

综述

椎间盘退行性疾病的生物学治疗进展

辛洪奎, 阮狄克, 张 超

(海军总医院骨科 100037 北京市)

中图分类号: R681.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2007)-02-0146-03

随着人类平均寿命的延长, 椎间盘退变性疾病(DDD)的发病率逐步上升。椎间盘退变的原因复杂, 归结起来主要有以下四大类因素^[1-4]: (1)年龄因素; (2)机械因素; (3)细胞营养及炎性介质的作用; (4)基因因素。不论是何种原因引起的椎间盘退变, 其最终结果都是使椎间盘细胞外基质如蛋白多糖及胶原的含量减少从而引发退变。生物学治疗正是着眼于促进细胞外基质合成这一核心环节, 通过应用生长因子、基因治疗及细胞移植等方法来实现治疗目的。笔者就 DDD 的生物学治疗研究进展作一综述。

1 生长因子的应用

生长因子对于椎间盘细胞增殖及细胞外基质合成的促进作用已经被越来越多的科研成果所证实。在椎间盘退变的较早阶段, 椎间盘细胞合成及代谢功能降低程度相对较轻, 可以通过向椎间盘内注射生长因子的方法, 促进细胞分泌细胞外基质, 从而达到维持椎间盘正常形态和功能、延缓椎间盘退变的目的。

在诸多的生长因子中, 研究较早、较多的是转化生长因子- β (TGF- β) 与胰岛素样生长因子-I (IGF-I)。1991 年, Thompson 将 TGF- β 加入体外培养的正常狗髓核细胞, 通过免疫组织化学及生化分析等方法检测其细胞外基质成分的含量, 结果实验组蛋白多糖的表达量较对照组明显增加。这一研究标志着 DDD 生物治疗研究领域的开端, 同时意味着 TGF- β 可能会对 DDD 的治疗起到积极的作用。张荣峰等^[5]对不同浓度血清条件下 TGF- β 及 IGF-I 对人正常髓核细胞的增殖活性进行了详细的研究, 发现二者单独应用时促进作用无统计学差异, 而二者联合应用时, 则能显著增强对髓核细胞增殖活性的促进作用。继 TGF- β 与 IGF-I 之后, 其他生长因子如骨形态发生蛋白 2、4、7(BMPs-2、4、7), 成纤维细胞生长因子等, 对椎间盘细胞外基质合成的直接或间接促进作用也相继得到证实^[6,7]。An 等^[8]向兔椎间盘内注射 BMP-7, 向另一椎间盘内注射生理盐水作为对照, 分别于实验第 2、4、8 周对两椎间盘高度进行测量比较, 并通过生化分析比较二者在含水量及蛋白多糖合成量上的区别。与对照组相比, 实验组的椎

间盘高度较高, 水分及蛋白多糖的含量也显著升高, 这种效果一直到实验的第 8 周仍可以明显观察到。这充分说明向椎间隙内注射生长因子是促进髓核细胞功能及维持椎间隙高度的有效方法, 有可能会在 DDD 的治疗中发挥作用。但是生长因子在体内半衰期较短, 不能长时间维持有效浓度, 而患者往往不能耐受反复的局部注射, 这使得其在 DDD 治疗中的作用变得相对局限。如果结合有效的持续给药方法, 避免过多的反复注射给患者带来的不适, 生长因子在 DDD 的治疗中必将发挥极为重要的作用。

2 基因治疗

基因治疗是将目的基因通过一定方式导入靶细胞, 改变靶细胞的基因构成, 控制其蛋白产物的表达, 从而不仅影响靶细胞自身的代谢, 也影响周围细胞及细胞外基质的代谢。对于 DDD 来说, 将携带某一生长因子基因的载体转导入椎间盘细胞, 使其持续表达这一生长因子, 从而长时间起到治疗作用。这样, 不仅达到和直接应用生长因子相同的治疗目的, 更克服了生长因子作用时间短这一显著弱点。DDD 的基因治疗中, 目的基因主要分为两类, 一类为促进细胞合成代谢的 TGF- β 、IGF-I 等生长因子的逆转录 DNA; 第二类为抑制细胞外基质降解的 IL-1 受体抗体(IL-1 Ra)及基质金属蛋白酶抑制剂(TIMP-1)的逆转录 DNA。

1998 年, Nishida 等^[9]成功将携带 LacZ 基因的腺病毒载体(Ad/CMV-lacZ)导入体外培养和体内的新西兰兔髓核细胞内, 并对其表达产物进行连续检测。结果显示, LacZ 基因在 12 周内表达产物无明显减少。如此长时间的基因持续表达说明在 DDD 的治疗中, 通过腺病毒载体将目的基因导入椎间盘细胞的可行性。而 Nishida 等^[10]随后的研究更加证实了这一点。他们用新西兰兔为动物模型, 从前方显露各腰椎间盘, 并将含有 Ad/CMV-TGF- β 的盐水直接注射到 L3/4 椎间盘, 向 L4/5 椎间盘注射生理盐水, 而 L1/2 则不做处理进行对照。1 周后处死实验动物, 用 ELISA 法测定 TGF- β 基因的表达。结果导入 Ad/CMV-TGF- β 基因的椎间盘中 TGF- β 的含量高出对照组 5 倍之多, 且胶原蛋白及蛋白多糖的合成量均较对照组高出 2 倍。这一实验结果首次证明了体内髓核细胞的生物学活性可以通过基因治疗的方法得到改变, 从而达到延缓椎间盘

第一作者简介: 男(1978-), 医师, 医学硕士, 研究方向: 组织工程、椎间盘疾患

电话: (010)66958224 E-mail: xintodorov@yahoo.com.cn

退变的治疗目的。Moon 等^[11]则将注意力直接放在了 Ad/CMV-TGF- β 对人髓核细胞的作用上。他们成功地用 Ad/CMV-hTGF- β 分别转染体外培养的正常及退变人髓核细胞,并将之与直接应用 TGF- β 的细胞进行比较。结果发现,转染 Ad/CMV-TGF- β 的细胞蛋白多糖的合成量较对照组增加了 200%,同时还发现转染 Ad/CMV-TGF- β 的细胞能够改变其周围未转染 Ad/CMV-TGF- β 细胞的生物学活性,即旁分泌效应,通过这种效应,比较低的病毒载量便可能达到所期望的治疗目的。2003 年,Wallach 等^[12]成功用 Ad/TIMP-1 体外转染人退变髓核细胞使其蛋白多糖的表达明显增加。这一成果具有非常积极的意义,它第一次证实了可以通过抑制分解代谢途径来提高细胞外蛋白多糖的含量,而不是采用以往应用的促进合成代谢的方法,从而为椎间盘退变基因治疗提供了更多的选择。矿化蛋白-1 (LMP-1) 由于能够刺激白细胞及成骨细胞分泌多种 BMP 而受到学者们的广泛关注。Yoon 等^[13]将 Ad/CMV-LMP-1 分别转染体外培养及体内的髓核细胞,不但 LMP-1 的表达增加,BMP-2 和 BMP-7 的 mRNA 及蛋白水平均明显升高,并且蛋白多糖的合成量也得到提高。由此他们认为,LMP-1 是通过以 BMP 为媒介的旁路途径来促进细胞合成细胞外基质成分的,LMP-1 基因同样可以作为治疗椎间盘退变的目的基因。

基因治疗取得成功需要以下两个条件:合适的基因载体及目的基因,而这两者中又以后者更为重要。一般来讲,细胞不会轻易接受目的基因并成功完成基因表达,要使这一过程顺利完成,必须找到合适的载体来保护、转运、传递目的基因。基因治疗中,所有的基因载体都是必不可少的,因为没有一种载体能够满足所有的要求,每种载体都有它自身的优点和缺点。在选择载体时,如何最大限度地利用某一载体的优点,而把其缺点的负面影响降到最小,对于基因治疗的应用和进步都至关重要。如何提高目的基因表达的效率 and 延长其表达时间一直是困扰国内外学者的难题。

基因治疗的最终目的是使靶细胞表达相应的生长因子,在这一系列复杂的生化反应中,翻译因子起着非常关键的作用,作为这一系列复杂反应的始动因子,它能够促进基因表达蛋白产物并提高其终产物的含量,将翻译因子作为目的基因转入靶细胞在理论上能够实现表达效率的提高和时间的延长。Sox9 基因作为一种翻译因子基因,受到国内外众多学者的关注和研究。Paul 等^[14]将 Sox9 基因转染体外培养的退变人髓核细胞,结果不但 Sox9 翻译因子的表达明显增加,II 型胶原及蛋白多糖的表达也得到了显著提高;Gruber 等^[15]对不同退变程度的人椎间盘进行了 Sox9 翻译因子的免疫定位研究,发现随着退变程度的加重,Sox9 翻译因子的表达也逐渐降低,说明 Sox9 翻译因子在维持椎间盘细胞正常生理功能中扮演着重要角色。为了进一步提高目的基因表达的效率 and 延长其表达时间,Nishida 等^[16]研究了超声介导基因转染技术的转染效率及

远期效果,取得了可喜的成果,这一技术显著提高了转染效率,并且大鼠体内转染基因的表达持续了 24 周之久。这一成果也为基因治疗的临床应用开辟了更为广阔的前景。随着在这一领域研究的不断深入,基因治疗完全有可能延缓或逆转椎间盘退变,从而从根本上减轻这类患者的痛苦。

3 组织工程学治疗

近年来组织工程学在骨、软骨、肌腱、血管等方面所取得的大量成果使许多学者的目光转移到组织工程椎间盘的构建上,并进行了大量的探索,努力为椎间盘退变性疾病的治疗开辟新的途径。

真正意义的组织工程椎间盘是由 Gruber 等^[17]最早开始构建的。该研究以明胶海绵为支架材料,将体外培养的自体髓核细胞荧光标记后与支架材料复合,随后将细胞-支架复合物回植到沙鼠椎间隙内进行观察,8 个月后仍可观察到植入的细胞存活,并通过免疫细胞化学方法在植入组织中观察到蛋白多糖及胶原等细胞外基质成分,但是他并未说明这一椎间盘修复方法是否有效。

Gruber 等的研究给我们提出了构建组织工程椎间盘的两个主要问题:种子细胞及基质支架材料。理论上,种子细胞应该具备以下特点:当处于合适的微环境下时,能够增殖分化并大量合成蛋白多糖及 II 型胶原。由于自体椎间盘细胞在取材上的不便以及常常发生退变而不能很好地实现大量合成细胞外基质的功能,没有受到太多的关注。较为理想的种子细胞来源有:软骨细胞、骨髓间充质干细胞。干细胞来源广泛,不同来源的干细胞都具有分化为椎间盘细胞的能力。其中,又以来源于骨髓及脂肪组织的干细胞具有较好的临床应用前景。为了探寻治疗 DDD 更为合适的细胞来源,Sakai 等^[18]尝试了构建人永生化的髓核细胞系。他们将 Ad/SV40 感染体外培养的人髓核细胞,并进行连续传代培养,结果实验组细胞传代达 40 代以上,传 40 代后的细胞在形态及功能上都与传代前的细胞极为接近,未发现其有明显的成瘤性,从而成功以 Ad/SV40 建立了人永生化的髓核细胞系。支架材料的主要作用是为细胞增殖与分化提供合适的微环境,从而使细胞保持恰当的表现型。同时,组织工程支架材料还要具备良好的生物相容性,在动物体内能够自动降解。目前应用的支架材料主要有:藻酸盐、琼脂糖凝胶、胶原凝胶、多聚磷酸钙、聚乳酸-羟基乙酸等。

之后其他学者们也进行了构建组织工程椎间盘的尝试,并取得了一定的成果。Sakai 等^[19]将 LacZ 基因标记的骨髓间充质干细胞与蜂巢状前胶原支架复合,植入退变的兔椎间隙内。4 周后,植入的细胞仍具有活力,椎间隙高度得到了很好的保持,并且,还可以观察到蛋白多糖的合成。Sato 等^[20]以激光汽化切除兔椎间盘髓核,将纤维环细胞复合蜂巢状前胶原支架,经荧光标记后接种于退变椎间隙内进行观察。移植后的细胞-支架复合物有效地减少了髓核

切除所带来的椎间隙高度的丢失。这些研究都初步证实了组织工程椎间盘在重建病变椎间盘结构和功能上的可能性,也为以后进一步的研究奠定了基础。

Ruan等^[21]在动物实验的基础上将同种异体椎间盘移植应用于临床,结果表明同种异体椎间盘移植后可以存活,并发挥一定的生理功能,病变椎间隙的高度及活动度得到了较好的保持。这一成果成功地将“替代”与“修复”结合起来,开辟了治疗 DDD 的新思路。

永生化髓核细胞系^[18]的建立为组织工程椎间盘提供了更为理想和高级的种子细胞来源,结合促细胞增殖的生长因子在组织工程椎间盘中的应用,将生长因子、基因转染及组织工程 3 种技术完美地结合,构建结构精细、功能完善的组织工程椎间盘替代退变椎间盘,重建病变椎间盘的生物结构和生理功能,从根本上治疗 DDD 具备了理论上的可能性。随着国内外学者们的不断探索,DDD 的机制会更加明确,相对应的生物治疗手段也会更为理想。

4 参考文献

- Boos N, Weissbach S, Rohrbach H, et al. Classification of age-related changes in lumbar intervertebral discs[J]. *Spine*, 2002, 27(23):2631-2644.
- Yamazaki S, Weinhold PS, Graff RD, et al. Annulus cells release ATP in response to vibratory loading in vitro [J]. *J Cell Biochem*, 2003, 90(4):812-818.
- Yamazaki S, Banes AJ, Weinhold PS, et al. Vibratory loading decreases extracellular matrix and matrix metalloproteinase gene expression in rabbit annulus cells[J]. *Spine J*, 2002, 2(6):415-420.
- Benneker LM, Heini PF, Alini M, et al. Vertebral endplate marrow contact channel occlusions and intervertebral disc degeneration[J]. *Spine*, 2005, 30(2):167-173.
- 张荣峰, 阮狄克, 张超, 等. 转化生长因子- β 1 和胰岛素样生长因子-1 对人體核细胞体外增殖活性的影响[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2006, 16(11):856-860.
- Li J, Kim KS, Park JS, et al. BMP-2 and CDMP-2: stimulation of chondrocyte production of proteoglycan [J]. *J Orthop Sci*, 2003, 8(6):829-835.
- Tsai TT, Guttapalli A, Oguz E, et al. Fibroblast growth factor-2 maintains the differentiation potential of nucleus pulposus cells in vitro: implications for cell-based transplantation therapy[J]. *Spine*, 2007, 32(5):495-502.
- An HS, Takegami K, Kamada H, et al. Intradiscal administration of osteogenic protein-1 increases intervertebral disc height and proteoglycan content in the nucleus pulposus in normal adolescent rabbits[J]. *Spine*, 2005, 30(1):25-32.
- Nishida K, Kang JD, Suh JK, et al. Adenovirus-mediated gene transfer to nucleus pulposus cells: implications for the treatment of intervertebral disc degeneration[J]. *Spine*, 1998, 23(22):2437-2442.
- Nishida K, Kang JD, Gilbertson LG, et al. Modulation of the biologic activity of the rabbit intervertebral disc by gene therapy: an in vivo study of adenovirus-mediated transfer of the human transforming growth factor β 1 encoding gene[J]. *Spine*, 1999, 24(23):2419-2425.
- Moon SH, Gilbertson LG, Nishida K, et al. Human intervertebral disc cells are genetically modifiable by adenovirus-mediated gene transfer[J]. *Spine*, 2000, 25(20):2573-2579.
- Wallach CJ, Sobajima S, Watanabe Y, et al. Gene transfer of the catabolic inhibitor TIMP-1 increases measured proteoglycans in cells from human intervertebral discs[J]. *Spine*, 2003, 28(20):2331-2337.
- Yoon ST, Park JS, Kim KS, et al. LMP-1 upregulates intervertebral disc cell production of proteoglycans and BMPs in vitro and in vivo[J]. *Spine*, 2004, 29(23):2603-2611.
- Paul R, Haydon RC, Cheng H, et al. Potential use of Sox9 gene therapy for intervertebral degenerative disc disease[J]. *Spine*, 2003, 28(8):755-763.
- Gruber HE, Norton HJ, Ingram JA, et al. The Sox9 transcription factor in the human disc: decreased immunolocalization with age and disc degeneration [J]. *Spine*, 2005, 30(6):625-630.
- Nishida K, Doita M, Takada T, et al. Sustained transgene expression in intervertebral disc cells in vivo mediated by microbubble-enhanced ultrasound gene therapy[J]. *Spine*, 2006, 31(13):1415-1419.
- 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.
- Sakai D, Mochida J, Yamamoto Y, et al. Immortalization of human nucleus pulposus cells by a recombinant SV40 adenovirus vector: establishment of a novel cell line for the study of human nucleus[J]. *Spine*, 2004, 29(14):1515-1523.
- 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.
- 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.
- Ruan DK, He Q, Ding Y, et al. Intervertebral disc transplantation in the treatment of degenerative spine disease: a preliminary study [J]. *Lancet*, 2007, 369(9566):993-999.

(收稿日期:2007-03-02 修回日期:2007-08-09)

(本文编辑 卢庆霞)