

脊髓损伤的基因治疗

朱伟²⁾ 侍坚^{1)*}

⁽¹⁾第二医科大学神经生物学研究室, 上海 200025;

⁽²⁾海军医学研究所, 上海 200433)

摘要 基因治疗脊髓损伤 (SCI) 既不存在胎儿神经组织移植的组织来源问题, 且比外周神经组织移植引起的排异性低, 是目前脊髓损伤治疗中最有前途的方法. 基因治疗的转基因方式有两种: 一是将目的基因直接导入体内靶细胞令其表达; 二是将基因在体外导入适当的细胞内, 并筛选出高效表达的移植细胞作为转基因中介移植到体内靶组织. 不论采用何种方式, 将基因导入细胞又可用多种手段实现: 如微注射、脂质体等物理或化学手段; 利用缺陷病毒作为载体感染细胞的生物学手段. 因为用生物学手段转基因的细胞移植方法空间定位明确, 所以目前最常采用它作为基因治疗效果的研究. 虽然 SCI 基因治疗目前仍停留在实验探索阶段, 一些问题尚待解决, 但随着基因治疗技术方法的不断提高, 它的临床应用前景可以预见.

关键词 脊髓损伤 (SCI), 神经营养因子 (NTF), 基因治疗

学科分类号 Q78

脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 是中枢神经系统 (CNS) 疾病的一大类. 成年哺乳动物 CNS 损伤不同于 PNS 损伤, 神经元轴突几乎无法再生, 导致某些神经元功能难以恢复, 故 CNS 疾病治疗一度被视为禁区. 直至 Aguayo 等通过大量实验提出了突破性的新观点: PNS 和 CNS 损伤后轴突生长的差异性取决于外界环境因素, 损伤的 CNS 轴突如暴露于外周神经移植体亦可导致再生. 神经科学领域的这一重大发现给 SCI 治疗带来了新的曙光. 另一方面基因治疗的概念自 20 世纪 80 年代提出之后, 实验方法和技术手段飞速发展, 在遗传病和肿瘤治疗方面均已发挥重要的推动作用. 由此可见, 将基因治疗手段应用于 SCI 的治疗可能具有很好的前景.

1 基因治疗在 SCI 治疗中的地位

成年脊髓可以有条件的再生, 这些条件包括: 损伤神经元仍具备表达有关生长基因的能力、提供神经营养因子、提供轴突生长必需的基质分子和减少轴突生长的不利因素 (轴突生长相关抑制因子及瘢痕组织形成等). 根据以上新观点, 目前脊髓损伤的治疗方案有: 外周神经组织移植、胎儿神经组织移植、基因治疗. 其中, 胎儿神经组织排异性低、分裂能力强、分化程度低, 用于 SCI 神经元功能恢复效果较好, 但由于来源和道德上的问题限制了它的临床应用. 虽然 CNS 系统的免疫应答能力微弱, 但对抗原性较强和种属相差甚远的靶细胞仍

具有较强的免疫排斥, 基因治疗的手段较外周神经组织移植排异性小, 且一次治疗能起到长期的效果. 所以, 脊髓损伤的基因治疗是最有前途的治疗方法之一, 也是目前研究者们重点攻关的热点.

2 基因治疗的手段和方法

2.1 目的基因的转移方式

转移方式有两种: 一是体内直接转基因 (*in vivo*), 即将目的基因直接导入体内靶细胞令其表达, 现已在腹腔、静脉、动脉、肝、肌肉、器官等多种组织器官获得成功. 另一种方式是细胞介导的基因治疗 (*ex vivo*), 即在体外将目的基因导入适当的移植细胞后, 筛选出能够高效表达目的基因的移植细胞并移植到体内靶组织.

2.2 目的基因的转移手段

不管将目的基因直接导入靶细胞还是导入移植细胞, 都牵涉到转移手段的问题, 目前的手段有: 通过物理或化学手段 (磷酸钙沉淀、电穿孔、微注射、脂质体、颗粒轰击等) 将目的基因导入细胞; 通过生物学手段, 即利用缺陷病毒作为载体 (逆转录病毒、腺病毒、单纯疱疹病毒、腺病毒相关病毒等) 感染细胞.

* 通讯联系人.

Tel: 021-63846590-48, E-mail: shijiank@online.sh.cn

收稿日期: 1999-12-11, 接受日期: 2000-02-26

2.3 基因载体的选择

腺病毒、腺相关病毒 (AAV) 和单纯疱疹病毒 (HSV) 都既可感染分裂期细胞也可感染非分裂期细胞. 将 AAV-TH (酪氨酸羟化酶) 病毒载体直接注射到用 6-羟基多巴去神经的 Parkinson 大鼠模型内, 在其神经及胶质细胞内有 TH 表达, 动物症状部分改观, 提示 AAV 在 SCI 治疗中也有应用潜力. HSV 能适应更大和更复杂的外源基因的插入, 感染神经细胞后能形成“终身隐性感染”, 有可能成为基因导入 CNS 的理想载体, 但至今尚未构建出既不致病又能持久存在和持续表达的理想 HSV 载体. 腺病毒载体无论体外培养或是体内注射, 均可特异性感染所涉及到的神经元和胶质细胞, 插入突变小, 但不利于长期表达, 多次导入易引起免疫反应. 比较而言, 逆转录病毒已建立了较安全的包装细胞系, 形成野生病毒的可能性小. Danos 和 Heard 以逆转录病毒介导的小鼠造血干细胞转基因实验为例, 统计了世界各地实验室所做的上千例相关实验, 还未发现有诱发白血病的报道, 说明逆转录病毒载体介导的基因转移技术诱发细胞恶变的可能性小, 目前已有应用于临床的实例^[1].

3 神经营养因子 (NTF) 对 SCI 治疗的作用

3.1 神经营养因子家族

NTF 是一类能够促进神经细胞生长、增殖、延长生存时间并调节神经细胞分化和形态重塑的蛋白质. 在发育阶段, 靶源产生的 NTF 可以防止神经元凋亡, 帮助促进能形成正确联接的神经元存活. 另外, 近来的体外实验也证明 NTF 能促进成年 CNS 神经元轴突生长、突触的重排以及树突的出芽和神经前体物的生存和增生. 已知的 NTF 有以下几类: 神经营养素家族包括神经生长因子 (NGF)、脑源神经营养因子 (BDNF)、神经营养因子-3 (NT-3)、神经营养因子-4/5 (NT-4/5); 有神经营养活性的细胞因子如成纤维细胞生长因子 (FGF)、胰岛素样细胞生长因子 (IGF); 另外还包括睫状神经营养因子 (CNTF)、胶质细胞源性生长因子 (GDNF) 等.

3.2 移植细胞的选择

CNS 中有两种重要的支持细胞: 星形胶质细胞和少突状胶质细胞. 星形胶质细胞在神经元发育期可以支持轴突生长, 但在成年 CNS 损伤后, 其活性增强会形成瘢痕组织, 影响轴突生长. 少突状胶质细胞在 CNS 损伤后产生髓鞘也会抑制轴突的

生长^[2]. 外周神经移植或胚胎组织移植之所以能促进轴突生长, 一方面因为将外周可分裂的神经细胞整合进了 CNS 内, 另一方面外周的支持细胞还可以提供生长必需的基质分子. 所以 SCI 的基因治疗不仅要考虑提供促进中枢神经元再生的 NTF, 还需要能同时提供基质分子的支持细胞. 常用的移植细胞有成纤维细胞、Schwann (SC) 细胞等. 另外, 1995 年 Bjorklund 实验室报道用 NGF 基因修饰过的中枢源温敏干细胞移植到损伤部位, 能完全阻止穹隆切断后基底前脑胆碱能神经元的变性, 提示这种细胞也可用于 SCI. 1997 年 Li 等^[3]报道将兼具 SC 细胞和星形细胞功能的嗅觉成鞘细胞 (OEC) 移植到上颈部皮质脊髓束一侧被切断的大鼠脊髓损伤部位, 10 d 后可见被切断的皮质脊髓束穿过移植物延伸入尾侧束, 大鼠可以用神经损伤侧的前爪够物.

3.3 NTF 基因治疗 SCI 举例

In vivo 方式的 SCI 基因治疗如: 1998 年, Zhang 等^[4]将大鼠背根第 4、5、6 对腰椎脊神经切断, 14~19 d 后将携有 NT-3 基因的腺病毒直接注射到腰椎前脚, 导致注射 4~40 d 内胶质细胞和前脚神经元大量表达目的基因, 背根损伤 16~37 d 后, 用免疫组化法可以看到已断的大量背根神经轴突再生至脊髓灰质内.

目前 SCI 的基因治疗多采用 *ex vivo* 的方法, 基因工程细胞移植一方面可以令 NTF 的分泌在空间有具体的定位, 另一方面可以为神经元的再生提供基质分子和生长的界面, 令神经元能够朝着 NTF 分泌的方向生长. Tuszynski 等利用来源于莫洛氏鼠白血病的逆转录病毒载体, 将 NGF 基因导入人的成纤维细胞后, 移植到半横贯损伤的鼠脊髓中 (T₇ 平面). 14 个月后, 通过 RT-PCR 技术鉴定成纤维细胞仍能表达 NGF, 电镜及免疫组化 (GFAP、CHAT、TH、5-HT 和 CGRP) 检查发现有大量的脊髓轴突再生 (感觉纤维). Tuszynski 将导入 NGF 基因的 SC 细胞移植到损伤的脊髓内, 发现 SC 在体内能稳定地表达 NGF 并促进轴突的再生, 证明 SC 细胞表达用以调节外周神经元轴突再生和成鞘的信号, 同样也可被中枢神经系统的神经元所识别^[5]. Grill 等^[6]将成年大鼠背侧的双侧椎板实行半切除, 并将损伤处抽吸出 3~4mm 的空腔, 造成脊髓慢性损伤模型. 术后 1~3 个月, 将可分泌 NGF 的成纤维细胞移植到损伤处. 移植 3~5 个月后电镜、免疫组化显示壳状蓝核和感觉神

经元的轴突都穿过移植物发生了稠密的生长. Grill等^[7]还将可分别分泌 NGF 和 NT-3 的成纤维细胞移植到急性脊髓损伤模型的大鼠损伤处, NGF 治疗组除了可以观察到同上一样的结果, 还可看到前脚壳状运动神经元轴突的生长. NT-3 治疗组则被发现可以促进皮质脊髓束的运动神经元的生长. Kim 等^[8]用重物下落的方法导致 T₈ 椎板切开术的暴露区发生脊髓挫伤, 形成暂时性截瘫模型, 用可分泌 NGF、BDNF 的成纤维细胞移植, 6 周后可见大鼠的运动能力恢复较单纯成纤维细胞移植组快.

4 其他细胞因子基因治疗 SCI 举例

除了大部分 NTF 基因治疗 SCI 的实例以外, 还有一些尝试用其他细胞因子基因治疗 SCI 病症的例子. 如: 将白血病细胞抑制因子 (LIF) 基因修饰的成纤维细胞移植到成年大鼠 CNS 损伤侧, 2 周后大鼠皮质脊髓束神经细胞轴突有显著增长, 且伴有 NT-3、BDNF、GDNF、CNTF 的分泌增加. 提示 LIF 能直接和间接地调节成年脊髓损伤后的分子和细胞反应向好的方向进行^[9]; 将抗细胞凋亡 bcl-2 基因质粒直接注射到 SD 大鼠 T₈ 半横切损伤部位 (Clarke's 核团轴突被切断), 术后 2 个月, 未经基因治疗的对照组的损伤处 85% 的神经细胞萎缩或死亡, 存活的仅占 15%, 而基因治疗组则有 61% 的细胞得以存活. 提示 bcl-2 基因可以对 SCI 造成的神经细胞退化性死亡进行部分保护, 将细胞萎缩降低到最小程度^[10].

5 SCI 基因治疗中存在的问题和发展前景

基因转移技术治疗 SCI 目前尚处于实验探索阶段, 还存在一些尚待解决的问题. 第一, 宿主对移植细胞的免疫排斥反应. 神经系统的免疫特异性是相对的, 令神经系统产生免疫应答的能力主要取决于移植的技术和植入细胞的某些生物学特性. 一般尽量选择自体工程细胞作为移植细胞, 也可采用免疫隔离法即使用微囊包膜 (microencapsulat) 的工程细胞进行移植. 移植抗原较强或种属相关较远的细胞, 应同时给予免疫抑制手段辅助治疗. 传统抑制剂环孢素 A 的免疫抑制作用是非特异性的, 长期运用对机体有很大的毒副作用, 所以无法与人的基因治疗连用. 据报道采用细胞因子加 CTLA4-Ig 阻断共刺激信号的传导方法进行免疫抑制有较好的作用, 但是人体的神经免疫-内分泌系统是一个相当复杂的网络, 有些细胞因子本身对神经元的生长

也发生作用, 所以应全面观察结果, 给出综合评价. 第二, 基因工程细胞移植方法由于是 *ex vivo* 方式, 总免不了会带来免疫排斥的问题, 所以 *in vivo* 的方式是最理想的, 但是如前所述病毒载体毒性蛋白基因的去留, 安全包装细胞体系的建立, 及目的基因体内表达的长久性、可控性是问题的关键. 第三, 移植细胞在宿主内存活的长期性. 由于脊髓损伤, 局部组织会发生一定病理反应, 可能会对移植细胞的生存不利. 反过来, 如果移植细胞的体积较大, 也可能对宿主组织及细胞产生机械性挤压, 从而影响其结构与功能的完整性. 因此, 建议使用微移植 (micro-transplantation) 技术, 提高细胞密度, 减小对宿主的创伤.

总之, SCI 基因治疗虽然目前仍停留在实验室阶段, 但却不可否认的具有临床应用的前景, 尤其基因治疗手段的不断提高为这种前景奠定了基础. 可以预见, 脊髓截瘫病人重新站起来的愿望将有可能成为现实.

参 考 文 献

- 1 侍 坚, 何小龙, 王成海, 等. 神经营养素-4 基因工程细胞的构建. 中国神经科学杂志, 1998, 14 (3): 134~ 139
Shi J, He X L, Wang C H, *et al.* Chin J Neurosci, 1998, 14 (30): 134~ 139
- 2 Montgomery C T, Tenaglia E A, Robson J A. Axonal growth into tubes implanted within lesions in the spinal cords of adult rats. *Experimental Neurology*, 1996, 137: 277~ 290
- 3 Li Y, Field P M, Raisman G, *et al.* Repair of adult rat corticospinal tract by transplants of olfactory ensheathing cells. *Science*, 1997, 277 (9): 2000~ 2002
- 4 Zhang Y, Dijkhuizen P A, Anderson P N, *et al.* NT-3 delivered by an adenoviral vector induces injured dorsal root axons to regenerate into the spinal cord of adult rats. *J Neurosci Res*, 1998, 54: 554~ 562
- 5 Weidner N, Blesch A, Grill R J, *et al.* Nerve growth factor-hypersecreting Schwann cell grafts augment and guide spinal cord axonal growth and remyelinate central nervous system axons in a phenotypically appropriate manner that correlates with expression of L1. *J Comp Neurol*, 1999, 413 (4): 495~ 506
- 6 Grill R G, Blesch A, Tuszynski M H. Robust growth of chronically injured spinal cord axons induced by grafts of genetically modified NGF-secreting cells. *Exp Neurol*, 1997, 148: 444~ 452
- 7 Grill R G, Blesch A, Gage F H, *et al.* Grafts of cells genetically modified to produce Nt-3 promote corticospinal axon sprouting after spinal cord injury. *Soc Neurosci Abs*, 1996, 22: 1211
- 8 Kim D H, Gutin P H, Noble L J, *et al.* Treatment with genetically engineered fibroblasts producing NGF or BDNF can accelerate recovery from traumatic spinal cord injury in the adult

- rat. Neuro Report, 1996, 7: 2221~ 2225
- 9 Blesch A, Uy H S, Grill R J. Leukemia inhibitory factor augments neurotrophin expression and corticospinal axon growth after adult CNS injury. J Neurosci, 1999, 19 (9): 3556~ 3566
- 10 Takahashi K, Schwarz E, Ljubetic C, *et al.* DNA plasmid that codes for human Bcl-2 gene preserves axotomized Clarke's nucleus neurons and reduces atrophy after spinal cord hemisection in adult rats. J Comp Neurol, 1999, 404 (2): 159~ 171

Gene Therapy of Spinal Cord Injury

ZHU Wei²⁾, SHI Jian^{1)*}

¹⁾Department of Neurobiology, Shanghai Second Medical University, Shanghai 200025, China;

²⁾Naval Medical Institute, Shanghai 200433, China)

Abstract Gene therapy of spinal cord injury (SCI) is the most promising method compared with the others, because it doesn't involve the problems of resource and higher exclusion which respectively exists in fetal nerve transplantation and peripheral nerve transplantation. There are two ways of gene therapy to be chosen: one is to transfer objective genes to the target-cells *in vivo* directly; the other is to transfer objective genes to one proper kind of transplantable cells firstly, then graft the highest expressing cells to the target-cells *in vivo*. To realize the transfer of genes to cells, two measures are used in common: physical or chemical measure such as micro-infection *et al* and biochemical measure i. e. gene modified defective virus. Although there are some questions unresolved in this field, the clinical value of gene therapy of SCI in the future is depended.

Key words spinal cord injury (SCI), neurotrophic factor (NTF), gene therapy

* Corresponding author. Tel: 86-21-63846590-48, E-mail: shijiank@online.sh.cn

Received: December 11, 1999 Accepted: February 26, 2000