

椎间盘退变的细胞治疗进展

张加芳, 郑召民

(中山大学附属第一医院骨外科 510080 广州)

中图分类号: R681.5, Q813 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2007)-12-0931-04

椎间盘退变是人体的一种自然衰老过程,但它可引起一系列疾病如腰椎间盘突出症、腰椎管狭窄(尤其是椎间孔狭窄)、退变性腰椎体滑脱、节段性腰椎不稳定和退变性腰椎侧凸等。至今为止,还没有一种理想的方法来治疗椎间盘退变。20 世纪 70 年代到 90 年代,基础科学在椎间盘退变的组织病理方面做了大量研究,这使得椎间盘再生治疗成为近 10 年来的临床研究热点^[1]。世界范围内的许多研究者都开始尝试用生物方法来治疗椎间盘退变,目前最常用的方法主要有基因治疗、细胞治疗和分子治疗^[2]。笔者就细胞治疗的研究进展作一综述。

1 椎间盘的细胞学特性

椎间盘的细胞环境在退变前后发生了明显的变化,这些改变为细胞治疗提供了理论基础。

1.1 正常椎间盘

椎间盘由外周的纤维环和中央的髓核及上下软骨终板构成,髓核和纤维环的细胞数量均较少,而细胞外基质丰富。在髓核内有两种形态不同的细胞:软骨样细胞与脊索细胞。人类脊索细胞的数量在儿童时期急剧减少,从而导致成人椎间盘内这种细胞的缺乏。纤维环的细胞主要由内层的软骨细胞和外层的成纤维细胞构成。

正常的髓核被认为是人体中最恶劣的生理环境:pH 值呈酸性(6.9~7.2),低氧含量,基础营养物质缺乏^[3]。椎间盘承受的机械重力使得这种环境处于高压力和复杂切应力的状态。另外,髓核内缺少血管,营养成分只能通过终板渗透,因此只能获取有限的营养物质。这些条件均不利于细胞的繁殖,所以椎间盘中的细胞含量仅为 1%。髓核和纤维环的细胞外基质内都含有丰富的胶原。纤维环外层主要以 I 型胶原为主,内层含大量的 II 型胶原,髓核主要以 II 型胶原为主。

1.2 退变椎间盘

目前,对于椎间盘退变的原因还没有一致的观点。从正常椎间盘的细胞学特性可以看出,椎间盘有着复杂的微环境,任何一个环节发生变化都有可能引起椎间盘的退变。但是,椎间盘形态的改变,椎间盘细胞的丢失以及细胞外基质包括蛋白多糖、胶原和水分的减少都是椎间盘退变

的显著共同特征。

Cappello 等^[4]研究发现,椎间盘内细胞表型的改变是退变的重要特征。他们在狗的椎间盘上发现,随着年龄增长脊索细胞逐渐丢失,同时伴随细胞外基质分泌的减少。Antoniu 等^[5]认为椎间盘退变是椎间盘内细胞和生化环境的改变造成的,这些变化包括椎间盘内细胞密度的下降伴随细胞外基质内 II 型胶原和蛋白聚糖成分的减少,髓核的 II 型胶原被 I 型胶原替代,正常的支架结构被破坏。纤维环的放射状结构也变得不完整,纤维的弹性和承重能力下降。

Leung 等^[6]提出椎间盘退变是椎间盘中炎症介质和间质金属蛋白酶上调的结果。退变的过程开始是髓核内蛋白多糖和水分的丢失,接着出现震动吸收能力的下降,从而导致椎间盘结构改变,引起微骨折、骨赘形成、椎间盘突出和疼痛。

2 椎间盘退变细胞治疗的研究现状

广义的细胞治疗包括体外培养椎间盘细胞移植,结合组织工程的椎间盘细胞移植,非椎间盘细胞移植,结合基因工程的细胞移植。目前研究的热点主要是间质干细胞移植、自体软骨细胞移植及髓核细胞移植。

2.1 间质干细胞移植

间质干细胞主要存在于骨髓中,人体脂肪中也含有丰富的间质干细胞。间质干细胞具有很强的可塑性,可以分化为骨、软骨、脂肪和纤维组织。在活体外培养,间质干细胞可以在特定的生长因子和化学物质的诱导下分化成特定的细胞。

Diduch 等^[7]在间质干细胞中加入条件培养液后,糖胺多糖和 II 型胶原表达活跃,这两种指标是软骨细胞分化的标志,表现出了软骨细胞的生物学特性。Yamamoto 等^[8]用间质干细胞与髓核细胞共同培养,结果显示间质干细胞可促进髓核细胞增殖及基质合成,而且在椎间盘环境中有良好的增殖能力。Risbud 等^[9]用大鼠骨髓间质干细胞在体外培养扩增,观察不同培养条件对骨髓间质干细胞分化的影响,发现低氧和转化生长因子能诱导干细胞分化与髓核细胞一致的表型。以上研究结果说明间质干细胞在体外具有转化为髓核细胞的潜在能力。

Zhang 等^[10]在兔正常椎间盘内植入骨髓间质干细胞,分别在术后 1、3、6 个月测定基质内 I 型胶原和 II 型胶原

的数量, 结果发现实验组 I 型胶原含量和对照组无差别, 而实验组所含的 II 型胶原则要高于对照组。说明间质干细胞能够在椎间盘内存活, 并且能够增加基质内蛋白多糖和 II 型胶原的数量。

Sakai 等^[11]在兔椎间盘退变模型中注入由胶原基质包裹的间质干细胞。4 周后, 这些间质干细胞仍存活, 相应的椎间盘内蛋白多糖含量增加。随后的研究发现, 绿色荧光蛋白 (GFP) 结合下的自体间质干细胞植入退变椎间盘后能够诱导其向髓核细胞分化并增加蛋白多糖和 II 型胶原的含量, 同时能够部分改善椎间盘高度和椎间盘的水合作用^[12]。由此, 可以推断间质干细胞植入后能够分化成髓核细胞或者促进原有髓核细胞的再生。

2.2 自体软骨细胞移植

体外研究表明, 软骨细胞能够自我增殖, 产生和分泌基质成分, 并且能够抵抗一定的应力。自体软骨细胞移植在 1997 年通过美国食品药品监督管理局批准, 是首批用于临床的骨科生物技术之一, 早期主要用于关节软骨缺损的治疗。基于与髓核细胞相似的特性, 软骨细胞也被用于椎间盘退变的治疗。

Rahmat 等^[13]在绵羊模型中将自体肋软骨的软骨细胞体外培养 6 周后移植入椎间盘, 分别于术后 3、6、12、24 周进行组织学分析, 12 周后发现软骨细胞仍能够存活并且产生细胞外基质。Tayrose 等^[14]在小鼠的椎间盘退变模型上做了自体肋软骨的植入实验, 术后 21d 发现有软骨植入的椎间盘高度恢复到正常的 64%, 而未植入的椎间盘单纯依靠自发修复则只恢复了 39%, 植入软骨细胞后蛋白多糖和胶原的含量均明显高于植入前。Gorensek 等^[15]在兔模型中利用兔耳的弹性软骨细胞进行自体移植, 术后 6 个月对移植后形成的软骨进行组织学分析, 发现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。

Ganey 等^[16]在狗的椎间盘退变模型上提取椎间盘软骨细胞, 在良好操作规范 (GMP) 条件下进行体外单层培养, 应用狗自体的血清来补充培养以保持严格的自体性质, 扩增 12 周后植入狗的退变椎间盘内。组织学检查显示植入的软骨细胞仍具有繁殖的能力, 并且产生的细胞外基质与正常椎间盘组织相似。在术后 6、9、12 个月免疫组化显示移植后的退变椎间盘内的 I 型和 II 型胶原数量增加。与对照组相比, 实验组的椎间盘产生的基质明显比对照组的椎间盘要多, 术后 12 个月发现实验组的椎间盘高度也明显恢复。

2002 年的一项前瞻、随机、对照性研究表明, 相对于单纯的椎间盘摘除术, 椎间盘摘除后再植入自体椎间盘软骨细胞更为安全、有效^[17]。Meisel 等^[18]认为通过自体椎间盘软骨细胞移植能够使椎间盘获得生物代谢和机械力学功能的完整性。他们开展了一项命名为“欧洲椎间盘”的前瞻、随机、多中心的临床试验, 目标是评价自体椎间盘软骨细胞移植的远期效果。在前 28 个患者中, 随机挑选 12 个

作为植入组, 另外 16 个为对照组。随访 2 年后发现, 植入组的临床效果明显优于对照组。虽然两组的椎间盘高度与椎体高度无差别, 但是自体软骨细胞植入组的椎间盘基质丢失量 (58%) 明显低于对照组 (75%), 这表明自体软骨细胞移植是有效的。

以上研究表明软骨细胞的移植是有效的。目前体外培养软骨细胞的方法主要有单层培养和立体培养。Niethard 等^[19]研究表明成人软骨细胞在单层培养下 II 胶原的表达随着传代次数的增加而减少, 而在三维立体培养下则能延缓这种减少; 单层细胞体外培养一定时间后细胞会发生去分化现象, 三维立体培养则能够保持细胞原有表型。

2.3 髓核细胞移植

髓核退变是椎间盘退变的一个重要影响因素。大量生物力学研究表明髓核内水分的丢失和髓核的纤维化能够导致传递应力能力的下降。结果, 纤维环承受了大部分垂直方向的重力, 容易引起纤维环的撕裂和随后的退变。

Gan 等^[20]认为恢复脊柱的组织结构功能最好的方法就是阻止或限制髓核的退变。目前可行的办法有两种: (1) 激活髓核细胞使其产生更多的细胞外基质; (2) 重新植入髓核细胞, 从而增加基质含量。他们同时认为髓核细胞的培养应该分两个阶段, 第一个阶段是数量的扩增; 第二阶段则是细胞表型表达能力的增强。要同时达到这两个要求, 需要结合单层培养和试管细胞团培养两种方法。对于髓核细胞的培养方式, 目前国内外的研究均表明三维立体培养下 I、II 型胶原分泌量都较单层培养有所提高。

Zhang 等^[21]在体外用携带多种骨形成蛋白基因的腺病毒转染的自体软骨细胞与髓核细胞共同培养, 结果发现软骨细胞不仅本身能够产生生长因子还能够刺激髓核细胞分泌细胞外基质。但这种方法具有一定的局限性, 因为退变椎间盘内的细胞可能已经失活或者变性。Okuma 等^[22]从日本白兔上提取髓核细胞和纤维环细胞, 在体外共同培养后通过测定 DNA 合成发现两种细胞的数量增加。随后, 同一研究小组又用人体的椎间盘细胞做了同样的实验, 在培养基中加入纤维环细胞繁殖标记物, 分别在 7d 和 14d 后测定标记物含量, 结果发现与髓核细胞共同培养组明显高于单纯培养组。

Nomura 等^[23]将同种异体髓核细胞植入吸出髓核的兔椎间盘退变模型中。术后 16 周, 通过对 II 型胶原的检测发现, 植入组的退变程度轻于未植入组, 且各组均无免疫排斥反应发生, 提示髓核细胞移植可以延缓椎间盘退变。Gruber 等^[24]将体外培养的椎间盘细胞植入沙鼠的椎间盘内, 随后分析植入细胞的存活和功能。在这项研究中, 他们用 2mm³ 的胶原基质包裹近 10 000 个培养的椎间盘细胞 (这些细胞事先都已标记以便植入后的追踪), 然后植入一处损伤的腰椎间盘内。术后 8 个月, 相应的椎间盘内仍可见标记的细胞, 但是没有报道椎间盘的恢复情况。

Iwashina 等^[25]在兔的退变椎间盘模型上植入人的髓

核细胞,术后 4 周发现植入组的椎间盘高度较未植入组有明显增加;术后 24 周,在未植入组的椎间盘上可见髓核的缺失和椎间盘高度的丢失,而植入组的髓核则完整;组织学检查发现植入组的纤维环结构保存完好,且髓核与纤维环的边界清晰可见;另外,植入组髓核内基质、胶原、蛋白聚糖的 mRNA 表达相对未植入组有显著提高。可见,人髓核细胞的移植能够延缓椎间盘的退变,同样对延缓人的椎间盘退变也存在可能。

3 椎间盘退变细胞治疗的前景和问题

椎间盘的细胞治疗处于萌芽阶段,具有广阔的发展前景。首先,细胞治疗具有重要的治疗价值,它可以增加椎间盘的基质含量,从而延缓椎间盘退变和促进椎间盘的再生;另外,通过细胞治疗可以帮助我们进一步了解椎间盘的退变机制;还有,细胞治疗可以促进基因治疗、分子治疗的进展。分子治疗和基因治疗的成功需要足够数量的反应细胞,而退变的椎间盘一般都伴有细胞数量的下降,所以应用细胞治疗来恢复细胞数量是非常必要的。

椎间盘的细胞治疗是一项复杂的工程,还存在很多问题,例如缺少理想的椎间盘退变动物模型,如何选择满意的植入细胞类型及细胞支架,怎样营造细胞繁殖和胶原产生的适宜生物力学环境,应用哪些生长因子或基因可以增强植入细胞的生物活性。

目前最大的限制就是椎间盘退变模型的制备和证实。绝大部分的退变模型都是通过椎间盘损伤建立的,这些模型与自然老化的椎间盘的相关性需要证实。一方面,应继续深入研究机械损伤对椎间盘营养健康的影响。另一方面,需要更先进的非创伤性的检测技术来监测椎间盘退变,高精度 MRI 的出现将能够满足这种需求。

细胞类型的选择上,近来主要倾向于自体间质干细胞和自体软骨细胞。理论上讲,自体髓核细胞最具可行性,但正常的自体髓核细胞获取途径有限,特殊的生存环境造成其体外培养困难,所以研究进展缓慢。骨髓间质干细胞具有自我更新和多向分化的潜能,在医学其他领域的应用已经积累了丰富的经验,骨髓间质干细胞移植将是细胞治疗椎间盘退变的有效手段。椎间盘退变是直接或间接由盘内营养的损失引起的,那么椎间盘能否提供足够的营养来维持植入细胞的存活将是个问题,因此细胞支架的制备也至关重要。

综上所述,从技术和方法上来看,细胞移植治疗椎间盘退变是可行的。但是目前应用于临床时机还不成熟,需要进一步确认其安全性和有效性。未来,我们的任务就是结合细胞、支架、生长因子三种因素定义出一种理想的移植植物,从而能够为椎间盘生物学上的完整性提供真正有意义的、长远的改善。

4 参考文献

1. Meisel HJ. The lumbar vertebral disc[J]. Eur Spine J, 2006, 15

(Suppl 15):301-302.

2. Evans C. Potential biologic therapies for the intervertebral disc [J]. J Bone Joint Surg Am, 2006, 88(Suppl 2):95-98.
3. Ohshima H, Urban JP. The effect of lactate and pH on proteoglycan and protein synthesis rates in the intervertebral disc [J]. Spine, 1992, 17(9):1079-1082.
4. Cappello R, Bird JL, Pfeiffer D, et al. Notochordal cell produce and assemble extracellular matrix in a distinct manner, which may be responsible for the maintenance of healthy nucleus pulposus [J]. Spine, 2006, 31(8):873-883.
5. Antoniou J, Steffen T, Nelson F, et al. The human lumbar intervertebral disc: evidence for changes in the biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, ageing, and degeneration [J]. J Clin Invest, 1996, 98(4):996-1003.
6. Leung VY, Chan D, Cheung KM. Regeneration of intervertebral disc by mesenchymal stem cells: potentials, limitations, and future direction [J]. Eur Spine J, 2006, 15 (Suppl 15):406-413.
7. Diduch DR, Coe MR, Joyner C, et al. Two cell lines from bone marrow that differ in terms of collagen synthesis, osteogenic characteristics, and matrix mineralization [J]. J Bone Joint Surg Am, 1993, 75(1):92-105.
8. 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.
9. Risbud MV, Albert TJ, Guttapalli A, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells towards a nucleus pulposus-like phenotype in vitro: implications for cell-based transplantation therapy [J]. Spine, 2004, 29(23):2627-2632.
10. Zhang YG, Guo X, Xu P, et al. Bone mesenchymal stem cells transplanted into rabbit intervertebral discs can increase proteoglycans [J]. Clin Orthop Relat Res, 2005, 430:219-226.
11. 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.
12. Sakai D, Mochida J, Iwashina T, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells transplanted to a rabbit degenerative disc model: potential and limitations for stem cell therapy in disc regeneration [J]. Spine, 2005, 30(21):2379-2387.
13. Rahmat R, Moore RJ, Nikoloff S, et al. Autologous chondrocyte implantation in an ovine model of disc degeneration [J]. J Bone Joint Surg Br, 2004, 86(Suppl 4):461-462.
14. Tayrose GA, Costa ER, Hooker J, et al. Costal cartilage autografts to simulated degenerative intervertebral discs in the rat [J]. Spine, 2006, 31(23):863-866.
15. 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.

综述

脊髓空洞症发病机制和治疗进展

王 嵘¹, 邱 勇¹, 蒋 健²

(1 南京大学医学院附属鼓楼医院脊柱外科; 2 神经外科 210008 南京市)

中图分类号: R744.4 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2007)-12-0934-03

脊髓空洞症(syringomyelia)是指脊髓内存在异常液性囊腔的一组病症。Milhorat 根据 105 例脊髓空洞症死亡患者尸检的病理研究发现脊髓空洞多是其他疾病的继发改变^[1], 结合临床资料和病因分析, 将其分为交通型、非交通型、萎缩型和肿瘤型^[2]。根据这一分型, 可以区分各类型脊髓空洞不同发病机制, 制定相应治疗策略^[3]。笔者对不同类型脊髓空洞症的发病机制和治疗进展加以综述。

1 交通型脊髓空洞症的发病机制与治疗

Milhorat 等^[4]报道的 105 例脊髓空洞症死亡患者尸检中, 有 47 例为交通型脊髓空洞, 又称脊髓积水(hydromyelia), 是脊髓中央管扩张所致, 和第四脑室直接相通, 均合并脑积水, 其中 43 例为婴幼儿, 26 例伴 Chiari II 型畸形。1958 年 Gardner 提出, 由于脑脊液循环通路中第四脑室出口发生堵塞, 形成梗阻性脑积水, 脑室内压力

增高导致脑脊液通过脊髓中央管上端开口(𠂇, obex)进入脊髓中央管, 液体蓄积、脊髓中央管扩张, 从而形成交通型脊髓空洞。根据这一学说, 有学者^[5]复制出交通型脊髓空洞动物(家兔)模型, 通过枕大池内注入致炎剂(白陶土, kaolin), 导致枕大池局部炎症从而堵塞脑脊液第四脑室出口, 形成梗阻性脑积水, 进而出现脊髓中央管扩张, 形成交通型脊髓空洞; 如果事先将𠂇堵塞, 则不会出现脊髓中央管扩张的脊髓空洞模型。Gardner 采用后枕部正中切口, 枕骨骨性减压, 开放第四脑室出口, 硬脑膜修补成形, 第四脑室可以和蛛网膜下腔沟通等, 可以有效缓解脊髓空洞。其他学者^[6]亦证明此治疗方法可以有效缓解脊髓空洞。

Hall 等^[7]在狗的颈段交通型脊髓空洞模型中采用单纯脑室引流治疗脑积水不能有效缓解脊髓空洞, 提示还有其他发病机制参与交通型脊髓空洞发病。1979 年 Williams 在狗的颈段交通型脊髓空洞模型中研究发现颈椎椎管和后颅窝蛛网膜下腔压力变化不同步(压力分离), 后颅窝蛛网膜下腔压力往往高于椎管内蛛网膜下腔压力, 导致了脑脊液进入脊髓中央管。在人体中的情况也得到了研究证实^[8]。

第一作者简介: 男(1971-), 副主任医师, 博士研究生, 研究方向: 脊髓空洞

电话: (025)83304616-11001 E-mail: wangr77@hotmail.com

16. Ganey T, Libera J, Moos V, et al. Disc chondrocyte transplantation in a canine model: a treatment for degenerated or damaged intervertebral disc [J]. Spine, 2003, 28 (23): 2609-2620.
17. Ganey TM, Meisel HJ. A potential role for cell-based therapeutics in the treatment of intervertebral disc herniation [J]. Eur Spine J, 2002, 11 (Suppl 2): 206-214.
18. Meisel HJ, Ganey T, Hutton WC, et al. Clinical experience in cell-based therapeutics: intervention and outcome [J]. Eur Spine J, 2006, 15 (Suppl 15): 397-405.
19. Niethard M, Schneider U, Wallich R. Differential behaviour of human adult arthrotic chondrocytes under 2D -and 3D -cultivation set-ups in a collagen I gel [J]. Z Orthop Ihre Grenzgeb, 2007, 145(1): 102-107.
20. Gan JC, Ducheyne P, Vresilovic EJ, et al. Intervertebral disc tissue engineering II: cultures of nucleus pulposus cells [J]. Clin Orthop Relat Res, 2003, 411: 315-324.
21. Zhang Y, Li Z, Thonar E J, et al. Transduced bovine articular chondrocytes affect the metabolism of cocultured nucleus pulposus cells in vitro: implications for chondrocyte transplantation into the intervertebral disc [J]. Spine, 2005, 30 (23): 2601-2607.
22. Okuma M, Mochida J, Nishimura K, et al. Reinsertion of stimulated nucleus pulposus cells retards intervertebral disc degeneration: an in vitro and in vivo experimental study [J]. J Orthop Res, 2000, 18(6): 988-997.
23. Nomura T, Mochida J, Okuma M, et al. Nucleus pulposus allograft retards intervertebral disc degeneration [J]. Clin Orthop Relat Res, 2001, 389: 94-101.
24. Gruber HE, Hanley EN. Recent advances in disc cell biology [J]. Spine, 2003, 28(2): 186-193.
25. Iwashina T, Mochida J, Sakai D, et al. Feasibility of using a human nucleus pulposus cell line as a cell source in cell transplantation therapy for intervertebral disc degeneration [J]. Spine, 2006, 31(11): 1177-1186.

(收稿日期: 2007-03-14 修回日期: 2007-08-06)

(本文编辑 彭向峰)