

## 无创胎儿 RhD 分型的研究进展与临床应用\*

龙宇鹏 综述,任 君<sup>△</sup>审校

(中国人民解放军第 324 医院检验科,重庆 400020)

关键词:RhD;无创;分型;新生儿溶血病

中图分类号:R722

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)33-4536-04

在妊娠期,Rh 血型 D 抗原阳性胎儿的红细胞可从胎盘漏出进入 RhD 阴性的母体内,促使其免疫系统产生的 RhD 抗体,并进入胎儿循环并导致胎儿和新生儿发生同种异体的免疫反应;在分娩时,大量的 RhD 阳性胎儿红细胞可进入母体,诱发 RhD 阴性血的母体对 Rh 因子产生抗体,在以后的妊娠中,这些抗体再通过胎盘进入胎儿循环,攻击胎儿的 RhD 阳性红细胞,引发了胎儿和新生儿溶血病(hemolytic disease of the fetus and newborn,HDFN),主要表现为溶血性贫血引发的胎儿水肿、黄疸、核黄疸以及胎儿宫内死亡或新生儿死亡<sup>[1]</sup>。在孕晚期和分娩过程中,D 抗原的风险最高,但 D 型的免疫反应也可以发生在早孕和中孕期<sup>[2]</sup>。胎儿和新生儿溶血性疾病的治疗取决于胎儿贫血的严重程度,而使用超声多普勒测定大脑中动脉的收缩期流速是确定胎儿贫血的一种安全、快速的方法。若病情较轻,胎儿可通过增加红细胞生成来代偿红细胞的破坏。若病情进一步加重则需要进行宫内输血治疗或剖宫产终止妊娠,胎儿出生后仍需要进行血液交换或完全性的输血治疗。因此,D 型免疫反应是导致 HDFN 这一严重威胁胎儿和新生儿生命的疾病的主要原因。本文将对目前国内外关于胎儿 RhD 的无创分型检测的研究进展及其在临床的应用作一综述。

### 1 胎儿和新生儿溶血病研究进展

在无免疫预防措施的 20 世纪 50 年代,HDFN 的发病率高达 1/2 200。到了 20 世纪 60 年代晚期,随着新生儿预防性注射抗 D 免疫球蛋白的广泛应用,RhD 阴性血妇女发生 D 抗原反应的频率从 17%降到 1%左右。后来又有研究认为,胎儿出生前进行预防性抗 D 治疗可以将免疫反应降至 0.2%<sup>[3]</sup>。因此现在普遍采用多次产前结合产后预防性注射免疫球蛋白将免疫反应的风险降到最低,产前可以在孕 28~29 周时单次注射 250~300 μg 或选择在孕 29、34 周时分别注射 150 μg 免疫球蛋白;而出生后的预防通常在出生后 72 h 内给予单次注射。以往 RhD 阴性血的孕妇应常规在分娩前进行预防性治疗,因为胎儿的血型直至出生后才能确定。但在欧洲血统的人群中,有 40%的 RhD 阴性孕妇所怀胎儿也是 RhD 阴性,因此这部分患者不存在 D 抗原免疫的风险,造成了一定程度的过度治疗<sup>[3]</sup>。

随着非侵入性产前诊断技术的发展,出现了母体血中无细胞的胎儿游离 DNA(cell-free fetal DNA,cffDNA)的无创分析策略,使胎儿 RhD 血型可以在出生前得到准确的预测,预防性免疫球蛋白的治疗也更具靶向性。目前这一筛查技术已经在欧洲乃至全球铺展开来,并且在丹麦、荷兰、芬兰、比利时、瑞

士、法国和英国等国胎儿 RhD 分型已经成为产前检查的常规项目<sup>[3]</sup>。也有一些国家将胎儿 RhD 分型作为 RhD 阴性孕妇的监测项目。

### 2 RhD 血型的特点及临床应用

Rh 血型系统由两个基因组成,均位于 1 号染色体上且位置接近(1p34-36.2),均含有 10 个外显子,并有 94%的序列相同。*RhD* 基因编码的 RhD 蛋白上携带有 D 抗原(RH1),*RHCE* 基因编码的 RhCE 蛋白上携带有 C 或 c、E 或 e 抗原(RH2-5)。目前为止,Rh 血型系统中已经发现 50 多种抗原,251 个 *RhD* 等位基因和 123 个 *RHCE* 等位基因。这种多态性增加了从 *RhD* 基因型中预测 D 表型的难度。

携带有功能性 *RhD* 基因的个体通常表现为 D 表型阳性。而引起 D 表型阴性的最常见原因就是 *RhD* 基因的缺失,这也成为 RhD 阴性孕妇胎儿 *RhD* 基因检测的焦点。D 阴性表型在不同人群中出现的频率分别为:欧洲 15%~17%、非洲 5%、亚洲 3%。在非洲人群中,D 阴性的表型可能是由于基因缺失,也有约 66%的人是携带不编码功能的假基因;而不同的 *RhD* 等位基因表达的差异较大,可表现为不表达、弱表达或部分表达 D 抗原的类型,因此存在 *RhD* 基因型的个体并不一定都有 D 阳性的表型,约有 0.2%~1.0%的欧洲人群为 D 抗原弱表达,部分 D 表达的人则更少<sup>[4]</sup>。还有一类表型是 DEL 型,即只有在抗 D 抗体吸收和洗脱后才能检测到 *RhD* 表型,这类表型在亚洲人较为常见,在欧洲人群较少,仅占 1/350~1/2 000<sup>[5]</sup>。携带有 D 抗原部分表达基因型的孕妇也应被归为 D 阴性人群,并接受预防性治疗,因为这类患者也可能与 D 阳性的胎儿产生免疫反应<sup>[6]</sup>。由此可见,带有以上的这些 *RhD* 基因型的孕妇,其胎儿 *RhD* 基因检测的复杂性显著地升高。

### 3 母血中的胎儿游离 DNA 及临床检测

胎盘合体滋养层含有细胞滋养细胞来源的胎儿细胞核,合体滋养层发生凋亡后可释放大量的凋亡小泡进入母体外周循环,小泡中包含的胎儿有核细胞的 DNA 片段会随着小泡的溶解、破裂而混入母血中,形成 cffDNA。自从 1997 年在母体循环中发现 cffDNA 以来,国内外的众多研究团队均聚焦于这一领域,并在 1998 年创立了针对 *RhD* 阴性孕妇的“基于非侵入性实时 PCR 的胎儿 *RhD* 基因检测”技术。但 cffDNA 的生物学功能还远未阐明。

母血中 cffDNA 的主要特点是高度碎片化,通常为小于 200 bp 的核酸片段;母血中的 cffDNA 的出现较早,在孕 4~5 周时即可检测到,但水平极低,直到孕 7 周以后才较为稳定,需到孕 10~11 周才能达到临床检测的标准。而且在整个孕期母

血中 cfDNA 的水平均较低,波动在 1~1 000 copy/mL,从早孕期的 20~25 copy/mL 开始逐渐升高,在中孕期含量约为 32 copy/mL,直至晚孕期接近 1 000 copy/mL 才较为容易检测,分娩后 1~2 d 即消失<sup>[7]</sup>。母血中 cfDNA 的水平波动和变异较大,主要是由于容易受到 DNA 提取方法、检测技术、定量和定性手段等因素的影响,但根本的原因还是母血中 cfDNA 水平较低<sup>[8]</sup>。

实时荧光定量 PCR(RT-PCR)法是目前胎儿 RhD 分型的主要技术<sup>[9]</sup>,其他用于分析 cfDNA 的方法包括:基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)<sup>[10]</sup>、数字 PCR(digital PCR)和新一代测序技术(NGS)<sup>[11]</sup>。对于胎儿 RhD 分型而言,母血中 cfDNA 的低水平所导致的最严重风险就是检测结果的假阴性。此外,由于母体血浆 cfDNA 在孕早期很难检测到,因此在早孕期检测假阴性的风险最大,但中孕和晚孕期也有假阴性出现<sup>[6]</sup>。对于临床母血 cfDNA 的检测,最关键的是要确保检测方法的高稳定性和高敏感性以避免假阴性结果出现,必须注意以下几点:(1)保证全血和血浆中胎儿 DNA 的稳定;(2)保证 DNA 的高提取率;(3)保证足量的胎儿 DNA 可用于分析检测。另外,母血中胎儿 DNA 的水平还受到运输、处理、离心和保存等分析前的条件影响,必须严格操作。

既往研究表明,cfDNA 在母体全血和血浆中均非常稳定,并可以在 EDTA 管中进行数天的运输,而不影响胎儿 RhD 分型的实时 PCR 检测结果。cfDNA 对环境温度的适应性也较好,血样可在室温或 4℃ 中保存或运输多日而不影响 DNA 水平。长时间的储存和运输可导致母体 DNA 的升高,同时 cfDNA 比例下降,但这并不会对基于 RT-PCR 的胎儿 RhD 检测法造成负性的影响<sup>[12]</sup>。DNA 的高提取率可以通过多种 DNA 提取方法实现,包括手工提取试剂盒(病毒核酸提取试剂盒、循环核酸试剂盒等)和具有高提取度、高重复性、低误差率的自动 DNA 提取法<sup>[13-14]</sup>。为获得足量的 cfDNA,可以增加母血样本的总量,目前的方法已经可以达到使用 1~4 mL 母体血浆检测胎儿 RhD 血型的水平。检测敏感性的增加与所用方法和策略密切相关,采用多个 DNA 作为靶标(双外显子联合法、多重标记法等)可以显著地增强测定的敏感性<sup>[14]</sup>。针对 cfDNA 碎片的特性,临床检测应使用短的 PCR 扩增子以获得更多完整的模板 DNA 分子和更高的敏感性<sup>[15]</sup>。

#### 4 胎儿 RhD 基因检测策略

运用 PCR 方法检测 RhD 基因,需要扩增 D 阳性的变体,也需要高特异性的检测方法以区分 RHCE。目前的检测包括 RhD 的 5、7 和 10 号外显子等多个靶点,可单独检测也可联合检测<sup>[16]</sup>。但多数学者均推荐至少检测 2 个外显子<sup>[17]</sup>。有研究采用 4、5、6 和 10 号外显子的联合检测将 RhD 阴性、阳性与 RhD 假基因、RhD-CE-Ds 变体进行区分,其准确率可达到 100%<sup>[18]</sup>。但是单独检测 5 号或 10 号外显子均有因该外显子为阴性而出现假阳性的检测结果<sup>[19]</sup>。也有胎儿 RhD 检测策略是使用 10 号外显子确定 D 抗原的变体,因为大多数杂合型等位基因均在此处隐藏;这种策略虽容易增加假阳性的预测结果,但对于临床诊断是必要的。另外,鉴于 RhD 基因频率的分布因地域差异而变,因此不同的实验室必须根据实际情况和胎儿 RhD 分型的临床目的(用于科学研究或人群筛查)设计检测的具体策略以适应当地的特殊人群<sup>[20]</sup>。

#### 5 免疫异常孕妇的胎儿 RhD 分型

如果 D 抗原阴性孕妇的胎儿为 RhD 阳性,则导致其出现免疫异常,发生 D 型免疫反应的风险较大。因此,正确地评估

这些孕妇发生 D 型免疫反应的风险对于这些孕妇的管理非常重要。若胎儿为 RhD 阳性,则需接受相应的监测和治疗;若为阴性则可以免受不必要的治疗。在全世界范围内,胎儿 RhD 分型都是一个综合性的需要高精度结果的临床服务项目。总体上,预测精确度和检测敏感性在过去的 15 年中有了极大提高,从 95% 提高至接近 100%,孕早期进行产前预测的可靠性已达到较高水平<sup>[20]</sup>。而且,RhD 阴性结果的检出必须明确,尽量减少假阴性的出现。为了增加胎儿 RhD 表型的准确性,常常采用多个外显子同时检测的策略<sup>[21]</sup>。在既往采用 2 种外显子分型的研究中已经得到了较高的准确性;此外,利用 MALDI-TOF MS 分析技术和早孕期的检测方法等也均已经得到了良好的检测结果,但是假阴性的结果依然无法避免。

为了保证胎儿 D 阴性表型预测的质量,可将通用的胎儿 RhD 阴性基因作为对照,也有利用多态性的标记结合 Y 染色体分析,或利用单核苷酸多态性进行分析。有研究认为,RASSF1A 基因启动子甲基化 BstUI 抗性可能会成为 cfDNA 分析的可靠对照而广泛应用。但胎儿对照组必须与检测目标的敏感性在总体上相一致。有些研究为了保证检测质量,排除母体 RhD 基因变异对胎儿检测结果的掩盖,分别在不同孕周抽取血样进行独立检测。也有研究者采用两个 RhD 外显子检测联合总 DNA 作为 DNA 提取技术的对照。另外,数字化 PCR 近年来也应用于母血含有 RhD 变体的检测中,而且,数字化 PCR、NGS 等新兴技术可以克服传统 RhD 分型技术的局限,具有潜在的开发价值。为了达到临床应用和推广的目的,检测 RhD 的相关工作强度也必须符合常规的临床检验标准<sup>[22]</sup>。

与检测孕妇 RhD 血型不同,产前胎儿的 RhD 分型主要的研究目标就是降低假阴性率,而假阳性的结果不会导致严重的临床后果。作为筛查方案,必须采用高成本效率、高样本处理量和快速的检测方法。按照目前的 RHD 筛查经验,仅有极少数研究结果中出现了假阴性,且这些结果的出现并非由于母体血 cfDNA 的低水平,而是样本中混入杂质或处理失误所致<sup>[23]</sup>。

#### 6 胎儿 RhD 分型与产前治疗方案

对于胎儿 D 抗原弱表达的孕妇,可以归为 RhD 阳性胎儿组,也可归为结果不明确组,在初诊时预防性使用抗 D 抗体进行治疗;但 1~3 型的弱阳性孕妇可以不必进行治疗<sup>[24]</sup>。对于携带有 RhD 假基因的孕妇也应按照上述方法归类并进行预防性治疗,并根据这些基因变体的频率涉及适当的方案,尽量排除不需治疗的个体。既往研究显示,有约 0.3%~2.3% 的孕妇因检测结果假阳性或归为结果不明确组而接受了原本不需要的预防性治疗,针对这部分患者的正确诊断仍有提升空间<sup>[3]</sup>。

胎儿 RhD 分型阳性的孕妇,产前靶向预防性治疗方案的实施需要一大群卫生专业人员的参与,包括专科医师、通科医师、助产士、实验室技术人员的工作和卫生管理机构的认可,参与者之间的通力协作对于方案的成功至关重要。越来越多的研究提示:高依从性是治疗项目实施和成功避免 D 抗原免疫反应的关键因素<sup>[23]</sup>。

然而,对于出生后的新生儿,脐带血血型检测原本是一种更加安全、廉价的 RhD 分型方法,同时也可以作为产前胎儿 RhD 分型结果不可信或不明确时的一种有效补救措施,但是最近在荷兰、丹麦等国被停用,其原因一方面是因为已经有研究显示其不能成为筛查结果的一个精确的标记,另一方面是其

质量控制和保障尚不完善。美国国家生物标准和控制研究所(National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC)已经制定了血浆的临床生物检测标准,规范的 cffDNA 检测标准尚未完成<sup>[25]</sup>。

## 7 小结与展望

综上所述,无创胎儿 RhD 分型技术是建立在 cffDNA 高度自动化、高敏感性检测的基础上,使用多种外显子作为检测靶点以降低假阴性率,必将发展成一种稳定的常规筛查方法,用以指导产前预防性治疗。在其广泛应用的过程中可从多个方面进行成本和耗费控制水平的提升:(1)采用简单、廉价、有效的方法提高检测敏感性,降低筛查的整体费用;(2)采用多种自动或手动的措施,降低假阴性率,减少不必要的产前治疗费用;(3)取代其他高成本的筛选或检测技术,获得更多的卫生经济学效益;(4)在孕早期进行确诊性筛查,及早发现 RhD 血型信息及其他免疫反应条件的信息,进行早期预防,节约后期治疗成本;(5)应用于 HDFN 相关的其他同类血型抗原(Rhc、Rhe、Kell、HPA 等)的评估和检测体系中,减少其他抗原分型的研究和诊治成本。因此基于 cffDNA 的无创 RhD 血型检测技术是一项极具研究价值和临床价值的重要方法。

## 参考文献:

- [1] Al Riyami AZ, Al Salmani M, Al Hashami S, et al. Successful management of severe hemolytic disease of the fetus due to anti-Jsb using intrauterine transfusions with serial maternal blood donations: a case report and a review of the literature[J]. *Transfusion*, 2014, 54(1): 238-243.
- [2] Tiblad E, Westgren M, Pasupathy D, et al. Consequences of being Rhesus D immunized during pregnancy and how to optimize new prevention strategies[J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2013, 92(9): 1079-1085.
- [3] Clausen FB, Damkjær MB, Dziegiel MH. Noninvasive fetal RhD genotyping[J]. *Transfus Apher Sci*, 2014, 50(2): 154-162.
- [4] Daniels G. Variants of RhD—current testing and clinical consequences[J]. *Br J Haematol*, 2013, 161(4): 461-470.
- [5] Denomme GA. Prospects for the provision of genotyped blood for transfusion[J]. *Br J Haematol*, 2013, 163(1): 3-9.
- [6] Sbarsi I, Isernia P, Montanari L, et al. Implementing non-invasive RHD genotyping on cell-free foetal DNA from maternal plasma: the Pavia experience[J]. *Blood Transfus*, 2012, 10(1): 34-38.
- [7] Yu SC, Lee SW, Jiang P, et al. High-resolution profiling of fetal DNA clearance from maternal plasma by massively parallel sequencing[J]. *Clin Chem*, 2013, 59(8): 1228-1237.
- [8] Clausen FB, Jakobsen TR, Rieneck K, et al. Pre-analytical conditions in non-invasive prenatal testing of cell-free fetal RHD[J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e76990.
- [9] Scheffer PG, de Haas M, van der Schoot CE. The controversy about controls for fetal blood group genotyping by cell-free fetal DNA in maternal plasma[J]. *Curr Opin Hematol*, 2011, 18(6): 467-473.
- [10] Moise KJJr, Boring NH, O'Shaughnessy R, et al. Circulating cell-free fetal DNA for the detection of RHD status and sex using reflex fetal identifiers[J]. *Prenat Diagn*, 2013, 33(1): 95-101.
- [11] Rieneck K, Bak M, Jonson L, et al. Next-generation sequencing: proof of concept for antenatal prediction of the fetal Kell blood group phenotype from cell-free fetal DNA in maternal plasma[J]. *Transfusion*, 2013, 53(11 Suppl 2): 2892-2898.
- [12] Wong D, Moturi S, Angkachatchai V, et al. Optimizing blood collection, transport and storage conditions for cell free DNA increases access to prenatal testing[J]. *Clin Biochem*, 2013, 46(12): 1099-1104.
- [13] Repiska G, Sedlackova T, Szemes T, et al. Selection of the optimal manual method of cell free fetal DNA isolation from maternal plasma[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2013, 51(6): 1185-1189.
- [14] Ordonez E, Rueda L, Canadas MP, et al. Development and validation of multiplex real-time PCR assay for noninvasive prenatal assessment of fetal RhD status and fetal sex in maternal plasma[J]. *Fetal Diagn Ther*, 2013, 34(1): 13-18.
- [15] Manzanares S, Entrala C, Sanchez-Gila M, et al. Noninvasive fetal RhD status determination in early pregnancy[J]. *Fetal Diagn Ther*, 2014, 35(1): 7-12.
- [16] Tsui NB, Hyland CA, Gardener GJ, et al. Noninvasive fetal RHD genotyping by microfluidics digital PCR using maternal plasma from two alloimmunized women with the variant RHD([V S3 + 1G > A] allele)[J]. *Prenat Diagn*, 2013, 33(12): 1214-1216.
- [17] Flores MA, Visentainer JE, Guelsin GA, et al. Rh, Kell, Duffy, Kidd and Diego blood group system polymorphism in Brazilian Japanese descendants[J]. *Transfus Apher Sci*, 2014, 50(1): 123-128.
- [18] Kent J, Farrell AM, Soothill P. Routine administration of Anti-D; the ethical case for offering pregnant women fetal RHD genotyping and a review of policy and practice[J]. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2014, 14: 87.
- [19] Liao GJ, Gronowski AM, Zhao Z. Non-invasive prenatal testing using cell-free fetal DNA in maternal circulation[J]. *Clin Chim Acta*, 2014, 428: 44-50.
- [20] Hyland CA, Gardener GJ, O'Brien H, et al. Strategy for managing maternal variant RHD alleles in Rhesus D negative obstetric populations during fetal RHD genotyping[J]. *Prenat Diagn*, 2014, 34(1): 56-62.
- [21] Dovc-Drnovsek T, Klemenc P, Toplak N, et al. Reliable Determination of Fetal RhD Status by RHD Genotyping from Maternal Plasma[J]. *Transfus Med Hemother*, 2013, 40(1): 37-43.
- [22] White HE, Dent CL, Hall VJ, et al. Evaluation of a novel assay for detection of the fetal marker RASSF1A: facilitating improved diagnostic reliability of noninvasive prenatal diagnosis[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e45073.
- [23] Hawk AF, Chang EY, Shields SM, et al. Costs and clinical

outcomes of noninvasive fetal RhD typing for targeted prophylaxis[J]. Obstet Gynecol,2013,122(3):579-585.

[24] Geaghan SM. Fetal laboratory medicine: on the frontier of maternal-fetal medicine[J]. Clin Chem,2012,58(2):337-352.

[25] Ordóñez E, Rueda L, Canadas MP, et al. Evaluation of sample stability and automated DNA extraction for fetal sex determination using cell-free fetal DNA in maternal plasma[J]. Biomed Res Int,2013,2013:195363.

(收稿日期:2014-06-10 修回日期:2014-07-22)

• 综 述 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.33.044

治疗椎间盘退变的生物学疗法\*

刘恒江 综述,张 柳<sup>△</sup>,王文雅 审校

(河北联合大学附属医院骨科,河北唐山 063000)

关键词:椎间盘;退变;生物疗法

中图分类号:R681.5 文献标识码:A 文章编号:1671-8348(2014)33-4539-03

低位腰痛是椎间盘退变患者就诊的最常见起因,也是影响成年人生活和工作能力的重要因素<sup>[1]</sup>。椎间盘切除术和脊柱融合术是常用的缓解疼痛的方法,但并不能恢复椎间盘的功能<sup>[2]</sup>。椎间盘源性的疼痛是由椎间盘炎症、神经支配增多以及椎间盘负荷过度引起的。椎间盘疾病的生物学疗法近来被广泛研究,修复和重塑椎间盘主要通过以下 3 条途径:生物分子疗法、细胞疗法、组织工程方法。以下将总结各种方法最新的研究进展,并且重点总结其应用优势和局限性。

1 生物分子疗法

合成代谢和分解代谢的平衡是维持健康椎间盘内环境的重要因素,打破平衡会导致细胞外基质的流失。生物分子疗法的目的是诱导细胞减少分解因子的产生,或者增加合成因子的产生,从而促使细胞外基质再生。生物分子和基因疗法能够在蛋白和基因水平改变细胞生物合成。若使这些方法有效,必须在组织中有大量的可利用细胞,使靶分子得到重组表达。由于这些原因,既往研究认为分子生物学疗法在椎间盘退变的早期阶段更有效。以下是几种分子生物学方法治疗椎间盘退变的研究。

1.1 促进基质合成代谢 生长因子通过刺激基质合成进而调节椎间盘细胞新陈代谢。转化生长因子(transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )和骨形成蛋白(bone morphogenetic protein, BMPs)能够通过调节椎间盘细胞中糖胺聚糖、蛋白多糖、Sox9 和 2 型胶原的含量促进软骨的形成<sup>[3-4]</sup>。当把动物的髓核细胞培养在含有 TGF- $\beta$  和 BMP-2 的培养基中时,二者能正向调节 1 型胶原、糖胺聚糖及 2 型胶原 mRNA 的表达<sup>[5]</sup>。血小板衍生因子(platelet derived growth factor, PDGF)、成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)和胰岛素样生长因子(insulinlike growth factor, IGF-1)这 3 种蛋白分裂素,已经被证实能刺激牛髓核细胞增殖。最近, Kim 等<sup>[6]</sup>证实 IGF-1 在牛的髓核细胞中能够增强合成代谢,并能提高 BMP-7 的作用。Gruber 等<sup>[7]</sup>研究发现,当退变的纤维环细胞处于 IGF-1 和 PDGF 中时,细胞凋亡加强。Wang 等<sup>[8]</sup>把 BMP-7 和动物椎间盘细胞培养在藻酸盐凝胶中,证实能促进蛋白多糖合成。Masuda 等<sup>[9]</sup>在动物的椎间盘退变模型中注射 BMP-7,椎间盘

的生物化学成分得到修复。Imai 等<sup>[10]</sup>将人重组 BMP-7 注射进动物的椎间盘中,增加了椎间盘高度。相对于重组生长因子而言,合成肽可能是一种更有效更安全的生物分子。已证实 Link N 是一种具有类似生长因子功能的合成肽,能有效刺激糖胺聚糖基因表达并且抑制蛋白酶的表达<sup>[11-12]</sup>。

1.2 基因疗法 由于生物分子半衰期较短,所以研究一种长效的治疗方法显得尤为重要。基因疗法已经被用作一种增强椎间盘细胞新陈代谢的方法。慢病毒载体和腺病毒相关载体(adenoviral-associated vectors, AAV)已经被应用于修复椎间盘组织。Leckie 等<sup>[13]</sup>发现, AVV2 能引起椎间盘细胞产生 BMP-2 或 TIMP-1 蛋白,延缓退变。但是在这些载体应用于临床之前其本身的免疫原型和其基因产物的长期疗效仍然是一个亟待解决的问题。

1.3 抑制基质分解代谢 促炎因子已经被证实能促使椎间盘退变,并且与退变时间相关。退变椎间盘细胞产生的 IL-1 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ),均是蛋白酶的间接产物,而且基质金属蛋白酶(MMPs)和蛋白聚糖酶能够分解基质。最近 Sinclair 等<sup>[14]</sup>在体外实验中证实可溶性 TNF- $\alpha$  受体能明显减弱 TNF- $\alpha$  在人椎间盘细胞中的作用,并且在一定程度上可以下调 NO、PGE2 和 IL-6。Chubinskaya 等<sup>[15]</sup>在一个大鼠椎间盘退变模型中证实 BMP-7 通过降低蛋白酶和细胞因子及疼痛相关蛋白水平使分解代谢降低。在椎间盘退变过程中 siRNA 分子能抑制干扰蛋白。在动物椎间盘退变模型中, Seki 等<sup>[16]</sup>证实单独注射蛋白聚糖酶 siRNA 能抑制退变并且能重塑髓核组织。这些疗法的重点是提高髓核细胞的代谢功能而不增加细胞数量,但是细胞功能降低、营养缺乏、低氧及衰老这些因素都会使疗效下降。因此生物疗法联合细胞或生物材料成为新的趋势。

2 细胞疗法

退变的椎间盘细胞失去自身修复能力,所以细胞移植能够提供健康细胞用来再生细胞外基质。有学者认为椎间盘退变起始在髓核,因此合成蛋白多糖、胶原和基质蛋白的各种细胞之间具有较高关联性。此类细胞具有成熟椎间盘细胞、关节软骨细胞和间充质干细胞(MSCs)的所有表型<sup>[17]</sup>。

2.1 椎间盘细胞 分化的椎间盘细胞能合成必需的细胞外基

\* 基金项目:河北省自然科学基金资助课题(H2013209257)。 作者简介:刘恒江(1986—),医师,硕士,主要从事骨质疏松与椎间盘退变的研究。 <sup>△</sup> 通讯作者, Tel:13313059881; E-mail:zhliu130@sohu.com。