

基因治疗促进脊柱融合的研究进展

杨 民¹, 马庆军², 党耕町²

(1 皖南医学院附属弋矶山医院骨一科 241001 安徽省芜湖市; 2 北京大学第三医院骨科 100083 北京市)

中图分类号: R687.3, Q786

文献标识码: A

文章编号: 1004-406X(2007)-02-0145-04

脊柱先天性畸形、退变、获得性不稳以及脊柱肿瘤等疾病治疗过程中都需要通过骨移植来促进脊柱融合,重建脊柱稳定性。虽然自体骨移植是促进脊柱融合的金标准,但仍然有 5%~35% 的单节段脊柱融合患者发生骨不融合,而多节段脊柱融合的骨不连发生率则更高^[1]。此外,自体骨、异体骨以及生物替代材料移植仍存在诸多难以解决的问题。因此,临床亟须进一步研究骨再生的生物学机制以寻求更好地促进脊柱融合的方法^[1]。应用局部基因治疗技术可在脊柱特定的解剖区域释放成骨递质以刺激新骨的形成从而最大程度地促进脊柱融合,该方法是一种较有希望替代传统自体骨移植的新型治疗技术。现就近年来基因治疗促进脊柱融合的相关研究进展作一综述。

1 基因治疗促进脊柱融合的可行性

脊柱融合不同于四肢长骨骨折的骨愈合:(1)不是重建原有的解剖结构,而是通过重建合理的脊柱机械力学结构来改变因脊柱侧凸、滑脱、肿瘤、感染和创伤所致的脊柱病理解剖变化;(2)脊柱后外侧横突间融合具有独特的局部微环境,横突细小,去皮质后对移植物的血液供应小,特别是移植物的中央部位,需要血管再化生;横突间融合是在椎体旁肌肉间的大段异位成骨,其融合的机制和所受的力学环境不同于四肢骨移植的正位骨修复^[2]。近年来,涉及生命科学和工程学的骨组织工程技术已成为骨修复重建领域的重要研究热点。在脊柱融合的临床实验研究中,需要在后外侧横突间植入高达毫克级的重组人骨形态发生蛋白(rhBMPs)才能有效地促进脊柱融合以克服外源蛋白应用易流失、半衰期短和效率低等缺点。但是,超生理剂量的 rhBMPs 临床应用存在费用昂贵、长期生理影响不确定等缺点而难以在临床进一步应用。目前,基因治疗研究策略已经调整为重点治疗非致死性疾病,利用现有技术条件,基因治疗最有希望在骨科领域的临床组织修复(如骨愈合等)上取得成功^[3-4]。就具有挑战性的临床脊柱融合而言,基因治疗适合于脊柱融合的治疗^[5]:(1)骨愈合过程高度保守,目前对此研究较为深入,而 BMP 作为一种有效的成骨基因其疗效得以肯定。(2)不同于慢性疾病的治疗,

骨愈合通常在几周内完成,此过程并不需要外源基因长期、高效表达。通过选择特定的基因导入载体可控制治疗基因的表达式,从而避免过多的新骨生成以影响机体功能。(3)通过局部基因治疗方法,可选择特定的种子细胞,并通过这些基因修饰的细胞将治疗基因导入四肢骨折或脊柱的特定解剖部位,从而可避免全身应用的并发症,其技术要求相对简单。(4)前期动物实验结果较为满意。

2 基因治疗促进脊柱融合的策略和方法

2.1 腺病毒介导的 BMPs 基因治疗

基因导入系统是基因治疗的核心技术,可分为病毒类和非病毒类载体系统,其中,腺病毒载体因具有高效转染、易于应用并能产生高水平的基因表达产物等诸多优点而在实验和临床前期研究中得到充分应用。Riew 等^[5,6]利用重组 BMP2 的腺病毒(AdBMP2)体外转染兔自体骨髓间充质干细胞(BMSC),随后将细胞和胶原载体复合后植入兔 L5、L6 后外侧横突间,结果发现 5 只实验动物中只有 1 只产生脊柱融合。该研究小组随后将 AdBMP2 体外转染 BMSC 的时间由原来的 1d 提高到 7d,发现所有实验动物都获得了满意的脊柱融合效果。Riew 等^[7]在此基础上进一步利用 AdBMP2 体外转染猪 BMSC 后,通过微创胸腔镜技术将 BMP2 基因修饰的猪自体 BMSC 细胞植入胸椎间盘中,6 周后证实实验组 6 个胸椎体间都获得满意的前路融合效果。Wang 等^[8]则比较了 BMP2 基因修饰的鼠 BMSC 细胞和自体骨在鼠单节段脊柱后外侧横突间融合的疗效,结果发现通过局部基因治疗方法在横突间产生了大量的近似正常的小梁样骨,而自体骨融合样本的组织学则显示为薄、花边样小梁骨。据此,作者认为基因治疗疗效优于自体骨。Hidaka 等^[9]利用 AdBMP7 转染体外扩增培养 4 周的骨髓细胞并种植到异体骨传导支架上构建人工骨材料,随后将该材料移植到裸鼠脊柱后外侧,术后 8 周的影像和机械力学资料显示脊柱融合率分别达到 70% 和 80%。但是该研究方案涉及冗长费时的细胞培养程序,并不适合临床应用。Helm 领导的研究组则尝试更为简便的方法促进脊柱融合:将一定量的 AdBMP2 或 AdBMP9 经皮直接注射到裸鼠的腰骶椎旁肌肉中,随后的 CT 影像学和组织学结果证实动物获得了满意的脊柱融合^[10,11]。

2.2 腺病毒介导的矿化蛋白-1(LMP-1)基因治疗

BMP 类分泌性骨诱导因子在高等动物脊柱融合的实

第一作者简介:男(1971-),医学博士,研究方向:脊柱外科,组织工程

电话:(0553)5739301 E-mail:yjsygyk@sohu.com

际应用中存在着一些缺陷^[2]:(1)高达毫克级的超生理剂量 BMP 蛋白才能有效促进脊柱融合且 BMP 蛋白在体内难以维持有效的生理浓度;(2)BMP 作为分泌性骨诱导蛋白只是复杂成骨途径中多因子相互作用环节中的一员,因此单独应用 BMP 诱导成骨不能完全模拟脊柱融合过程中内在的分子作用机制;(3)高剂量 BMP 体内应用的生理副作用有待进一步观察。基于此,Boden 等^[12,13]利用差异 PCR 显示技术,成功地克隆了一种新的细胞内信号分子——矿化蛋白-1(LIM mineralize protein,LMP-1),该分子表达于成骨细胞分化前数小时,可诱导转染 LMP-1 基因的靶细胞内 BMP2、4、6、7 等多种 BMP 分子及其他生长因子的表达。因此,作为一种细胞内信号分子,仅需要少量细胞表达即可发挥级联放大的成骨效应,提高成骨作用。作者认为 LMP-1 作为成骨早期细胞内信号分子可以克服 BMP 类分泌因子的缺陷从而能按生理形式完整模拟骨生成的过程。因 LMP-1 高效诱导成骨,故在体内应用时不需要基因高效转染和表达。Boden 等^[2]以脂质体为基因转移载体,发现转染了 LMP-1 基因的大鼠骨髓细胞和脱钙骨基质复合后所构建的人工骨能有效地促进裸鼠胸、腰脊柱融合。虽然该研究中作为基因转移载体的脂质体在体外的转染效率仅为 1%,但实验仍然获得了良好的成骨效果。随后,他们发现重组 LMP-1 的腺病毒(AdLMP-1)在体外转染成骨前驱细胞时只需要很低的感染复数(MOI=0.25pfu/cell),和其他以腺病毒为基因转移载体的基因治疗相比低几个数量级^[2]。在兔脊柱融合研究中,该研究组证实 AdLMP-1(MOI=0.25~0.4pfu/cell)体外转染兔骨髓或周围血细胞后种植于脱钙骨基质或胶原-陶瓷复合体后能有效地诱导兔腰椎后外侧横突间的融合^[14]。因此这种低剂量腺病毒体外转染的治疗模式可以最大限度地避免转染后移植到体内的细胞被机体免疫系统识别清除,有较强的临床适用性。Boden 等^[15]进一步探索上述实验成果应用于临床的可行性,考虑到既往感染过腺病毒的人群在接受治疗时体内产生的抗体可能会影响 AdLMP-1 的临床疗效,他们将兔预先注射 Ad5 型腺病毒后复制预先感染腺病毒的兔动物模型,4 或 16 周后,在移植自体 LMP-1 基因修饰的周围血细胞细胞促进兔脊柱融合实验时,通过增加病毒感染剂量或受感染的细胞数目(MOI=10pfu/cell, 1×10^7 细胞),以及增加病毒感染的时间(30min)来克服机体体液免疫排斥反应,达到了满意的脊柱融合效果。

2.3 裸质粒介导的 BMP7 基因治疗

为避免病毒类载体体内应用可能产生的毒性、免疫反应等副作用,部分学者尝试应用非病毒基因转移载体促进脊柱融合。Bright 等^[16]通过经皮穿刺和开放手术方法,将 25mg 或 500mg 编码 BMP7 基因的裸质粒和胶原载体复合物植入 SD 大鼠 L5~L6 后外侧横突间肌肉中,术后 2、4 周通过组织学检查发现上述方法能成功地诱导肌肉内异位成骨,但没有产生脊柱融合。作者认为可能是所构建的裸质粒和胶原复合物在动物肌肉中所产生的 BMP7 蛋白总

量不足以成功诱导脊柱融合。作者进一步的实验将通过改进裸质粒的结构和优化载体或者通过肌肉内电转移方法来促进 BMP7 蛋白的生成,希望能通过这种副作用小的非病毒基因治疗方法能有效促进脊柱融合。

2.4 商品化 BMPs

在多种动物脊柱融合模型中,应用基因重组技术生产的 BMPs 取得了满意的融合效果,为其过渡到临床应用打下基础。Boden 等^[17]将载有 BMP2 和可吸收胶原复合物的 cage 通过前入路置入 11 例患者的腰椎间,术后 2 年随访发现所有患者都获得了满意的脊柱融合。临床上,需要高达毫克级商品化 BMPs 才能有效促进脊柱融合,而高昂的费用限制了其临床应用。

3 基因治疗促进脊柱融合的安全性研究

尽管基因治疗促进脊柱融合的动物实验结果较为理想,但是,在临床应用时尚需解决诸多问题,如病毒载体的安全性及治疗基因表达的可控性、种子细胞的优化、支架载体的选择以及多基因联合治疗的问题。而这其中,基因治疗的安全性是首先需要考虑的问题。

3.1 病毒载体的安全性和治疗基因表达的可控性

通过去除病毒载体所有的病毒基因而只保留其复制和包装所必须的顺式作用元件是病毒载体发展的方向。这种策略可以最大限度地扩大载体的容量和减少病毒蛋白表达所引发的免疫毒性。腺病毒基因组中的早期基因表达产物是导致体内腺病毒应用部位细胞和体液反应的根本原因,这种免疫排斥反应可导致治疗基因表达水平的下降。虽然将基因修饰后的种子细胞注入体内可以避免机体直接接触病毒而产生免疫排斥,但研究表明在某些情况下,感染腺病毒的细胞所表达的腺病毒早期基因产物可能逸漏出细胞而造成免疫排斥反应^[18]。因此,生产大部分病毒基因删除的无内脏的腺病毒是腺病毒载体研究发展的一种趋势,其尚未在骨愈合研究领域得以应用。而腺相关病毒(AAV)载体在构建时删除了病毒基因组所有组件而只保留了两端的长末端重复序列,因此该载体体内应用时免疫原性低。Chen 等^[19,20]将一定量重组 BMP2 和 BMP4 的腺相关病毒(AAVBMP2、AAVBMP4)直接注射到免疫功能正常的大鼠后肢肌肉中,发现能诱导肌肉内异位成骨且注射局部没有免疫炎症反应。与 AAV 载体相反,在免疫功能正常的大鼠中,需要在肌肉注射 AdBMP2 前 24h 给予一定剂量的免疫抑制剂以暂时抑制机体的免疫反应才可以观察到有明显的成骨^[21]。Chen 等^[19]指出,在免疫功能正常的机体中,利用微创技术将 AAVBMP2/4 载体多点注射到需要融合节段的脊柱后外侧横突间肌肉中,有望达到满意的脊柱融合效果。

治疗基因的高效表达并不是基因治疗时的唯一要求,如果进入体内的基因处于无调控状态将会对机体产生灾难性后果,最佳的方法是能够有序控制基因的时空表达。尽管基因治疗促进脊柱融合的动物实验结果较为理

想,对于以干细胞为种子细胞的基因治疗来说,在未来临床应用时,通过严谨调控外源基因的表达时间、持续过程和表达产量而调节治疗基因的表达显得尤为重要,因为骨愈合通常在几周内完成,此过程并不需要 BMP 等外源基因长期、高效表达。BMP 长期、高效表达后过多的新骨生成会造成脊柱融合邻近部位的神经根和脊髓不必要的受压;此外,BMP 具有多重生理作用,过多的、超过治疗窗口浓度的 BMP 所引发的潜在的全身副作用不容低估。随着安全、无毒、触发式可诱导在转录水平严谨调控基因表达的载体研制成功,为基因治疗进入临床应用提供了有力的工具。新一代四环素调控的基因表达系统(Tet-on/off)有效地解决了诱导物毒性作用、基线逸漏和低水平表达等问题,是最常用的一种基因表达调控系统,适合于未来临床的应用^[22]。Gazit 等^[23]将四环素调控 BMP2 表达的质粒 pTATop-BMP2(Tet-off)转染 C₃H₁₀T_{1/2} 细胞并筛选稳定表达 BMP2 的细胞克隆,将细胞和胶原海绵复合后用于修复小鼠的桡骨骨缺损。实验首次证实四环素衍生物强力霉素(DOX)可调控小鼠体内 BMP2 的表达并能有效修复桡骨骨缺损。该研究小组新近将 2×10⁶ 个上述细胞直接注射到 C₃H/HeN 鼠的 L2~L6 椎旁肌肉中,在手术后 3d、7d 和 30d 分别在动物饮水中添加 DOX 以终止 BMP2 的表达,从而判断脊柱融合所需要的 BMP2 表达最短时间窗口,结果表明,实验组动物 4 周后即能在脊柱后外侧形成新骨,而 8 周后可形成更为成熟的板层骨从而达到坚强的脊柱融合^[1]。更为重要的是,实验证明在该脊柱融合实验模型中 BMP2 最短表达时间窗口为 7d 就足以诱导新骨形成以促进脊柱融合,从而第一次在探讨 BMP2 时空表达和新骨形成的关系上做出了有益的探索。此外,该实验同时表明在脊柱融合邻近部位没有局部以及全身毒副作用。作者推测以可调控的 BMP 基因修饰的间充质干细胞为种子细胞的基因治疗可能是未来临床促进脊柱融合的有效手段。Gazit 等^[24]进一步构建了四环素正性调控(Tet-on)的 AAVBMP2 载体,直接注射到小鼠颅骨缺损处和椎体旁肌肉中亦能有效地修复颅骨缺损和促进脊柱融合。作者将进一步深入研究 DOX 和新骨生成之间的剂量-骨生成反应曲线,以便最大限度地模拟自然骨生成模式和精确调控骨形成。

3.2 商品化 BMPs 促进脊柱融合的安全性研究

临床上,椎板切除减压后常需要同时行后外侧横突间、前路椎体间或后路椎体间植骨融合。所以,应用 BMPs 后如果新骨过多形成,则有可能导致脊柱融合节段以远部位不必要的融合、硬膜外新骨生成导致脊髓压迫及椎间孔狭窄。Martin 等^[25]将 17 只恒猴腰椎板切除后应用 BMP2 行腰椎后外侧融合,结果发现在椎板切除部位只有反应性骨形成,而没有过多的新骨生成压迫脊髓。在随后的实验中,Boden 等^[26]将 BMP2 和不同载体复合后植入 24 只腰椎板切除后的恒猴后外侧横突间,结果椎板切除后暴露的硬膜上没有骨生成。已有的研究结果证实 BMPs 促进脊柱融合是安全有效的。

4 基因治疗促进脊柱融合的动物实验原则

基因治疗促进脊柱融合进入临床实验前必须进行严格规范的动物实验,且动物实验必须遵循从低等到高等动物的原则^[12]。因动物和人类体内生理和力学解剖环境有所不同,在动物实验中所获得的实验数据推断到人的临床应用中必须谨慎,在动物骨折愈合和脊柱融合实验中获得成功的基因治疗方案不一定在人类临床实验中获得成功。反之,在低等动物实验中不成功的方案必然在更复杂的人体环境中难以取得成功。因此,在低等动物中获得成功的基因治疗促进骨愈合或脊柱融合的方法需要在非人灵长目动物实验中获得成功后方能进入临床实验,最终可以过渡到临床试验和临床应用中。目前基因治疗促进脊柱融合的实验研究仍局限于小动物实验研究,且多为单一的脊柱后外侧横突间融合模式,进一步深入研究需以灵长目动物为实验对象,进行外侧横突间和椎体间融合实验研究,以求更接近临床实际。

大量临床前期研究数据清楚表明局部基因治疗技术可应用于人类疾病治疗,但针对需要接受骨修复治疗的患者而言,自体骨移植仍然是目前临床常规治疗方法。一般而言,基因治疗技术并不是对所有患者来说都是必须的。但是,对于难治性骨修复而言,该技术提供了一种新的治疗途径。此外,当应用基因治疗策略治疗上述疾病时,研究者必须考虑到这些新的分子治疗方法是能够用来改善患者的生活质量,而不是用来治疗致死性的疾病。因此,首先要考虑这种治疗的安全性。动物实验研究中较理想的腺病毒载体在未来临床应用中必须进一步加以改进以确保其应用时有极大程度的生物安全性。随着安全、高效并能实现治疗基因精确调控的基因治疗技术进一步完善,基因治疗技术有望替代临床常规自体骨移植而成为促进脊柱融合的常规手段。

5 参考文献

1. Hasharoni A, Zilberman Y, Turgeman G, et al. Murine spinal fusion induced by engineered mesenchymal stem cells that conditionally express bone morphogenetic protein-2[J]. J Neurosurg Spine, 2005, 3(1): 47-52.
2. Cha CW, Boden SD. Gene therapy applications for spine fusion[J]. Spine, 2003, 28(Suppl 15): 74-84.
3. Evans CH, Ghivizzani SC, Robbins PD. Orthopaedic gene therapy[J]. Clin Orthop Relat Res, 2004, 429: 316-329.
4. Baltzer AW, Lieberman JR. Regional gene therapy to enhance bone repair[J]. Gene Ther, 2004, 11(4): 344-350.
5. Riew KD, Wright NM, Cheng S, et al. Induction of bone formation using a recombinant adenoviral vector carrying the human BMP-2 gene in a rabbit spinal fusion model[J]. Calcif Tissue Int, 1998, 63(4): 357-360.
6. Cheng SL, Lou J, Wright NM, et al. In vitro and in vivo induction of bone formation using a recombinant adenoviral vector carrying the human BMP-2 gene[J]. Calcif Tissue Int, 2001, 68

- (2):87-94.
7. Riew KD, Lou J, Wright NM, et al. Thoracoscopic intradiscal spine fusion using a minimally invasive gene-therapy technique [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2003, 85(5):866-871.
 8. Wang JC, Kanim LE, Yoo S, et al. Effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing bone marrow cells on spinal fusion in rats [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2003, 85(5):905-911.
 9. Hidaka C, Goshi K, Rawlins B, et al. Enhancement of spine fusion using combined gene therapy and tissue engineering BMP-7-expressing bone marrow cells and allograft bone [J]. *Spine*, 2003, 28(18):2049-2057.
 10. Alden TD, Pittman DD, Beres EJ, et al. Percutaneous spinal fusion using bone morphogenetic protein-2 gene therapy [J]. *J Neurosurg*, 1999, 90(Suppl 1):109-114.
 11. Helm GA, Alden TD, Beres EJ, et al. Use of bone morphogenetic protein-9 gene therapy to induce spinal arthrodesis in the rodent [J]. *J Neurosurg*, 2000, 92(2):191-196.
 12. Yoon ST, Boden SD. Spine fusion by gene therapy [J]. *Gene Ther*, 2004, 11(4):360-367.
 13. Minamide A, Boden SD, Viggswarapu M, et al. Mechanism of bone formation with gene transfer of the cDNA encoding for the intracellular protein LMP-1 [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2003, 85(6):1030-1039.
 14. Viggswarapu M, Boden SD, Liu Y, et al. Adenoviral delivery of LIM mineralization protein-1 induces new-bone formation in vitro and in vivo [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2001, 83(3):364-376.
 15. Kim HS, Viggswarapu M, Boden SD, et al. Overcoming the immune response to permit ex vivo gene therapy for spine fusion with human type 5 adenoviral delivery of the LIM mineralization protein-1 cDNA [J]. *Spine*, 2003, 28(3):219-226.
 16. Bright C, Park YS, Sieber AN, et al. In vivo evaluation of plasmid DNA encoding OP-1 protein for spine fusion [J]. *Spine*, 2006, 31(19):2163-2172.
 17. Boden SD, Zdeblick TA, Sandhu HS, et al. The use of rhBMP-2 in interbody fusion cages. Definitive evidence of osteoinduction in humans: a preliminary report [J]. *Spine*, 2000, 25(3):376-381.
 18. Lou J, Xu F, Merkel K, et al. Gene therapy: adenovirus-mediated human bone morphogenetic protein-2 gene transfer induces mesenchymal progenitor cell proliferation and differentiation in vitro and bone formation in vivo [J]. *J Orthop Res*, 1999, 17(1):43-50.
 19. Chen Y, Luk KD, Cheung KM, et al. Gene therapy for new bone formation using adeno-associated viral bone morphogenetic protein-2 vectors [J]. *Gene Ther*, 2003, 10(16):1345-1353.
 20. Luk KD, Chen Y, Cheung KM, et al. Adeno-associated virus-mediated bone morphogenetic protein-4 gene therapy for in vivo bone formation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 308(3):636-645.
 21. Okubo Y, Bessho K, Fujimura K, et al. Osteoinduction by bone morphogenetic protein-2 via adenoviral vector under transient immunosuppression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 267(1):382-387.
 22. Goverdhan S, Puntel M, Xiong W, et al. Regulatable gene expression systems for gene therapy applications: progress and future challenges [J]. *Mol Ther*, 2005, 12(2):189-211.
 23. Moutsatsos IK, Turgeman G, Zhou S, et al. Exogenously regulated stem cell-mediated gene therapy for bone regeneration [J]. *Mol Ther*, 2001, 3(4):449-461.
 24. Gafni Y, Pelled G, Zilberman Y, et al. Gene therapy platform for bone regeneration using an exogenously regulated, AAV-2-based gene expression system [J]. *Mol Ther*, 2004, 9(4):587-595.
 25. Martin GJ, Boden SD, Morone MA, et al. Posterolateral intertransverse process spinal arthrodesis with rhBMP-2 in a nonhuman primate: important lessons learned regarding dose, carrier, and safety [J]. *J Spinal Disord*, 1999, 12(3):179-186.
 26. Boden SD, Martin GJ, Monroe MA, et al. Posterolateral intertransverse process spinal arthrodesis with rhBMP-2/hydroxyapatite-tricalcium phosphate after laminectomy in the non-human primate [J]. *Spine*, 1999, 24(12):1179-1185.

(收稿日期:2006-12-18)

(本文编辑 彭向峰)

喜 讯

为了激励广大科技人员不断创新,发表高水平的学术论文,进一步提高办刊质量,加速我国科技期刊国际化,促进我国科学技术水平的不断提高,从2003年起,中国科学技术协会每年举办一届中国科协优秀论文评选活动。参加评选的论文由中国科协所属全国性学会、协会、研究会主办的学术期刊编辑部推荐,先由3名同行专家个人推荐,再由刊物的主办学会组织专家初审后推荐,经中国科协期刊优秀学术论文专家评审委员会评选,报中国科协学术交流工作委员会审定,评出优秀论文。由《中国脊柱脊髓杂志》编辑部推荐的“内窥镜辅助下经颈动脉三角区前路松解治疗难复性寰枢关节脱位”(作者为中南大学湘雅二医院脊柱外科吕国华、王冰、马泽民、李晶,论文刊登于《中国脊柱脊髓杂志》2005年第3期)被评为“第四届中国科协期刊优秀学术论文”(获奖证书见后插页I)。