

胶质细胞源性神经营养因子治疗帕金森病研究进展

王思^{1,2}, 刘菲² 综述 李秀华² 审校

1. 潍坊医学院, 山东省潍坊市 261000

2. 山东大学附属千佛山医院神经内科, 山东省济南市 250014

摘要: 帕金森病是一种中枢神经变性疾病,除了目前的基本药物治疗外,胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)是黑质纹状体系统中重要的靶源性神经营养因子,被作为一种新的治疗药物备受学术界关注。近年来,国内外相继开展了大量GDNF治疗帕金森病的动物实验和临床研究,取得了一定的进展,更多的临床实验有待进一步开展。如何通过采用安全恰当的给药途径及方式,既能使GDNF在体内持续高效稳定地发挥作用,又能将不良反应降到最低,是未来研究GDNF治疗帕金森病的努力方向。

关键词: 胶质细胞源性神经营养因子; 帕金森病; 载体; 治疗

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种中枢神经退行性疾病,临床症状主要以静止性震颤、运动迟缓、肌张力增高、姿势步态异常及嗅觉障碍、认知异常、感觉障碍等非运动症状为主,病理特征主要是中脑黑质、纹状体多巴胺能神经元进行性变性坏死和路易小体的形成。PD的病因尚未明了,但可能与遗传因素、环境因素、氧化应激、线粒体功能障碍、自身免疫等多因素有关。目前PD的治疗主要以提高纹状体中多巴胺含量,增强多巴胺能活动为主,但是并不能阻止病情发展,减缓神经变性,更无法治愈。随着细胞及分子生物学的发展和神经营养因子认识的深入,大量的实验研究表明,胶质细胞源性神经营养因子(glial cell line derived neurotrophic factor, GDNF)能保护退化的多巴胺神经元并能促进黑质纹状体多巴胺系统的再生。现就GDNF治疗PD的研究现状作一简要综述。

1 GDNF治疗帕金森病的基础

GDNF最初是由Lin等^[1]于1993年从培养大鼠胶质细胞系B49的无血清培养基中经浓缩、分离纯化而来。GDNF是一种神经营养因子,是转化生长因子 β 家族中的一员,GDNF的神经保护作用机制尚未完全阐明,其与受体相互作用及涉及的信号通路相当复杂。GDNF的复合受体包括GDNF家族受体 $\alpha 1$ (GDNF family receptor alpha 1, GFR- $\alpha 1$)和Ret受体。GFR- $\alpha 1$ 是糖基化的磷脂酰肌醇

(glycosylphosphatidylinositol, GPI)锚定到细胞表面的蛋白分子,是配体、受体结合复体;Ret是由原癌基因c-Ret编码的受体酪氨酸激酶,是信号传递系统的一部分。GDNF与GFR- $\alpha 1$ 特异性结合,Ret被磷酸化,将信号转入细胞内,激活通路下游的丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)等,导致细胞内一系列信号传导途径激活^[2],起到营养神经、抑制神经元变性坏死的作用。

2 GDNF与帕金森病动物模型研究

2.1 GDNF直接输注

将GDNF直接显微注射在MPTP毁损小鼠PD模型和6-羟基多巴胺(6-OHDA)毁损大鼠PD模型的脑室、纹状体或黑质内,能促进受损的多巴胺能神经元的修复,有保护作用。Cohen等^[3]单侧纹状体注射GDNF预处理SD大鼠PD模型,通过检测黑质纹状体的酪氨酸羟化酶(TH)、多巴胺转运蛋白(DAT)和囊泡单胺转运体-2(VMAT2)等多个表型标记,证实GDNF可阻止多巴胺的细胞死亡和纹状体DA含量下降,但数周后多巴胺能表型才能完全恢复。将GDNF和一些生长因子联合注入纹状体,能促进GDNF的神经营养保护作用^[4,5]。刘洪梅等^[6]在6-OHDA损伤的大鼠纹状体内联合注射表皮生长因子(EGF)与GDNF,发现联合注射比单独注射GDNF更能促进黑质内钙结合蛋白(CB)表达

基金项目:首都医科大学神经生物国家重点实验室开放课题(3500-112291);山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(2008BS03012)

收稿日期:2014-11-17;修回日期:2015-01-23

作者简介:王思(1990-),女,硕士研究生,主要从事帕金森病临床研究。

通讯作者:李秀华(1973-),女,副主任医师,硕士生导师,主要从事帕金森病临床研究。E-mail:lxh731023@126.com。

和星形胶质细胞的激活,说明 EGF 能加强 GDNF 保护受损的 DA 能神经元并促进其再生。但是 GDNF 直接输注不能起到全面持久的治疗作用。

2.2 以病毒为载体的基因疗法

Emborg 等^[7]用老年 MPTP 恒河猴为实验对象,于尾状核、壳核、黑质注射编码 GDNF 的慢病毒,而对照组注射编码 β 半乳糖苷酸酶的慢病毒,3 个月后实验组帕金森临床评分比对照组有明显改善,GDNF 在脑内有大量表达,且黑质纹状体的多巴胺有较多保存。Kells 等^[8]将编码人 GDNF 的腺相关病毒(AAV2-GDNF)注射到 MPTP 恒河猴纹状体内,对照组注射 PBS,24 个月后,实验组比对照组有明显的功能性运动改善,帕金森临床评定量表(CRS)评分明显升高,并且没有发现毒副作用,脑脊液和血清中也没有发现 GDNF 抗体。说明以病毒为载体,GDNF 能修复受损的 DA 能神经元,并改善运动行为。但是,患者情况和注射部位不同可能会给 PD 患者带来不同影响。Su 等^[9]向老年恒河猴黑质内注入 AAV2-GDNF,发现有严重的体重减低,而 MPTP 恒河猴壳核内注射 AAV2-GDNF 则没有。Kordower 等^[10]将编码 GDNF 的慢病毒(Lenti-GDNF)注入老年恒河猴或 MPTP 恒河猴的纹状体和黑质内,发现 Lenti-GDNF 能增加老年猴子纹状体内多巴胺的功能,逆转 MPTP 猴 DA 能神经元的功能缺陷并且完全阻止黑质纹状体变性。此外,Lenti-GDNF 注射到恒河猴可有长达 8 个月的长期基因表达。以病毒为载体介导 GDNF 能起到持续治疗 PD 的作用,但是其安全性等问题尚待解决。

2.3 经细胞介导输注 GDNF

经基因工程改造的能持续表达 GDNF 的间充质干细胞也可以作为有效导入 GDNF 的一个途径^[10,11]。Biju 等^[12]将经基因修饰的能表达 GDNF 的巨噬细胞通过尾静脉注射移植到 MPTP 小鼠,结果发现实验组 3 周和 9 周黑质致密部多巴胺能神经元减少分别为 35% 和 15%,而对照组为 70%。Open-field 试验中,实验组小鼠和正常组运动水平相似,对照组明显活动减低。说明巨噬细胞介导的 GDNF 能改善 MPTP 引起的多巴胺能神经性变,显著降低 MPTP 引起的 TH 阳性神经元的损害,并促进黑质多巴胺神经元的再生。行为学方面,能明显缓解运动减少,并且没有出现异常性疼痛,体重减轻等副作用。徐胜利等^[13]用同种异体大鼠神经干细胞作为载体细胞,将 GDNF 导入 PD 大鼠纹状体

内。9 周后移植细胞能分化为星形胶质细胞,并很好的整合到脑内,不会产生免疫排斥。大鼠的旋转行为有所改善,移植侧的多巴胺及其代谢产物增多但不显著。Moloney 等^[14]将骨髓基质干细胞(BMSCs)和经基因修饰的能表达 GDNF 的骨髓基质干细胞(BMSCs)提前 4 天纹状体内注射治疗 6-OHDA 诱导的 PD 大鼠,发现骨髓基质干细胞也有分泌 GDNF 的作用,但数量较少,经基因修饰的 BMSCs 能分泌较多 GDNF,形成微环境保护纹状体内多巴胺能神经元,并改善其行为学表现。束汉生等^[15]也有相同发现。然而,细胞移植到大脑后可出现存活不良,并促进宿主脑的神经免疫的小胶质细胞和星形胶质细胞的活化^[10,16]。Hoban 等^[17]用一个原位凝胶系统作为载体,将编码 GDNF 的 BMSCs 注射到 SD 大鼠 PD 模型的纹状体内,降低小胶质细胞和星形胶质细胞的反应,并降低宿主对间充质干细胞的排斥反应,不阻碍 GDNF 的表达、释放和扩散到周围的脑组织,说明这是一个很好的耐受性细胞递送平台技术。经间充质干细胞介导输注 GDNF 能高效并持久的治疗 PD,但是还有不少问题仍需解决,如细胞移植产生的免疫排斥反应;干细胞的伦理问题等。

2.4 分子木马技术介导 GDNF

利用分子木马技术(molecular Trojan horse, MTH),将人 GDNF 与转铁蛋白受体的抗体结合,形成融合蛋白 cTfRMAB-GDNF^[18-20]。Zhou 等^[18]在 6-OHDA 小鼠 PD 模型研究中,通过静脉注射,cTfRMAB-GDNF 能通过血脑屏障并进入黑质纹状体,GDNF 能正常表达,可改善旋转行为,增加纹状体酪氨酸酶活性,并且不会引起毒副作用。

2.5 绕过血脑屏障给药

GDNF 分子量较大,不能通过血脑屏障。Migliore 等^[21]向 PD 大鼠鼻内注射 GDNF 或包裹 GDNF 的脂质体,3~4 周后,发现 GDNF 可绕过血脑屏障,到达黑质纹状体致密部,保护多巴胺神经元,增加酪氨酸羟化酶密度,并增加大鼠体重,鼻内注射 GDNF 或包裹 GDNF 的脂质体并没有显著地不同。但是,鼻内注射不能做到靶向给药。

3 GDNF 与帕金森病临床研究

大量动物实验研究表明,GDNF 能保护并修复多巴胺神经元,并改善 PD 动物模型的运动障碍。而对于 PD 患者,也有大量谨慎的临床试验研究。Lang 等^[22]对 34 例病程超过 5 年、年龄介于 36~70

岁的 PD 患者进行随机分组临床试验。治疗组患者持续 6 个月双侧壳核内注入重组人 GDNF (liatermin) 15 $\mu\text{g}/\text{d}$, 6 个月后治疗组病人的统一帕金森病评定量表 (the unified Parkinson's disease rating scale, UPDRS) 关期评分降低 10%, 而安慰剂组降低 4.5%, 但这种差异并无统计学意义, 这不能证明 liatermin 有临床疗效。并且治疗组患者出现感觉异常、头疼、上呼吸道感染等副作用, 可能通过改善药物输入方式或持续高剂量给药会有临床疗效并减少副作用。Slevin 等^[23] 在一期试验中, 向 10 例 PD 患者单侧壳核注入 GDNF 并持续 6 个月, 可发现有明显运动功能改善。二期试验仍壳核给药, 持续给药 1 年, UPDRS 开期和关期分数改善分别为 42% 和 38%, 但在停用 GDNF 后 9~12 个月, 疗效逐渐减退, UPDRS 评分恢复到一期试验水平。治疗过程中有 1 例患者因感染而撤管, 7 例患者出现抗 GDNF 抗体, 但没有出现不良反应和小脑损害。上述临床实验说明, 单侧壳核注入 GDNF 对 PD 患者有明显持久的疗效, 但停用 GDNF 后 9~12 个月, 疗效逐渐减退, 证明这是一种有效治疗 PD 的方案, 但治疗过程中要密切监测药物的安全性。Nikunj 等^[24] 对单个病例进行观察研究, 患者为一名 56 岁男子, 接受颅内壳核后背部注射 GDNF, 双侧壳核每天注射 GDNF 14~43 mg, 持续 39 个月。在终止 GDNF 注射后 36 个月, UPDRS-III 和 UPDRS-II 关期评分分别有 74% 和 76% 的改进, 患者的味觉、嗅觉和性功能均有改善, 没有发现副作用。表明 GDNF 对 PD 患者治疗安全有效, 并有持续作用。

4 问题与展望

随着老龄化的加剧, PD 已经成为中老年人中常见的一种中枢神经退行性变。目前 PD 的治疗方法只能改善临床症状, 不能阻止病情的发展, 彻底治愈疾病。GDNF 已被众多研究证实有神经保护作用, 能阻止 PD 病情的进展, 是治疗 PD 的一种理想药物, 但作为一种成熟有效的临床治疗药物的前景并不明朗, 虽然动物试验已取得很好效果, 但是临床试验进行较少, 还有许多问题尚待解决, 比如 GDNF 具体作用机制, 安全有效的给药途径和剂量, 提高 GDNF 的靶向性, 减少副作用, PD 动物模型与人类本身的差异性, 载体移植的免疫排斥, 干细胞介导 GDNF 的伦理问题等一系列问题仍需进一步探讨与研究。鉴于目前的相关研究, 应进一步研究如何使 GDNF 安全、高效、稳定、持续地发挥作

用治疗 PD, 同时应更多地开展临床试验, 为 GDNF 治疗 PD 进入临床应用提供更多依据。

参 考 文 献

- [1] Lin LF, Doherty DH, Lile JD, et al. GDNF: a glial cell line derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic. *Science*, 1993, 260(5111): 1130-1132.
- [2] Li X, Peng C, Li L, et al. Glial cell derived neurotrophic factor protects against proteasome inhibition induced dopamine neuron degeneration by suppression of endoplasmic reticulum stress and caspase-3 activation. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2007, 62(9): 943-950.
- [3] Cohen AD, Zigmond MJ, Smith AD, et al. Effects of intrastriatal GDNF on the response of dopamine neurons to 6-hydroxydopamine: Time course of protection and neurorestoration. *Brain Res*, 2011, 1370: 80-88.
- [4] Yu ZQ, Zha JH, Liu HM, et al. Effect of Intranigral Injection of GDNF and EGF on the Survival and Possible Differentiation Fate of Progenitors and Immature Neurons in 6-OHDA-Lesioned Rats. *Neurochem Res*, 2009, 34(12): 2089-2101.
- [5] Gonzalez-Aparicio R, Flores JA, Fernandez-Espejo E. Antiparkinsonian trophic action of glial cell line-derived neurotrophic factor and transforming growth factor β 1 is enhanced after co-injection in rats. *Exp Neurol*, 2010, 226(1): 136-147.
- [6] 刘洪梅, 丁艳霞, 王炎强, 等. 表皮生长因子加强胶质细胞源性神经营养因子对 PD 模型大鼠黑质多巴胺能神经元的保护作用. *解剖学杂志*, 2011, 34(5): 537-575.
- [7] Emborg ME, Moirano J, Raschke J, et al. Response of aged parkinsonian monkeys to in vivo gene transfer of GDNF. *Neurobiol Dis*, 2009, 36(2): 303-311.
- [8] Kells AP, Eberling J, Su X, et al. Regeneration of the MPTP-lesioned dopaminergic system after convection-enhanced delivery of AAV2-GDNF. *J Neurosci*, 2010, 30(28): 9567-9577.
- [9] Su X, Kells AP, Huang EJ, et al. Safety Evaluation of AAV2-GDNF Gene Transfer into the Dopaminergic Nigrostriatal Pathway in Aged and Parkinsonian Rhesus Monkeys. *Hum Gene Ther*, 2009, 20(12): 1627-1640.
- [10] Moloney TC, Dockery P, Windebank AJ, et al. Survival and immunogenicity of mesenchymal stem cells from the green fluorescent protein transgenic rat in the adult rat brain. *Neurorehabil Neural Repair*, 2010, 24(7): 645-656.
- [11] Glavaski-Joksimovic A, Virag T, Mangatu TA, et al. Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor-Secreting Genetically Modified Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Promote Recovery in a Rat Model of Parkinson's Dis-

- ease. *J Neurosci Res*, 2010, 88(12): 2669-2681.
- [12] Biju K, Zhou Q, Li G, et al. Macrophage-mediated GDNF delivery protects against dopaminergic neurodegeneration: a therapeutic strategy for Parkinson's disease. *Mol Ther*, 2010, 18(8): 1536-1544.
- [13] 徐胜利, 周明, 陈彪. 神经营养因子基因修饰的神经干细胞在帕金森病大鼠模型中的治疗作用. *中华老年医学杂志*, 2010, 29(1): 58-62.
- [14] Moloney TC, Rooney GE, Barry FP, et al. Potential of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for delivery of neurotrophins to the Parkinsonian rat brain. *Brain Res*, 2010, 4(1359): 33-43.
- [15] 束汉生, 朱成, 王淮, 等. GDNF 诱导分化骨髓基质细胞对 PD 大鼠的治疗作用. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2008, 7(5): 415-418.
- [16] Praet J, Reekmans K, Lin D, et al. Cell type-associated differences in migration, survival, and immunogenicity following grafting in CNS tissue. *Cell Transplant*, 2012, 21(9): 1867-1881.
- [17] Hoban DB, Newland B, Moloney TC, et al. The reduction in immunogenicity of neurotrophin overexpressing stem cells after intra-striatal transplantation by encapsulation in an in situ gelling collagen hydrogel. *Biomaterials*, 2013, 34(37): 9420-9429.
- [18] Zhou QH, Boado RJ, Hui EK, et al. Chronic Dosing of Mice with a Transferrin Receptor Monoclonal Antibody-Glia-Derived Neurotrophic Factor Fusion Protein. *Drug Metab Dispos*, 2011, 39(7): 1149-1154.
- [19] Zhou QH, Boado RJ, Lu JZ, et al. Monoclonal Antibody-Glia-Derived Neurotrophic Factor Fusion Protein Penetrates the Blood-Brain Barrier in the Mouse. *Drug Metab Dispos*, 2010, 38(4): 566-572.
- [20] Fu A, Zhou QH, Hui EK, et al. Intravenous treatment of experimental Parkinson's disease in the mouse with an IgG-GDNF fusion protein that penetrates the blood-brain barrier. *Brain Res*, 2010, 1352: 208-213.
- [21] Migliore MM, Ortiz R, Dye S, et al. Neurotrophic and neuroprotective efficacy of intranasal GDNF in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 2014, 274: 11-23.
- [22] Lang AE, Gill S, Patel NK, et al. Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease. *Ann Neurol*, 2006, 59(3): 459-466.
- [23] Slevin JT, Gash DM, Smith CD, et al. Unilateral intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor in patients with Parkinson disease: response to 1 year each of treatment and withdrawal. *Neurosurg Focus*, 2006, 20(5): E1.
- [24] Patel NK, Pavese N, Javed S, et al. Benefits of putamenal GDNF infusion in Parkinson disease are maintained after GDNF cessation. *Neurology*, 2013, 81(13): 1176-1178.

远程神经病学的应用研究

陈静, 金巍, 董文帅 综述 任传成, 顾勇 审校
 复旦大学附属上海市第五人民医院, 上海市 200240

摘要: 近年发展起来的远程神经病学(teleneurology)作为远程医疗的一部分,指医生和患者在空间上,甚至时间上不同步的情况下,完成神经科医疗行为。本综述主要是介绍远程神经病学研究背景、概念、主要应用的方向、技术设备和远程神经病学应用的利弊进行阐述。

关键词: 远程医疗; 远程神经病学; 远程卒中

目前,神经专科医生在国内外均相对缺乏,尤其是在交通不便利的郊区或农村地区,随着人口老

基金项目:上海市基于物联网技术进行居家远程瘫痪康复的示范应用(2013SJXW152);上海市家庭监护设备的临床实验和试点应用(12DZ1941103)

收稿日期:2014-11-06;修回日期:2015-01-20

作者简介:陈静(1990-),女,在读硕士研究生。主要从事脑血管相关性疾病及远程康复在脑卒中后康复应用的研究。

通讯作者:任传成(1967-),男,博士生导师,主任医师,主要从事脑卒中后脑保护机制相关研究及远程康复在脑卒中后康复应用的研究。E-mail:rcnsf@sina.com。

顾勇(1961-),男,博士生导师,院长、主任医师,主要从事慢性肾功能减退的机制及防治对策及远程医疗在慢性疾病的应用研究。E-mail:yonggu@vip.163。