

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

• 综述 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.33.044

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)

## 治疗椎间盘退变的生物学疗法\*

刘桓江 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; 生物学疗法

**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。因此生物学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:刘桓江(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。

质分子,用于治疗或重建椎间盘微环境。在沙鼠等椎间盘退变模型中,椎间盘细胞能限制基质破坏,促进椎间盘高度恢复,并能合成新的蛋白多糖和 1、2 型胶原<sup>[18]</sup>。Benz 等<sup>[19]</sup>发现,羊的椎间盘能自发修复,但是椎间盘细胞的注入加速了修复过程。在临床试验中,通过微创术将移植细胞注入到患者体内,疼痛症状明显缓解。在注入细胞 2 年后,相对那些单纯做椎间盘切除术的患者椎间盘液体含量增加。但这种方法需要获得椎间盘细胞,因此这就会导致 2 次创伤性手术,增加了感染和损伤神经根的概率。况且,在体外培养时,从患者退变组织获得的椎间盘细胞分化能力不强,并且丧失了产生糖胺聚糖和 2 型胶原的能力<sup>[20]</sup>。尽管椎间盘细胞能通过生物分子或者 3D 培养再分化,但是这并不能达到正常细胞水平<sup>[21-22]</sup>。由于这些原因,软骨细胞和间充质干细胞成为新的研究方向。

**2.2 软骨细胞** 近来,在猪去髓核模型中,将培养的自体软骨细胞运送到体内 3 个月,软骨形成密度增加,并且在移植 12 个月细胞活力上升<sup>[23]</sup>。Arana 等<sup>[24]</sup>在体外实验中发现软骨组织通过调节炎症反应能刺激髓核细胞合成。然而软骨细胞产生的蛋白多糖与胶原的比值比髓核细胞低。与髓核细胞相似,软骨细胞移植也面临一样多的问题(如二次创伤和供体组织的缺乏),因此软骨细胞可能并不是最好的细胞疗法。

**2.3 间充质干细胞** Jin 等<sup>[25]</sup>认为,MSCs 是椎间盘修复更好的选择,因为这些细胞有单独分化的能力并且能在椎间盘基质中产生蛋白多糖和胶原。MSCs 的获取途径很多,可以提供合适的自体细胞来源。而且能在体外扩增到临床所需要的数量并能以未分化祖细胞的形式注射到体内,分化成与椎间盘细胞相类似的表型。在动物的退变模型中,与没有注射组相比,MSCs 注射组最小化了椎间盘高度的降低,并使 GAG 的水平在 16 周后增加,而干细胞组和髓核细胞注射组差异无统计学意义<sup>[26]</sup>。在体外实验中,当与健康髓核细胞共同培养时,MSCs 分化成一种类似髓核细胞的表型,有抑制糖胺聚糖和 SOX9 的作用。当 MSCs 与退变的髓核细胞一起培养时,髓核细胞能产生更多的蛋白多糖和胶原。最近的研究发现 MSCs 和髓核细胞的主要联系是二者膜成分的双向改变<sup>[27-29]</sup>。MSCs 不仅具有促进基质合成作用,还可以降低椎间盘中的炎症反应<sup>[30]</sup>。在体外培养中,干细胞能诱导髓核细胞抑制基质退变的相关分子基因的表达,如 MMPs 和炎症因子。干细胞的免疫调节作用,包括其表达 Fas 配体(免疫细胞中一种跨膜蛋白)的能力,是通过合成抗免疫反应因子(尤其是 TGF- $\beta$ )来降低免疫反应的<sup>[31]</sup>。然而对体内干细胞产生抗免疫反应因子的机制还不是完全明白。自体 MSCs 疗法是有效的,能明显缓解疼痛降低残疾率,并且没有并发症,能使椎间盘液体含量明显增加,然而椎间盘高度在治疗 12 个月没有增加。这与先前的动物实验结果一致,MSCs 能抑制椎间盘脱水的过程并能诱导水分的获取。自体 MSCs 注入到两位椎间盘退变患者 2 年后,其疼痛症状减轻并且椎间盘液体含量增多。然而这些研究周期较短,并且患者数量较少,难以确定感染和其他并发症的发生风险。然而 MSCs 抑制的长期疗效和分化能力还需要进一步研究。

### 3 组织工程疗法

单纯地将生物分子和细胞共同注射进椎间盘虽然可以再生组织,但是退变早期细胞和基质流失严重,此时需要大量的因子和细胞。因此组织工程将细胞、运载支架、生物力学和生物化学条件相结合,其优点是可整合并重塑椎间盘结构及功能。

**3.1 仿生学方法模拟椎间盘组织** 支架结构作为细胞附着和引导组织生长的一种支撑,如果惰性植入则只提供生理支撑,没有转变细胞生物活性的作用;如果活性植入,会产生生物活性分子引导细胞生物合成。理想的支架既可以提供生物力学作用,又可以使新基质沉积而增强负荷能力。水凝胶支架可以保持新沉积的蛋白多糖含量。含藻酸盐和琼脂糖并以水凝胶为基础的培养基已经应用于髓核培养。水凝胶由透明质酸组成,可以保持髓核表型,并维持其生物力学。最近的研究的热点是如何提高支架材料性能,尝试联合胶原分子或聚合凝胶的方法提高拉力并压缩机械组成。EP 依附于纤维环和髓核纤维,并且与椎体相邻近。Fernando 等<sup>[32]</sup>用一种混合模型,证实 EP 能提供一种黏附力,能够减弱在骨与椎间盘连接处的负荷。EP 细胞含有特殊因子,能刺激蛋白多糖合成,并能抑制 TNF- $\alpha$ ,说明髓核与 EP 在内环境中存在交联。另外,在组织生长和内环境稳定中,人造生物反应器能被用于再生其物理功能。See 等<sup>[33]</sup>将 MSCs 培养在含丝的支架中,其周围被一个硅做的椎间盘包绕,形成一种类似椎间盘结构的东西。将其培养在一种自定义的生物反应器中,持续压缩椎间盘 4 周,这种结构被径向拉伸,导致 2 型胶原和细胞外基质增加,使之与内层纤维环相似。因此,生物反应器可以应用于工程组织,其性能更接近于正常的组织。

**3.2 临床移植的障碍** 组织工程仍然处于起步阶段,组织工程治疗中支架材料的切开移植势必损伤原本完整的纤维环结构,引起炎症反应,从而加重椎间盘退变。另外载体支架的仿生学性能并未达到我们的期望,在今后的研究中组织工程将会完善这些问题,为临床治疗提供更有力的保障。

### 参考文献:

- [1] Wang SZ, Rui YF, Tan Q, et al. Enhancing intervertebral disc repair and regeneration through biology: platelet-rich plasma as an alternative strategy[J]. *Arthritis Res Ther*, 2013, 15(5):220.
- [2] 邓忠良. 微创腰椎椎间融合术[J]. *重庆医学*, 2008, 37(8):1673-1675.
- [3] Rejon CA, Hancock MA, Thompson TB, et al. Activins bind and signal via bone morphogenetic protein receptor type II (BMPR2) in immortalized gonadotrope-like cells [J]. *Cell Signal*, 2013, 25(12):2717-2726.
- [4] 田峰, 崔学生, 张帅, 等. 转化生长因子  $\beta 1$  及白介素  $1\beta$  对终板软骨细胞的作用[J]. *重庆医学*, 2012, 41(1):36-38.
- [5] Park SY, Kim KH, Shin SY, et al. Dual delivery of rhP-DGF-BB and bone marrow mesenchymal stromal cells expressing the BMP2 gene enhance bone formation in a critical-sized defect model[J]. *Tissue Eng Part A*, 2013, 19(21/22):2495-2505.
- [6] Kim JS, Ellman MB, An HS, et al. 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.
- [7] Gruber HE, Norton HJ, Hanley EN, et al. Anti-apoptotic effects of IGF-1 and PDGF on human intervertebral disc cells in vitro[J]. *Spine (Philadelphia)*, 2000, 25(17):2153-2157.
- [8] Wang H, Zhou Y, Huang B, et al. Utilization of stem cells

- in alginate for nucleus pulposus tissue engineering[J]. *Tissue Eng Part A*, 2014, 20(5/6):908-920.
- [9] Masuda K, Imai Y, Okuma M, et al. Osteogenic protein-1 injection into a degenerated disc induces the restoration of disc height and structural changes in the rabbit anular puncture model[J]. *Spine (Philadelphia)*, 2006, 31(7):742-754.
- [10] Imai Y, Okuma M, Nakagawa K, et al. Restoration of disc height loss by recombinant human osteogenic protein-1 injection into intervertebral discs undergoing degeneration induced by an intradiscal injection of chondroitinase ABC[J]. *Spine(Philadelphia)*, 2007, 32(11):1197-1205.
- [11] Gawri R, Antoniou J, Ouellet J, et al. Best paper NASS 2013:link-N can stimulate proteoglycan synthesis in the degenerated human intervertebral discs[J]. *Cell Mater*, 2013, 11(26):107-119.
- [12] Wang Z, Weitzmann MN, Sangadala S, et al. Link protein N-terminal peptide binds to bone morphogenetic protein (BMP) type II receptor and drives matrix protein expression in rabbit intervertebral disc cells[J]. *Biol Chem*, 2013, 288(39):28243-28253.
- [13] Leckie SK, Bechara BP, Hartman RA, et al. Injection of AAV2-BMP2 and AAV2-TIMP1 into the nucleus pulposus slows the course of intervertebral disc degeneration in an in vivo rabbit model[J]. *Spine*, 2012, 12(1):7-20.
- [14] Sinclair SM, Shamji MF, Richardson WJ, et al. Attenuation of inflammatory events in human intervertebral disc cells with a tumor necrosis factor antagonist[J]. *Spine (Philadelphia)*, 2011, 36(15):1190-1196.
- [15] Chubinskaya S, Kawakami M, Matsumoto T, et al. Anticatabolic effect of OP-1 in chronically compressed intervertebral discs[J]. *Orthop Res*, 2007, 25(4):517-530.
- [16] Seki S, Asanuma-Abe Y, Masuda K, et al. Effect of small interference RNA (siRNA) for ADAMTS5 on intervertebral disc degeneration in the rabbit anular needle-puncture model[J]. *Arthritis Res Ther*, 2009, 11(6):R166.
- [17] Liang C, Li H, Zhou X, et al. Responses of human adipose-derived mesenchymal stem cells to chemical micro-environment of the intervertebral disc[J]. *Transl Med*, 2012, 10:49.
- [18] Huang B, Zhuang Y, Liu LT, et al. Regeneration of the intervertebral disc with nucleus pulposus cell-seeded collagen II/hyaluronan/chondroitin-6-sulfate tri-copolymer constructs in a rabbit disc degeneration model[J]. *Spine (Philadelphia)*, 2011, 36(26):2252-2259.
- [19] Benz K, Stippich C, Fischer L, et al. Intervertebral disc cell and hydrogel-supported and spontaneous intervertebral disc repair in nucleotomized sheep[J]. *Eur Spine*, 2012, 21(9):1758-1768.
- [20] Hegewald AA, Endres M, Abbushi A, et al. Adequacy of herniated disc tissue as a cell source for nucleus pulposus regeneration[J]. *Neurosurg Spine*, 2011, 14(2):273-280.
- [21] Cabraja M, Endres M, Vetterlein S, et al. A 3D environment for annulus fibrosus regeneration[J]. *Neurosurg Spine*, 2012, 17(2):177-183.
- [22] Hegewald AA, Enz A, Sittinger M, et al. Engineering of polymer-based grafts with cells derived from human nucleus pulposus tissue of the lumbar spine[J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2011, 5(4):275-282.
- [23] Acosta FL, Metz L, Adkisson HD, et al. Porcine intervertebral disc repair using allogeneic juvenile articular chondrocytes or mesenchymal stem cells[J]. *Tissue Eng Part A*, 2011, 17(23/24):3045-3055.
- [24] Arana CJ, Diamandis EP, Kandel RA. Cartilage tissue enhances proteoglycan retention by nucleus pulposus cells in vitro[J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(11):3395-3403.
- [25] Jin ES, Min J, Choi KH, et al. Analysis of molecular expression in adipose tissue-derived mesenchymal stem cells:prospects for use in the treatment of intervertebral disc degeneration[J]. *Korean Neurosurg Soc*, 2013, 53(4):207-212.
- [26] Feng G, Zhao X, Zhang H, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells in a degenerative disc model in rabbits: a comparison of 2 cell types as potential candidates for disc regeneration[J]. *Neurosurg Spine*, 2011, 14(3):322-329.
- [27] Strassburg S, Richardson SM, Freemont AJ, et al. Co-culture induces mesenchymal stem cell differentiation and modulation of the degenerate human nucleus pulposus cell phenotype[J]. *Regen Med*, 2010, 5(5):701-711.
- [28] Strassburg S, Hodson NW, Richardson SM, et al. Bi-directional exchange of membrane components occurs during co-culture of mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3):337-339.
- [29] Svanvik T, Henriksson HB, Hagman M, et al. Human disk cells from degenerated disks and mesenchymal stem cells in co-culture result in increased matrix production[J]. *Cells Tissues Organs*, 2010, 191(1):2-11.
- [30] Bertolo A, Thiede T, Baur M, et al. Human mesenchymal stem cell co-culture modulates the immunological properties of human intervertebral disc tissue fragments in vitro[J]. *Eur Spine*, 2011, 20(4):592-603.
- [31] English K. Intervertebral disc repair: mesenchymal stem cells to the rescue[J]. *Transplantation*, 2011, 92(7):733-734.
- [32] Fernando HN, Czamanski J, Yuan TY, et al. Mechanical loading affects the energy metabolism of intervertebral disc cells[J]. *Orthop Res*, 2011, 29(11):1634-1641.
- [33] See EY, Toh SL, Goh JC. Effects of radial compression on a novel simulated intervertebral disc-like assembly using bone marrow-derived mesenchymal stem cell cell-sheets for annulus fibrosus regeneration[J]. *Spine (Philadelphia)*, 2011, 36(21):1744-1751.