

· 综述与进展 ·

基因治疗在运动医学中的应用

APPLICATION OF GENE THERAPY TO SPORTS MEDICINE

赵 云* 马力宏 ZHAO Yun MA Li-hong

摘要 运动创伤经常累及那些修复能力低下的组织, 从而造成一系列严重损伤, 为了改善修复进程, 搞清修复的分子生物学与细胞生物学机制显得尤为重要。许多研究证明生长因子和细胞素对修复过程有明显的促进作用, 这些分子有望成为治疗运动创伤的新制剂。

关键词 基因治疗 运动医学 生长因子

Abstract The present study points out that sports injuries involve tissues with low repair ability frequently and it is important to improve the repair process to understand molecular and cellular biological mechanisms of repair. The paper puts forward the conclusion that several growth factors and cytokines accelerate the repair process which promise to be new therapeutic agents for sports injuries.

Key Words gene therapy sports medicine growth factor

随着分子生物学研究的深入, 人体细胞基因介导和表达的技术也得到相应发展, 从而拓展了基因治疗的应用范围, 在矫形运动医学中发挥着重大作用。关节软骨、半月板、前交叉韧带和腱鞘是边缘性血管化或无血管组织, 自发修复能力低下, 并且对手术或非手术治疗应答很差^[1], 这些部位在运动中极易受累, 损伤后不仅出现急性功能下降而且造成慢性功能障碍。Tippel SB 等研究发现, 特定的生长因子可以激活与修复有关的因素, 如细胞游走、增殖、分化及基质合成^[2]。如果损伤组织可以血管化, 生长因子从受损部位的血小板释放并迅速激活修复应答, 然后, 再由炎性浸润细胞或正常宿主细胞合成新的生长因子, 如成纤维细胞及内皮细胞, 以保证修复进程。在这些自发修复能力低下的组织中, 特异性生长因子的缺乏或不良表达均会影响修复进程, 因此外源性生长因子的使用或增加内源性的合成都会加强组织的修复。

目前的一些研究表明了将标记基因向滑膜、软骨细胞、半月板的纤维软骨细胞、腱细胞及韧带成纤维细胞转移的可行性^[3], 基因转移可改善损伤的治疗, 特别是生长因子的靶细胞的导入, 提高了治疗的特异性和时效性。可见, 基因技术在运动医学领域有着更为广泛的应用前景。

1 基因治疗

基因能够表达和产生基因产物(蛋白质或 RNA)的 DNA 序列, 按产物类别可分为蛋白质基因和 RNA 基因(rRNA 基因和 tRNA 基因)两大类^[4]。

基因治疗是一项将功能基因插入人体细胞以修改遗传缺陷或引入一种新的功能从而达到治疗目的技术。最初仅用于单基因缺陷性遗传病的替代治疗, 如血友病; 后来拓展

至致病基因的基因修正及基因增强治疗, 如骨质疏松与 VDR (VitD 受体) 基因多态性的研究^[5,6]; 现在也用来治疗获得性疾病, 如利用反基因技术治疗肿瘤^[7]。基因疗法要求将外源性基因转移到靶细胞并在靶组织内表达, 关键是基因转移技术和基因表达的调控技术。其它相关的治疗还包括治疗型 RNA 的转移, 如反义 RNA (micRNA 可抑制核糖体与 mRNA 的结合, 从而抑制 mRNA 的翻译, 同时使 mRNA 含量明显减少) 和 R 酶(即核糖核酸酶, 为具有催化活性的 RNA) 技术^[4]。目前, 基因转移仅限于体细胞, 由于涉及到伦理学问题, 种系细胞的遗传学修饰仍受到限制^[8]。

外源基因能否在体内准确导入靶向细胞并有效表达是基因治疗技术中的难点, 也是研究领域的热点。遗传物质转移技术大多要求有载体的参与, 从而将遗传物质导入靶细胞并予以特异性表达, 载体一般分为非病毒和病毒载体两类。非病毒载体介导方式有直接微量注射法、电穿孔法、磷酸钙共沉淀法及阳离子脂质体转染技术(转染, 使目的基因通过生物化学或生物物理的方法介导进入真核细胞的过程, 一般需要使用某些试剂同含有需要表达基因的 DNA 质粒混合后, 导入靶细胞中表达)^[9]。脂质体是最常用的非病毒载体, 但目前, 非病毒载体导入法的效率较低。相比较, 病毒载体更有效, 他们利用病毒对宿主细胞的亲合性将遗传物质嵌入感染细胞, 但病毒使用前必须剔除编码致病型病毒蛋白的基因, 然后再插入治疗基因, 这样既转移了靶基因又避免了发病。基因治疗领域有效性和安全性日益受到重视, 推出高效、非致免疫且易于制备的非病毒载体成了当务之急^[10,11]。

基因导入靶细胞后, 靶基因进入细胞核进行转录。在核内, 植入 DNA 可以整合到宿主细胞的染色体上或以游离的分子形式存在如附着体(染色体外的能复制的辅助遗传成分, 可以游离于细胞质中, 也可与染色体结合)。植入 DNA 的表达可以是瞬时也可是持续的, 植入基因的染色体整合确保

* 女, 运动生理硕士研究生, 天津体院研究生部, 天津 300381
Correspondence to: ZHAO Yun, Dept. of Postgraduate, Tianjin Institute of Physical Education, Tianjin 300381, China.
收稿: 1998-10-29

了遗传信息向子代的稳定传递。逆转录病毒是整合病毒,在遗传病治疗方面尤为重要,故得到了深入的研究。莫氏鼠白血病毒是基因治疗中最常用的逆转录病毒,它的衍生物成功地应用于临床基因治疗。但仍有一些缺陷,如包装容量较小,仅能感染分离细胞(逆转录病毒载体一直用于离体基因转移)及因过度表达或嵌入突变引起的毒性反应等^[12]。有研究显示,慢病毒作为逆转录病毒,可稳定导入非分离细胞进行在体转移,有望成为基因治疗的新病毒载体^[13]。

腺病毒载体是另一种病毒载体,它并不把植入DNA整合到高频感染的宿主细胞的染色体上,而是以附着体形式存于核内,这样就避免了嵌入突变所致细胞基因型永久改变的危险^[2]。腺病毒可感染分离型或非分离型细胞,也用于感染原位组织。该病毒导入基因的表达时效较差,起始很高,但随之快速下降,考虑由附着体DNA不稳定性或非特异性炎症反应及细胞免疫反应造成。腺病毒载体多用于在体治疗,在许多病例中都见到了由其引发的炎症反应,然而其介导基因的瞬时高效表达,在组织损伤修复等短期治疗中却发挥了重要作用。另外,还有一些病毒载体如副腺病毒、单纯疱疹病毒和脊髓灰质炎病毒也处于研究构建阶段。

2 基因介导途径

基因介导一般分别为离体和在体基因治疗^[14-17]。离体基因介导,即将靶细胞由病人体内分离出来,在体外进行培养和遗传学修饰,然后将修饰后细胞再植入体内的过程。这种方法允许细胞进行选择 and 扩增,例如选择性标记与治疗基因的并发转导(细菌由于噬菌体的影响而引起遗传物质的重组,并将一个细菌体内的遗传物质通过噬菌体转移到另一个细菌体)及随后在适宜条件的培养基上的生长。离体途径费力且造价昂贵,但安全性高,因为靶细胞在体外控制条件下进行操作,无需给病人注射病毒颗粒,且在重新植入前可对遗传修饰细胞予以检验。在体基因介导技术要求相对简单,即将载体直接注入病人体内。

在尝试将基因技术用于组织修复治疗时,关键是编码修复转移因子的基因转移,基因对目的细胞的安全导入尤为重要,但在基因导入上还有很多技术问题有待解决。目前,可见到有关改进基因转移的修饰方法的报道。具体途径的选择还取决于靶器官的解剖生理学构造,疾病的病理生理机制,载体的选择及对安全性的考虑等多方面因素。

3 基因表达和调控

基因表达包括一系列的复杂过程,调控范围分为DNA水平(基因拷贝数和重排)、转录水平、转录后水平和翻译水平等多层次,其中转录水平的调控尤为关键。从70年代后半期,人们利用定点突变法及脚印法系统研究基因转录的调控位点,认为高等真核生物基因表达调控需要两种DNA序列,即启动子和增强子。启动子一般位于转录起始点上游100bp的范围内,是RNA聚合酶进行精确而有效的转录所必需的;增强子的作用在于增加转录速率^[18,19]。在组织特异性的基因表达顺式调控中^[20],上述因子与外源基因连接,从而达到靶向转录的目的,并且使用人体细胞本身的启动子可以避免病毒启动子/增强子序列在人体细胞中的失活,从而使被导入基因在该细胞中长期表达^[21]。目前,该领域的研究主要集中

于诱导启动子的检验。表达载体启动子的顺式调控提供了位置信息,真正起转录调控作用的是反式作用因子,可改善、提高目的基因的表达效率。向转染靶细胞中导入表达载体启动子相应的强反式激活因子是提高外源基因表达的新策略。大量事实表明,翻译水平的调控是快速控制基因表达的方式,为各种高等真核生物所广泛使用。mRNA稳定性(mRNA寿命)的提高,增加了细胞内mRNA的浓度,达到了翻译扩增的效果^[22]。

4 基因治疗在运动医学中的应用

基因治疗广泛应用于遗传病的临床治疗,在运动医学领域的应用尚处于尝试阶段,但对于改进运动损伤的临床治疗不失为一种有效的新方法。Chanin Lamsam等人的研究证实,基因治疗对于诱发和加速软骨、半月板、鞘和韧带的损伤修复十分有效^[3]。损伤修复过程为血液从破损血管渗出,形成纤维凝块,纤维支架血管化,细胞增生,细胞外基质合成以及修复组织的最后重建。生长因子和细胞素通过自分泌或旁分泌途径自损伤细胞、血小板、巨噬细胞和淋巴细胞释放,作用于修复过程,生长因子促进损伤修复的效力在动物模型上得到了证实,但未见到有关各型结缔组织特异性修复进程深入研究的报道。大量研究表明,某些生长因子如血小板衍生生长因子(PDGF)、表皮生长因子(EGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)和转移生长因子-(TGF-)均有增强组织修复的能力。

4.1 PDGF与损伤修复^[23,24]

PDGF为二聚体形式,分为PDGF-AA,PDGF-BB,PDGF-AB三种,是多种细胞的强力丝裂原和趋化物。目前研究发现外科手术和/或损伤修复过程中伴随有局部PDGF-B链基因表达量的升高和受体的上调等,此外尚有许多研究结果提示它在损伤修复中起重要作用,甚至被称为损伤修复因子,美国FDA也已批准其进入软组织损伤的临床试验。

PDGF是一种活性多肽,在损伤修复中有潜在的应用价值,它可促进成纤维细胞的合成,转导该重组基因的成纤维细胞胶原合成率显著提高,至于后者可能与PDGF-B基因表达后的自分泌刺激诱导其它静息状态基因的活化有关。成纤维细胞的增殖和胶原合成的增加无疑将促进损伤修复。

4.2 TGF-与损伤修复

TGF-是一类多功能的细胞生长因子,体内含量最为丰富,在胚胎发育、创口愈合、基质形成、骨组织形成及改建中起着重要作用。孙玉鹏等实验显示,TGF-可刺激间充质细胞的增殖和分化,形成成骨细胞和软骨细胞,从而诱导新骨的生成^[25]。多数学者认为,TGF-通过刺激成骨细胞的活性与增殖直接促进膜内成骨,并刺激成骨细胞合成I型胶原和骨连接素。体外免疫组织化学观察证实软骨瘤中TGF-的存在,表明TGF-同时还调节软骨细胞的增殖与分化及软骨基质的合成。

Massague研究显示,在体外培养的Ito细胞能刺激结缔组织合成,同时轻微上调T_R-I和T_R-II mRNA的表达^[26]。

最近一项在体研究表明,在那些需要软骨素酶治疗的缺陷处局部使用含有特异性生长因子的纤维凝块,可以引起细

胞自滑膜向缺陷处募集, TGF- β 的使用可大大加速这一进程。在半月板移植细胞培养中,可见到 TGF- β 1 刺激纤维软骨细胞的增生和蛋白多糖的合成。

目前, TGF- β 的应用研究方兴未艾,在国内外均已进入临床期研究,特别是与 BMP(骨形成蛋白)的联合使用,对加速损伤修复起到了积极的作用。

4.3 EGF, FGF 与损伤修复

EGF 广泛存在于体液中,可促进细胞的增殖分化,具有非促丝裂作用。EGF 可增强半月板无血管区损伤的修复,对前交叉韧带的成纤维细胞也有调控作用^[27]。

关节软骨及半月板无血管区,正是由于缺少与修复相关的生长因子的组织来源,才造成修复能力低下。动物模型在体研究显示,向关节软骨表浅撕裂伤部位灌注 FGF,可加速修复反应进程。体外实验发现,FGF 能促进软骨细胞前质的分化及软骨细胞的增殖和成熟^[28]。

大量研究结果证实,生长因子是促进组织修复的高效制剂,在运动损伤的临床治疗方面具有潜在的应用价值。

在基因治疗中,随着组织修复的分子学机制的阐明,特异性生长因子的选定,基因转移技术的安全性及有效性引起了人们极大的关注。1977 年以来, Messing 等人根据 - 互补原理构建了一系列利用染色法直接筛选的载体。如转移标志基因 LacZ(编码 - 半乳糖苷酶),用 X-gal 染色,通过显色情况分析 LacZ 基因的表达(野生型 LacZ 基因产物有分解 X-gal 显示蓝色的能力)。采用最佳方法,将修复生长因子基因导入在体或离体细胞并予以靶向表达,从而达到治疗目的。

基因治疗技术近年来已取得了很大的进展,特别是在运动医学领域的应用,无疑成为体育科学中的研究热点。人们已认识到基因治疗对于运动创伤修复的积极作用,以及对提高运动能力,延长运动生命的潜在价值。尽管如此,仍有许多技术难点,如外源基因导入的靶向性与高效性的统一,转移基因在运动损伤修复中的确切作用机制,基因转移和表达调控技术等均需要进一步的研究探讨。

参考文献

- 1 Gerich T G, Fu F H, Robbins P D, Evans C H. Prospects for Gene Therapy in Sports Medicine. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 1996, 4(3): 180 ~ 187
- 2 Trippel S B, Coutts R d, Einhorn T A et al. Growth Factors as Therapeutic Agents. *J Bone Joint Surg Am*, 1996, 78: 1272 ~ 1286
- 3 Lamsam C, Fu F H, Robbins P D et al. Gene Therapy in Sports Medicine. *Sports Med*, 1998, 25(2): 73 ~ 77
- 4 孙乃东, 孙东旭, 朱德熙. 分子遗传学. 南京: 南京大学出版社, 1990
- 5 黄海宁. 骨质疏松与遗传. 国外医学遗传学分册, 1998, 21(2): 57 ~ 60
- 6 Ego See man, John L Hopper, Nicholas R Young et al. Do Genetic Factors Explain Associations between Muscle Strength, Lean Mass, and Bone Density? A Twin Study. *Am J Physiol*, 1996, 270: E320 ~ 327
- 7 蒋罗化, 王新娟. 三链 DNA 与基因治疗. 国外医学遗传学分册, 1998, 21(2): 69 ~ 73
- 8 Latchman D S. Germline Gene Therapy. *Gene Ther*, 1994, 1: 277 ~ 279
- 9 王颢, 林其谁. 核酸转染技术和阳离子脂质体. 细胞生物学杂志, 1998, 20(1): 21 ~ 25
- 10 Luzzatto L. Gene Transfer and Gene Therapy. *J Inter Med*, 1992, 231(1): 3 ~ 6
- 11 Friedmann T. The Promise and Overpromise of Human Gene Therapy. *Gene Ther*, 1994, 1(4): 217 ~ 218
- 12 Crystal R G. Transfer of Genes to Human: Early Lessons and Obstacles to Success. *Science*, 1995, 270: 404 ~ 410
- 13 Naldini L, Blomer U, Gally H et al. In vivo Gene Delivery and Stable Transduction of Nondividing Cell by a Lentiviral Vector. *Science*, 1996, 272: 263 ~ 267
- 14 Eming S A, Mbrgan J R, Berger A. Gene Therapy for Tissue Repair: Approaches and Prospects. *Br J Plast Surg*, 1997, 50(7): 491 ~ 500
- 15 Schmidt - Wolf G D, Schmidt - Wolf I G. Cancer and Gene Therapy. *Ann Hematol*, 1996, 73(5): 207 ~ 218
- 16 Cornetta K, Fan Y. Retroviral Gene Therapy in Hematopoietic Diseases. *J Clin Apheresis*, 1997, 12(4): 187 ~ 193
- 17 Harris J. Gene Delivery and Therapy Strategies. *Lancet*, 1993, 342(342): 234
- 18 李冠武, 温博贵. 核基因与基因表达调控研究进展. 生理科学进展, 1998, 29(3): 257 ~ 259
- 19 Khoury G, Gruss P. Enhancer Elements. *Cell*, 1983, 37: 313 ~ 314
- 20 Maniatis T et al. Regulation of Inducible and Tissue-specific Gene Expression. *Science*, 1987, 236: 1237 ~ 1245
- 21 许道松. 外源基因的靶向细胞表达. 国外医学分子生物学分册, 1987, 48: 5 ~ 6
- 22 Russel R, Elaine W R et al. The Biology of Platelet - derived Growth Factor. *Cell*, 1986, 46: 155 ~ 169
- 23 王忠彪, 孙逊, 李勇等. PDGF - B 基因表达及其对成纤维细胞增生和胶原合成的促进作用. 中国创伤杂志, 1998, 14(4): 216 ~ 218
- 24 孙玉鹏, 张皖清, 马福成等. TGF- β 与 BMP 复合材料的骨修复作用. 中国创伤杂志, 1998, 14(2): 88 ~ 91
- 25 Messague J. Receptors for the TGF- Family. *Cell*, 1992, 69: 1067 ~ 1070
- 26 管茶香, 孙秀泓, 罗自强等. 表皮生长因子对肺泡巨噬细胞趋化性的调控. 中国应用生理学杂志, 1998, 14(1): 43 ~ 45
- 27 刘晋才. 细胞因子与骨和软骨的修复. 中华骨科杂志, 1998, 18(4): 243 ~ 245