不足:(1)目的基因的转染是否带来一些长期的不良反应,如 SV40 和 hTERT 基因转染入活体后,是否会引起长期的一个致肿瘤作用;正常髓核细胞的生长代谢是受多种基因调控的,单一的基因治疗是否能达到最佳的治疗效果,是否需要进行多基因的联合治疗以及如何联合基因的筛选。(2)使用大剂量的病毒载体来传导单一基因对全身或局部具有一定毒性作用、免疫反应以及病毒载体自身的复制都可能带来潜在的危险;非病毒载体转基因表达时效较短,转染率较低,是否能满足椎间盘退变这种慢性疾病治疗的需要。(3)在椎间盘退变的何种阶段,以及采用多大剂量的基因改造细胞或者目的基因进行治疗,才能取得最佳的治疗效果。(4)由于针刺椎间盘本身就能造成椎间盘的退变,采用针刺的方法进行细胞或治疗基因的注射是否合适,能否找到一种更好的治疗实施方式,而且椎间盘本身的营养供应条件较差,没有血供,退变椎间盘的微环境就更差,经基因改造后的治疗细胞能否在退变椎间盘中存活,以及存活时间的长短都将影响到基因治疗的效果。这些问题都有待于进一步的研究。

尽管存在着一些争议,基因治疗作为一种新的治疗手段,在椎间盘退变的治疗研究领域,已经初步取得了一些可喜的研究成果,随着分子生物学技术的发展,进一步从基因水平上认识椎间盘退变的生物学机制;寻找最合适的治疗基因或者最佳的基因组合;构建更加安全有效的转基因载体;完善基因治疗中的表达调控;建立稳定的理想的动物模型;筛选更加理想的基因治疗细胞;转基因技术与组织工程技术的结合;随着这些研究的深入,我们相信,基因疗法将成为一种极具价值的治疗方法,为椎间盘退变疾病的治疗开辟新的途径。

7 参考文献

1. Wang DL, Jiang SD, Dai LY. Biologic response of the intervertebral disc to static and dynamic compression in vitro [J]. Spine, 2007, 32(23): 2521-2528.
2. Zhang YJ, Uitto J, Thonar E. Cell based gene therapy for the degenerating intervertebral disc [J]. American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation, 2006, 85(3): 248-249.
3. Wang JC, Kim JS. Biological or genetic modulation of intervertebral disk degeneration [J]. Current Orthopaedic Practice, 2008, 19(4): 366-371.
4. Crystal RG. Transfer of genes to human: early lessons and obstacles to success [J]. Science, 1995, 270(5235): 404-410.
5. Evans CH, Robbins PD. Possible orthopaedic applications of gene therapy [J]. J Bone Joint Surg Am, 1995, 77(7): 1103-1113.
6. 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.
7. Zhang Y, Li Z, Thonar EJ, et al. Transduced bovine articular chondrocytes affect the metabolism of cocultured nucleus pulposus cells in vitro: implications for chondrocyte transplantation into the intervertebral disc [J]. Spine, 2005, 30(23): 2601-2607.
8. Li J, Yoon ST, Hutton WC. Effect of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) on matrix production, other BMPs, and BMP receptors in rat intervertebral disc cells [J]. J Spinal Disord Tech, 2004, 17(5): 423-428.
9. An HS, Takegami K, Kamada H, et al. Intradiscal administration of osteogenic protein-1 increases intervertebral disc height and proteoglycan content in the nucleus pulposus in normal adolescent rabbits [J]. Spine, 2005, 30(1): 25-32.
10. Walsh AJ, Bradford DS, Lotz JC. In vivo growth factor treatment of degenerated intervertebral discs [J]. Spine, 2004, 29(2): 156-163.
11. Thompson JP, Oegema TR Jr, Bradford DS. Stimulation of mature canine intervertebral disc by growth factors [J]. Spine, 1991, 16(3): 253-260.
12. 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.
13. Le Maitre CL, Hoyland JA, Freemont AJ. Interleukin-1 receptor antagonist delivered directly and by gene therapy inhibits matrix degradation in the intact degenerate human intervertebral disc: an in situ zymographic and gene therapy study [J]. Arthritis Res Ther, 2007, 9(4): R83.
14. Yoon ST, Park JS, Kim KS, et al. ISSLS prize winner: LMP-1 upregulates intervertebral disc cell production of proteoglycans and BMPs in vitro and in vivo [J]. Spine, 2004, 29(23): 2603-2611.
15. 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.
16. Gruber HE, Norton HJ, Ingram JA, et al. The sox9 transcrip-

- tion factor in the human disc: decreased immunolocalization with age and disc degeneration [J]. Spine, 2005, 30 (6): 625-630.
17. Sakai D, Mochida J, Yamamoto Y, et al. Immortalization of human nucleus pulposus cells by a recombinant sv40 adenovirus vector [J]. Spine, 2004, 29 (14): 1515-1523.
18. Chung SA, Wei AQ, Connor DE, et al. Nucleus pulposus cellular longevity by telomerase gene therapy [J]. Spine, 2007, 32 (11): 1188-1196.
19. Kazunari T, Kazunori K, Takuro N. Non-viral Gene Therapy [M]. Tokyo: Springer-Verlag, 2005: 3-11.
20. Morrey ME, Anderson PA, Chambers G, et al. Optimizing non-viral-mediated transfection of human intervertebral disc chondrocytes [J]. Spine J, 2008, 8 (5): 796-803.
21. Lattermann C, Oxner WM, Xiao X, et al. The adeno associated viral vector as a strategy for intradiscal gene transfer in immune competent and pre-exposed rabbits [J]. Spine, 2005, 30 (5): 497-504.
22. Levicoff EA, Kim JS, Sobajima S, et al. Safety assessment of intradiscal gene therapy II [J]. Spine, 2008, 33 (14): 1509-1516.
23. Liu X, Li K, Song J, et al. Efficient and stable gene expression in rabbit intervertebral disc cells transduced with a recombinant baculovirus vector [J]. Spine, 2006, 31 (7): 732-735.
24. Miyazaki M, Sugiyama O, Tow B, et al. The effects of lentiviral gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing bone marrow cells on spinal fusion in rats [J]. J Spinal Disord Tech, 2008, 21 (5): 372-379.
25. Lever AM, Kaye JF, McCann E, et al. Lentivirus vectors for gene therapy [J]. Biochem Soc Trans, 1999, 27 (6): 841-847.
26. Kuh SU, Zhu Y, Li J, et al. The AdLMP-1 transfection in two different cells: AF cells, chondrocytes as potential cell therapy candidates for disc degeneration [J]. Acta Neurochir (Wien), 2008, 150 (8): 803-810.
27. Moon SH, Nishida K, Gilbertson LG, et al. Biologic response of human intervertebral disc cells to gene therapy cocktail [J]. Spine, 2008, 33 (17): 1850-1855.
28. Toouli CD, Hushcha LI, Neumann AA, et al. Comparison of human mammary epithelial cells immortalized by simian virus 40 T-antigen or by the telomerase catalytic subunit [J]. Oncogene, 2002, 21 (1): 128-139.
29. Wallach CJ, Kim JS, Sobajima S, et al. Safety assessment of intradiscal gene transfer: a pilot study [J]. Spine J, 2006, 6 (2): 107-112.
30. Schweinfest CW, Graber MW, Henderson KW, et al. Cloning and sequence analysis of hsp89alpha delta N, a new member of the hsp90 gene family [J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1398 (1): 18-24.
31. Hu MC, Davidson NA. A combination of derepression of the lac operator-repressor system with positive induction by glucocorticoid and metal ions provides a high-level-inducible gene expression system based on the human metallothionein-II A promoter [J]. Mol Cell Biol, 1990, 10 (12): 6141-6151.
32. Ko MS, Takahashi N, Sugiyama N, et al. An auto-inducible vector conferring high glucocorticoid inducibility upon stable transformant cells [J]. Gene, 1989, 84 (2): 383-389.
33. Vadalà G, Sowa GA, Smith L, et al. Regulation of transgene expression using an inducible system for improved safety of intervertebral disc gene therapy [J]. Spine, 2007, 32 (13): 1381-1387.
34. Mahmood-ur-Rahman, Ali I, Husnain T, et al. RNA interference: the story of gene silencing in plants and humans [J]. Biotechnol Adv, 2008, 26 (3): 202-209.
35. Suzuki T, Nishida K, Kakutani K, et al. Sustained long-term RNA interference in nucleus pulposus cells in vivo mediated by unmodified small interfering RNA [J]. Eur Spine J, 2009, 18 (2): 263-270.

(收稿日期: 2009-06-30 修回日期: 2009-07-31)

(本文编辑 彭向峰)

读者·作者·编者

规范作者署名及第一作者单位

作者署名是对文责自负的一种承诺,是一件很严肃的事情,应认真对待。科技论文的作者一般不超过 6 位。每位作者应该是:①论文学术思想的构思者或设计者;②实验数据的采集并能给予解释者;③能对编辑部提出的审改意见进行解释者;④最终同意该文发表者。对参加部分工作的合作者,接受委托进行某项工作的辅助人员以及组织指导、提供资助者,可用简短的文字致谢,并征得被致谢者的同意。每篇论文的作者及排序应在投稿时确定,在编排过程中不应再作改动。如有改动,必须附有全体作者签名的正式说明。作者中如有外籍作者,应有其本人同意的证明信或授权书。

第一作者现单位与论文资料来源单位不一致时,应以资料来源单位作为发表单位,在第一作者简介中说明目前所在单位即可;若要以现单位为发表单位,则必须由资料来源单位出具授权书,同意第一作者使用其资料并且以第一作者目前单位发表该文章。