

类风湿关节炎基因治疗的研究进展

沈俊娅, 盛文彬, 冷建杭 (杭州市第一人民医院, 杭州 310006)

摘要: 类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是累及多关节、多系统的慢性自身免疫性疾病, 在自身免疫性结缔组织病中患病率居首位。疾病可发展为关节僵直、畸形、致残而严重影响劳动力。RA 的传统药物治疗多起效慢, 长期使用副作用大, 近年来兴起的生物治疗广泛应用于临床, 但生物制剂昂贵、副作用大、需要反复注射且无靶器官特异性, 而基因治疗则避免了这些缺点, 选择性高, 可以从分子水平针对发病机制进行治疗, 为 RA 的治疗开辟了新领域。

关键词: 类风湿关节炎; 基因治疗; 治疗策略

中图分类号: R915.2

文献标识码: A

文章编号: 1007-7693(2008)01-0028-03

Research Advances of Gene Therapy in Rheumatoid Arthritis

SHEN Jun-ya, SHENG Wen-bing, LENG Jian-hang (Central Laboratory, Hangzhou First People's Hospital, Hangzhou 310006, China)

ABSTRACT: Rheumatoid arthritis (RA) is a systemic inflammatory and autoimmune disease whose clinical manifestations predominate in the joints. The prevalence of RA is at the top of autoimmune desmosis. Without adequate treatment, it will cause pain, severe disability, and excess mortality. The conventional therapy for RA is slow-acting and with serious side-effects. The recent developed biological agents require repeated and expensive high dosages to achieve therapeutic concentrations. These high circulating levels of biologicals and its non-targeting specificity can result in serious side-effects. Gene therapy can ensure efficient long-lasting delivery of therapeutic proteins, it is a promising approach for RA treatment on the basis of molecules.

KEY WORDS: rheumatoid arthritis; gene therapy; therapy strategy

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 在自身免疫性结缔组织病中其患病率居首位。该病如不及时诊治, 可发展为关节僵直、畸形、致残而严重影响劳动力。RA 的传统药物治疗多起效慢, 长期使用不良反应大, 近年来兴起的生物治疗广泛应用于临床, 但生物制剂昂贵、不良反应大、需要反复注射并且无靶器官特异性, 而基因治疗则避免了这些缺点, 选择性高, 可以从分子水平针对发病机制进行治疗, 为 RA 的治疗开辟了新的领域。现就 RA 基因治疗策略的最新进展作一综述。

1 细胞因子基因治疗

1.1 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)

TNF- α 在 RA 患者的关节破坏和炎症过程中起了关键作用。TNF- α 可以被其受体 (p55 或 p75) 的过度表达所抑制。Kim 等^[1] 将携带有编码可溶性人 TNF 受体 (Soluble TNF receptor, s TNFR) p75 和人 IgG1 的融合基因 (s TNFR: Fc) 的载体注入牛 II 型胶原诱导的 RA DBA/1 小鼠腓肠肌中, 随后进行电刺激。5 d 后, s TNFR: Fc 表达达最高水平, RA 小鼠足的肿胀变形程度明显下降, 一次注射持续效果达 18 d, 而且

滑膜和软骨损坏也明显降低。有研究显示, 在离体脾细胞中通过逆转录病毒转染并获得表达的 s TNFR II 单体可抑制胶原诱导关节炎 (Collagen-induced arthritis, CIA)。

1.2 白介素-1 (IL-1)

IL-1 是软骨损伤的重要介质。IL-1 受体拮抗剂 (IL-1 receptor antagonist, IL-1 Ra) 能抑制 IL-1 的炎症前效应。Wonhee 等^[2] 将携带人类 IL-1 Ra 基因和绿色荧光蛋白 (Green fluorescent protein, GFP) 基因的重组腺病毒 (Ad. hIL-1 Ra/GFP) 对缺乏 IL-1 Ra 基因的 Balb/cA 小鼠进行踝关节内注射。研究者将小鼠按出生后的年龄分为两组: 出生后 8 周的为早期炎症组, 出生后 15 周的为慢性炎症组。结果发现: Ad. hIL-1 Ra/GFP 能明显改善早期炎症组的关节炎症状, 减轻爪垫肿胀程度。组织病理学显示早期炎症组接受 Ad. hIL-1 Ra/GFP 治疗后, 滑膜增生程度和炎症细胞浸润都显著降低, 表明早期进行 IL-1 Ra 基因治疗在 RA 的病情发展中有重要预防作用。Evans 等^[3] 对进展期 RA 患者采用携带编码 IL-1 Ra 基因的逆转录病毒进行了第一阶段的临床试验, 获得了成功。

基金项目: 浙江省科技计划项目 (2005C33008)

作者简介: 沈俊娅, 女, 主管技师 Tel: (0571) 87065701-10541

E-mail: luzhong87065701@yahoo.com.cn

1.3 β 干扰素 (interferon- β , IFN- β)

IFN- β 有重要的免疫调节作用,同时在保持骨吸收的稳态上也有重要作用。Adriaansen等^[4]将携带 IFN- β 基因的腺病毒(Ad. IFN- β)对佐剂型关节炎(Adjuvant arthritis, AA)大鼠进行关节内注射。结果显示 IFN- β mRNA及其表达的蛋白质在接受关节注射后 2 d达高峰,随后下降。局部的 Ad. IFN- β 基因治疗显著减轻了爪子肿胀程度和滑膜炎,临床效应可持续 9 d;研究还显示 Ad. IFN- β 能保护骨质不受破坏,降低 c-Cbl和 Cbl-b(调节破骨细胞活性的信号分子)水平。

1.4 白介素-4(IL-4)

IL-4是一个多效性的细胞因子。许多文献报道了它在 RA中的重要治疗作用。最近,Christian等^[5]在 AA大鼠模型中对 IL-4在血管形成中的作用进行了研究。研究采用携带编码 IL-4基因的腺病毒对大鼠进行关节内注射,然后取踝关节匀浆作体内和体外的血管生成分析,用 ELISA检测蛋白质水平和细胞因子及生长因子,用免疫组化的方法检测滑膜组织表达的 α v整合素。结果发现,IL-4基因治疗后能降低滑膜组织血管形成,同时减轻炎症反应;IL-4还有调节 IL-18, CXCL16(CXC亚族的第十六个趋化因子)和 α v整合素等与血管形成有关的因子的作用。

2 细胞凋亡的基因治疗

RA滑膜细胞上的 Fas表达上升,而 FasL表达极低,导致滑膜细胞凋亡异常,淋巴细胞浸润和滑膜增生。将 FasL基因转染体外培养的 RA滑膜细胞,结果滑膜细胞 FasL表达升高,滑膜细胞凋亡增加,关节炎症减轻^[6]。

另外,RA滑膜组织中 NF- κ B高度活化。NF- κ B可诱导炎症前细胞因子,黏附分子和可诱导一氧化氮的转录。抑制 NF- κ B活性不仅能抑制炎症因子,还能显著增加滑膜细胞的凋亡。研究发现^[7],使用特异性的 NF- κ B抑制肽,NBD肽,在体外能有效抑制多种细胞类型的 NF- κ B活性,在体内能降低 TNF- α 和 IL-1 β 的水平从而改善 CIA小鼠的关节炎症状。

3 过继性细胞的基因治疗

3.1 抗原特异性 T细胞介导的基因治疗

抗原特异性 CD4⁺ T细胞具有组织特异性定位的特性。人类自身免疫性疾病和小鼠模型的靶器官中都已发现了 CD4⁺ T细胞。目前有学者在 RA患者的滑膜组织中发现了能表达趋化因子受体的 T细胞,提出用携带目的基因的逆转录病毒感染的 CD4⁺ T细胞可以成为 RA基因治疗的理想的导入载体。Tame^等^[8]用携带 IL-4基因的逆转录病毒感染抗原特异性 T杂交瘤细胞对 CIA小鼠进行治疗,然后用生物发光成像的方法检测,发现杂交瘤细胞迁移到了发炎的关节,并在炎症局部表达 IL-4,小鼠的关节炎症明显减轻。Smith^等^[9]用携带抗 TNF单链抗体(anti-TNF single-chain antibodies, scFv)基因的逆转录病毒感染 T杂交瘤细胞,对 CIA小鼠进行局部基因治疗,疾病得到了很好的控制。关于抗原特异性 T细胞介导的基因治疗的临床应用也有不少报道,但也发现了不少问题。最近,Bey-Abina^等^[10]在用该法进行的两例临床试验中发现了成熟 T细胞发生了不可控制的呈指

数级的克隆增殖。

3.2 树突状细胞(dendritic cells, DCs)介导的基因疗法

RA的发生涉及抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC)对自身抗原的异常递呈,导致自身反应性 T细胞的激活。树突状细胞是功能最强大的专职性 APC,具有调节免疫反应和免疫耐受平衡的作用。免疫调节分子基因修饰的 DCs治疗自身免疫性疾病是目前的研究热点。Liu^等^[11]报道,应用经胶原处理并转染强力霉素调控的 TRAIL基因的 DC成功地抑制了 CIA小鼠的关节炎病情,这些基因修饰的 DCs通过其表达的 TRAIL和 T细胞表面 TRAIL受体相互作用,诱导抗原特异性 T细胞凋亡,调节免疫反应。

4 反义基因治疗

4.1 反义寡核苷酸(oligodeoxynucleotide, ODN)

ODN可以通过与翻译起始位点杂交或与 RNA序列结合,从而干扰目的基因的表达。Zwicky^等^[12]报道,用反义 DNA来抑制软骨细胞中组织蛋白酶 B基因的表达对骨性关节炎的软骨破坏有改善作用。ODN反义技术比表达载体基因治疗更为安全有效,但是 ODN易受体内普遍存在的 DNA酶的破坏,血浆中 ODN的半衰期较短。因此,通过化学修饰以减少对其降解和提高其稳定性显得至关重要。

4.2 核酶

核酶可催化 RNA切割和 RNA剪接反应。具有催化 RNA切割的核酶可作为基因表达和病毒复制的抑制剂,目前已被开发用于基因治疗。Rutkauskaitė^等^[13]在对 RA模型进行的体内试验中设计了针对基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinase-1, MMP-1)的特异性核酶(RzMMP-1),把它克隆入一种复制缺陷逆转录病毒,然后再将这一载体转入滑膜成纤维样细胞。结果发现,被 RzMMP-1转染的细胞的 MMP-1产量显著降低,并持续了至少两个月。另有研究发现^[14],用针对组织蛋白酶 L的核酶反义治疗,能降低 RA小鼠模型的蛋白质合成以及减轻软骨破坏程度。核酶反义治疗需要解决的问题主要有:核酶能够进入体内合适的细胞并发挥作用;对目标基因的抑制程度及持续时间的调控;所用载体可引起某些基因的插入性活动。

4.3 RNAi

近年来,RNA干扰技术无论在技术本身的改进上还是应用上都有了很大进展,尤其是小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)的产生和引入方法有了一系列的改进,使 siRNA的长期稳定表达成为可能。Schiffelers^等^[15]在 CIA小鼠模型中,用电穿孔技术,将 siRNA导入关节内,使在关节炎发作中起主要作用的细胞因子基因产生沉默效应。这种方法明显抑制了关节炎的临床症状。Leung^等^[16]用化学修饰和加入结合物(如胆固醇)的方法,避免 siRNA受外源或内源核酸内切酶的破坏,提高了 siRNA的导入效率。目前,RNA干扰技术待解决的问题主要有:能够使 siRNA长期稳定表达的引入方法;外来的载体基因整合入基因组的危险;siRNA的沉默效应持续时间较短以及过剩的 siRNA会干扰细胞的正常功能。

综上所述,RA的基因治疗已取得许多成果,但存在的问题还很多。就自身免疫性疾病而言,基因治疗面临着相似的问题,如缺乏最理想的载体,宿主对载体的免疫反应,转导的基因能否稳定表达等。就RA而言,因为RA是慢性进行性基础上的反复发作,而动物模型只是复制出了疾病的某个方面而不能反映全部或系统的表现,从动物实验中获得的结论只能在所用动物模型的基础上来研究,并不一定适合其他动物模型,基因治疗的临床试验有待进一步发展。

REFERENCES

- [1] KIM J M, HO S H, HAHN W, *et al.* Electro-gene therapy of collagen-induced arthritis by using an expression plasmid for the soluble p75 tumor necrosis factor receptor-Fc fusion protein [J]. *Gene Ther*, 2003, 10(15): 1216-1224.
- [2] WONHEE HUR, MI-LA CHO, SEUNG KEW YOON, *et al.* Adenoviral delivery of IL-1 receptor antagonist abrogates disease activity during the development of autoimmune arthritis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice [J]. *Immunol Lett*, 2006, 106(2): 154-162.
- [3] EVANS C H, ROBBINS P D, GHIVIZZANI S C, *et al.* Gene transfer to human joints: progress toward a gene therapy of arthritis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(24): 8698-8703.
- [4] ADRIAANSEN J, KUHLMAN R R, VAN HOLTEN J, *et al.* Intraarticular interferon- β gene therapy ameliorates adjuvant arthritis in rats [J]. *Hum Gene Ther*, 2006, 17(10): 985-996.
- [5] CHRISTIAN S HAAS, M ASIF AMIN, BRITTANY B ALLEN, *et al.* Inhibition of angiogenesis by interleukin-4 gene therapy in rat adjuvant-induced arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(8): 2402-2414.
- [6] KOBAYASHI T, OKAMOTO K, KOBATA T, *et al.* Novel gene therapy for rheumatoid arthritis by FADD gene transfer: induction of apoptosis of rheumatoid synoviocytes but not chondrocytes [J]. *Gene Ther*, 2000, 7(6): 527-533.
- [7] JIMI E, AOKI K, SAITO H, *et al.* Selective inhibition of NF-kappa B blocks osteoclastogenesis and prevents inflammatory bone destruction *in vivo* [J]. *Nat Med*, 2004, 10(6): 617-24.
- [8] TARNER I H, NAKAJIMA A, SEROOGY C M, *et al.* Retroviral gene therapy of collagen-induced arthritis by local delivery of IL-4 [J]. *Clin Immunol*, 2002, 105(3): 304-314.
- [9] SMITH R, TARNER I H, HOLLENHORST M, *et al.* Localized expression of an anti-TNF single-chain antibody prevents development of collagen-induced arthritis [J]. *Gene Ther*, 2003, 10(15): 1248-1257.
- [10] HACEIN-BEY-ABINA S, VON KALLE C, SCHMIDT M, *et al.* LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1 [J]. *Science*, 2003, 302(17): 415-419.
- [11] LIU Z, XU X, HSU H-C, *et al.* CII-DC-AdTRAIL cell gene therapy inhibits infiltration of CII-reactive T cells and CII-induced arthritis [J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(9): 1332-1341.
- [12] ZWICKY R, MUNTENER K, GOLDRING M B, *et al.* Cathepsin B expression and down-regulation by gene silencing and antisense DNA in human chondrocytes [J]. *Biochem J*, 2002, 367(1): 209-214.
- [13] RUTKAUSKAITE E, ZACHARIAS W, SCHEDEL J, *et al.* Ribozymes that inhibit the production of matrix metalloproteinase 1 reduce the invasiveness of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts [J]. *Arthritis Rheum*, 2004, 50(5): 1448-1456.
- [14] SCHEDEL J, SEEMAYER C A, PAP T, *et al.* Targeting cathepsin L (CL) by specific ribozymes decreases CL protein synthesis and cartilage destruction in rheumatoid arthritis [J]. *Gene Ther*, 2004, 11(13): 1040-1047.
- [15] SCHIFFELERS RM, XU J, STORM G, *et al.* Effects of treatment with small interfering RNA on joint inflammation in mice with collagen-induced arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2005, 52(4): 1314-1318.
- [16] LEUNG R K, WHITTAKER P A. RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics [J]. *Pharmacol Ther*, 2005, 107(2): 222-239.