

血小板衍生化生长因子的基因治疗进展

陈曦 谭谦

血小板衍生化生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 是较早被人们认识的一种多肽生长因子,最早由 Balk 在实验中偶然发现,由 Ross 和 Kehler 等证实。PDGF 与创伤修复有十分密切的关系,直接或间接地参与炎症反应、细胞增殖等修复的全过程。对 PDGF 的研究已有二十余年,大致可分 3 个阶段:第 1 阶段:1974~1985 年,发现并基本弄清 PDGF 及其受体的结构、性质及作用机制。第 2 阶段 1986~1992 年,研究提纯或重组 PDGF 在急性、正常和病理性创面的应用。第 3 阶段:1993 年以后,在体内外通过病毒载体或其他物理化学方法,将 PDGF 转入真核细胞,促进创面愈合。

应用基因工程技术,重组人 PDGF 可较为容易地生产出来,经实验及临床研究证实其有促进创面愈合的作用,但仍存在许多缺点:生物半衰期短、易被创面中的蛋白酶灭活、赋予剂型后生物利用度下降、每日需多次使用、在创面的释放不是生理持续性而是间断的。因此,为了寻找一种更加有效的方法,遂开展了基因治疗。PDGF 的基因治疗开展较早,所涉及的靶器官有皮肤、韧带、骨组织、动脉内膜、消化道粘膜、牙周组织等,转染方法分病毒和非病毒两大类,下面按不同靶器官和转染方法分别叙述如下。

一、PDGF 基因治疗的靶器官或组织

1. 皮肤:皮肤是 PDGF 最主要的靶器官。Eming 等^[1]将转染人 PDGF-A 基因的角质细胞体外培养形成皮片后,植入裸鼠去全层皮肤创面上,7 d 后皮片下方结缔组织平均增加 68%,并出现新生血管。随后他又将该转染的角质细胞种植于由冷冻尸体皮制成的脱细胞真皮上,形成复合皮肤移植物,移植到裸鼠创面,7 d 后移植物表面形成分层分化的表皮,真皮内有宿主毛细血管长入,鼠 V 型胶原明显增多,且转染后可有效抑制创面收缩,如第 28 天时,PDGF-A 组创面收缩率仅为 19%,而对照组收缩率达到 51%^[2]。由此提示转染的角质细胞能显著加快并提高愈合质量,尤其在脱细胞真皮支架上,且能有效诱导血管形成。

Breitbart 等^[3]将 PDGF-B 基因转入鼠成纤维细胞,再种植到可吸收的聚乙醇酸支架上,治疗后第 7、14 天与对照组相比,成纤维细胞明显增多。他还 将 PDGF-B 转入兔的真皮成纤维细胞用于兔耳缺血创面的治疗中,10 d 后见肉芽组织量较其它组明显增多^[4]。Machens 等研究了转染 PDGF-AA 的鼠成纤维细胞对上腹部岛状皮瓣的作用,观察到实验组皮瓣局部 PDGF-A 浓度超过对照组,血管形成早,能更好地耐受断蒂手术。此外,Chandler 等^[5]制备编码有 PDGF-B 基因的腺病毒载体 (AdPDGF-B),但并不在体外转染到靶细胞,而将其种于胶原膜片,这种胶原膜片不但能将病毒载体固定于创面,而且创面中的修复细胞可以向其内空隙生长。进一步研究显示,含有 AdPDGF-B 的胶原膜片可使创面肉芽组织增加 3~4 倍。对于缺血创面,AdPDGF-B 胶原膜片使肉芽组织增加 13 倍,上皮面积增加 6 倍,远期观察未见创面收缩^[6]。可见创面的主要修复细胞—角质细胞和成纤维细胞均是良好的基因转染靶细胞,而在给予支架物的条件下,创面愈合质量可大大提高。

2. 韧带:Woo 等人的研究结果显示,在各种生长因子中,PDGF-B 和 EGF 对韧带成纤维细胞的促增殖的作用最强,给予高剂量 PDGF 组较低剂量组其组织抗拉力性更强,提示 PDGF 可能是一种能够提高韧带愈合质量的生长因子。Menetrey 等^[7]用带有 LacZ 基因的腺病毒转染兔前交叉韧带的成肌细胞和成纤维细胞,在注射后的 4、7、14、21 d 均可在韧带及滑液中观察到转染成功的成肌细胞和成纤维细胞,且转染的成肌细胞能合成肌管。Nakamura 等^[8]用包裹了 PDGF-BcDNA 的 HVJ-脂质体直接注入 Wistar 大鼠损伤的髌韧带中,转染 4 周后,髌韧带中 PDGF 的表达增强,使创面血管生成增多,胶原沉积加快。

3. 骨组织:PDGF 是骨组织中广泛存在的促细胞分裂因子,刺激成骨细胞增殖和骨胶原沉积。PDGF-AA 是成骨细胞的自分泌生长因子,而 PDGF-BB 一般不表达,但在创伤刺激时和转化生长因子 (TGF- β)、碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 的诱导

下可使 PDGF-B 基因开放表达,从而产生强的促增殖作用。如将 PDGF-B 应用于骨缺损,或通过基因转染将 PDGF-B 转入成骨细胞中,可能对骨组织修复有良好的促进作用。

Lee 等^[9]将三磷酸钙制成海绵样载体,浸泡于含 PDGF-BB 的溶液中,使其携带较多的 PDGF-BB,再移植到大鼠颅盖骨的缺损中,可见颅骨愈合明显增快。Park 等人将硫酸软骨素制成海绵样载体,也得到了同样的结果。Jason 等^[12]人对骨的基因治疗作了初步研究,他在大鼠颞骨创伤的模型上,通过逆转录病毒将 β -牛乳糖标志基因转入骨组织中,经显色后观察到 β -牛乳糖在骨切开处及周边有长达 10 d 的稳定表达。这提示今后可将骨源性或血管源性的生长因子如 PDGF 转入,以加速骨组织的修复。

4. 血管内膜:对血管内膜进行 PDGF 的基因治疗开展最早。Pompili 将 PDGF-B 基因转染入猪损伤后动脉内,观察到 PDGF-B 的表达与猪内膜形成直接相关,第 2 天即可见平滑肌细胞的增生,在第 7 天达到高峰,细胞外基质的沉积和前胶原的合成也表现相应变化。在转染后 4~21 d 中,转染组内膜较对照组增厚 3~10 倍。与此相对应, Deguchi 等^[14]将 PDGF- β 受体通过腺病毒转染入大鼠颈动脉,见新内膜形成明显受到抑制。这一实验有力提示 PDGF 在动脉内膜的修复中起着重要的作用。

5. 其他组织:PDGF 是间叶来源细胞的重要分裂源和趋化因子,起作用的组织十分广泛。Sazbo 等^[12]用裸露的 PDGF 和 VEGF 的 DNA 片段或以腺病毒为载体对鼠乙胺诱导的大鼠结肠溃疡进行治疗,结果显示其能够显著地促进慢性结肠溃疡的愈合。Giannobile 等^[13]以腺病毒为载体将 PDGF-A 转入成牙骨质细胞,结果 DNA 合成及随后的增殖程度大于或等于使用重组 PDGF 组。Imanishil 等^[14]观察到,研究发现 PDGF 能够促进角膜上皮细胞、内皮细胞的增生并诱导迁移,对角膜的愈合及维持透明度有十分重要的作用。

二、转染方法

目前常用的转染方法可分为病毒转染和非病毒转染两类。病毒转染较为常用,具有高转移率和靶向性好的优点。非病毒的物理化学方法具有相对安全、毒性低的优点,但往往转移率达不到要求。

1. 病毒:在哺乳动物细胞基因转染中逆转录病毒(retrovirus, RV)是最为常用的。Eming 等^[1,2]以 RV 为载体将 PDGF-A 转入,以 α -珠蛋白(α -globin)和巨细胞病毒为启动子,以 ψ -CRIP 为包装细胞系,

角肌细胞的感染率大约在 50%。Breitbart 等^[3,4]将以人脐静脉内皮细胞 RNA 为模板复制人 PDGF-B 的 cDNA 片段,插入逆转录病毒中,以 CMV 为启动子,以 PA317 细胞为包装细胞,成功感染到 SD 大鼠的真皮成纤维细胞。痘苗病毒(vaccinia virus, VV)已广泛应用于免疫接种,临床上使用较为安全。Norton 等人在牛痘病毒血凝素位点转入 PDGF-BB 基因,事先用补骨脂素和长波长的紫外线照射使该病毒高效地感染细胞,转染后 5 d 内 PDGF 可在局部高浓度表达而对细胞无任何损伤。

病毒载体的转染率均较高,大多可达 90% 以上;逆转录病毒最为常用,但只能感染增殖的靶细胞,对非分裂期细胞不敏感;容纳 DNA 片段较小;有重组成野生型病毒的可能,对人体有一定危险性。腺病毒可感染多种类型细胞,其外源基因以附加型方式表达,遗传毒性较低、较安全。VV 承载容量大,可携带长度达 40 kb 的外源 DNA 片段,可在同一或不同的区域插入,因此可考虑同时插入多种生长因子的基因,可能更有助于创伤的愈合。

2. 粒子轰击:粒子轰击的基本原理是将外源 DNA 用金属包被,在电场中获得高速度以穿入受体细胞、组织或器官中,实现基因转移。其缺点是转移基因多为短暂表达不稳定。Eming 等^[16]人在 1999 年尝试了粒子轰击的方法。他在 MFG 质粒上将 PDGF-A、PDGF-B、PDGF-B211 3 段基因分别插入,将所得到的质粒用直径为 0.95 μ m 的金颗粒包裹,无水乙醇洗涤处理后,用基因枪以 800 psi 的压力打入大鼠创面,在这种条件下可使得粒子刚好聚集于表皮和真皮交界处,少量处于真皮中,这样角质细胞即成为主要被转染细胞。研究表明,PDGF 的表达在转染后前 3 d 内较高,第 5 天时测不到。在第 7、14 天创面强度明显增加,与对照组相比分别增加 3.5 倍和 1.5 倍。

3. 脂质体融合法:脂质体法目前应用较为广泛,其基本原理是双层磷脂膜包装外源 DNA,以超声波等方法处理受体细胞,使外源 DNA 进入靶细胞。它具有制备简单、不易被核酸酶降解、转染率相对较高等优点。Meuli 等^[17]的研究表明,局部直接注射较经血管注射的方法更易聚集在真皮及其周围组织中,使得在皮肤中的表达更高,并可持续表达约 8 周。非病毒载体基因转移方式比较安全,一般不诱发机体免疫反应;方法简便,对 DNA 大小的限制较少,长达 48 kb 的片断都可转入细胞中,但转移效率较病毒载体低,难以取得基因治疗所需要的 10^8

~10¹² 个转化细胞,因此有一定局限性。

三、展望

始于 20 世纪 80 年代生长因子与创伤修复的研究,如今已深入到分子水平,并积极干预创伤修复的过程,主动缩短创面愈合时间,提高愈合质量。其中以 PDGF 为代表的生长因子的研究最早,但尚未取得突破性进展,如没有高效稳定的基因导入系统,难以做到可控性表达,尚未解决安全性问题。创伤愈合各阶段有不同的生长因子参与和调控,目前的研究大多限于单个生长因子,转染后的表达在浓度、数量和时间上亦无法控制。多种生长因子联合转染并使之按正常的生理顺序实现可控性表达,是将来的研究方向。

近年来有学者提出“修复相关基因”的概念,认为不同物种或个体在组织修复过程中的差异可能与遗传基础不同有关。如能通过基因工程技术调控和改造病理的修复过程,将可能给创伤修复带来质的飞跃。基因治疗具有巨大的临床应用前景。随着基因技术的进一步的发展和完善,不久的将来可能研究出更安全更有效的基因治疗方法。

参 考 文 献

- Eming SA, Lee J, Snow RG, et al. Genetically modified human epidermis overexpressing PDGF-A directs the development of a cellular and vascular connective tissue stroma when transplanted to athymic mice. *J Invest Dermatol*, 1995, 15:756 - 763.
- Eming SA, Medalie DA, Tompkins RG, et al. Genetically modified human keratinocytes overexpressing PDGF-A enhance the performance of a composite skin graft. *Hum Gene Ther*, 1998, 9:529 - 539.
- Breitbart AS, Mason JM, Urmacher C, et al. Gene-enhanced tissue engineering: applications for wound healing using cultured dermal fibroblasts transduced retrovirally with the PDGF-B gene. *Ann Plast Surg*, 1999, 43:632-639.
- Breitbart AS, Grande DA, Laser J, et al. Treatment of ischemic wounds using cultured dermal fibroblasts transduced retrovirally with PDGF-B and VEGF 121 genes. *Ann Plast Surg*, 2001, 46:555 - 562.
- Chandler LA, Doukas J, Gonzalez Am, et al. FGF2-Targeted adenovirus encoding platelet-derived growth factor-B enhances de novo tissue formation. *Mol Ther*, 2000, 2:153 - 160.
- Doukas J, Chandler LA, Gonzalez AM, et al. Matrix immobilization enhanced the tissue repair activity of growth factor gene therapy vectors. *Hum Gene Ther*, 2001, 12:783 - 798.
- Menetrey J, Kasemkiuwattana C, Day CS, et al. Direct - , fibroblast- and myoblast-mediated gene transfer to the anterior cruciate ligament. *Tissue Eng*, 1999, 5:435 - 442.
- Nakamura N, Shino K, Natsuume T, et al. Early biological effect of in vivo gene transfer of platelet-derived growth factor (PDGF)-B into healing patellar ligament. *Gene Ther*, 1998, 5:1165 - 1170.
- Lee YM, Park YJ, Lee SJ, et al. The bone regenerative effect of platelet-derived growth factor-BB delivered with a chitosan/tricalcium phosphate sponge carrier. *J Periodontol*, 2000, 71:418 - 424.
- Jason A, Spector MD, Babak J, et al. Expression of adenovirally delivered gene products in healing osseous tissues. *Ann Plast Surg* 2000, 44:522 - 528.
- Deguchi J, Namba T, Hammada H, et al. Targeting endogenous platelet-derived growth factor B-chain by adenovirus-mediated gene transfer potently inhibits in vivo smooth muscle proliferation after arterial injury. *Gene Ther*, 1999, 6:956 - 965.
- Szabo S, Deng X, Khomenko T, et al. Gene expression and gene therapy in experimental duodenal ulceration. *J Physiol Paris*, 2001, 95:325 - 335.
- Giannobile WV, Lee CS, Tomala MP, et al. Platelet-derived growth factor (PDGF) gene delivery for application in periodontal tissue engineering. *J Periodontol*, 2001, 72:815 - 823.
- Imanishi J, Kamiyama K, Iguchi I, et al. Growth factors: importance in wound healing and maintenance of transparency of the cornea. *Prog Retin Eye Res*, 2000, 19:113 - 129.
- Norton A, Peplinski GR, Tsung K. Expression of secreted Platelet-derived growth factor-B by recombinant nonreplicating and noncytopathic vaccinia virus. *Ann Surg*, 1996, 224:555 - 560; discussion 560 - 562.
- Eming SA, Whitsitt JS, He L, et al. Particle-mediated gene transfer of PDGF isoforms promotes wound repair. *J Invest Dermatol*, 1999, 112:297 - 302.
- Meuli M, Liu Y, Liggitt D, et al. Efficient gene expression in skin wound sites following local plasmid injection. *J Invest Dermatol*, 2001, 116:131 - 135.

(收稿日期:2001-05-24)

(本文编辑:张 红)

· 消息 ·

2003 年《中国临床康复》杂志征订

《中国临床康复》(原《现代康复》)杂志是由卫生部主管、中国康复医学会主办的国家级医学期刊。系中国科技论文统计源期刊,中国医学核心期刊,百种中国杰出学术期刊,ISSN1671-5926, CN21-1470/R。

本刊为临床康复医学医疗、教学、科研服务。及时报道国内外临床康复医学的新理论、新技术、新经验和新进展,重点组发省部级以上基金项目及各类重点科研课题及优秀博、硕士答辩论文的中文及全英文稿件,可以“快通道”发稿。专栏特色为每期专题论坛(继续教育园地)。

本刊为半月刊, A4 开本, 160 页, 邮发代号: 8-94, 12 元/册, 全年 288 元。欲分科订阅上、下半月刊各 144 元/12 册。通联:辽宁省沈阳市和平区十纬路 16 号《中国临床康复》杂志社 吕明超, 邮编 110003。E-mail: kf23385083@sina.com, 需了解本刊, 可登陆 <http://www.zglckf.com>。