

- monoclonal antibody administration down-regulated CD25 expression without eliminating the neogenetic functional regulatory T cells in kidney transplantation[J]. Clin Exp Immunol, 2009, 155(3): 496-503.
- [20] Fangmann J, Arns W, Marti HP, et al. Impact of daclizumab, low-dose cyclosporine, mycophenolate mofetil and steroids on renal function after kidney transplantation [J]. Nephrol Dial Transplant, 2010, 25(1): 283-292.
- [21] Gentil MA, Osuna A, Capdevilla L, et al. Daclizumab in combination with mycophenolate mofetil and a late introduction of Tacrolimus at low doses, as a therapeutic approach in the elderly renal transplant donor-recipients pairs in kidney transplant [J]. Nefrologia, 2008, 28(3): 287-292.
- [22] McKeage K, McCormack PL. Basiliximab: a review of its use as induction therapy in renal transplantation [J]. Bio-Drugs, 2010, 24(1): 55-76.
- [23] Kandus A, Arnol M, Omahen K, et al. Basiliximab versus daclizumab combined with triple immunosuppression in deceased donor renal transplantation; a prospective, randomized study [J]. Transplantation, 2010, 89(8): 1022-1027.
- [24] Scherer MN, Banas B, Mantouvalou K, et al. Current concepts and perspectives of immunosuppression in organ transplantation [J]. Langenbecks Arch Surg, 2007, 392(5): 511-523.
- [25] Yeung MY, Sayegh MH. Regulatory T cells in transplantation: what we know and what we do not know [J]. Transplant Proc, 2009, 41(6 Suppl): S21-26.
- [26] Taflin C, Nochy D, Hill G, et al. Regulatory T cells in kidney allograft infiltrates correlate with initial inflammation and graft function [J]. Transplantation, 2010, 89(2): 194-199.
- [27] Fandrich F. Induction of tolerance in clinical organ transplantation [J]. Nephrol Dial Transplant, 2006, 21(5): 1170-1173.
- [28] Xia G, Shah M, Luo X. Prevention of allograft rejection by amplification of Foxp3(+)CD4(+)CD25(+) regulatory T cells [J]. Transl Res, 2009, 153(2): 60-70.
- [29] Joffre O, Santolaria T, Calise D, et al. Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T lymphocytes [J]. Nat Med, 2008, 14(1): 88-92.
- [30] Eksler B, Rigotti P, Gridelli B, et al. Xenotransplantation of solid organs in the pig-to-primate model [J]. Transpl Immunol, 2009, 21(2): 87-92.
- [31] O' Callaghan CA. Kidney transplantation—the long term view [J]. QJM, 2008, 101(12): 985-986.

(收稿日期: 2011-05-09 修回日期: 2011-07-12)

· 综 述 ·

基因治疗椎间盘退变的研究进展

张 勇 综述, 伍光辉 审校

(泸州医学院附属中医院骨科, 四川泸州 646000)

关键词: 基因疗法; 椎间盘; 细胞因子类

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2011.35.043

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)35-3629-03

椎间盘退变可引起椎间盘突出、脊柱不稳、脊髓神经根病等疾病, 给患者工作和生活带来了巨大的痛苦和不便。但是, 目前的治疗方法, 无论手术还是非手术均无助于椎间盘退变后病理状态的改变, 疗效和并发症存在很多问题。随着椎间盘生理、生化研究不断深入, 基因治疗疾病范畴不断扩大, 采用基因治疗阻止或延缓椎间盘退变已具有广阔的前景。现将其进展综述如下。

1 椎间盘组成

椎间盘由髓核、纤维环、上下软骨终板构成。主要成分是水、胶原和蛋白多糖等细胞外基质(ECM)。水分约占 80%, 正常情况下纤维环中含有 60% II 型胶原和 40% I 型胶原。I 型胶原抗张力, 主要分布在纤维环外层; II 型胶原抗压力, 主要分布在髓核内。蛋白多糖是椎间盘主要的大分子结构, 包括硫酸软骨素、硫酸角质素和透明软骨素等, 主要作用是维持椎间盘水分、电离子浓度、渗透压, 正常代谢和均匀分布应力。椎间盘的大部分结构无直接血供, 盘内细胞只能靠溶质弥散获取营养。由于无直接血供, 这不利于它损伤修复, 但在封闭相对缺血的环境下, 却可避免发生自身免疫反应。正是椎间盘的结构

特殊, 使得基因疗法的应用比其他组织更具优势。

2 参与椎间盘退变的炎症介质和细胞因子

大量研究表明, 炎症介质和细胞因子是引起椎间盘退变的重要原因。有学者发现在退变椎间盘组织中白介素(IL)-1 α 具有较高活性, 提示 IL-1 α 可能参与了椎间盘退变^[1]。也有研究发现, IL-1 β 在退变椎间盘中表达高于正常, 它通过刺激核因子- κ B(NF- κ B)抑制转录因子 SOX-9 及 II 型胶原的表达, 促进椎间盘退变进一步发展^[2-4]。Kohyama 等^[5]观察到退变椎间盘中含有高活性的一氧化氮(NO), 并证实 NO 能诱导细胞凋亡, 使细胞数目减少, ECM 合成下降, 说明 NO 在椎间盘退变中起作用。Miyamoto 等^[6]对 15 个退变椎间盘中环氧化酶-2(COX-2)的基因表达进行研究, 结果显示 COX-2 基因的表达仅出现于退变组, 表明 COX-2 可能参与了椎间盘退变。基质金属蛋白酶(MMPs)对 ECM 的降解具有促进作用, 是调整基质动态平衡的重要酶系^[7-8]。在 MMPs 家族中, 以 MMP-3 在 ECM 降解中的作用最重要, 最新发现 MMP-10、MMP-28 对 ECM 降解也发挥了非常重要的作用^[9-10]。而 Gruber 等^[11]发现婴幼儿的椎间盘中, MMP-19 均匀分布于外部纤维环, 而成

人无论内部还是外部纤维环均少有 MMP-19 基因表达。已知 MMP-19 可调节胰岛素样生长因子介导的细胞增殖,因此提示 MMP-19 可能与退变椎间盘细胞的减少有关。其他研究者相继发现退变椎间盘中 MMP-1、MMP-7、MMP-9 及 MMP-13 基因的 mRNA 表达增高,表明 MMP 基因表达异常可能是椎间盘退变的重要因素^[12-13]。Sive 等^[14]在正常和退变的椎间盘髓核细胞中均观察到有 II 型胶原和转录因子萨班斯-9(SOX-9)基因表达,但退变组明显低于正常组,提示在退变的椎间盘组织中,SOX-9 基因可能受到了抑制,不能发挥生物学作用,阻止了退变椎间盘组织再生及修复。有学者还观察到 SOX-9 基因在新生儿椎间盘中均匀表达,随年龄增长和椎间盘退变而表达减少,提示 SOX-9 基因表达的降低,可能对退变引起的 II 型胶原减少起了一定作用^[15]。Wallach 等^[16]报道在退变椎间盘中脂肪酸合成酶(Fas)蛋白与细胞凋亡有关。有学者观察到兔退变椎间盘中 Fas 基因表达明显高于正常组^[13]。Park 等^[17]也观察到椎间盘细胞在长期压力下凋亡率升高,且髓核中有 Fas 配体阳性细胞存在。提示 Fas 和 Fas 配体引起的细胞过度凋亡,可能是椎间盘退变发生及进展的原因之一。

3 基因治疗目的基因选择

基因治疗概念最早于 1972 年提出。针对椎间盘退变,有学者进行转基因治疗,使外源基因能有效表达,发挥生物学作用,促进髓核细胞合成代谢功能增强,使蛋白多糖含量增加。Thompson 等^[18]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。结果显示不同生长因子可以作用不同椎间盘区域或细胞,促进细胞增殖和基质合成。Maeda 和 Kokubun^[19]证实 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 IL-1 受体抑制剂(IL-Ira)则有抑制 IL-1 的作用。从而为椎间盘基因治疗目的基因选择提供两种途径:即细胞因子和致炎因子拮抗剂。前者主要为生长转移因子(TGF- β)、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)、成胃蛋白-1(OP-1)等;后者包括 IL-Ira、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)拮抗剂、MMPs 抑制剂等。

4 基因治疗载体选择

目前介导目的基因转入的载体有病毒和非病毒两类。前者又分可整合入基因组的逆转入病毒型,如逆转入病毒、慢病毒等;不整合入基因组的质粒型,如疱疹病毒、腺病毒、腺相关病毒等。逆转入病毒型一般转染分裂细胞,而椎间盘细胞为非分裂细胞,故目前应用较多的为质粒型载体,如腺病毒。但用腺病毒作为载体的主要缺点是会引发机体免疫反应,且这种反应可能会很强烈甚至致命。Lattermann 等^[20]用腺相关病毒代替腺病毒进行椎间盘细胞的转染,发现它能转染人体外和兔体内的椎间盘细胞。虽然它也会引起体液免疫反应,但没有出现腺病毒中那样明显的细胞免疫反应,且可见转化基因的明显表达,这表明它可作为将来病毒载体中一种相对安全和有价值的选择。

5 基因治疗靶细胞选择

目前基因治疗椎间盘退变的靶细胞已有两种尝试:(1)椎间盘终板软骨细胞;(2)椎间盘髓核细胞。而当前主要的选择是终板软骨细胞,原因如下:(1)终板软骨细胞较髓核细胞更易体外培养;(2)终板软骨细胞与椎间盘纤维环和髓核细胞 ECM 上虽然存在差异,但它们在解剖上是连续的,相互之间有迁移的可能性;(3)终板软骨细胞产生的蛋白可能弥漫整个椎间盘;(4)应用椎间盘镜从退变的椎间盘中获取有生存潜力的终板软

骨细胞进行体外培养在临床上没有困难;(5)退变的椎间盘髓核细胞的体外培养存在困难,再植成活的概率小。

6 基因治疗的调控

基因治疗过程中,所表达的目的基因产物总量需要控制。如果持续表达,则可造成表达产物过量而引起不良反应。鉴于此,研究人员已经开始研究基因表达调控系统,目前应用得较多的是四环素调控系统("Tet-on"系统),它是在靶细胞内的目的基因连接一个配体活化启动区作为基因开关,应用四环素衍生物作为配体来激活转基因的表达,把该系统整合到腺病毒载体,使其在体内、外的调控效率和反应速度都有显著的改善^[21]。Ueblacker 等^[22]已用此系统成功对新西兰大白兔膝关节软骨细胞中标记基因的表达进行调控。虽然它没有直接应用于椎间盘,但研究表明这个调控系统在椎间盘退变基因治疗领域具有广阔的前景。

7 问题与展望

从 1997 年 Wehling 等^[23]首先提出基因治疗椎间盘退变的设想开始,经过十多年的发展,这方面的研究已取得了令人鼓舞的成果。不过,下面还有几个问题亟待解决:(1)椎间盘退变的分子机制尚待进一步阐明,以便为目的基因的筛选及联合应用提供更可靠的理论基础。Sobajima 等^[24]运用实时逆转录-聚合酶链反应(real-time RT-PCR)对退变兔椎间盘模型中多个因子和基质成分在不同退变阶段中的表达进行了定量的比较分析,为明确退变中多种因素的相互作用作了进一步探索。(2)建立更具可靠性和可重复性的椎间盘退变动物模型,为基因治疗的研究提供必需的实验基础。(3)椎间盘基因治疗的安全性和不良反应还研究不足。还需开发更安全、有效的转基因载体系统,明确治疗所需的转基因载体剂量。(4)在寻找更多有治疗潜力的生长因子的同时,尚需进一步阐明这些因子的作用机制。(5)转基因的表达调控一直是研究的难点,如何使目的基因适时、适量的表达是基因治疗的重要问题。Leo 等^[25]的研究已在这方面作了新的尝试。(6)尽管组织工程在椎间盘领域研究相对较少、较浅,但在椎间盘退变中、晚期,与基因治疗联合应用是促进退变椎间盘再生与修复有潜力的新的治疗思路^[26]。(7)改进基因导入方法。努力使在体直接转染方法不断成熟,从而更加有效避免基因治疗中可能产生的不良反应^[27]。由此看来,基因治疗要从实验室真正走入临床应用还有许多艰难的工作要做,今后的努力方向不仅要对现有模式作进一步的深入研究,还要勇于拓展新的思路。当然,也应坚信,随着分子技术的发展和上述各项研究的深入、完善,基因治疗必将成为将来椎间盘退变性疾病治疗的重要手段。

参考文献:

- [1] Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of human intervertebral disc degeneration[J]. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7(4): 732-745.
- [2] Le Maitre CL, Hoyland JA, Freemont AJ. Catabolic cytokine expression in degenerate and herniated human intervertebral discs: IL-1 β and TNF α expression profile [J]. *Arthritis Res Ther*, 2007, 9(4): R77.
- [3] 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.
- [4] Yu ZG, Xu N, Wang WB, et al. Interleukin-1 inhibits Sox9 and collagen type II expression via nuclear factor-kappaB in the cultured human intervertebral disc cells[J]. *Chin Med J*, 2009, 122(20):2483-2488.
- [5] Kohyama K, Saura R, Doita M, et al. Intervertebral disc cell apoptosis by nitric oxide; biological understanding of intervertebral disc degeneration [J]. *Kobe J Med Sci*, 2000, 46(6):283-295.
- [6] Miyamoto H, Saura R, Doita M, et al. The role of cyclooxygenase-2 in lumbar disc herniation[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2002, 27(22):2477-2483.
- [7] Le Maitre CL, Pockert A, Buttle DJ, et al. Matrix synthesis and degradation in human intervertebral disc degeneration[J]. *Biochem Soc Trans*, 2007, 35(Pt 4):652-655.
- [8] Bachmeier BE, Nerlich A, Mittermaier N, et al. Matrix metalloproteinase expression levels suggest distinct enzyme roles during lumbar disc herniation and degeneration[J]. *Eur Spine J*, 2009, 18(11):1573-1586.
- [9] Richardson SM, Doyle P, Minogue BM, et al. Increased expression of matrix metalloproteinase-10, nerve growth factor and substance P in the painful degenerate intervertebral disc[J]. *Arthritis Res Ther*, 2009, 11(4):R126.
- [10] Gruber HE, Ingram JA, Hoelscher GL, et al. Matrix metalloproteinase 28, a novel matrix metalloproteinase, is constitutively expressed in human intervertebral disc tissue and is present in matrix of more degenerated discs [J]. *Arthritis Res Ther*, 2009, 11(6):R184.
- [11] Gruber HE, Ingram JA, Hanley EN Jr. Immunolocalization of MMP-19 in the human intervertebral disc; implications for disc aging and degeneration[J]. *Biotech Histochem*, 2005, 80(3/4):157-162.
- [12] Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. Human disc degeneration is associated with increased MMP 7 expression[J]. *Biotech Histochem*, 2006, 81(4/6):125-131.
- [13] Anderson DG, Izzo MW, Hall DJ, et al. Comparative gene expression profiling of normal and degenerative discs; analysis of a rabbit annular laceration model [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2002, 27(12):1291-1296.
- [14] Sive JI, Baird P, Jeziorski M, et al. Expression of chondrocyte markers by cells of normal and degenerate intervertebral discs[J]. *Mol Pathol*, 2002, 55(2):91-97.
- [15] Gruber HE, Norton HJ, Ingram JA, et al. The SOX9 transcription factor in the human disc; decreased immunolocalization with age and disc degeneration[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2005, 30(6):625-630.
- [16] Wallach CJ, Gilbertson LG, Kang JD. Gene therapy applications for intervertebral disc degeneration [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2003, 28(15 Suppl):S93-98.
- [17] Park JB, Lee JK, Park SJ, et al. Mitochondrial involvement in fas-mediated apoptosis of human lumbar disc cells[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2005, 87(6):1338-1342.
- [18] Thompson JP, Oegema TR Jr, Bradford DS. Stimulation of mature canine intervertebral disc by growth factors [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1991, 16(3):253-260.
- [19] 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 (Phila Pa 1976)*, 2000, 25(2):166-169.
- [20] 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.
- [21] Mizuguchi H, Xu ZL, Sakurai F, et al. Tight positive regulation of transgene expression by a single adenovirus vector containing the rtTA and tTS expression cassettes in separate genome regions [J]. *Hum Gene Ther*, 2003, 14(13):1265-1277.
- [22] Ueblacker P, Wagner B, Krüger A, et al. Inducible nonviral gene expression in the treatment of osteochondral defects [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2004, 12(9):711-719.
- [23] Wehling P, Schulitz KP, Robbins PD, et al. Transfer of genes to chondrocytic cells of the lumbar spine. Proposal for a treatment strategy of spinal disorders by local gene therapy [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1997, 22(10):1092-1097.
- [24] Sobajima S, Shimer AL, Chadderdon RC, et al. Quantitative analysis of gene expression in a rabbit model of intervertebral disc degeneration by real-time polymerase chain reaction [J]. *Spine J*, 2005, 5(1):14-23.
- [25] Leo BM, Li X, Balian G, et al. In vivo bioluminescent imaging of virus-mediated gene transfer and transduced cell transplantation in the intervertebral disc [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2004, 29(8):838-844.
- [26] Anderson DG, Albert TJ, Fraser JK, et al. Cellular therapy for disc degeneration [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2005, 30(17 Suppl):S14-19.
- [27] 黄宗强, 刘尚礼, 郑召民. 椎间盘退变的分子生物学研究进展 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2003, 11(1):55-56.

(收稿日期:2011-05-09 修回日期:2011-07-16)

《重庆医学》——中文核心期刊, 欢迎投稿, 欢迎订阅!