

BMP 系列基因治疗骨缺损的实验研究进展

刘 芳 综述 唐学阳 刘利君 审校

基因治疗代表当前医学发展的前沿,全球有很多临床试验正在探索研究疾病的基因疗法。基因治疗在骨修复重建中的应用也在进行积极探索。目前自体骨移植被认为是治疗骨不连、骨缺损等的金标准,但是自体骨移植应用有局限性,如骨量有限致取材有限,取材部位的疼痛、感觉异常、感染等。随着分子生物学的发展,生长因子在骨折愈合中的骨诱导作用逐渐被认识。人工合成骨生长因子被证实可加快骨愈合,但长期疗效不明确,且不具有足够的骨诱导作用。基因治疗可能是解决上述问题的新途径,特别是应用具有诱导成骨作用的骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)的基因治疗。

一、基因治疗的相关原理及概况

基因治疗就是通过传送目标基因至靶细胞并使其表达,从而改变靶细胞的生理功能或病理状态。基因治疗过程包括四步:转导,转录,翻译,表达。基因转移是基因治疗的关键,而基因载体的构建和转移的途径则是基因转移的关键。

1. 基因载体:基因转导就是把目标基因导入靶细胞并能随着靶细胞的复制而复制,并成功表达外源性基因,从而达到长时间的治疗作用。基因治疗利用载体来实现基因转导。基因载体分为病毒载体和非病毒载体。常用的病毒载体包括腺病毒载体,腺病毒伴随载体,逆转录病毒载体,疱疹病毒载体等。病毒载体的优点在于外源性基因能高滴度长时间表达;可以转导至多种类型细胞,包括分裂期以及非分裂期的细胞。缺点主要是病毒载体转基因的表达持续时间相对于非病毒载体来说更长,而长时间的基因表达存在安全隐患;另一方面,病毒载体随着目标基因的表达病毒基因的蛋白也在表达,易引起免疫反应,降低基因的转导效率及表达持续时间和滴度^[1];还有转基因的插入可能会导致病毒发生

不可预计及不可控制的基因突变。鉴于病毒载体诸多弊端,非病毒载体的逐渐获得大家的重视^[2]。常用的非病毒载体包括:裸露 DNA,脂质体,质粒, DNA 聚合物,分子轭合物等。非病毒载体的优点在于不易引起机体的免疫反应,化学稳定性强,易贮存。由于基因转染至宿主细胞细胞质中,不能整合到宿主细胞基因组,不能随着宿主细胞的增殖而增殖,故基因持续表达时间有限。因此越来越多的试验致力于研究如何提高非病毒载体的转导效率并使之达到病毒载体的转导效率水平^[3],如局部反复多次直接注射^[4]或联合应用显微注射^[5]、高压注射^[5]、电穿孔术^[6]、超声声裂法^[2]均可以促进基因的转染。其中尤其是联合超声微泡技术,集合了非病毒载体及超声声裂法,安全性高,转染效率高,适合应用于体内途径^[2],是目前非病毒载体研究热点。总之基因载体的选择有赖于基因治疗应用的目的和途径(如体内途径或体外途径),基因表达需要持续的时间,基因治疗部位以及所需治疗机体的状态。

2. 基因转移途径:把靶基因传输到宿主细胞可通过 2 种途径:①体外用目标基因转染特定细胞,然后把被转染的细胞植入宿主体内;②体内直接注射含目标基因的载体,从而直接转染宿主细胞。体外转导途径的优点有:①拟转导靶细胞具有可选择性,如骨髓基质细胞,成骨细胞,肌原细胞等,不同疾病选择不同靶细胞;②转导效率高;③只需要一个侵入性操作即可达到预期临床效果;④使那些在体内原位增殖低而在体外能大量增殖的细胞的应用成为可能,如骨髓基质细胞,滑膜细胞,软骨细胞等。体外途径转导缺点有:过程繁琐,需要从体内获取靶细胞;需要特殊的技术支持,并进行靶细胞的增殖;体外细胞培养技术要求高,费用高,因此成本效益较低。体内途径步骤简单,技术要求相对低,花费少。但是体内途径转染缺少靶向性,而且转导效率低,主要受限于所注射载体的局部扩散性以及机体对外源蛋白的免疫排斥性。病毒载体介导的体内途径,由于其病毒蛋白产生易引起免疫反应,还面临着病毒

doi:10.3969/j.issn.1671-6353.2012.06.025

作者单位:四川大学华西临床医学院华西医院小儿外科(四川省成都市,610041),E-mail:liufang_sa@sina.com,通讯作者:唐学阳,E-mail:tangxueyang100@163.com,本研究受国家自然科学基金项目(编号 81071475)资助。

变异及继发致病风险,从而应用受限。因此非病毒载体介导的体内途径基因治疗正日渐备受关注,如超声微泡技术介导体内途径基因治疗^[2]。

二、BMP 概述

BMP 是一类糖多肽蛋白,由 Urist 于 1965 年从骨基质分离出来,因最先发现其骨诱导作用从而被命名为骨形态发生蛋白。现已发现 BMP 家族至少有 40 多个成员^[7]。除 BMP-1 外,BMPs 均属于转化生长因子- β (transforming growth factor β , TGF- β) 超家族的一员,是一组具有高度保守序列的功能蛋白,不同种族的 BMP 具有高度一致性。BMP 家族又根据各亚型之间结构序列的相近性分为五个亚家族^[7]。

现有研究表明,BMP 家族不仅具有骨诱导作用,而且涉及胚胎学、发育学、基因学、进化学等多种学科以及与肾脏、肠道、心脏等器官某些疾病的发生息息相关。BMP 基因治疗目前主要在骨缺损修复重建、脊柱融合、颌面骨及牙齿修复、肌腱韧带生成与修复、骨质疏松治疗、骨坏死治疗等方面进行探索性研究^[8-15]。

三、BMP 系列基因在治疗骨缺损中的研究进展

自从 Wozney 等于 1998 年克隆出 BMP 的 DNA 以来,现已重组出多种人重组骨形态发生蛋白(rh BMP)。虽然研究表明直接应用 rh BMP 可以诱导骨形成,但是小剂量的 rh BMP 骨诱导作用有限,不能形成持续足够的骨诱导作用。BMP 基因治疗正是解决这一问题的的重要途径。

1. BMP 系列基因单基因疗法在治疗骨缺损中的应用: BMP 单基因治疗在不同的动物模型中获得了令人振奋的结果。Long^[10]等取日本家兔骨髓间充质干细胞(MSCs)体外培养增殖,并用 Ad-BMP-2 转染,家兔右侧下颌骨切开牵张成骨模型随机分 A 组(牵张速率 0.8 mm/d,无干预措施)、B 组(牵张速率 2.4 mm/d,缺损处注射 Ad-MSCs)、C 组(牵张速率 2.4 mm/d,缺损处注射 Ad-BMP2-MSCs),4 周后影像学显示 C 组骨量生成及骨小梁厚度等优于 A 组,而 B 组无明显成骨,且 C 组新生骨生物力学相关参数检测均优于 A 组,而 8 周后影像学显示除骨小梁数目和骨皮质强度外,A 组与 C 组之间的影像学及生物力学相关参数间差异无统计学意义,实验证明局部基因治疗可以表达大量骨形态发生蛋白,并能大大促进骨生成,短期体外自体细胞培养应用于基因治疗是可行的,该实验也证明了 BMP-2 基因治疗所形成的新骨组织的特性优于自

身成骨。BMP-2 基因治疗应用于家兔的脊柱融合模型、山羊胫骨骨缺损模型、小猎犬股骨缺损模型也验证了其成骨活性^[16-18]。此外,BMP-4、BMP-6、BMP-7 以及 BMP-9 也被用于局部基因治疗研究,并成功诱导骨形成^[19-21,6]。BMP 单基因治疗的体内途径也是可行的。Betz 等^[22]证明直接在体内骨缺损处注射携带有 BMP-2 基因的腺病毒载体,BMP-2 基因成功表达,骨缺损得以修复。而 Kimelman Bleich^[6]等体内利用电穿孔术向小鼠股骨骨不连处直接注射含 BMP-9 基因质粒后 3 周,影像学显示骨连接形成,证实非病毒载体体内途径的可行性。综上所述,BMP 单基因治疗可以促进骨生成修复,形成骨连接,修复骨缺损。

2. 多基因联合应用: 众多研究证明不仅单个 BMP 基因治疗能有效诱导骨形成,不同种 BMP 基因联合或者 BMP 基因与其他生长因子联合应用也可能是骨形成的有效启动因子。实验证实 BMP-2/7^[23],BMP-4/7^[24] 异二聚体相较于 BMP-2,BMP-4,BMP-7 的各自同源二聚体有更强的骨诱导活性。Shi S 等^[25]体外培养兔子关节软骨细胞,用含有 Ad-BMP2-BMP-7-IGF1 转染关节软骨细胞,相对于单个基因治疗组,关节软骨细胞表现出更多蛋白多糖及 II 型胶原合成。Fang 等^[26]分别用只含有 PTH1-34 片段的质粒、只含 BMP-4 基因的质粒与同时含有 PTH1-34 片段和 BMP-4 基因的质粒直接注射到兔股骨缺损部位,转染成纤维细胞,结果显示注射含 2 种基因的质粒组 4 周后股骨缺损显示骨连接,而注射只含一种基因的质粒组 9 周后股骨缺损才获得骨连接。Li 等^[27]利用 BMP-4 基因联合 TGF- β 1 修复火器伤致家兔股骨骨折,也得到了类似的结果。Cui 等用 BMP-6 联合 VEGF 基因转染鼠骨祖细胞,相较于单个基因转染,碱性磷酸酶活性及矿物质沉积等优于单个基因转染^[28]。实验证明,多基因联合应用治疗诱导骨形成优于单基因诱导成骨效果。

3. BMPs 基因治疗联合生物材料载体: 骨缺损修复重建的基因治疗中,载体运载 BMPs 基因进行转导,联合应用生物材料载体可以减少带菌体扩散,而且提供骨诱导基质促进骨诱导作用^[29],还可以减少机体对腺病毒载体的免疫反应^[30]。BMP 生物材料载体大体可分为四类^[29]: ①天然材料,如胶原,透明质酸,纤维蛋白,海藻酸盐,琼脂糖等; ②无机材料,如磷酸钙 TCP (tricalcium phosphate, TCP),硫酸钙,生物玻璃等; ③合成材料,如聚乳酸 (polylactic acid, PLA),聚乙醇酸 (polyglycolic acid, PGA);

④复合材料,即上述材料的联合使用。。一般认为较理想的 BMP 生物材料应具备以下条件^[29]:无细胞毒性;无免疫原性或很低;可进行生物降解并在相对较短的时间内被新生骨组织替代;较易制备或购买;有一定的结构并可起骨缺损区的支架作用;与 BMPs 复合时,复合方法简便有效且不影响 BMPs 的生物活性;易消毒、储备。为了增强 BMPs 骨诱导作用,许多学者也在探索 BMP 系列基因及其产物与两种或两种以上材料的复合^[29],如 BMPs 或其基因与透明质酸(hyaluronic acid,HA)胶原复合,BMPs 与 β -TCP^[31](beta-tricalcium phosphate, β -TCP,BMPs 或其基因与 HA、纤维蛋白、不溶性非胶原蛋白复合,BMPs 或其基因与脱钙骨基质颗粒、骨水泥复合等。虽然生物材料联合 BMPs 基因治疗可促进骨诱导作用,但生物材料的药理学、毒理学及安全性尚待验证,不同生物材料载体之间的效应对照研究也需进行,而且目前 BMPs 基因治疗联合生物材料的研究中 BMPs 剂量都偏大,甚至是正常人体含量的 1 000 倍,高剂量的 BMPs 会给人体带来怎样的生理病理效应目前尚不明确,因此无毒,安全,无免疫原性,减少 BMPs 剂量等应是生物材料载体开发时需重点考虑的。

四、BMP 系列基因在治疗骨缺损中的现存问题

1. 病毒载体的免疫原性:病毒载体本身的基因组会随着所载目的基因的表达而表达,而生成的这些外源性的病毒蛋白易引起机体免疫反应,进而降低基因的转导效率,骨诱导作用减弱。制作病毒载体时转基因的插入可能使病毒发生基因突变。腺病毒伴随载体由于完全去除腺病毒基因组,改良了病毒载体的免疫原性,同时也避免了插入致使基因突变等风险^[32],但是腺病毒伴随载体不易生产,而且携带基因能力减弱,转导效率也相对降低,只能转导非分裂期细胞^[33]。Okubo^[34]等利用环磷酸胺使机体形成暂时的免疫抑制状态,减弱了注射携带 BMPs 基因的腺病毒载体后机体的免疫反应,获得了较满意的基因的转导效率及骨诱导作用的持续,但是此方法应用于人体的利弊有待权衡。非病毒载体不会引起机体免疫反应,但是基因转导效率相对较低,但如能够同时应用辅助技术提高基因转导效率,如超声微泡技术,则可使非病毒载体的基因转导率得到提高,同时也避免了载体的免疫源性,是相对较理想的载体。

2. BMPs 基因表达的控制:目前的研究中绝大部分都在探索如何提高基因转导效率并高滴度表达

BMPs,但是也应需要注意 BMPs 基因持续高滴度表达所带来的后果,如过量的骨生成,潜在的致癌作用等。有实验研究证明 BMP 基因构建如 pcDNA3.1 载体后转染入真核细胞中,能在细胞内表达目的基因的同时,不进入细胞染色体组,目的基因表达 2 周左右后消失,一定程度上可防止过度表达^[35,36]。控制 BMPs 基因的过度表达也可能通过利用一些诱导启动子,即通过使用无活性的物质实现基因表达的外源性调控。

五、展望

对于骨缺损来说,现有的治疗手段尚不能获得令人满意的效果,基因治疗的出现为骨缺损修复带来了新的思路与方向,特别是应用具有诱导成骨作用的 BMPs 的基因治疗。虽然 BMPs 基因治疗在啮齿类动物及灵长类动物实验中均有研究并得到了令人振奋的结果,但是不同 BMP 基因之间、BMP 基因协同其他生长因子之间的骨诱导作用缺乏随机对照研究。因此尚不能确定对于不同部位及不同类型骨缺损的局部基因治疗最适宜的基因种类、剂量、治疗途径和方法、合理的载体等。病毒载体的免疫原性及单纯非病毒载体的低转导率,将使无毒高效的基因载体研究成为研究重点,目前物理技术联合非病毒载体介导 BMP 基因治疗,尤其是超声微泡联合 BMPs 基因治疗骨缺损更是目前研究的热点。BMPs 基因表达调控,即持续多长时间既能修复骨缺损,又避免骨的过量生成,BMPs 基因及其他生长因子、联合生物材料的药理学以及毒理学,辅助性技术如超声微泡技术的安全性等,这些问题都有待于进一步的实验研究。骨缺损作为一个非致死性疾病,在人体中应用基因治疗时应充分考虑其安全性,任何会增加致死率或致残率均会使 BMPs 基因治疗应用于人体受限。目前,BMP 基因疗法在治疗骨缺损的动物实验研究中成效显著,虽然在应用于人体之前必要的对照实验研究以及临床试验尚需继续进行,但是,相信随着生物技术的进步及其他相关学科的发展,基因载体的改进,BMP 基因疗法在骨缺损的治疗中将发挥越来越重要的作用,是有前景有希望的治疗手段。

参考文献

- 1 Xu X, Dai K, Tang T. An immunological study on adenovirus mediated human bone morphogenetic protein 2 gene therapy[J]. Chinese Journal of Reparative & Reconstructive Sur-

- gery, 2005, 19(8):635-638.
- 2 Pathak A, Patnaik S, Gupta KC. Recent trends in non-viral vector-mediated gene delivery [J]. *Biotechnology J*, 2009, 4:1559-1572.
- 3 Douglas KL. Toward development of artificial viruses for gene therapy: a comparative evaluation of viral and non-viral transfection[J]. *J Biotechnology Progress*, 2008, 24(4): 871-883.
- 4 Osawa K, Okubo Y, Nakao K, et al. Osteoinduction by repeat plasmid injection of human bone morphogenetic protein-2[J]. *Journal of Gene Medicine*, 2010, 12(12):937-944.
- 5 Wells DJ. Gene therapy progress and prospects; electroporation and other physical methods[J]. *Gene Therapy*, 2004, 11(8): 1363-1369.
- 6 Kimelman-Bleich N, Pelled G, Zilberman Y, et al. Targeted gene-and-host progenitor cell therapy for nonunion bone fracture repair[J]. *Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy*, 2011, 19(1):53-59.
- 7 S. J. E. Matthews, Biological activity of bone morphogenetic proteins (BMPs) Injury [J]. *J Care Injured*, 2005, 36S: S34-S37.
- 8 Wang JC. Gene therapy for spinal fusion[J]. *Spine Journal: Official Journal of the North American Spine Society*, 2011, 11(6):557-559.
- 9 王敏, 程政, 姚天华, 等. 人骨形态发生蛋白 2 基因治疗大鼠牙槽骨缺损的实验研究[J]. *陕西医学杂志*, 2010(2): 131-133, 139.
- 10 Long J, Li P, Du HM, et al. Effects of bone morphogenetic protein 2 gene therapy on new bone formation during mandibular distraction osteogenesis at rapid rate in rabbits [J]. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology & Endodontics*, 2011, 112(1):50-57.
- 11 Betz O, Ochsner PE, Liu F, et al. Ex vivo adenoviral transfer of bone morphogenetic protein 12 (BMP-12) cDNA improves Achilles tendon healing in a rat model[J]. *Gene Therapy*, 2008, 15(16):1139-1146.
- 12 Wang CJ, Weng LH, Hsu SL, et al. pCMV-BMP-2-transfected cell-mediated gene therapy in anterior cruciate ligament reconstruction in rabbits[J]. *Arthroscopy*, 2010, 26(7):968-976.
- 13 司晓辉, 杨连君, 冯志军, 等. 骨形成蛋白介导的基因治疗研究进展[J]. *北京生物医学工程*, 2011, 30(4): 425-430.
- 14 Tang Y, Tang W, Lin Y, et al. Combination of bone tissue engineering and BMP-2 gene transfection promotes bone healing in osteoporotic rats[J]. *Cell Biology International*, 2008, 32(9):1150-1157.
- 15 Cui Q, Botchwey EA. Emerging ideas: treatment of pre-collapse osteonecrosis using stem cells and growth factors[J]. *Clinical Orthopaedics & Related Research*, 2011, 469(9):2665-2669.
- 16 Olabisi R, M, Lazard Z, Heggeness MH, et al. An injectable method for noninvasive spine fusion[J]. *Spine Journal: Official Journal of the North American Spine Society*, 2011, 11(6):545-556.
- 17 Xu XL, Tang TT, Zhu ZA, et al. Zhang XL Repairing of goat tibial bone defects with BMP-2 gene-modified tissue-engineered bone[J]. *Calcified Tissue International*, 2005, 77(1):55-61.
- 18 Yan MN, Tang TT, Zhu ZA, et al. Effects of bone morphogenetic protein-2 gene therapy on the bone-implant interface: an experimental study with dogs[J]. *Chinese Medical Journal*. 2005, 85(22):1521-1525.
- 19 Chen JC, Winn SR, Gong X, et al. rhBMP-4 gene therapy in a juvenile canine alveolar defect model[J]. *Plastic & Reconstructive Surgery*, 2007, 120(6):1503-1509.
- 20 Menendez MI, Clark DJ, Carlton M, et al. Direct delayed human adenoviral BMP-2 or BMP-6 gene therapy for bone and cartilage regeneration in a pony osteochondral model [J]. *Osteoarthritis & Cartilage*, 2011, 19(8):1066-1075.
- 21 Krocze A, Park J, Birkholz T, et al. Effects of osteoinduction on bone regeneration in distraction: results of a pilot study [J]. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 2010, 38(5):334-344.
- 22 Betz OB, Betz VM, Nazarian A, et al. Delayed administration of adenoviral BMP-2 vector improves the formation of bone in osseous defects[J]. *Gene Therapy*, 2007, 14:1039-1044.
- 23 Koh JT, Zhao Z, Wang Z, et al. Combinatorial gene therapy with BMP2/7 enhances cranial bone regeneration[J]. *J Dent Res*, 2008, 87: 845-849.
- 24 Zhao M, Zhao Z, Koh JT, et al. Combinatorial gene therapy for bone regeneration: cooperative interactions between adenovirus vectors expressing bone morphogenetic proteins 2, 4, and 7[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2005, 95(1):1-16.
- 25 Shi S, Mercer S, Eckert G. J, et al. Regulation of articular chondrocyte aggrecan and collagen gene expression by multiple growth factor gene transfer[J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2012, 30(7):1026-1031.
- 26 Fang J, Zhu Y, Smiley E, et al: Stimulation of new bone by direct transfer of osteo-genic plasmid genes[J]. *Science USA*, 1996, 93:5753-5758.
- 27 Li BC, Zhang JJ, Xu C, et al. Treatment of rabbit femoral defect by ? re-arm with BMP- (下转第 478 页)