

颞下颌关节骨关节炎基因治疗的研究进展

杨 彬综述 张志光审校

(中山大学光华口腔医学院·附属口腔医院·口腔医学研究所 广东 广州 510055)

[摘要] 骨关节炎是常见的关节退行性疾病,以软骨损伤为特征,常规治疗效果不理想,基因治疗作为新的技术近年来已经开始用于关节病的治疗。颞下颌关节是活动最频繁的滑膜关节之一,出生后即开始发生不断地改建,以适应不同年龄阶段咀嚼功能的需要,其结构与功能对于维持口颌系统的平衡起着重要作用。颞下颌关节虽然体积小,但却承担了相对较大的咀嚼力,因此较其他的大关节更容易发生骨关节炎。本文对颞下颌关节骨关节炎基因治疗的靶细胞、目的基因和载体等的研究进展作一综述。

[关键词] 颞下颌关节; 骨关节炎; 基因治疗

[中图分类号] R 782.6 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1673-5749.2010.05.032

Research progress of gene therapy on temporomandibular joint osteoarthritis YANG Bin, ZHANG Zhi-guang. (Research Institute of Stomatology, Hospital of Stomatology, Guanghua School of Stomatology, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510055, China)

[Abstract] Osteoarthritis is a common degenerative articulation disease, which is characterized by cartilage injury. Conventional treatment of this disease is not satisfactory. Gene therapy becomes a new technique for the treatment of joint diseases in recent years. Temporomandibular joint is one of the most active synovial joints. It is in ongoing remodeling after birth, which will meet to the demand of masticatory function at different age stages. The structure and function of this joint are significant to keep the balance of stomatognathic system. Although temporomandibular joint is small in size, it bears relatively heavy masticatory force. So it is more vulnerable to osteoarthritis than other larger joints. This article is a brief review about the progress of target cells, candidate gene and vectors of gene therapy on temporomandibular joint osteoarthritis.

[Key words] temporomandibular joint; osteoarthritis; gene therapy

骨关节炎(osteoarthritis)是一种以关节软骨退行性损耗为特征的疾患,多发生于中老年人,多伴发软骨下骨、滑膜和滑液的改变,会随着关节结构的破坏而出现功能障碍,其发病是一个慢性迁移、进行性加重的过程。虽然骨关节炎不是致命性的疾病,但是严重危害着患者的生活质量。颞下颌关节是人体中活动最频繁的滑膜关节之一,在咀嚼、吞咽、言语和呼吸时都在运动,并且颞下颌关节的形态不固定,人的一生中髁突、关节窝、关节盘和关节软骨在不断地发生改建以适应不同年龄阶段口颌系统的平衡,这使得关节结构经常处于破坏—修复—改建—破坏的过程中。颞下颌关节内骨和软骨的结构较其他大关节更为精细,耐受力更小。因此,颞下颌关节结构的稳定

性较其他大关节差,更容易发生骨关节炎。目前,颞下颌关节骨关节炎的保守治疗或手术治疗在缓解症状和恢复功能方面取得了一定的效果,但都不能恢复关节的退行性变,很难实现关节软骨、软骨下骨和滑膜的修复与再生。近年来,基因治疗作为一种新兴的治疗手段已经得到了飞速发展,为关节病的治疗打开了一扇新窗口。

1 基因治疗和颞下颌关节病基因治疗的可行性

基因治疗是指将人的正常基因或有治疗作用的基因通过一定方式导入人体靶细胞以纠正基因的缺陷或者发挥治疗作用的新技术。其基本程序包括治疗性基因的选择、基因载体的选择、靶细胞的选择、基因转移、外源性基因表达检测和回输体内等基本程序。基因治疗分为直接体内法和间接体内法。直接体内法是将目的基因导入体内在体内转染靶细胞而获得表达。间接体内法

[收稿日期] 2009-03-06; [修回日期] 2009-08-27

[作者简介] 杨 彬(1983—),男,山东人,博士

[通讯作者] 张志光, Tel: 020-83870387

是在体外先对靶细胞进行基因修饰后再将靶细胞回输体内。1994 年, Hung 等^[1]首次将基因疗法引入关节病的治疗, 并提出转入相关基因可抑制关节内病理过程的观点, 为以后骨关节病的基因治疗指出了一条道路。1996 年, Evans 等^[2]对抗炎细胞因子基因治疗类风湿性关节炎临床试验的安全性、可行性和有效性进行了评估。1999 年, Kuboki 等^[3]试用腺病毒载体(adenovirus, AD)携带 β -半乳糖苷酶基因直接体内法注射到豚鼠颞下颌关节上腔, 4 周后发现, 关节软骨和滑膜均有 β -半乳糖苷酶的稳定表达, 从而证明了腺病毒介导基因治疗颞下颌关节疾病的可行性。

2 关节病基因治疗的靶细胞

目的基因要通过载体转染到合适的靶细胞内才能稳定表达, 理想的靶细胞要有较高的转染率, 能够持续表达目的基因产物, 转染后能够在治疗时间内发挥修复或保护功能, 并且易于获得和易于体外培养。由于转入外源性基因有引起插入突变的可能性, 故还要求靶细胞要有较小的畸变率。目前, 关节病基因治疗的靶细胞包括软骨细胞、滑膜细胞、骨髓基质干细胞和肌源性干细胞等。滑膜作为类风湿性关节炎的主要病变部位, 而且其分布面积较大, 所以大多数类风湿性关节炎的基因治疗常选择滑膜细胞作为靶细胞。但 Gouze 等^[4]发现, 滑膜细胞不能长时间的表达目的基因, 不适合长期的基因治疗; 同时他们还发现, 载体、目的基因的产物和靶细胞之间的免疫相容性也影响着目的基因的长期表达。因骨关节病是以软骨损伤、炎症和软骨细胞凋亡为特征的疾病, 如何通过导入相关基因并使其良好表达来实现软骨的修复是治疗骨关节病的重点。骨髓基质干细胞和肌源性干细胞等经体外转染基因修饰后再回输体内, 可以定向分化为软骨、滑膜或骨组织, 但其需要定向分化后才能参与修复。

3 目的基因

候选基因的目的基因产物有抑制炎症、促进修复、抗衰老和抑制凋亡等治疗作用, 或者可以转入反义核苷酸直接抑制有害基因的表达。

3.1 抗炎基因

3.1.1 白细胞介素-1 受体拮抗剂(interleukin-1 receptor antagonist, IL-1ra) IL-1ra 竞争性与 IL-1 受体结合, 阻断 IL-1 对关节软骨的破坏。

Hung 等^[1]用间接体内法将 IL-1ra 基因转入兔膝关节滑膜细胞中, 证实了外源性 IL-1ra 对关节滑膜和软骨有保护作用。之后不断有 IL-1ra 基因治疗关节病的研究, 如 Wehling 等^[5]进行了 IL-1ra 基因治疗类风湿性关节炎的人体临床试验后发现, 人体内 IL-1ra 可至少稳定表达 1 个月, 并证实了其临床治疗的安全性。

3.1.2 可溶性肿瘤坏死因子受体(soluble tumor necrosis factor receptor, sTNFR) sTNFR 通过与肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)结合, 抑制其对关节滑膜和软骨的破坏作用。Ghivizzani 等^[6]将 sTNF- α R 基因和可溶性 IL-1ra 基因通过 AD 转入兔膝关节后发现, 如果单独转染 IL-1ra 基因可以抑制软骨基质降解和关节腔内白细胞的浸润; 单独转染 sTNF- α R 基因仅可抑制白细胞的浸润, 但如果同时转染 IL-1ra 基因和 sTNF- α R 基因, 则可以大大增强抑制关节软骨基质降解和白细胞浸润的作用。

3.1.3 IL-10 目前认为, IL-10 是一种免疫调节分子, 可抑制 TNF- α 等多种炎性细胞因子的合成, 并下调基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)的合成, 对关节软骨起保护作用。Zhang 等^[7]将 IL-10 基因通过逆转录病毒载体(retrovirus, RV)转染 IL-1 β 诱导的兔膝关节滑膜成纤维细胞后发现, 该方法可以有效地抑制 IL-1 β 诱导的炎症反应。

3.1.4 组织基质金属蛋白酶抑制因子-1(tissue inhibitor of matrix metalloproteinase, TIMP-1) TIMP-1 是一种 MMP 组织抑制剂, 可以限制 MMP 的活性, 减轻其对软骨基质的溶解破坏。Kafienah 等^[8]用泛嗜性逆转录病毒(pantropic retrovirus)作为载体将 TIMP-1 基因转染牛软骨细胞后发现, TIMP-1 可持续表达 6 周以上, 并可抑制软骨基质胶原的降解和保护蛋白多糖。

3.2 促进修复基因

3.2.1 转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1) TGF- β_1 能够逆转 IL-1 所引起的 MMP 分泌增加^[9]和蛋白聚糖合成抑制, 并可诱导 TIMP-3 的产生^[10], 促进软骨修复。Shuler 等^[11]利用 AD 将 TGF- β_1 基因转入新西兰白兔膝关节和肩关节软骨细胞后发现, 这种方法可以提升软骨细胞产胶原和蛋白多糖的能力。一些学者^[12-13]分别将 TGF- β_1 基因转入骨髓间充质干细胞, 再将经体外修饰的间充质干细胞回输体内后发现, 其成

软骨修复关节软骨全层缺损的能力大大提高。

3.2.2 成纤维细胞生长因子-2(fibroblast growth factor-2, FGF-2) FGF-2 基因可以促进软骨细胞增殖和蛋白多糖合成,是软骨细胞的有丝分裂原。Cucchiaroni等^[14]将 FGF-2 基因转染到关节软骨细胞中后发现,稳定表达的 FGF-2 能够促进软骨细胞的有丝分裂,但对基质合成增加的促进能力有限。

3.2.3 胰岛素样生长因子-1(insulin like growth factor-1, IGF-1) IGF-1 是刺激软骨基质蛋白多糖合成的重要物质,IGF-1 还可抑制软骨基质的降解并可对抗 IL-1 的软骨破坏作用^[15]。Izal等^[16]用直接体内法将 IGF-1 通过腺相关病毒载体转染到胶原诱导的关节炎大鼠模型体内后发现,其可以促进损伤的修复。

3.2.4 骨形态发生蛋白-2、4、7(bone morphogenetic protein-2,4,7, BMP-2,4,7) 近年来,发现 BMP 对软骨形成有重要的调节作用。Di Cesare等^[17]用 BMP-2 裸 DNA 质粒诱导间充质干细胞获得了透明软骨样软骨组织。Chen等^[18]通过杆状病毒载体将 BMP-2 转染去分化的软骨细胞后发现,其能促进去分化软骨细胞在体外重新合成软骨样组织。Kuroda等^[19]将 BMP-4 转染肌源性干细胞,再将经 BMP-4 修饰的肌源性干细胞回输裸鼠体内后发现,其能增强肌源性干细胞成软骨的能力。Hidaka等^[20]将 BMP-7 转染马关节软骨细胞修复马软骨缺损后发现,其能诱导出透明软骨样修复组织。

3.2.5 生长分化因子-5(growth differentiation factor-5, GDF-5) GDF-5 亦称软骨形态发生蛋白-1(cartilage-derived morphogenetic protein-1, CDMP-1)。Feng等^[21]将 GDF-5 通过 AD 转染大鼠脂肪干细胞后发现,这种方法可以促进其定向分化为软骨并提高蛋白聚糖和 I 型胶原在 mRNA 水平和蛋白质水平的表达。

3.3 多种基因联合共转染

为减少转染的次数、提高转染率,减少基因治疗过程给靶细胞和机体的副作用,同时探讨不同外源性基因共转染是否存在正向或负向的关系,有学者将 2 种或 2 种以上的基因通过重组到 1 个载体中实现了同时转染靶细胞。Steinert等^[22]将 TGF- β_1 、IGF-1 和 BMP-2 同时转染间充质干细胞后发现,这种方法可以实现 TGF- β_1 、IGF-1 和 BMP-2 长时间稳定的共表达,并能促进间充质干

细胞向软骨的定向分化。Wei等^[23]用重组 AD 将 TGF- β_1 和血管内皮生长因子 165(vascular endothelial growth factor 165, VEGF165)即 Ad-VEGF-165-IRES-TGF- β_1 同时转染到新西兰大白兔膝关节前十字韧带成纤维细胞中后发现,TGF- β_1 和 VEGF165 可以共表达,并可以上调 I 型和 II 型胶原的表达。Morisset等^[24]将 IL-1ra/IGF-1 经 AD 联合转染软骨细胞修复软骨全层缺损,6 周后发现,IL-1ra/IGF-1 可以持续的共表达且 I 型胶原和蛋白多糖的合成增强。

3.4 反义核苷酸技术的应用

目前,应用于关节病基因治疗的主要是 RNA 干扰技术(RNA interference, RNAi)。RNAi 的基本原理是将与靶细胞 mRNA 对应的反义寡核苷酸导入细胞,反义寡核苷酸与靶 mRNA 结合,激活 RNA 裂解酶,使 mRNA 发生特异性的降解,或通过直接阻止核糖体结合来直接抑制 mRNA 的翻译,从而导致其相应的基因沉默和相关有害蛋白质合成通路的障碍,抑制有害蛋白质的表达,取得治疗的效果。Chen等^[25]通过 AD 将核因子 κ Bp65(nuclear factor- κ Bp65, NF- κ Bp65) 的小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)即 Ad-siRNA(NF- κ Bp65)导入软骨细胞治疗早期大鼠骨关节炎后发现,该方法能够抑制 NF- κ Bp65 的表达,减少滑液中 IL-1 和 TNF- α 的合成,抑制退行性关节炎的早期炎症反应。

4 载体

外源性基因通过载体传递到靶细胞内必须经适当表达后才能发挥作用。载体的生物安全性、转染率、免疫原性、致突变率、载体的容量、基因转染的控制和制备的难易等都是基因治疗的关键。目前,所用的载体分为病毒载体和非病毒载体。

4.1 病毒载体

病毒载体主要是 AD。AD 的优点在于其获得容易、可转染分裂或未分裂期的细胞、转染率高、宿主靶细胞广泛、转染的基因能够高表达,而且已经获得国外用于临床实验的批准;但是,其免疫原性大,虽整合率较低,但高剂量时也表现细胞毒性^[26]。而腺相关病毒载体(adeno-associated virus, AAV)感染宿主靶细胞后不表达自身病毒蛋白、较少诱发免疫反应、生物安全性高,到目前尚未发现有致病性;但是,其容量小、所转基因

表达不足,制备较 AD 困难。Dai 等^[27]用 AAV-2 携带绿色荧光蛋白直接体内法转染 SD 大鼠颞下颌关节髁突软骨细胞后发现,绿色荧光蛋白能够长期表达,并在 21 d 时达到顶峰。这就证实了 AAV-2 作为载体携带目的基因治疗颞下颌关节病的可行性。RV^[28]可有效地将携带的目的基因整合入宿主基因组中,以达到长期稳定的表达,但其容易在体内降解失活、插入突变率高、生物安全性差,而且只能感染分裂期的细胞,使其应用受到局限^[26]。慢病毒载体(lentivirus, LV)^[29]是特殊的 RV,与 RV 相比较,其可感染非分裂期和分裂期的细胞,容量更大,缺点仍是容易引起插入突变。还有其他学者将昆虫杆状病毒^[30]和单纯疱疹病毒^[26]等作为载体转移目的基因用于关节病的基因治疗。

4.2 非病毒载体

裸 DNA(naked DNA)是将目的基因连接到表达质粒后直接注射入组织中,其操作简单、生物安全性好,但转染率低、靶向性差、基因表达时间短^[26]。脂质体载体是磷脂包裹的 DNA,其操作简单、生物安全性好、体内转染率低,但可引起机体的免疫反应、基因表达时间短。Goomer 等^[31]通过脂质体载体将 TGF- β_1 和 β -半乳糖苷酶真核表达质粒转染软骨细胞后发现,能够得到可以稳定表达 7 d 的基因产物,体外转染率达 70%以上。此外,还有学者将阳离子聚合物^[32]和壳聚糖^[33]作为载体来携带目的基因转染软骨细胞。

另外,新的基因物理转移方法如基因枪(gene gun)、电穿孔法(electro-transfer)和超声波法等均见于目前关节病基因治疗领域的研究当中。

5 结束语

综上所述,以上基因治疗大部分都是以大关节作为靶器官。颞下颌关节病的基因治疗报道文献有限,但颞下颌关节骨关节病与大关节骨关节病在病理过程上是相同的,大关节病基因治疗的研究为颞下颌关节基因治疗指明了方向。

目前,关节病基因治疗所存在的问题如下。首先,目前大都将病毒类或脂类等天然或人工合成物作为载体来传递目的基因,这势必引起插入突变或免疫反应的安全隐患,寻找生物安全性更好的载体或更有效的物理转基因方法,将基因治疗的副作用减至最小,仍然是以后需要解决的难题;其次,目前发现所转基因表达时间有限,

而颞下颌关节骨关节病是慢性、进行性发展的,怎样使所转基因产物长期稳定的表达,而且能达到治疗浓度,仍然需要进一步的研究;再次,骨关节病是多种因素引起的,软骨、滑膜和软骨下骨等多种组织受累的多基因病,因此,单一基因治疗就有局限性,故通过基因芯片等新技术寻找新的关键致病基因,并通过联合基因治疗实现多基因治疗的效果,也需要进一步的研究;此外,目前所进行的基因治疗都是治疗基因的基因增补或致病基因的基因沉默,都没有从根本上纠正或置换致病基因,在一定条件下,致病基因有恢复表达或上调表达的可能。因此,关节病基因治疗仍是不断发展的新技术,颞下颌关节骨关节病基因治疗领域的研究更是任重而道远。

6 参考文献

- [1] Hung GL, Galea-Lauri J, Mueller GM, et al. Suppression of intra-articular responses to interleukin-1 by transfer of the interleukin-1 receptor antagonist gene to synovium[J]. *Gene Ther*, 1994, 1(1): 64-69.
- [2] Evans CH, Robbins PD, Ghivizzani SC, et al. Clinical trial to assess the safety, feasibility, and efficacy of transferring a potentially anti-arthritis cytokine gene to human joints with rheumatoid arthritis[J]. *Hum Gene Ther*, 1996, 7(10): 1261-1280.
- [3] Kuboki T, Nakanishi T, Kanyama M, et al. Direct adenovirus-mediated gene delivery to the temporomandibular joint in guinea-pigs[J]. *Arch Oral Biol*, 1999, 44(9): 701-709.
- [4] Gouze E, Gouze JN, Palmer GD, et al. Transgene persistence and cell turnover in the diarthrodial joint: Implications for gene therapy of chronic joint diseases[J]. *Mol Ther*, 2007, 15(6): 1114-1120.
- [5] Wehling P, Reinecke J, Baltzer AA, et al. Clinical responses to gene therapy in joints of two subjects with rheumatoid arthritis[J]. *Hum Gene Ther*, 2009, 20(2): 97-101.
- [6] Ghivizzani SC, Lechman ER, Kang R, et al. Direct adenovirus-mediated gene transfer of interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha soluble receptors to rabbit knees with experimental arthritis has local and distal anti-arthritis effects[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(8): 4613-4618.
- [7] Zhang N, Cui HD, Xue HX. Effect of local viral transfer of interleukin 10 gene on a rabbit arthritis model induced by interleukin 1beta[J]. *Chin Med J(Engl)*, 2008, 121(5): 435-438.
- [8] Kafienah W, Al-Fayez F, Hollander AP, et al. Inhibition of cartilage degradation: A combined tissue engi-

- neering and gene therapy approach[J]. *Arthritis Rheum*, 2003, 48(3) :709-718.
- [9] Harvey AK, Hrubey PS, Chandrasekhar S. Transforming growth factor- β inhibition of interleukin-1 activity involves down-regulation of interleukin-1 receptors on chondrocytes[J]. *Exp Cell Res*, 1991, 195(2) :376-385.
- [10] Qureshi HY, Ricci G, Zafarullah M. Smad signaling pathway is a pivotal component of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 regulation by transforming growth factor β in human chondrocytes[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1783(9) :1605-1612.
- [11] Shuler FD, Georgescu HI, Niyibizi C, et al. Increased matrix synthesis following adenoviral transfer of a transforming growth factor β 1 gene into articular chondrocytes[J]. *J Orthop Res*, 2000, 18(4) :585-592.
- [12] Pagnotto MR, Wang Z, Karpie JC, et al. Adeno-associated viral gene transfer of transforming growth factor- β 1 to human mesenchymal stem cells improves cartilage repair[J]. *Gene Ther*, 2007, 14(10) :804-813.
- [13] Guo X, Zheng Q, Yang S, et al. Repair of full-thickness articular cartilage defects by cultured mesenchymal stem cells transfected with the transforming growth factor β 1 gene[J]. *Biomed Mater*, 2006, 1(4) :206-215.
- [14] Cucchiari M, Madry H, Ma C, et al. Improved tissue repair in articular cartilage defects *in vivo* by rAAV-mediated overexpression of human fibroblast growth factor 2[J]. *Mol Ther*, 2005, 12(2) :229-238.
- [15] Gooch KJ, Blunk T, Courter DL, et al. IGF-1 and mechanical environment interact to modulate engineered cartilage development[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 286(5) :909-915.
- [16] Izal I, Acosta CA, Ripalda P, et al. IGF-1 gene therapy to protect articular cartilage in a rat model of joint damage[J]. *Arch Orthop Trauma Surg*, 2008, 128(2) :239-247.
- [17] Di Cesare PE, Frenkel SR, Carlson CS, et al. Regional gene therapy for full-thickness articular cartilage lesions using naked DNA with a collagen matrix[J]. *J Orthop Res*, 2006, 24(5) :1118-1127.
- [18] Chen HC, Sung LY, Lo WH, et al. Combination of baculovirus-expressed BMP-2 and rotating-shaft bioreactor culture synergistically enhances cartilage formation [J]. *Gene Ther*, 2008, 15(4) :309-317.
- [19] Kuroda R, Usas A, Kubo S, et al. Cartilage repair using bone morphogenetic protein 4 and muscle-derived stem cells[J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(2) :433-442.
- [20] Hidaka C, Goodrich LR, Chen CT, et al. Acceleration of cartilage repair by genetically modified chondrocytes overexpressing bone morphogenetic protein-7[J]. *J Orthop Res*, 2003, 21(4) :573-583.
- [21] Feng G, Wan Y, Balian G, et al. Adenovirus-mediated expression of growth and differentiation factor-5 promotes chondrogenesis of adipose stem cells[J]. *Growth Factors*, 2008, 26(3) :132-142.
- [22] Steinert AF, Palmer GD, Pilapil C, et al. Enhanced *in vitro* chondrogenesis of primary mesenchymal stem cells by combined gene transfer[J]. *Tissue Eng Part A*, 2009, 15(5) :1127-1139.
- [23] Wei XL, Lin L, Hou Y, et al. Construction of recombinant adenovirus co-expression vector carrying the human transforming growth factor- β 1 and vascular endothelial growth factor genes and its effect on anterior cruciate ligament fibroblasts[J]. *Chin Med J(Engl)*, 2008, 121(15) :1426-1432.
- [24] Morisset S, Frisbie DD, Robbins PD, et al. IL-1ra/IGF-1 gene therapy modulates repair of microfractured chondral defects[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2007, 462 :221-228.
- [25] Chen LX, Lin L, Wang HJ, et al. Suppression of early experimental osteoarthritis by *in vivo* delivery of the adenoviral vector-mediated NF- κ Bp65-specific siRNA [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008, 16(2) :174-184.
- [26] Steinert AF, Nöth U, Tuan RS. Concepts in gene therapy for cartilage repair[J]. *Injury*, 2008, 39(Suppl 1) :97-113.
- [27] Dai J, Rabie AB. Direct AAV-mediated gene delivery to the temporomandibular joint[J]. *Front Biosci*, 2007, 12 :2212-2220.
- [28] Zhang N, Cui HD, Xue HX. Effect of local viral transfer of interleukin 10 gene on a rabbit arthritis model induced by interleukin 1 β [J]. *Chin Med J(Engl)*, 2008, 121(5) :435-438.
- [29] Delgado M, Toscano MG, Benabdellah K, et al. *In vivo* delivery of lentiviral vectors expressing vasoactive intestinal peptide complementary DNA as gene therapy for collagen-induced arthritis[J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58(4) :1026-1037.
- [30] Chen HC, Sung LY, Lo WH, et al. Combination of baculovirus-expressed BMP-2 and rotating-shaft bioreactor culture synergistically enhances cartilage formation [J]. *Gene Ther*, 2008, 15(4) :309-317.
- [31] Goomer RS, Defetos LJ, Terkeltaub R, et al. High-efficiency non-viral transfection of primary chondrocytes and perichondrial cells for *ex-vivo* gene therapy to repair articular cartilage defects[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2001, 9(3) :248-256.
- [32] Ohashi S, Kubo T, Ikeda T, et al. Cationic polymer-mediated genetic transduction into cultured human chondrosarcoma-derived HCS-2/8 cells[J]. *J Orthop Sci*, 2001, 6(1) :75-81.
- [33] Zhang X, Yu C, Xu S, et al. Direct chitosan-mediated gene delivery to the rabbit knee joints *in vitro* and *in vivo*[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 341(1) :202-208.