

综述

细胞移植治疗椎间盘退变的研究进展

宁 斌, 胡有谷

(青岛大学医学院附属医院 山东省创伤骨科研究所 266003 青岛市)

中图分类号: R681.5, Q813.3

文献标识码: A

文章编号: 1004-406X(2005)-10-0636-03

椎间盘退变是引起慢性腰痛的最常见的病因之一。目前,保守疗法和手术治疗是主要治疗方法,椎间盘修复术在临床上也有应用^[1]。利用成人自体椎间盘细胞、软骨细胞或干细胞移植到椎间盘,即细胞移植治疗椎间盘退变的方法正处于研究的前沿。笔者就有关细胞移植治疗椎间盘退变的研究进展综述如下。

1 细胞移植治疗椎间盘退变的细胞学基础

干细胞通常在组织中存活较长时间,它们能够在特殊的条件下增殖分化成不同的成体细胞。多能干细胞能够在不同的环境因素下分化成三个胚层中的任何细胞。位于椎间盘纤维环外层和中层的细胞起源于间叶组织细胞,内层为类软骨细胞。成人的髓核细胞多为类软骨细胞,与关节软骨和纤维环中的类软骨细胞有所差异,幼儿的髓核细胞多为脊索细胞,后期分化为类软骨细胞^[2]。多能干细胞的多向分化性使其成为椎间盘细胞治疗的最佳选择。然而,应用胚胎干细胞会导致原发畸胎瘤和移植排斥反应的发生,且应用胚胎干细胞还存在伦理学问题。成体干细胞已经在人体不同的组织和器官中发现,包括骨髓、外周血、眼、胃肠道和胰腺等,且与胚胎干细胞不同的是:不同组织的成熟干细胞具有其组织器官的特性。成体干细胞数量非常少,在 10 000~15 000 个骨髓细胞中仅有 1 个造血干细胞。到目前为止,成体干细胞和胚胎干细胞还没有明确的区分,成体干细胞的起源尚不清楚,但能够通过体内或体外的功能测定来证实它们的存在。

骨髓是造血干细胞(HSC)的存储器,在人的生命中心HSC不断地增殖和分化成不同的造血细胞系来补充循环血细胞,维持体内内环境的稳定。在过去的 40 年里,骨髓移植的临床应用限制在重建正常的造血功能来治疗血液系统疾病和恶性肿瘤。最近的研究发现,用骨髓干细胞来治疗非血液系统疾病是可行的。成人骨髓中包含一定数量的干细胞,处于成体干细胞和成熟细胞的中间阶段的细胞称为始祖细胞或前体细胞,其能够分化成各种非造血系统的细胞^[3],被称之为骨髓基质干细胞、多能成人始祖细胞或是间充质干细胞。在适当的试验条件下,间充质干细胞能够分化形成不同胚层的特殊细胞,如成骨细胞、脂肪细胞、

软骨细胞、肝细胞、心肌细胞和血管神经细胞等^[4]。故利用骨髓成体干细胞移植来治疗椎间盘疾病是可行的,但来源于不同组织器官的干细胞有其特殊的分化特性^[5],单细胞移植试验需验证成人组织特殊干细胞的特性^[6],故确定能分化成椎间盘细胞的成体干细胞类型及其分化条件是当前研究的热点。

2 细胞移植治疗椎间盘退变的方法

目前最具前途的椎间盘生物性再生的方法是自体椎间盘细胞的移植或未分化细胞(干细胞或始祖细胞)的移植,移植后能够产生新的细胞外基质,以此来逆转椎间盘退变过程。通过细胞移植能够增加椎间盘细胞蛋白多糖的表达、诱导椎间盘再生或延缓椎间盘退变。细胞移植治疗的过程包括细胞的采集、加工处理和移植。细胞移植治疗还应注意同以下两点结合:①细胞移植所依附的支架;②具有生物活性的生长因子或基因。

2.1 椎间盘细胞或软骨细胞的移植

成年椎间盘髓核和纤维环细胞通过体外细胞培养大量增殖后进行体内椎间盘移植的动物试验已有报道^[6-8]。Saad 等^[9]将椎间盘细胞移植到胶原氨基葡萄糖支架(collagen-glycosaminoglycan scaffolds)上,通过细胞移植来修复椎间盘缺陷,体内培养 8 周后,检测 I 型胶原、II 型胶原、蛋白多糖的合成,结果显示,移植后的细胞新合成了蛋白质,而且细胞数量增多。Yamamoto 等^[10]应用细胞与细胞直接接触的新型培养系统,将骨髓基质干细胞同髓核细胞联合培养,发现髓核细胞的增殖、DNA 合成、蛋白多糖合成明显提高,为体内细胞移植所需要的大量供体细胞提供了一种新型的培养方式。

更进一步的在兔模型椎间盘中进行椎间盘髓核细胞(细胞和细胞外基质)注射的试验也有报道^[11]。自体椎间盘细胞移植已经证明是可行的。许多证据表明椎间盘细胞移植能够减缓椎间盘退变^[3,5]。Gruber 等^[12]建立了一个沙鼠的模型,利用自体椎间盘移植来观察其生物学效应。Nomura 等^[13]也证实椎间盘内注射带有细胞外基质(ECM)的髓核细胞比单纯注射髓核细胞对延缓椎间盘退变更加有效。在动物试验中,种子细胞来源于未退变的椎间盘,另外一个选择是利用相似的组织来源,如软骨的细胞。Rahmat 等^[13]的研究表明,在绵羊模型中,将自体肋软骨的软骨细胞移植入椎间盘,观察到其在移植后 3 个月依然

第一作者简介:男(1979-),医学硕士,研究方向:脊柱疾患(现在济南市中心医院 250012)
电话:13589133507 E-mail:psyga@163.com

能够存活,并且产生了细胞外基质。Gorensek 等^[14]利用兔的弹性软骨细胞自体移植来治疗椎间盘退变,术后 6 个月对移植后形成的软骨行组织学分析显示,髓核区仅被透明软骨样组织代替,而新的软骨基质中检测不到任何弹力纤维。证实兔耳软骨的同源性软骨细胞可移植入椎间盘代替髓核,移植细胞大量耐受、存活并产生透明样软骨组织。

2.2 椎间盘或相近组织的自体干细胞移植

据报道,从成人骨髓中分离出来的间充质干细胞给予适当刺激,能在微载体表面生长,细胞形成类软骨样结构^[15]。刺激因素包括:转化生长因子- β 、低氧张力等。扩增间充质细胞培养的的动物试验证明其能够修复动物模型的软骨缺陷。用免疫分类、Western blot 和 RNA 检测法测定不同的软骨基质聚糖、ECM 蛋白质和 II 型胶原的表达;用组织填充软骨缺陷进行生物力学测定、组织学检测和 II 型胶原 RT-PCR 检测^[16]等方法来验证移植的效果。所有的方法都显示通过间充质干细胞移植能够促进软骨愈合。

Wakitani 等^[16]评价了应用骨髓间充质干细胞移植来修复骨关节炎患者软骨的可行性。临床试验组从 12 例骨关节炎患者体内提取骨髓间充质干细胞,扩增培养后植入胶原凝胶,随后移植到患者的膝软骨。42 周后活组织检查显示,在移植的区域透明软骨样软组织部分覆盖了有缺陷的区域,通过关节镜能够观察到软骨的再生。然而,同对照组相比没有明显的临床症状的改善。以前报道过利用异源性骨髓移植治疗儿童成骨不全的可能性,成骨细胞移植 3 个月活组织检查发现,尽管移植成活率不高(20%),但是能够观察到骨矿物质含量增多,骨折减少,生长率有所提高^[17]。有人对患有类风湿性关节炎的患者做了一系列临床试验,在给患者应用大剂量环磷酰胺后给予自体骨髓干细胞移植,在骨髓干细胞移植后能够明显减少症状,没有发现严重的不良反应^[18]。

许多研究者已经开始在动物体内用间充质干细胞移植的方法来治疗椎间盘退变,但是尚无临床试验发布。Sakai 等^[19]报道了兔退变模型的试验,在建立髓核退变模型 2 周后进行骨髓间充质干细胞的移植,供体细胞在移植前先植入 Atelocollagen 支架,移植 8 周后观察椎间盘的组织学表现并检测髓核蛋白多糖含量,同退变椎间盘细胞做比较,初步结果表明,椎间盘经过间充质干细胞移植后退变减缓,功能改善。

3 椎间盘干细胞移植的有利和不利因素

成人椎间盘是人体最大的无血管组织,其本身的营养及代谢产物的处理都依赖椎间盘以外的血管进行。椎间盘的三个组成部分,即纤维环、软骨终板和髓核的营养供应也有所不同。健康椎间盘的营养供应主要来源于终板,退变时供应减少^[20]。Horner 等^[20]进行了体外椎间盘营养供应的研究,通过扩散盒中的细胞培养,观察其营养循环的情况。研究显示,减少营养循环供应使细胞存活的数目减少。细胞移植尤其是新 ECM 的注入为退变椎间盘细胞提供了

另一种营养供应方式。通过细胞移植能够改善椎间盘细胞生长的内环境。椎间盘细胞对应力刺激反应敏感,退变椎间盘细胞的静水压的改变能导致其 ECM 的产生减少^[21]。而且椎间盘中心的高静水压使得移植细胞的粘弹力降低,甚至可能被挤出椎间盘的中心^[22]。在退变椎间盘细胞移植中,植入的间充质干细胞种植于支架上,理论上能够提高细胞的黏性,并能够让细胞开始产生新的细胞外基质。体外干细胞由于刺激的不同能够分化成不同的类型,这就意味着可以刺激间充质干细胞分化成椎间盘细胞,故移植是可行的。另一方面,退变椎间盘细胞的分解代谢可能刺激移植干细胞无法分化成椎间盘细胞,并分泌细胞外基质,甚至能够诱导存活椎间盘细胞的死亡。椎间盘外层有纤维环的保护,所以当干细胞移植入椎间盘时,能够很好的包被在椎间盘中,并在延缓甚至逆转椎间盘退变的过程中起重要作用。

4 展望

已有充分的证据证明,自体移植间充质干细胞是安全的,人体内间充质干细胞移植的可行性首先在血液系统疾病中得到证实,目前在实体肿瘤及其它系统疾病中(如软骨和心肌)也取得新的进展^[18,23,24]。但在退变椎间盘中进行细胞移植尚有大量的问题,如用于移植的细胞的类型、移植细胞的 pH、细胞移植用不用支架以及细胞移植后如何改善营养途径等急需解决。下一步的研究重点在于确定细胞表形的特征,确认能够诱导间充质干细胞分化成髓核或纤维环细胞的因子;动物试验着重在研究支架和了解体内椎间盘细胞退变的细胞学行为。更远期的工作在于将骨髓间充质干细胞移植治疗椎间盘退变应用于临床。

5 参考文献

1. 胡有谷.腰椎间盘突出症[M].第 3 版.北京:人民卫生出版社,2003.183-184.
2. Kim KW, Lim TH, Kim JG, et al. The origin of chondrocytes in the nucleus pulposus and histologic findings associated with the transition of a notochordal nucleus pulposus to a fibrocartilaginous nucleus pulposus in intact rabbit intervertebral discs [J]. Spine, 2003, 28(10):982-990.
3. Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM. Stem cells: hype and reality[J]. Hematology, 2002, 1(10):369-391.
4. Tao H, Ma DD. Evidence for transdifferentiation of human bone marrow-derived stem cells: recent progress and controversies[J]. Pathology, 2003, 35(1):6-13.
5. Krause DS, Theise ND, Collector MI, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell[J]. Cell, 2001, 105(3):369-377.
6. Ganey TM, Meisel HJ, Hutton WC, et al. Autologous chondrocyte transplantation for disc repair[R]. Presented at the 49th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. New Orleans, LA: 2003.

7. Sato M, Asazuma T, Ishihara M, et al. An experimental study of the regeneration of the intervertebral disc with an allograft of cultured annulus fibrosus cells using a tissue-engineering method[J]. Spine, 2003, 28(6): 548-553.
8. Watanabe K, Mochida J, Nomura T, et al. Effect of reinsertion of activated nucleus pulposus on disc degeneration: an experimental study on various types of collagen in degenerative discs[J]. Connect Tissue Res, 2003, 44(2): 104-108.
9. Saad L, Spector M. Effects of collagen type on the behavior of adult canine annulus fibrosus cells in collagen-glycosaminoglycan scaffolds[J]. J Biomed Mater Res, 2004, 71(2): 233-241.
10. Yamamoto Y, Mochida J, Sakai D, et al. Upregulation of the viability of nucleus pulposus cells by bone marrow-derived stromal cells: significance of direct cell-to-cell contact in co-culture system[J]. Spine, 2004, 29(14): 1508-1514.
11. Nomura T, Mochida J, Okuma M, et al. Nucleus pulposus allograft retards intervertebral disc degeneration [J]. Clin Orthop Relat Res, 2001, 389(2): 94-101.
12. Gruber HE, Johnson TL, Leslie K, et al. Autologous intervertebral disc cell implantation: a model using psammomys obesus, the sand rat [J]. Spine, 2002, 27(15): 1626-1633.
13. Rahmat R, Moore RJ, Nikoloff S, et al. Autologous chondrocyte implantation in an ovine model of disc degeneration[R]. Spine Society of Australia. Canberra, Australia: 2003.
14. Gorensek M, Jaksimovic C, Kregar-Velikonja N, et al. Nucleus pulposus repair with cultured autologous elastic cartilage derived chondrocytes[J]. Cell Mol Biol Lett, 2004, 9(2): 363-373.
15. Reyes M, Lund T, Lenvik T, et al. Purification and ex-vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells[J]. Blood, 2001, 98(9): 2615-2625.
16. Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, et al. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2002, 10(3): 199-206.
17. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, et al. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: implications for cell therapy of bone [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(13): 8932-8937.
18. Moore J, Brooks P, Milliken S, et al. A pilot randomized trial comparing CD34-selected versus unmanipulated hemopoietic stem cell transplantation for severe, refractory rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 2002, 46(9): 2301-2309.
19. Sakai D, Mochida J, Yamamoto Y, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells embedded in Atelocollagen gel to the intervertebral disc: a potential therapeutic model for disc degeneration [J]. Biomaterials, 2003, 24(20): 3531-3541.
20. Horner HA, Urban JP. 2001 Volvo award winner in basic science studies: effect of nutrient supply on the viability of cells from the nucleus pulposus of the intervertebral disc [J]. Spine, 2001, 26(23): 2543-2549.
21. Hutton WC, Elmer WA, Bryce LM, et al. Do the intervertebral disc cells respond to different levels of hydrostatic pressure [J]? Clin Biomech, 2001, 16(9): 728-734.
22. Ananthakrishnan DC, Walsh AJ, Berven SH, et al. Carrier matrix viscosity influences mesenchymal stem cell delivery to the intervertebral disc[R]. Presented at the 49th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. New Orleans, LA: 2003.
23. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration[J]. Lancet, 2003, 361(9351): 45-46.
24. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure[J]. Circulation, 2003, 107(18): 2294-2302.

(收稿日期: 2005-01-20 修回日期: 2005-08-18)

(本文编辑 卢庆霞)

消息

《中国脊柱脊髓杂志》编辑部征文与倡议

腰椎疾患是骨科常见病,是脊柱外科或相关论文评定的重要内容,采用正确的评估方法和实用的评定标准,对腰椎疾患的病情判断、治疗方法选择、治疗效果及预后评估有着重要意义。由于评定方法不统一,使治疗效果的横向比较产生困难,不利于学术交流。目前国内采用的多为“洋”标准,与 13 亿人口大国极不相称,且有的标准也比较陈旧,如常用的“JOA”标准,并不全面,也缺乏时代特点。

故我们建议专家们参照过去国内外相关标准,结合我国实际情况,提出自己对评定标准的见解或新的标准(单一疾病的或腰椎疾患的),供同道们讨论。对大家认为较好的或满意的标准,编辑部将在一定时间组织全国有关专家进一步讨论认定后,供全国同道参照!