

综述

脊索细胞与椎间盘退变关系研究进展

马智林, 邵增务

(华中科技大学同济医学院附属协和医院骨科 430022 湖北省武汉市解放大道 1277 号)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2009.06.17

中图分类号: R681.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2009)-06-0470-03

随着年龄的增长, 椎间盘退行性变是一类患病率很高、严重影响生活质量的疾病。椎间盘组织以大量基质为主要组成结构, 少量细胞散在分布于基质中。蛋白多糖和胶原是构成椎间盘基质的主要蛋白质, 决定基质结构和功能的完整性, 因而它们的损耗是椎间盘退变的重要因素。脊索细胞对细胞外基质的合成有重要作用, 与椎间盘退变密切相关。笔者着重从脊索细胞的生物学特性和其促进椎间盘髓核细胞外基质合成的机制等研究进展作一综述。

1 脊索细胞的发育生物学、分离鉴定和形态结构

1.1 脊索细胞发育生物学及分离鉴定

脊索细胞在椎间盘髓核组织内, 起源于内胚层, 随年龄增长逐渐减少甚至消失, 被来源于中胚层的类软骨细胞替代, 这也是椎间盘退变的重要病理基础^[1,2]。不同动物的脊索细胞消失的年龄不同, 如人在 10 岁以后脊索细胞就消失了, 兔在 16 个月时只有少量脊索细胞^[3]。

脊索细胞通过缝隙连接进行细胞和细胞间的信号传导, 一些酶可能对其造成损伤, 甚至杀死脊索细胞, 因此脊索细胞分离培养比较困难。但是 Hunter 等^[4]认为脊索细胞可以抵抗机械性破坏, 其机制为: 脊索细胞内的包涵体(囊泡)是低渗透压的, 通过离子泵向细胞质泵出其内容物, 调解细胞的渗透压、体积和张力, 抵抗外界损伤。鉴于脊索细胞这种抵御外界损伤的特性, 人们可以剪碎髓核, 经过一系列酶解反应后, 应用密度梯度离心法, 分离脊索细胞^[5]。

Chen 等^[6]用整合素(Integrin) $\alpha 1$ 、 $\alpha 6$ 和 $\beta 1$ 抗体对脊索细胞进行免疫荧光染色, 发现脊索细胞高表达 Integrin $\alpha 1$ 、 $\alpha 6$ 和 $\beta 1$, 因此可以通过检测 Integrin $\alpha 1$ 、 $\alpha 6$ 和 $\beta 1$, 对脊索细胞做鉴定。以往研究人员曾认为半乳糖-3(galectin-3)可以作为脊索细胞的表面标志物, 但最近 Oguz 等^[7]研究发现, galectin-3 在髓核细胞可以检测到, 在纤维环、胸骨、肋骨的细胞中也可以检测到, 因此 galectin-3 不能作为脊索细胞的表面标志物。

1.2 脊索细胞结构及形态学特性

不同物种来源的脊索细胞的形态结构不同, 同种动

物杂合体和纯合体的脊索细胞形态也不同。Hunter 等^[8]研究发现, 2 岁杂交狗的脊索细胞比较大, 并且是相互连接的; 2 岁纯种狗的脊索细胞比较小, 而且是不连接的细胞群。虽然不同个体来源的脊索细胞形态不同, 但基本形态结构是相似的。脊索细胞多呈圆形或椭圆形, 体积较大, 直径 30~40 μm , 由细胞膜、细胞质、细胞核和包涵体(囊泡)构成。细胞和细胞之间借助肌动蛋白微丝和连接蛋白连接起来, 形成细胞簇。此外髓核中还有少量的类软骨细胞, 需要与脊索细胞鉴别, 这类细胞直径一般小于 10 μm , 无包涵体, 数量相对较少, 大多是独立的, 或 4~6 个细胞组成的小细胞群。Hunter 等^[9]选用无软骨营养障碍、小于 2 岁的狗椎间盘髓核细胞, 用组织学、共聚焦激光显微镜和透射电子显微技术观察髓核组织切片, 发现每张切片含有 4~30 多个大细胞群, 细胞群被一层薄的基质分开, 这些细胞(脊索细胞)体积较大(直径 30~40 μm), 内有泡状的包涵体, 包涵体不能被曙红、过碘酸和油红 O 染色; 细胞中央是一小片嗜酸性细胞质, 细胞质包绕着细胞核; 对脊索细胞进行肌动蛋白染色发现大量包涵体, 大约占细胞体积的 55.8%, 稠密的肌动蛋白微丝包绕着包涵体和细胞核; 连接蛋白 43 抗体染色法和波形蛋白抗体染色法显示, 这两种蛋白都存在于脊索细胞中; 连接蛋白 43 分散于整个细胞表面, 集中于细胞间的连接部位, 波形蛋白主要位于细胞质中; 共聚焦显微镜三维重构显示, 平均每个细胞簇体积是 $1.06 \times 10^7 \pm 2.6 \times 10^6 \mu\text{m}^3$, 有 109 ± 17 个细胞, 细胞密度为 $1.31 \times 10^5/\text{cm}^3$, 细胞的有效半径为 $27.1 \pm 0.9 \mu\text{m}$, 每个包涵体体积为 $1870 \pm 531 \mu\text{m}^3$, 平均每个细胞含有 7.2 ± 0.69 个包涵体, 占细胞体积的 $(55.8 \pm 3.3)\%$ 。Guehring 等^[10]研究猪的脊索细胞也观察到了上述相似结构。

2 脊索细胞与椎间盘退变的关系

2.1 促进髓核细胞外基质合成

赵献峰等^[11]取 4 周龄新西兰兔, 取其髓核中类软骨细胞和脊索细胞, 将类软骨细胞单独培养作为对照组, 类软骨细胞和脊索细胞共培养为实验组, 发现脊索细胞可促进类软骨细胞增殖, 维持类软骨细胞表达蛋白多糖和 II 型胶原。Aguiar 等^[12]把髓核细胞和脊索细胞共培养, 蛋白聚糖的合成增加, 但纯化的脊索细胞几乎不合成蛋白聚糖, 因此他认为脊索细胞可以分泌一种可溶性因子, 进而促进蛋

第一作者简介: 男(1983-), 在读硕士, 研究方向: 脊柱外科

电话: (027)85351626 E-mail: 155382539@qq.com

通讯作者: 邵增务

白聚糖的合成。此外,Smits 等^[13]认为脊索细胞和类软骨细胞都表达蛋白聚糖和Ⅱ型胶原,并且受 Sox5 和 Sox6 的影响,表达 Sox5 和 Sox6 的基因缺失,脊索细胞和类软骨细胞表达蛋白聚糖和Ⅱ型胶原就会减少,影响髓核形成。脊索细胞的存在使髓核细胞外基质的合成增多,但其具体的机制仍不甚明确,主要有以下两种观点。

(1)“指挥者”。该观点认为脊索细胞可以分泌结缔组织生长因子(CTGF),促进髓核中的类软骨细胞分泌髓核细胞外基质。Erwin 等^[14]研究发现,类软骨细胞在含脊索细胞的培养基中培养时,聚集蛋白聚糖、多功能蛋白聚糖和透明质酸合酶 2 基因的表达都上调了,并且其表达的量分别是对照组(相同的培养基含类软骨细胞但不含脊索细胞)的 2.7、2.2 和 2.6 倍。用无软骨营养不良和有软骨营养不良狗的椎间盘髓核细胞,测定二者 CTGF 基因表达的量无明显差异,证实了髓核中的 CTGF 不是类软骨细胞分泌的,而是脊索细胞分泌的^[14]。

脊索细胞分泌的 CTGF 是一种长度为 36~38kd 的富含半胱氨酸的分泌性蛋白,共有 349 个氨基酸残基。它含有一个 von Willebrand 因子—C 区的结构,可以结合转化生长因子 β 和骨形态发生蛋白质类,从而促进类软骨细胞聚集蛋白聚糖、多功能蛋白聚糖、透明质酸合酶 2 基因表达。Erwin 等^[14]进一步研究表明聚集蛋白聚糖基因的表达与重组 CTGF 存在剂量依赖关系,重组 CTGF 浓度越高,聚集蛋白聚糖基因的表达就越多。脊索细胞分泌的 CTGF 不仅可以促进聚集蛋白聚糖的合成,它在退变椎间盘的血管形成中也有重要作用^[15]。Erwin 等^[16]也认为脊索细胞可以促进类软骨细胞合成细胞外基质,并且发现类软骨细胞蛋白多糖生成与脊索细胞数量存在明显剂量依赖关系;同时类软骨细胞增殖能力也明显加强,但不存在明确的剂量依赖关系。

(2)“生产者”。近年来,人们对脊索细胞在椎间盘髓核细胞外基质的合成作用方面,有了新的观点。Cappello 等^[17]认为脊索细胞以一种独特的方式生产和汇聚细胞外基质。他们认为,脊索细胞合成聚集蛋白聚糖的速度可以是小的髓核细胞(类软骨细胞)的 1.5 倍,而且把聚集蛋白聚糖均衡的分布于细胞表面和细胞之间的部分。然而类软骨细胞分泌到细胞表面的聚集蛋白聚糖的量是分泌到较远处细胞之间的 3 倍。类软骨细胞分泌的聚集蛋白聚糖在细胞表面形成大的聚集物,然后被转运到较远处细胞之间的区域,且这种聚集作用不依赖于年龄。然而,脊索细胞分泌的聚集蛋白聚糖可以在聚集成大块聚集物之前迅速转移到较远处细胞之间的部分。可见,Erwin 等认为在髓核细胞外基质的合成过程中,脊索细胞充当了“指挥者”,而 Cappello 等则认为脊索细胞本身就是聚集蛋白聚糖的“生产者”。

2.2 脊索细胞凋亡与椎间盘退变的关系

无论上述哪种机制,脊索细胞都可以使髓核细胞外基质增多,可见脊索细胞的减少是椎间盘退变的重要因

素。脊索细胞 fas 配体表达随年龄的增加而增加。Inui 等^[18]用斯普拉格-道利鼠研究发现,14.5d 的胚胎脊索细胞 fas 配体正染色为阴性,16.5d 的部分胚胎脊索细胞 fas 配体正染色为阳性,18.5d 的大部分胚胎脊索细胞 fas 配体正染色为强阳性。Kim 等^[19]研究发现脊索细胞表达 fas 和 fas 配体,并且其增殖水平在出生后 4 周时最高,而在 6 和 12 个月时明显降低。相反其凋亡水平在 4 周时最低,而在 6 和 12 个月时明显升高。尽管脊索细胞在体内逐渐减少的机制尚不清楚,但由 Fas 介导的凋亡可能在脊索细胞凋亡过程中起重要作用^[18,19]。Kim 进一步研究发现氧化应激可以通过激活凋亡相关蛋白 Caspases-9(内在的)和 Caspases-8(外在的)途径,使脊索细胞凋亡显著增加,而二者的抑制剂并不能明显抑制这种凋亡作用,但是 Caspase-3 的抑制剂可以明显对抗这种凋亡作用,因此应用 Caspase 抑制剂有望抵抗氧化应激诱导的脊索细胞凋亡,推迟椎间盘退变的起始年龄^[20]。国内也有学者^[21]经研究证实,在退变的椎间盘中凋亡细胞数越多,Caspase-8、Caspase-9 表达越强,认为二者可能在颈椎病颈椎间盘退行性变发生和发展中发挥重要作用,且细胞凋亡蛋白 Caspase-9 的作用可能比 Caspase-8 强。对脊索细胞凋亡的研究将进一步揭示椎间盘退变的起始过程,通过抑制脊索细胞凋亡,使脊索细胞长期稳定的促进类软骨细胞合成髓核细胞外基质,有望推迟椎间盘退变的起始年龄,甚至将长期稳定生存的脊索细胞,作为椎间盘组织工程的种子细胞,为防止和治疗椎间盘退变开辟新途径。

3 问题与展望

椎间盘退行性变是一种常见的严重影响人们生活质量的疾病。髓核组织自身修复能力差,椎间盘组织的退变难以自行逆转。由于髓核的生物力学功能复杂,目前临床应用的新技术,如人工椎间盘置换、人工髓核置换等也难以完全模拟和替代,这些方法虽然可以减轻临床症状,但仍存在并发症和远期疗效不佳的问题,更不宜应用于椎间盘退变的早期治疗。相比之下,采用组织工程学技术直接修复髓核,使椎间盘再生,既促进椎间盘细胞分泌细胞外基质,抑制分解代谢过程相关酶,防止细胞外基质降解、退变,进而阻止或预防退变过程的发生是治疗椎间盘退变的理想途径^[22]。对于椎间盘退变机制的研究,尤其是与脊索细胞相关的研究,使我们进一步加深了对椎间盘退行性机制的认识,更有助于我们认识较为幼稚的椎间盘髓核细胞外基质合成代谢的影响因素,从而使我们看到椎间盘再生的新前景。椎间盘组织工程学常用骨髓间充质细胞和类软骨细胞作为种子细胞^[23],对于脊索细胞的研究较少,目前人们对脊索细胞的研究,为将脊索细胞作为种子细胞,植入退变椎间盘进行修复提供了重要的理论依据和技术指导。

总之,这些以脊索细胞为切入点的研究,将会为我们开辟研究椎间盘退行性变治疗的新领域。

4 参考文献

1. Wang WL, Abramson JH, Ganguly A, et al. The surgical pathology of notochordal remnants in adult intervertebral discs: a report of 3 cases [J]. *Am J Surg Pathol*, 2008, 32 (8): 1123–1129.
2. Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. Accelerated cellular senescence in degenerate intervertebral discs: a possible role in the pathogenesis of intervertebral disc degeneration [J]. *Arthritis Res Ther*, 2007, 9(3): R45.
3. Hunter CJ, Matyas JR, Duncan NA. The functional significance of cell clusters in the notochordal nucleus pulposus: survival and signaling in the canine intervertebral disc [J]. *Spine*, 2004, 29(10): 1099–1104.
4. Hunter CJ, Bianchi S, Cheng P, et al. Osmoregulatory function of large vacuoles found in notochordal cells of the intervertebral disc running title: an osmoregulatory vacuole [J]. *Mol Cell Biomech*, 2007, 4(4): 227–237.
5. Aguiar DJ, Johnson SL, Oegema TR. Notochordal cells interact with nucleus pulposus cells: regulation of proteoglycan synthesis [J]. *Exp Cell Res*, 1999, 246(1): 129–137.
6. Chen J, Yan W, Setton LA. Molecular phenotypes of notochordal cells purified from immature nucleus pulposus [J]. *Eur Spine J*, 2006, 15(Suppl 3): S303–311.
7. Oguz E, Tsai TT, Di Martino A, et al. Galectin-3 expression in the intervertebral disc: a useful marker of the notochord phenotype [J]. *Spine*, 2007, 32(1): 9–16.
8. Hunter CJ, Matyas JR, Duncan NA. Cytomorphology of notochordal and chondrocytic cells from the nucleus pulposus: a species comparison [J]. *J Anat*, 2004, 205(5): 357–362.
9. Hunter CJ, Matyas JR, Duncan NA. The three-dimensional architecture of the notochordal nucleus pulposus: novel observations on cell structures in the canine intervertebral disc [J]. *J Anat*, 2003, 202(Pt 3): 279–291.
10. Guehring T, Urban JP, Cui Z, et al. Noninvasive 3D vital imaging and characterization of notochordal cells of the intervertebral disc by femtosecond near-infrared two-photon laser scanning microscopy and spatial-volume rendering [J]. *Microsc Res Tech*, 2008, 71(4): 298–304.
11. 赵献峰, 刘浩, 丰干均, 等. 脊索细胞促进髓核软骨样细胞增殖及表型维持 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2008, 22 (8): 939–943.
12. Aguiar DJ, Johnson SL, Oegema TR. Notochordal cells interact with nucleus pulposus cells: regulation of proteoglycan synthesis [J]. *Exp Cell Res*, 1999, 246(1): 129–137.
13. Smits P, Lefebvre V. Sox5 and Sox6 are required for notochord extracellular matrix sheath formation, notochord cell survival and development of the nucleus pulposus of intervertebral discs [J]. *Development*, 2003, 130(6): 1135–1148.
14. Erwin WM, Ashman K, O'Donnel P, et al. Nucleus pulposus notochord cells secrete connective tissue growth factor and up-regulate proteoglycan expression by intervertebral disc chondrocytes [J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(12): 3859–3867.
15. Ali R, Le Maitre CL, Richardson SM, et al. Connective tissue growth factor expression in human intervertebral disc: implications for angiogenesis in intervertebral disc degeneration [J]. *Biotech Histochem*, 2008, 83(5): 239–245.
16. Erwin WM, Inman RD. Notochord cells regulate intervertebral disc chondrocyte proteoglycan production and cell proliferation [J]. *Spine*, 2006, 31(10): 1094–1099.
17. 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): 873–882; discussion 883.
18. Inui Y, Nishida K, Doita M, et al. Fas-ligand expression on nucleus pulposus begins in developing embryo [J]. *Spine*, 2004, 29(21): 2365–2369.
19. Kim KW, Kim YS, Ha KY, et al. An autocrine or paracrine Fas-mediated counterattack: a potential mechanism for apoptosis of notochordal cells in intact rat nucleus pulposus [J]. *Spine*, 2005, 30(11): 1247–1251.
20. Kim KW, Ha KY, Lee JS, et al. The apoptotic effects of oxidative stress and antiapoptotic effects of caspase inhibitors on rat notochordal cells [J]. *Spine*, 2007, 32(22): 2443–2448.
21. 张学森, 丁惠强. 退变颈椎间盘组织中细胞凋亡及相关蛋白 Caspase-8、Caspase-9 的表达 [J]. *宁夏医学杂志*, 2008, 30(4): 295–297.
22. O'halloran DM, Pandit AS. Tissue-engineering approach to regenerating the intervertebral disc [J]. *Tissue Eng*, 2007, 13 (8): 1927–1954.
23. Nesti LJ, Li WJ, Shanti RM, et al. Intervertebral disc tissue engineering using a novel hyaluronic acid-nanofibrous scaffold (HANFS) amalgam [J]. *Tissue Eng Part A*, 2008, 14(9): 1527–1537.

(收稿日期: 2008-11-26 修回日期: 2009-05-08)

(本文编辑 彭向峰)