

脊髓损伤基因治疗的研究进展

Advances of gene therapy for spinal cord injury

岑景盛¹, 万 勇¹, 邓宇斌²

(1 中山大学附属第一医院脊柱外科; 2 中山大学附属第一医院转化医学中心 510080 广州市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2012.12.13

中图分类号: R683.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2012)-12-1117-04

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)传统的治疗手段主要针对 SCI 的继发性损害进行干预,但效果并不能令人满意^[1]。SCI 后修复困难的关键在于抑制轴突生长的因子持续存在及神经营养因子的缺乏共同构成了不利于神经再生的微环境。近年来大量研究利用基因治疗的方法上调、沉默或拮抗特定靶基因的功能,致力于提高轴突的再生能力及改造局部的抑制性微环境,在动物实验中均能观察到一定程度的功能恢复^[2,3]。笔者就脊髓损伤基因治疗的研究进展综述如下。

1 基因治疗的载体

在 SCI 的基因治疗中常利用携带治疗基因的载体于体内转染目的细胞,或于体外转染后移植或回输体内,以实现特定基因的表达上调、沉默或功能拮抗,从而达到治疗目的。载体主要分为病毒及非病毒载体,非病毒载体包括脂质体、高分子聚合物、多肽、纳米颗粒等^[4],同时也可用电击、超声等物理方法实现目的基因的递送,但在转染率和表达时限方面较病毒载体逊色^[5]。相对而言,基因治疗使用病毒载体的好处在于一旦转移的基因整合到宿主基因组,其介导的基因表达或沉默可长期且稳定的存在,以适应神经修复漫长的过程。这是相对于传统药物输注和非病毒载体介导的基因转移方法不可比拟的优势^[6]。目前常用的病毒载体包括腺病毒(adenovirus, AdV)、腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)、单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)、逆转录病毒(retrovirus, ReV)和慢病毒(lentivirus, LV)。AAV 和 LV 能感染分裂期和非分裂期细胞,有一定的载体容量,是近年用于研究 SCI 治疗应用较多的载体^[6,7]。

2 上调神经营养因子的表达

目前,SCI 基因治疗的手段之一是上调神经营养因子的表达。所涉及的神经营养因子(neurotrophic factors, NTFs)是一组由神经元、神经胶质细胞及神经支配靶组织

产生的神经营养多肽,包括神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、神经营养素-3(neurotrophin-3, NT-3)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、胶质细胞源性营养因子(glial cell line derived neurotrophic factor, GDNF)、睫状体神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)等,其效应主要由高亲和力受体 TrkA、B、C (tyrosine kinase neurotrophin receptors A, B, C)介导,两者结合后激活 Ras、磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)、磷脂酶 C- γ (PLC- γ)等通路,最终引起相关基因表达水平的变化^[8,9]。

2.1 NGF

NGF 对多种神经元尤其感觉神经元具有营养活性作用,SCI 后脊髓组织内 NGF 的表达量至少升高 4 倍^[10],而且髓外背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)中 NGF mRNA 表达量也增高,且越靠近损伤部位的 DRG 中 NGF 的表达水平越高,可能与 DGR 神经元中枢轴突的损伤有关^[11]。Tang 等^[12]将大鼠 L4/5 背根神经横断后,发现脊髓背角降钙素基因相关肽(calcitonin gene related peptide, CGRP)阳性纤维数量减少,同时伴随后肢感觉功能障碍,4 周后于损伤部位注射 AdV/NGF,损伤后 8 周观察到 CGRP 阳性纤维数量明显增加,大鼠痛觉功能恢复至接近正常水平,而再次切断神经根后痛觉反应消失,表明 NGF 的过表达能促进传入神经纤维的再生并通过背根入髓区(dorsal root entry zone, DREZ)进入脊髓。

2.2 BDNF

BDNF 广泛分布于成年大脑的皮质层、部分皮质下及脊髓区域,SCI 后可抑制受损轴突神经元胞体的萎缩并增强轴突的再生^[13]。有研究发现,BDNF 可通过抑制 Caspase 凋亡通路减少神经元和少突胶质细胞的死亡而起到神经保护作用^[14]。Kwon 等^[15]利用携带 BDNF 的慢病毒载体转染颈髓半切伤后的大鼠红核神经元,在 SCI 急性期和慢性期均发现 BDNF 的过表达对红核神经元的萎缩有明显抵抗作用,并认为 BDNF 通过上调神经元再生相关基因[生长相关蛋白 43(GAP-43)和胸腺肽 $\alpha 1$ (T $\alpha 1$)]的水平促进胞体的存活。Nakajima 等^[16]将 AdV/BDNF 悬液注射至 SCI 大鼠胸锁乳突肌,发现 AdV 可通过神经轴突逆行转染颈髓

第一作者简介:男(1987-),硕士研究生,研究方向:脊柱外科

电话:(020)87755766-8236 E-mail:cenjingsheng@sina.com

通讯作者:万勇 E-mail:yongwan65@163.com

前角运动神经元, BDNF 的表达在 1~2 周达到峰值, 且 4 周后仍能检测到较高水平, AdV/BDNF 的处理明显增加 SCI 后前角运动神经元的存活数量, 提示可通过神经纤维支配的局部组织逆行转染神经元的方法改变特定靶基因的表达水平, 从而达到治疗目的。由于没有对脊髓造成额外的伤害, 该方法在临床上有一定的应用前景。

2.3 NT-3

NT-3 可以维持交感神经元、感觉神经元、基底前脑胆碱能神经元及运动神经元存活, 还能增强受损的皮质脊髓束、感觉传导束及网状脊髓束的芽生^[17]。研究表明 NT-3 对 SCI 后轴突在胶质瘢痕所产生的抑制性微环境下的生长受阻有拮抗作用^[18]。SCI 后胶质瘢痕所产生的硫酸软骨素蛋白多糖(chondroitin sulphate proteoglycans, CSPGs)是抑制性微环境的重要组成部分, 神经多糖 2(neuroglycan 2, NG2)是 CSPGs 中的主要抑制因子。Donnelly 等^[19]利用过表达 NG2 的 Neu7 星形胶质细胞以模拟 SCI 后的抑制性微环境, 并用 LV/NT-3 转染 Neu7, 然后和 DRG 神经元共培养, 发现 DRG 神经元的轴突长度在 NT-3 过表达的环境中明显增加, 提示 NT-3 可通过拮抗 NG2 的作用促进轴突的生长。Shang 等^[19]将 NT-3 修饰的 HUMSCs(human umbilical cord mesenchymal stromal cell)(NT-3/HUMSCs)移植到大鼠脊髓压迫性损伤部位, 通过 BBB 评分观察到处理组大鼠后肢运动能力得到明显改善, 12 周后组织学观察发现 5-羟色胺(5-HT)阳性纤维数量较对照组增多, 同时损伤部位脊髓空洞的数量减少且残余的髓鞘增多, 提示 NT-3/HUMSCs 可能通过减少急性 SCI 后神经细胞的丢失及轴突的崩解而对神经组织起到保护作用。

2.4 GDNF

GDNF 是强大的神经存活因子, 对多巴胺能、去甲肾上腺能及脊髓运动神经元的作用尤其明显^[20]。为观察其诱导和促进损伤部位近端的轴突长入再植后神经根, Eggers 等^[20]对 L4~L6 脊髓前根撕脱性损伤大鼠模型行神经再植术, 并在再植部位注射 LV/GDNF, 发现 GDNF 的过表达可有效阻止神经根损伤后运动神经元的萎缩, 并且观察到有再生的轴突长入再植神经根, 但治疗 16 周后, 新生的轴突在再植部位中形成神经瘤样结构而不能进一步延长, 而此时仍可检测到高水平的 GDNF。研究者认为 GDNF 的高表达可能与轴突的延长受阻有关, 提示在神经修复的不同阶段神经营养因子起到不同的作用, 因此神经营养因子的调节性表达在神经修复的治疗中有重要意义。Koelsch 等^[21]将携带 GDNF 的 HSV 直接注射至胸腰段脊髓钝挫伤部位, 5 周的观察过程中 BBB 评分逐步提高, 与此相适应的是损伤水平脊髓组织中突触素(synaptophysin)及谷氨酸脱羧酶(glutamic acid decarboxylase, GAD)表达增多, 表明 GDNF 可促进轴突的芽生、突触的形成及 γ -氨基丁酸(GABA)在神经元之间的传递。

2.5 Trks (tropomyosin-related kinase receptors)

Trk 受体家族(TrkA, B, C)能与神经营养因子家族成

员特异性结合, 受体配体结合后通过下游的 PI3K 及 PLC- γ 信号通路影响神经细胞的存活及分化^[22]。Wang 等^[23]利用腺病毒载体转染雪旺细胞及神经干细胞, 分别使其过表达 NT-3 及 TrkC, 然后将两者共移植至 SCI 大鼠脊髓损伤局部, 检测大鼠的皮层运动诱发电位(CMEP)及皮层体感诱发电位(CSEP), 两者的延迟得到显著改善, 同时 NSC 的分化和胞间的突触形成以及雪旺细胞的髓鞘化均较对照组增多, 进而促进 SCI 大鼠活动功能的恢复, 提示利用过表达特定神经因子及其受体的相容细胞共移植是促进神经修复的研究中一个有价值的方向。SCI 后皮质脊髓束的再生能力非常有限, 其修复直接关系到自主运动功能的恢复, 有研究^[23]利用 LV/TrkB 转染皮质脊髓束神经元胞体, 发现 TrkB 的过表达能成功诱导皮质脊髓束的再生, 可能和 TrkB 与来源于损伤部位的 BDNF 结合后激发神经元内在的 BDNF 相关的再生机制有关。

3 轴突生长抑制性因子的拮抗或沉默

SCI 基因治疗的另一策略是拮抗或沉默轴突生长抑制性因子。SCI 后, 损伤部位释放的髓磷脂中的 3 种成分 Nogo、MAG(myelin-associated glycoprotein)、Omgp(oligodendrocyte myelin glycoprotein)与共同的受体复合物 NgR1/p75/Lingo-1 或 NgR1/Troy/lingo-1 结合, 将抑制信号导入神经元胞内, 激活小 G 蛋白 RhoA, 并通过其下游的效应分子 ROCK(Rho kinase)产生一系列反应, 最终抑制神经轴突生长^[9]。这些抑制因子及其下游的信号通路均有可能成为 SCI 基因治疗的潜在靶点。

3.1 NgR1(Nogo-66 Receptor 1)

NgR1 与髓磷脂抑制因子结合后, 会引起轴突生长锥的塌陷, 从而阻碍轴突延长^[24]。可溶性 NgR(sNgR)是 NgR1 的胞外片段, 能与髓磷脂抑制因子结合但不激活下游的信号通路, 因此可以拮抗 NgR1 的作用。有研究^[25]利用 sNgR 的持续输注达到促进轴突生长的目的。Peng 等^[25]构建表达 sNgR 的 HSV 载体, 体外实验证实 sNgR 的释放能阻止髓鞘抑制因子对海马神经元及 DRG 神经元轴突延长的抵抗作用, 且与抑制 RhoA 信号通路的激活有关, 而后经皮下注射 HSV 载体转染 DRG 神经元, 发现 sNgR 的过表达能显著促进损伤后有髓纤维的再生, 同时发现 RhoA 的激活减少后可下调 Nogo-A 的水平, 提示 sNgR 尚可通过抑制 Nogo-A 的表达而加速轴突再生。也有研究^[26]利用 RNA 干扰的方法诱导 NgR1 沉默, 通过构建的 NgR 特异性 siNgR199 慢病毒重组体转染大鼠大脑皮层运动区神经元实现 RNA 干扰, BDA 示踪可见处理组 SCI 区域有神经纤维生长通过。

3.2 Lingo-1(leucine-rich repeat and immunoglobulin domain-containing, Nogo receptor-interacting protein-1)

Lingo-1 特异地存在于脑和脊髓组织中, 而在非神经组织中未检测到其表达^[27]。在大鼠脑内, Lingo-1 仅分布于神经元及少突胶质细胞中^[28]。大鼠 SCI 损伤 14d 后 Lingo-

1 mRNA 的表达量增加约 5 倍^[27],而在对脊髓半切损伤模型大鼠鞘内注射 Lingo-1 N 端与 IgG 的融合蛋白 (Lingo-1-Fc)后,发现内源性 Lingo-1 与 NgR1 的结合被 Lingo-1-Fc 阻断,可明显促进皮质脊髓束和红核脊髓束的芽生,且与 RhoA 的激活减少相关^[29]。这为促进 SCI 后的神经修复提供了新的治疗靶点,即通过抑制 Lingo-1 的功能,阻碍 NgR1 受体复合物向其下游分子的信号转导,从而促进轴突再生。另外,有研究证实利用 Lingo-1 拮抗物或抗体可增加少突胶质细胞的分化与髓鞘化以及神经元存活^[30,31]。可见,在 SCI 的修复中 Lingo-1 扮演着重要角色,以其为靶点的治疗手段可有效促进受损神经组织的修复。

3.3 RhoA-ROCK

RhoA-ROCK 通路是许多抑制性分子下游的共同信号通路,RhoA 是细胞膜受体与细胞骨架之间的分子开关,与 ROCK 一起参与生长锥细胞骨架的信号传递、调节生长锥的塌陷、延长及神经轴突的回缩等过程^[32]。因此,阻断该通路,如使用 C3 转移酶及 Y27632 分别阻滞 RhoA 和 ROCK 可有效促进轴突的生长和髓鞘化^[32]。此外,ROCK 的显性失活突变体 RB/PH (TT) (DNROCK) 亦可用于抑制 ROCK 信号通路^[33]。Wu 等^[33]利用 LV/DNROCK 于体外转染 DRG 神经元,发现 ROCK 抑制的 DRG 神经元长出更多的神经突,且其长度明显长于绿色荧光蛋白 (GFP) 对照组;为观察 ROCK 对红核脊髓束 (RST) 的影响,于 C4 水平切断大鼠单侧 RST,而后将 LV/DNROCK 注射至大鼠红核部位,发现 DNROCK 组大鼠的前后肢活动能力较对照组明显改善,镜下可见有更多的神经轴突穿越损伤部位至脊髓远端,提示 DNROCK 的表达可抑制 RhoA-ROCK 通路并促进轴突的再生及芽生。

4 小结与展望

近年来对 SCI 后病理生理变化的相关分子机制的研究不断深入,如经典营养因子的新特性、抑制轴突生长的相关分子的发现及其与下游信号通路的相互作用,以及基因工程技术的不断发展,为促进损伤脊髓组织的修复及功能的恢复提供了越来越多的治疗靶点、方法和路径。但 SCI 后的病理生理过程是一个错综复杂的、有众多因素参与的过程,决定了 SCI 的治疗不能只单单针对某一因素进行干预而取得满意的效果,因此多因素组合干预的方法,包括多种生物因子或其拮抗物的联合使用、经基因工程修饰的细胞移植,以及组织工程的方法是未来促进 SCI 修复研究的重点。

5 参考文献

1. Fehlings MG, Vawda R. Cellular treatments for spinal cord injury: the time is right for clinical trials[J]. *Neurotherapeutics*, 2011, 8(4): 704-720.
2. Li S, Liu BP, Budel S, et al. Blockade of Nogo-66, myelin-associated glycoprotein, and oligodendrocyte myelin glycoprotein by soluble Nogo-66 receptor promotes axonal sprouting and recovery after spinal injury[J]. *J Neurosci*, 2004, 24(46): 10511-10520.

3. Bradbury EJ, Moon LD, Popat RJ, et al. Chondroitinase ABC promotes functional recovery after spinal cord injury [J]. *Nature*, 2002, 416(6881): 636-640.
4. Mintzer MA, Simanek EE. Nonviral vectors for gene delivery [J]. *Chem Rev*, 2009, 109(2): 259-302.
5. Papale A, Cerovic M, Brambilla R. Viral vector approaches to modify gene expression in the brain [J]. *J Neurosci Methods*, 2009, 185(1): 1-14.
6. Terzi D, Zachariou V. Adeno-associated virus-mediated gene delivery approaches for the treatment of CNS disorders [J]. *Biotechnol J*, 2008, 3(12): 1555-1563.
7. Dreyer JL. Lentiviral vector-mediated gene transfer and RNA silencing technology in neuronal dysfunctions[J]. *Mol Biotechnol*, 2011, 47(2): 169-187.
8. Hollis ER 2nd, Tuszynski MH. Neurotrophins: potential therapeutic tools for the treatment of spinal cord injury [J]. *Neurotherapeutics*, 2011, 8(4): 694-703.
9. McDonald CL, Bandtlow C, Reindl M. Targeting the Nogo receptor complex in diseases of the central nervous system[J]. *Curr Med Chem*, 2011, 18(2): 234-244.
10. Marsh DR, Wong ST, Meakin SO, et al. Neutralizing intraspinal nerve growth factor with a trkA-IgG fusion protein blocks the development of autonomic dysreflexia in a clip-compression model of spinal cord injury [J]. *J Neurotrauma*, 2002, 19(12): 1531-1541.
11. Brown A, Ricci MJ, Weaver LC. NGF mRNA is expressed in the dorsal root ganglia after spinal cord injury in the rat [J]. *Exp Neurol*, 2007, 205(1): 283-286.
12. Tang XQ, Cai J, Nelson KD, et al. Functional repair after dorsal root rhizotomy using nerve conduits and neurotrophic molecules[J]. *Eur J Neurosci*, 2004, 20(5): 1211-1218.
13. Nagahara AH, Tuszynski MH. Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10(3): 209-219.
14. Nakajima H, Uchida K, Yayama T, et al. Targeted retrograde gene delivery of brain-derived neurotrophic factor suppresses apoptosis of neurons and oligodendroglia after spinal cord injury in rats[J]. *Spine*, 2010, 35(5): 497-504.
15. Kwon BK, Liu J, Lam C, et al. Brain-derived neurotrophic factor gene transfer with adeno-associated viral and lentiviral vectors prevents rubrospinal neuronal atrophy and stimulates regeneration-associated gene expression after acute cervical spinal cord injury[J]. *Spine*, 2007, 32(11): 1164-1173.
16. Nakajima H, Uchida K, Kobayashi S, et al. Rescue of rat anterior horn neurons after spinal cord injury by retrograde transfection of adenovirus vector carrying brain-derived neurotrophic factor gene [J]. *J Neurotrauma*, 2007, 24(4): 703-712.

17. Schnell L, Hunanyan AS, Bowers WJ, et al. Combined delivery of Nogo-A antibody, neurotrophin-3 and the NMDA-NR2d subunit establishes a functional detour' in the hemisectioned spinal cord[J]. Eur J Neurosci, 2011, 34(8): 1256-1267.
18. Donnelly EM, Strappe PM, McGinley LM, et al. Lentiviral vector-mediated knockdown of the neuroglycan 2 proteoglycan or expression of neurotrophin-3 promotes neurite outgrowth in a cell culture model of the glial scar [J]. J Gene Med, 2010, 12(11): 863-872.
19. Shang AJ, Hong SQ, Xu Q, et al. NT-3-secreting human umbilical cord mesenchymal stromal cell transplantation for the treatment of acute spinal cord injury in rats [J]. Brain Res, 2011, 1391(5): 102-113.
20. Eggers R, Hendriks WT, Tannemaat MR, et al. Neuroregenerative effects of lentiviral vector-mediated GDNF expression in reimplanted ventral roots[J]. Mol Cell Neurosci, 2008, 39(1): 105-117.
21. Koelsch A, Feng Y, Fink DJ, et al. Transgene-mediated GDNF expression enhances synaptic connectivity and GABA transmission to improve functional outcome after spinal cord contusion[J]. J Neurochem, 2010, 113(1): 143-152.
22. Wang JM, Zeng YS, Wu JL, et al. Cograft of neural stem cells and schwann cells overexpressing TrkC and neurotrophin-3 respectively after rat spinal cord transection [J]. Biomaterials, 2011, 32(30): 7454-7468.
23. Hollis ER 2nd, Jamshidi P, Löw K, et al. Induction of corticospinal regeneration by lentiviral trkB-induced Erk activation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(17): 7215-7220.
24. Laurén J, Airaksinen MS, Saarma M, et al. Two novel mammalian Nogo receptor homologs differentially expressed in the central and peripheral nervous systems[J]. Mol Cell Neurosci, 2003, 24(3): 581-594.
25. Peng X, Zhou Z, Hu J, et al. Soluble Nogo receptor down-regulates expression of neuronal Nogo-A to enhance axonal regeneration[J]. J Biol Chem, 2010, 285(4): 2783-2795.
26. Lü BT, Yuan W, Xu SM. Lentiviral vector-mediated RNA interfere gene Nogo receptor to repair spinal cord injury [J]. Zhonghua Wai Ke Za Zhi, 2010, 48(20): 1573-1576.
27. Mi S, Lee X, Shao Z, et al. LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex[J]. Nat Neurosci, 2004, 7(3): 221-228.
28. Barrette B, Vallières N, Dubé M, et al. Expression profile of receptors for myelin-associated inhibitors of axonal regeneration in the intact and injured mouse central nervous system [J]. Mol Cell Neurosci, 2007, 34(4): 519-538.
29. Ji B, Li M, Wu WT, et al. LINGO-1 antagonist promotes functional recovery and axonal sprouting after spinal cord injury[J]. Mol Cell Neurosci, 2006, 33(3): 311-320.
30. Lee X, Yang Z, Shao Z, et al. NGF regulates the expression of axonal LINGO-1 to inhibit oligodendrocyte differentiation and myelination[J]. J Neurosci, 2007, 27(1): 220-225.
31. Inoue H, Lin L, Lee X, et al. Inhibition of the leucine-rich repeat protein LINGO-1 enhances survival, structure, and function of dopaminergic neurons in Parkinson's disease models[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(36): 14430-14435.
32. Boomkamp SD, Riehle MO, Wood J, et al. The development of a rat in vitro model of spinal cord injury demonstrating the additive effects of Rho and ROCK inhibitors on neurite outgrowth and myelination[J]. Glia, 2012, 60(3): 441-456.
33. Wu D, Yang P, Zhang X, et al. Targeting a dominant negative rho kinase to neurons promotes axonal outgrowth and partial functional recovery after rat rubrospinal tract lesion[J]. Mol Ther, 2009, 17(12): 2020-2030.

(收稿日期:2012-04-19 末次修回日期:2012-07-24)

(本文编辑 李伟霞)

消息

欢迎订阅《中国脊柱脊髓杂志》2012 年合订本

《中国脊柱脊髓杂志》2012 年合订本为精装本(上、下册),上册已经出版,下册将于 2012 年 12 月底出版,定价为 110 元/册,全年共 220 元;另外还有 2006~2011 年合订本,均为精装本(上、下册),2006 年定价 180 元/套,2007~2010 年定价 200 元/套,2011 年定价 220 元/套。有需要者请与本刊经理部联系。

联系地址:北京市朝阳区中日友好医院内《中国脊柱脊髓杂志》经理部,邮编:100029。联系电话:(010)84205510。编辑部 E-mail 地址:cspine@263.net.cn。

汇款时请在汇款单上注明所需物品及数量。