综述

文章编号:1000-5404(2005)16-1702-03

基因增强的骨组织工程研究进展

Progress of gene enhanced bone tissue engineering

罗 飞 综述,许建中 审校 (第三军医大学西南医院骨科,全军矫形外科中心,重庆 400038)

组织工程和基因工程研究都在促进骨缺损修复方面取得可喜进展。近年来,出现了把这两种方法结合起来的新方法,被称作基因增强的组织工程(gene enhanced tissue engineering)[1],它利用基因工程技术将编码特定功能因子的目标基因转移到种子细胞或附着在支架材料上,使其能在体内表达,发挥促进种子细胞的增殖和分化、降低异体免疫性、促进血管化等作用,进而促进组织修复。基因增强的组织工程在修复骨缺损方面较以往的方法主要有以下优势:①基因转移的靶细胞可持续表达目标基因以调控其自身及其它效应细胞的生长,从而获得人们所需的特定功能;②基因转移的靶细胞位于需要修复的部位,合成分泌的内源性蛋白在效应部位的浓度和活性更高,所需产物量更小,减少了外源性重组蛋白大剂量反复使用的副作用;③质粒或病毒载体制备容易、稳定性好、半衰期长、持续表达的时间能满足骨缺损修复的需要;④生物活性支架的应用改变了单纯细胞治疗的不足,满足了骨缺损修复所必须的"骨传导性"的特殊要求。

基因增强的组织工程创新之处在于把组织工程和基因工程两大热门技术有机的结合起来,该技术需要解决的关键问题包括:确定基因转移的方式、选择能同时满足基因工程和组织工程两方面要求的种子细胞及优选高效促进组织修复的目标基因。现就这些方面最新研究成果综述如下。

1 基因转移方式

按照基因转移的技术路线可将基因强化的骨组织工程分为两种:体外法(*ex vitro*)和体内法(*in vivo*)。

1.1 体内法

其主要技术路线是将含有目标基因的载体直接与基质材料支架复合形成基因活化基质(gene activated matrix, GAM)后植于骨缺损部位,目标基因原位转移入周围细胞并表达相应的活性产物以促进骨缺损修复[2]。既往的研究中,Bonadio等[3]用甲状旁腺激素PTH 1-34基因质粒和胶原海绵构建成的GAM修复狗2.0 cm股骨缺损,靶细胞的转导率在30%~50%之间,质粒DNA及其转录的mRNA在骨缺损的局部表达时间可达6周;新骨生成作用有剂量依赖性,最低成骨诱导剂量为1~2 mg。Backstrom等[4]用同样的GAM修复马掌骨缺损模型,发现这样的GAM对效应细胞丰富的骨膜下成骨疗效显著,但是对软骨下骨缺损无法取得满意的修复效果,推测是因为缺乏必要的靶细胞。Chen等[5]局部应用编码PTH 1-34的GAM和静脉注射甲状旁腺激素促进大鼠的股骨缺损修复,结果显示同时采用上述两种给药方法的动物肢体修复部位的骨密度、骨矿含量、成骨范围、局部骨钙素mRNA均较单独给药方法组高。这些试验说明GAM携带的目标基因能被表达并发挥了促进骨组织再生的生物活性;促进骨再生作用的强度与DNA质粒的剂量存在量效关系;GAM对修复区域的组织类项要求比较高,材料周围缺乏足量的靶细胞会显著影响修复效果;全身用药和局部GAM两种方法能协同促进骨修复。

进一步的研究表明,利用肽段、蛋白和类脂化合物非共价连接到质粒DNA上够增强质粒的稳定性和基因转化率,将有助于提高基因转移效率[6,7];但是体内阳离子化试剂容易引起组织坏疽、DNA复合物有可能永久联在GAM基体[8],采用的质粒载体由于细胞分裂的缘故可能引发病源性的抗体导致肾脏疾病,甚至引起早期死亡的危险[9],因此进一步提高基因转移效率、增加表达时间、减少潜在的危险性是其主要研究方向。

1.2 体外法

体外细胞转染的技术路线是在体外将目的生物活性基因转移到种子细胞,然后将这些细胞种植于可吸收支架上,形成复合物后再植入体内发挥组织修复功能。这样的技术路线更符合组织工程的经典定义,大量实验显示了其在骨折、骨不连、骨缺损病例中强大的组织修复能力,从而为骨组织工程的进一步发展开辟了新的途径。由于没有把基因载体直接引入机体,因而体外法更安全;在体外进行基因转移操作便于选择特定的细胞克隆,基因转移效率高,表达容易控制,生物安全性好;该方法基因转移的靶细胞也是组织修复的种子细胞,故对周围组织的依赖小。尽管与体内法相比,体外法存在步骤复杂、耗时较长、费用高的缺点,但还是吸引了大量学者的注意,以下内容将重点讨论该方法。

2 种子/靶细胞的选择

不同于传统转基因技术中基因药物寻找靶细胞,在GAM技术中,基因载体在体内接触了各种各样的细胞,靶细胞需要主动寻找位于支架表面的DNA载体,骨缺损处的成纤维细胞、成骨细胞、成肌细胞都可能成为其靶细胞,但主要为成纤维细胞[2,3]。因此,GAM技术适于修补成纤维细胞和其它利于直接

基金项目:国家高技术研究发展计划资助重大攻关课题("863"计划)(2003-AA205020)
Supported by the National "863" High-Tech Development Plan of China (2003AA205020)

作者简介:罗 飞(1976-),男,四川省内江市人,博士研究生,医师,主要从事骨组织工程相关方面的研究。E-mail: luofly1009@hotmail.com
通讯作者:许建中,电话:(023)68754164, E-mail: xjzslw@hotmail.com

收稿日期:2005-01-30;修回日期:2005-06-24

在体内转基因的细胞含量丰富的组织和部位。

体外法的基因增强技术除了要求种子细胞具有高效的组织修复能力、容易获得、容易体外增殖、长期传代不改变生物活性、抗原性小等特性外,还要求它容易通过转基因技术获得目标基因、低更新率及高代谢活力,能在一定时期内持续存在并表达目标基因。

间充质干细胞(mesenchymal cem cells, MSCs)具有干细胞的自我更新和多向分化潜能特性,更新率低而代谢活力高,可通过转基因技术获得目标基因并在体内外长期表达。它具备很多有利因素:只需在局麻下穿刺骨髓就可以获得自体 MSCs,取材方便、机体损伤小、易于临床操作;具有贴壁生长的特性,易于在体外分离;可以在体外培养中长期传代并保持未分化状态,易于扩增数量;来自自体,无须配型,无抗原性;具有多向分化能力,可以分化成为骨、软骨、肌肉、肌腱和脂肪等多种中胚层组织。因此,MSCs 可以作为骨、软骨、腱等组织工程的理想的种子细胞来源;也可以作为基因治疗中接受目标基因的优秀载体细胞[2,3,10~13]。

3　目标基因的选择

MSCs 具体向哪个方向分化是由周围微环境所调控的,在培养基中加入的诱导剂可以诱导 MSCs 向特定方向分化。近年来国内外对诱导剂进行了大量的研究,普遍认为骨形态形成性蛋白(bone morphogenic proteins, BMPs)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)等能诱导成骨分化。

BMP-2 是最经典的成骨诱导因子,Cheng 等[14]用腺病毒携带 BMP-2 基因转染兔 MSCs,体外培养 1 周后可以检出 BMP-2 生成;将转染的 MSCs 移植到自体横突间隙,观察到显著的促进骨生成作用。Chang 等[10]采用三维 CT 成像技术定量分析了转染 BMP-2 基因的 MSCs 修复兔颅骨缺损术后 3 个月的疗效,证实骨缺损修复效果显著优于对照组。国内,戴克戎等[15]采用难度更高的羊胫骨干骨缺损模型评价 BMP-2 基因转染的组织工程骨修复效果也得到了类似结果。Moutsatsos 等[16]把四环素可调控表达载体编码的 BMP-2 基因转入 MSCs,体内外实验均可用强力霉素控制 BMP-2 基因的表达强度,实现了基因表达的可控化。Blum 等[17]比较了腺病毒、逆转录病毒、脂质体载体对转 hBMP-2 基因小鼠 MSCs 修复颅骨缺损的效果差异,发现腺病毒组成骨效果最显著,脂质体组最少。

Breitbart 等[11]用逆转录病毒质粒载体将 BMP-7 基因转染到兔骨膜来源的 MSCs,并与聚乙醇酸载体复合,用以修复兔颅骨缺损模型,用 RNA 印迹证明 BMP-7 的 mRNA 和酶联免疫吸附试验证明 BMP-7 转染的细胞能够在体外表达;复合聚乙醇酸载体后在兔颅骨缺损模型的 12 周完成修复,比未转染细胞、空白转染细胞、无细胞组明显。

国内学者已将 bFGF 基因用脂质体转导入 MSCs 中,结果显示 bFGF 基因能转入成骨细胞并得到稳定表达,表达时间达 4 周以上。同时 bFGF 基因转导显著促进成骨细胞增殖和骨钙素合成,说明外源基因能很好地调控 MSCs 的定向分化,使其获得良好的成骨活性;而且体内实验进一步证实 bFGF 基因转染还能显著促进骨缺损局部毛细血管的生成[13]。

最近,甲状旁腺激素(parathyroid hormone, PTH)对成骨的作用受到关注,它对骨转换具有双向调节作用:大剂量给药有促进骨吸收的作用;小剂量给药能促进成骨前体细胞分化为成骨细胞,发挥促进骨形成作用。PTH 产品特立帕肽(Teriparatide Forteo)已经通过美国 FDA 批准用于治疗原发性和绝经后骨质疏松症,该产品能提高成骨细胞活性,减少脊柱压缩性骨折发生率达 66% 以上,减少其它骨折 50%[18]。PTH 1-34 是编码 PTH 氨基活性端的基因片段,已成为 GAM 最常用的目标基因[3~5]。

端粒酶对于维持干细胞自我更新能力和复制潜能具有重要意义。利用端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)基因修饰干细胞,可实现 MSCs 在体外长期扩增并维持某些干细胞的多向分化潜能特性,文献证实用 TERT 基因修饰的 MSCs 体外连续传代培养 3 年后,仍保持良好的自我更新和多向分化潜能[19],还能促进异基因种子细胞构建的组织工程骨在动物体内的成骨[20]。利用 TERT 基因修饰的 MSCs 建立种子细胞库有可能解决目前骨组织工程临床应用中种子细胞来源的难题,但其生物安全性尚需进一步证实。

综上所述,基因工程与组织工程技术结合而成的基因增强的骨组织工程技术在促进骨缺损修复方面已经显示出超越现有其它技术的优越性,是将来组织修复的发展方向之一。通过基因修饰的技术有可能解决异基因种子细胞的免疫原性和永生化等问题,将为"随取随用"的组织工程产品提供理想的种子细胞,使骨组织工程规模化制备和商品化成为可能。基因增强的骨组织工程在进入临床应用前需要着重解决这些问题:①改进基因的载体,提高 GAM 技术的基因转移效率、增加表达时间、减少潜在的危险性;②选择适当的目标基因,降低种子细胞的免疫原性和实现其永生化;③实现外源性基因在受体细胞内的表达时间和数量的人为调控,使之与再生组织的需要相适应;④把基因转移和外源性基因产物的危险性降低到安全范围。

关键词:组织工程;间充质干细胞;基因工程

中图法分类号:R318　　**文献标识码**:A

参考文献:

[1] Griffith L G, Naughton G. Tissue engineering - current challenges and expanding opportunities[J]. Science, 2002, 295(5557): 1009 - 1014.

[2] Bonadio J. Tissue engineering *via* local gene delivery[J]. J Mol Med, 2000, 78(6): 303 - 311.

[3] Bonadio J, Smiley E, Patil P, *et al*. Localized, direct plasmid gene delivery *in vivo*: prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration[J]. Nat Med, 1999, 5(7): 753 - 759.

[4] Backstrom K C, Bertone A L, Wisner E R, *et al*. Response of induced bone defects in horses to collagen matrix containing the human parathyroid hormone gene[J]. Am J Vet Res, 2004, 65(9): 1223 - 1232.

[5] Chen H, Frankenburg E P, Goldstein S A, *et al*. Combination of local and systemic parathyroid hormone enhances bone regeneration[J]. Clin Orthop, 2003, (416): 291 - 302.

[6] Schaffer D V. Genetic approaches to tissue repair[J]. Ann N Y Acad Sci, 2002, 961: 68 - 70.

[7] Thomas M, Klibanov A M. Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 62(1): 27 - 34.

[8] Zelphati O, Liang X, Nguyen C, *et al*. PNA-dependent gene chemistry: stable coupling of peptides and oligonucleotides to plasmid DNA [J]. Biotechniques, 2000, 28(2): 304-310, 312-314, 316.

[9] McKenzie D L, Kwok K Y, Rice K G. A potent new class of reductively activated peptide gene delivery agents[J]. J Biol Chem, 2000, 275(14): 9970-9977.

[10] Chang S C, Chuang H, Chen Y R, *et al*. Cranial repair using BMP-2 gene engineered bone marrow stromal cells[J]. J Surg Res, 2004, 119(1): 85-91.

[11] Breitbart A S, Grande D A, Mason J M, *et al*. Gene-enhanced tissue engineering: applications for bone healing using cultured periosteal cells transduced retrovirally with the BMP-7 gene [J]. Ann Plast Surg, 1999, 42(5): 488-495.

[12] Tsuchida H, Hashimoto J, Crawford E, *et al*. Engineered allogeneic mesenchymal stem cells repair femoral segmental defect in rats[J]. J Orthop Res, 2003, 21(1): 44-53.

[13] 郑启新，郭晓东，刘 勇，等. bFGF基因修饰的间充质干细胞/多孔β-TCP陶瓷复合移植修复兔节段性骨缺损[J]. 中国生物医学工程学报，2003，22(2)：171-177.

[14] Cheng S L, Lou J, Wright N M, *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.

[15] 戴克戎，徐小良，汤亭亭，等. 骨形态发生蛋白-2基因修饰的组织工程化骨修复羊胫骨干骨缺损[J]. 中华医学杂，2003，83(15)：1345-1349.

[16] Moutsatsos I K, Turgeman G, Zhou S, *et al*. Exogenously regulated stem cell-mediated gene therapy for bone regeneration[J]. Mol Ther, 2001, 3(4): 449-461.

[17] Blum J S, Barry M A, Mikos A G, *et al*. *In vivo* evaluation of gene therapy vectors in *ex vivo*-derived marrow stromal cells for bone regeneration in a rat critical-size calvarial defect model[J]. Hum Gene Ther, 2003, 14(18): 1689-1701.

[18] Ma Y L, Bryant H U, Zeng Q. New bone formation with teriparatide [human parathyroid hormone-(1-34)] is not retarded by long-term pretreatment with alendronate, estrogen, or raloxifene in ovariectomized rats[J]. Endocrinology, 2003, 144(5): 2008-2015.

[19] Abdallah B M, Haack Sorensen M, Burns J S, *et al*. Maintenance of differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene despite of extensive proliferation[J]. Biochem Biophy Res Commun, 2005, 326(3): 527-538.

[20] Shi S, Gronthos S, Chen S, *et al*. Bone formation by human postnatal bone marrow stromal stem cells is enhanced by telomerase expression [J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(6): 587-591.

（编辑 王 红）

综述

文章编号：1000-5404(2005)16-1704-04

VEGF促进骨组织工程血管化的研究进展

Advances of VEGF promoting angiogenesis in bone tissue engineering

李 强，何清义 综述，许建中 审校 （第三军医大学西南医院骨科，全军矫形外科中心，重庆 400037）

组织工程骨的体积越大、结构越复杂、所需的种子细胞数量就越多，因此须有更多的动、静脉及血管网为种子细胞提供营养，可见有效的组织工程血管化是大块工程组织移植的关键。目前研究认为促进组织工程血管化方式主要有3种：①在工程组织内加入VEGF(vessel endothelium growth factor)；②将可分泌VEGF的细胞与种子细胞混合移植；③种子细胞接种之前将支架材料预血管化。由于VEGF在血管生成和血管形成过程中均发挥了极其重要的作用，试图采用VEGF缓释和将可分泌VEGF的细胞与种子细胞混合移植的方法促进组织工程血管化的研究备受关注。现将近来年相关文献综述如下。

1 血管生成与血管形成

血管的形成和生长是生殖、胚胎发育、器官形成、伤口愈合和组织再生过程中的重要环节，根据形成的方式不同分为血管生成(angiogenesis)和血管形成(vasculogenesis)[1,2]。Angiogenesis是指邻近的毛细血管通过出芽的方式长出新血管的过程，包括血管扩张、基底膜降解、内皮细胞迁移和增生、毛细血管的管样结构形成、新生血管的基底膜形成、血管周细胞和血管平滑肌细胞聚集在基底膜外形成成熟的血管。而Vasculogenesis主要由未分化的内皮细胞(endothelial cells, EC)聚集、分化形成，在胚胎发育时期，中胚层的卵黄囊内的血管母细胞先分化形成血管丛，进而再形成原始的血管。包括5个步骤，血管母细胞分化出EC；EC相互聚集；极化的EC形成早期的血管腔；进而组成新生的毛细血管网；血管周细胞和血管平滑肌细胞聚集在基底膜外形成成熟的血管

近年来，研究表明血液循环中也存在EC，其主要由骨髓中的内皮细胞前体细胞(endothelial progenitor cells, EPC)分化而

基金项目：国家高技术研究发展计划资助重大攻关课题("863"计划)(2003AA205020)，国家自然科学基金资助项目(30300357)
Supported by the National "863" High-Tech Development Plan of China (2003AA205020) and the National Natural Science Foundation of China (30300357)

作者简介：李 强(1972-)，男，安徽省徐州市人，博士研究生，主治医师，主要从事骨科临床与组织工程方面的研究。E-mail：lqlq101@126.com
通讯作者：许建中，电话：(023)68754164，E-mail：sjzslw@hotmail.com

收稿日期：2005-01-30；修回日期：2005-06-24