

椎间盘退行性变的生物学治疗进展*

韩小伟¹综述,冯刚^{2△}审校(1. 川北医学院组织工程与干细胞研究所, 四川南充 637000; 2. 四川省南充市中心
医院/川北医学院第二临床医学院 637000)**关键词:**椎间盘退行性变; 基因治疗; 组织工程; 生物学治疗

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.21.038

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)21-2204-03

椎间盘退行性变可诱发脊柱退行性改变、椎间盘髓核突出、椎管狭窄等疾病,是引起下腰痛的主要原因,因其具有高发病率和高致残率的特点,给社会和家庭带来了沉重的负担。目前的治疗措施主要包括髓核摘除、椎管减压及退变脊柱节段融合等,但只能在短期内缓解临床症状,其远期疗效并不显著,且存在并发症多的缺点^[1]。近年来,随着分子生物学、细胞生物学的深入研究,发现椎间盘细胞数量减少、压力损伤终板的微骨折、细胞外基质降解增加、炎症因子的异常表达等均可导致椎间盘的主要成分代谢失衡,从而引发椎间盘退行性变的发生、发展。研究人员以此为基础,针对退行性变的不同阶段,利用基因工程、细胞工程、组织工程手段来恢复退行性变椎间盘细胞数量或重建椎间盘解剖结构和生理功能,从根本上为治疗椎间盘退行性变提供了有效策略。

1 椎间盘的结构功能及退变特点

椎间盘属于免疫豁免、完全封闭、无血管的组织结构,由中央的髓核(NP)、外周的纤维环(AF)及上下软骨终板(CEP)3部分构成。纤维环呈同心环状排列,分外层的成纤维细胞层和内层的类软骨细胞层;髓核细胞生长在髓核凝胶状基质中,主要含脊索细胞和类软骨样细胞,细胞含量较少,但相互之间联系紧密。髓核细胞分泌的Ⅱ型胶原和蛋白聚糖为细胞外基质的主要成分,其主要作用是保持正常椎间盘的含水量,保证细胞正常代谢及均匀分布椎间盘应力,从而维持椎间盘一定的形态和静水压,有效对抗自身体质量和肌肉运动产生的应力,因此髓核是行使椎间盘功能的关键部位。

椎间盘由于完全封闭,其营养代谢途径主要通过以软骨终板通路的渗透作用出入椎间盘,此过程受到血管因素、软骨终板、基质内转运、细胞因素和机械因素等影响^[2]。一旦渗透功能降低,其营养物和代谢物的转运将受阻,加之局部炎症因子以及特定基因表达异常等,促使椎间盘细胞生物活性降低,细胞外基质(蛋白聚糖、胶原蛋白等)降解增加,从而引起基质代谢失衡,细胞凋亡加快、间盘水分减少、高度降低,最终导致椎间盘生物力学发生改变。

2 基因工程干预早期椎间盘退行性变

基因治疗是通过把一段特定的核酸序列(目的基因)以一定技术或载体转入靶细胞,以改变细胞核酸成分使其表达特定的细胞因子,从而达到治疗或者预防疾病的目的。通过改变细胞遗传学性状,使其持续稳定表达基质主要成分,不仅影响靶

细胞自身的代谢,还影响周围细胞的代谢。

椎间盘退行性变的早期,细胞轻度受损,基质分泌能力有所下降。因此早期调控特定细胞因子和抑制炎症因子的表达,可增加蛋白聚糖和胶原蛋白的合成,维持椎间盘的正常形态及功能或减缓椎间盘退。然而直接将细胞因子和炎症因子拮抗剂注入椎间盘,往往作用短暂而且价格昂贵,转基因技术的发展为解决细胞因子和炎症因子拮抗剂持续作用于椎间盘带来了便捷之道。

2.1 目的基因的选择 能够促使靶细胞稳定表达所需细胞因子的目的基因主要分以下两类,一类为促进细胞合成代谢途径的转化生长因子- β (TGF- β)、胰岛素样生长因子(IGF-1)、骨形态生成蛋白(BMPs)、骨矿化蛋白 1(LMP-1)、SOX9 基因等;另一类为阻断细胞外基质降解途径的金属蛋白酶组织抑制剂(TIMP-1)、白细胞介素 1 受体抗体(IL-1Ra)基因等。

Le Maitre 等^[3]将 IL-1 与 IL-1Ra 加入到体外培养的人髓核细胞中,证实 IL-1Ra 能抑制细胞外基质的降解,增加蛋白聚糖的合成。而 IL-1 则增加基质蛋白酶 3 与 13 的水平,促进蛋白多糖的分解。在研究单个目的基因的作用水平同时,也有研究人员通过进行多基因联合转导,来观察细胞外基质的分泌情况。Kim 和 Ellman^[4]用 BMP-7 和 IGF-1 共同作用于牛髓核细胞,发现对照 BMP-7 或者 IGF-1 的单一转染,联合转染的蛋白表达量增加更为明显。但是多种基因的联合转导是否真正有效,研究人员之间也存在不同的观点,作者认为这可能与目的基因选择和转入后基因之间的相互作用有一定关系。

2.2 基因治疗的载体 应用基因疗法来治疗椎间盘退行性变必须要有一个基因传递载体,能在体内或体外把目的基因导入靶细胞。现有的载体主要分为病毒载体和非病毒载体。非病毒载体能避免转染载体的播散和降低宿主对载体的免疫反应,但是它仍受到转染率不高、基因表达时间短的困扰。而病毒由于能够侵入细胞并影响转录和翻译,因此最常被用来做为基因传递载体。

病毒载体可以分为两类,一类是可以把基因整合到宿主染色体内而增加其表达时间的载体,如逆转录病毒(RV,包括慢病毒载体);另一类则不把基因整合入宿主细胞的染色体,如腺病毒(AV)、腺相关病毒(AAV)。

以人类免疫缺陷 I 型病毒(HIV-1)为基础发展起来的慢病毒载体,具有能感染各时相的细胞,并可携带较大的基因片

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30872614,81071270),四川省科技支撑计划项目(2008SZ0103),四川省杰出青年学科带头人资助计划(2009-05-396),川北医学院苗圃基金资助项目(MP-09A-06)。 △ 通讯作者, Tel:15881729989; E-mail: lssmd18@gmail.com。

段、延长目的基因表达时间等优势,是近年来基因工程运用较多的病毒载体。Miyazaki 等^[5]把 BMP-2 基因整合到慢病毒,然后转导进兔髓间充质干细胞,结果细胞贴附生长的胶原三维支架逐渐消失,注入部位的相邻横突间彼此形成骨连接。

腺相关病毒属微小病毒科家族成员,其复制依赖于其他辅助病毒,如 AV、痘苗病毒等。通过对 AV 和 AAV 这两种载体对椎间盘基因治疗的安全性作了对比研究,结果发现,腺病毒转染组大多出现了明显的临床、组织学及病理学改变,而腺相关病毒组则未出现明显的不良反应^[6]。

3 细胞移植治疗中期椎间盘退行性变

椎间盘退行性变中期,细胞进一步受损,基质分泌能力严重下降,基质的降解加快,但病变仍只限于髓核组织中。此阶段单纯基因治疗并不能有效地干预退变的进展,相比之下细胞移植则不仅能补充椎间盘细胞数量,而且还可以联合基因工程以提高细胞分泌活性,增加细胞外基质含量。因此,细胞移植是延缓中期椎间盘退变的理想方法。现有的诱导培养体系为研究者提供了较多类型移植所需的种子细胞,但细胞来源、分化表型、增殖能力、科学伦理等因素又极大地限制了研究者的选择。

3.1 自体或异体椎间盘细胞移植 椎间盘细胞包括脊索细胞、纤维环细胞、髓核细胞。脊索细胞可以促进髓核细胞增殖分化,对维持髓核内细胞数量及细胞外基质含量起重要作用;正常髓核细胞能合成蛋白聚糖和Ⅱ型胶原,是构建椎间盘组织工程的理想的种子细胞。Nomura 等^[7]将兔同种异体的完整髓核和髓核细胞移入吸出髓核导致的椎间盘退行性变模型中,16 周后进行组织学观察和免疫组化检测,结果显示,移植完整髓核的椎间盘退行性变最轻,移植髓核细胞的椎间盘次之,未治疗的椎间盘退变最严重,每组通过 CD4 和 CD5 抗体检查 T 和 B 淋巴细胞反应均未发现免疫排斥反应。针对体外培养髓核细胞增殖能力较低且易发生退变,Lwashina 等^[8]成功建立出人髓核细胞系(HNPSV),并将其植入退变椎间盘,免疫组化分析和形态学观察发现移植组椎间盘髓核与纤维环结构完整,蛋白聚糖和Ⅱ型胶原表达明显增高。

3.2 间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs) 主要来源于骨髓、脂肪、脐带,属于成体干细胞的分支,现有的研究表明 MSCs 在椎间盘基质微环境、生物活性物质或椎间盘细胞等共培养条件下均具有向髓核细胞分化的潜能。Yang 等^[9]将 MSCs 植入鼠椎间盘退变模型,证实 MSCs 可以向髓核细胞分化,诱导脊索细胞数量增加,提高蛋白聚糖基因的表达和细胞外基质在髓核部位的聚积。Gaetani 等^[10]将人脂肪干细胞和髓核细胞在体外藻酸盐三维培养基中共培养用透射电镜观察细胞形态学,免疫荧光法测细胞外基质;结果显示,脂肪干细胞表达出髓核细胞样生物活性,产生大量的蛋白聚糖和Ⅱ型胶原,从而能在体外构建出髓核组织。

3.3 诱导多潜能性干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs) iPSCs 在形态学、分子学以及分化潜能等方面与胚胎干细胞极为相似,弥补了胚胎干细胞伦理学争论和异体排异反应的缺陷,以及解决了间充质干细胞增殖和分化能力有限的难题。因其具有胚胎干细胞样特性,而倍受人们关注,已有学者成功地将 iPSCs 诱导成神经细胞和心肌细胞,并具有相应功能特性和表达特异性标记^[11-12]。

有研究认为软骨细胞是细胞移植的治疗椎间盘退变的最佳

种子细胞。Kuh 等^[13]体外培养软骨细胞、纤维环细胞、骨髓基质细胞,用重组人骨形态发生蛋白-2(rhBMP-2)添加前后做比较,结果证实软骨细胞生成的蛋白聚糖量最多。然而软骨细胞含量稀少,且增殖能力有限,限制了其在研究中的运用。

4 组织工程重建椎间盘

椎间盘退行性变后期,盘内细胞含量极少,分泌功能丧失,组织形态结构也发生改变,纤维环破裂、髓核突出,压迫脊髓、神经根等组织导致各种严重的临床症状。在此阶段,基因工程和细胞工程手段均难以恢复椎间盘结构及其生理功能,因此运用组织工程技术重建出具有仿生学性能的椎间盘是我们治疗退变后期的关键突破口。

目前,组织工程椎间盘的研究主要集中在种子细胞、支架材料、生物活性因子 3 个方面。除上文提及的种子细胞外,常用的组织工程支架材料可分为天然生物材料、人工合成材料以及复合材料。天然生物材料包括胶原、藻酸盐、糖胺多糖(glycosaminoglycans, GAGs)^[14]、壳聚糖凝胶^[15]等;人工合成材料主要有聚左旋乳酸(Poly-L-lactic acid, PLLA)^[16]、聚羟基乙酸(polyglycolic acid, PGA)、聚己酸内酯三元醇等;复合材料则是由两种或两种以上的不同材料优化组合而成,是椎间盘组织工程的重点研究方向。

4.1 髓核组织工程支架材料研究 去端肽胶原为胶原上抗原决定簇去掉后的一种变性胶原,经处理后免疫排斥性进一步得到了降低了,且在 4℃~10℃时呈半液态,在 37℃时呈固态,可以按需要塑形。Halloran 等^[17]将牛尾骨椎间盘髓核细胞接种在去端肽Ⅱ型胶原支架上培养,结果表明该支架能促进细胞生长并稳定的维持细胞表型。Mauth 等^[18]将纤维蛋白水凝胶与聚氨酯复合以改善支架力学性能和降解速率,提高细胞粘附性能;他们将髓核细胞接种于纤维蛋白凝胶-聚氨酯支架进行体外复合培养,结果发现,髓核细胞的粘附、增殖能力、表型特性得到维持;生化分析进一步表明细胞 DNA 含量增加,胶原、GAGs 等细胞外基质合成增多。

4.2 纤维环组织工程支架材料研究 Shao 等^[19]将犬纤维环细胞接种于藻酸盐复合支架,扫描电镜显示纤维环细胞生长增殖情况良好、细胞外基质丰富;同时复合支架能缓慢降解,降解产物无细胞毒性。Wan 等^[20]构建的苹果酸/聚酯聚合物 POM 支架,具有更好的机械强度和伸缩性,种植在上面的大鼠纤维环细胞生长良好,同时有Ⅱ型胶原等细胞外基质产生;此外,该研究组成员还成功构建出一种双相三维弹性支架材料,内相支架由同心状的聚己酸内酯苹果酸三醇构成,其外相支架由环状脱钙骨基质明胶(BMG)构成,分别模拟内外层纤维环,物理测试结果显示其拉伸应力接近动物椎间盘纤维环的生理水平^[21]。

4.3 软骨终板组织工程支架材料研究 软骨终板是供应椎间盘营养的平台,其发生硬化、钙化及增厚往往是诱发椎间盘退变的始动因素,然而软骨终板是一薄层软骨,构建其完整的支架材料难度很大。Hamilton 等^[22]在多孔聚磷酸钙(CPP)表面种植软骨终板细胞,培养至 8 周,通过组织学、形态学、力学性能等分析,证实在 CPP 表面形成了软骨终板样组织。Wang 和 Campbell^[23]以聚乙烯醇冷凝胶(PVA-C)模拟天然椎间盘软组织结构,结果发现 PVA-C 具有良好的生物力学特性和生物相容性,为构建软骨终板提供了有效的材料选择。

5 问题与展望

虽然应用生物学手段治疗椎间盘退变的研究结果令人兴

奋,但是要最终从实验向临床治疗过渡还需解决诸多问题。(1)目的基因的导入效率低下,通常需要转染回输多次才能成功,既损伤了靶细胞的增殖活性又增加了多基因转导的检测难度。(2)病毒载体插入或整合到染色体的位置是随机的,大剂量病毒载体导致的免疫反应以及靶细胞恶性转化的潜在危险难以排除。(3)现有椎间盘退变的模型大多是通过人为因素制造,和椎间盘本身的退变机制存在一定差异。(4)如果不能解决椎间盘的营养供应,即使前期的工作获得成功也是没有任何意义的。(5)在体外培养出的种子细胞团,最终需要植入体内才能完成它的功能,而目前的研究多在于体外培养和动物实验,虽然能够表现出一定的生物修复可能性,但植入人体内是否有效发挥作用是一个难以预测的问题。(6)植入的载体支架其仿生学性能未曾有理想的突破,有待进一步解决。(7)在椎间盘退变的病理分级,及其各分级干预的方式,尚无统一标准。

未来研究将会集中在深入了解椎间盘退变的生物学机制、种子细胞的诱导培育、仿生支架的构建及其多个工程手段联合干预等方面。相信随着科研工作者的不懈努力,上述问题将会逐一解决,并最终应用于临床。

参考文献:

- [1] Schizas C, Kulik G, et al. Disc degeneration: current surgical options[J]. *Eur Cell Mater*, 2010, 43(20):306-315.
- [2] Tian Wei, Qq Hui. Association between intervertebral disc degeneration and disturbances of blood supply to the vertebrae [J]. *Chin Med J*, 2010, 123(2):239-243.
- [3] Le Maitre CL, Hoyland JA, Freemont AJ. Interleukin-1 receptor antagonist delivered directly and by gene therapy inhibits matrix degradation in the intact degenerate human intervertebral disc: an in situ zymographic and gene therapy study [J]. *Arthritis Res Ther*, 2007, 9(4):R83.
- [4] Kim JS, Ellman MB. Insulin-like growth factor 1 synergizes with bone morphogenetic protein 7-mediated anabolism in bovine intervertebral disc cells [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(12):3706-3715.
- [5] Miyazaki M, Sugiyama O, Tow B, et al. The effects of lentiviral gene therapy with bone morphogenetic protein - 2 -producing bone marrow cells on spinal fusion in rats [J]. *J Spinal Disord Tech*, 2008, 21(5):372-379.
- [6] Levicoff EA, Kim JS, Sobajima S, et al. Safety assessment of intradiscal gene therapy II [J]. *Spine*, 2008, 33(14):1509-1516.
- [7] Nomura T, Mochida J, Okuma M, et al. Nucleus pulposus allograft retards intervertebral disc degeneration [J]. *Clin Orthop*, 2001, 34(389):94-101.
- [8] Iwashina T, Mochida J, Sakai D. Feasibility of using a human nucleus pulposus cell line as a cell source in cell transplantation therapy for intervertebral disc degeneration [J]. *Biomaterials*, 2006, 31(11):1177-1186.
- [9] Yang F, Leung VY, Luk KD. Mesenchymal stem cells arrest intervertebral disc degeneration through chondrocyte differentiation and stimulation of endogenous cells [J]. *Spine*, 2009, 17(11):1959-1966.
- [10] Gaetani P, Torre ML, Klinger M. Adipose-derived stem cell therapy for intervertebral disc regeneration: an in vitro reconstructed tissue in alginate capsules [J]. *Tissue Eng*, 2008, 14(8):1415-1423.
- [11] Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, et al. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors [J]. *Nature*, 2010, 463(7284):1035-1041.
- [12] Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors [J]. *Cell*, 2010, 142(3):375-386.
- [13] Kuh SU, Zhu Y, Li J. A comparison of three cell types as potential candidates for intervertebral disc therapy: annulus fibrosus cells, chondrocytes, and bone marrow derived cells [J]. *Eur Cell Mater*, 2009, 76(1):70-74.
- [14] Nesti LJ, Li WJ, Shanti RM, et al. Intervertebral disc tissue engineering using a novel hyaluronic acid-nanofibrous seafold (HANFS) amalgam [J]. *J Tissue Eng*, 2008, 14(9):1527-1537.
- [15] Richardson SM, Curran JM, Chen R, et al. The differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into chondrocyte-like cells on poly-L-lactic acid (PLLA) scaffolds [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(22):4069-4078.
- [16] Roughley P, Hoemann C, DesRosiers E, et al. The potential of chitosan-based gels containing intervertebral disc cells for nucleus pulposus supplementation [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(3):388-396.
- [17] Halloran DO, Grad S, Stoddart M, et al. An injectable crosslinked scaffold for nucleus pulposus regeneration [J]. *Biomaterials*, 2008, 29(4):438-447.
- [18] Mauth C, Bono E, Haas S, et al. Cell-seeded polyurethane-fibrin structures - a possible system for intervertebral disc regeneration [J]. *Eur Cell Mater*, 2009, 10(8):27-38.
- [19] Shao X, Hunter CJ. Developing an alginate/ chitosan hybrid fiber scaffold for annulus fibrosus cells [J]. *J Biomed Mater Res*, 2007, 82(3):701-710.
- [20] Wan Y, Feng G, Shen FH, et al. Novel biodegradable poly (1,8 -octanediol malate) for annulus fibrosus regeneration [J]. *Macromol Biosci*, 2007, 7(11):1217-1224.
- [21] Wan Y, Feng G, Shen FH, et al. Biphasic scaffold for annulus fibrosus tissue regeneration [J]. *Biomaterials*, 2008, 29(6):643-652.
- [22] Hamilton DJ, Seguin CA, Wang J, et al. Formation of a nucleus pulposus-cartilage endplate construct in vitro [J]. *Biomaterials*, 2006, 27(3):397-405.
- [23] Wang BH, Campbell G. Formulations of polyvinyl alcohol cryogel that mimic the biomechanical properties of soft tissues in the natural lumbar intervertebral disc [J]. *Spine*, 2009, 34(25):2745-2753.