

综述

腰椎间盘突出髓核组织工程研究进展

袁 维, 王会仁, 董 健

(复旦大学附属中山医院骨科 200032 上海市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2011.02.16

中图分类号: R318 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2011)-02-0154-05

腰椎间盘突出性病变 (symptomatic lumbar intervertebral disc degeneration) 是造成腰腿痛的一个重要原因。研究显示, 退变最初发生于椎间盘, 以髓核退变为主^[1-2]。临床上根据病变轻重进行保守治疗和外科干预^[3-5], 目的是缓解疼痛, 稳定脊柱生物力学平衡。近十年来, 髓核组织工程研究取得了较大进展, 理论上可以修复原有退变组织, 为退变椎间盘寻找有效的生物学修复方法。

1 腰椎间盘突出退变机制

椎间盘由髓核、纤维环和软骨终板构成, 其中髓核是胶状组织, 处于无血管、无神经支配的相对封闭环境中, 髓核细胞是软骨样细胞, 其细胞外基质成分是蛋白多糖和 II 型胶原。由于椎间盘组织承受人体躯干及上肢的重量, 劳损较其他部位重而早, 且营养依靠软骨终板渗透为主, 营养有限, 容易退变^[6]。研究报道^[7], 椎间盘组织的营养供应减少、椎间盘细胞的凋亡、基质酶活性改变、炎症及细胞因子、生物力学改变、自身免疫等因素均可能参与了腰椎间盘的退变。髓核细胞数量减少, 细胞外基质含水量下降, II 型胶原和蛋白多糖基质成分减少, 椎间盘弹性和

膨胀性下降, 髓核会出现水平和垂直裂缝并从纤维环上撕脱, 导致退变椎体节段的生物力学改变, 椎间盘高度下降并膨出, 关节突关节重叠, 同时退变的椎间盘向局部软组织和周围空间中释放炎症介质^[8]。

2 组织工程方法修复退变髓核

构建髓核组织工程研究重点是种子细胞和载体材料的选择以及细胞因子的作用。组织工程方法修复退变髓核组织, 是一种生物学方法治疗退变性腰椎间盘突出疾病, 理论上可修复或重塑髓核, 使其恢复到自然功能状态, 避免外科手术带来的并发症, 促使退变达到生理康复^[9]。

2.1 种子细胞

目前常用的种子细胞主要包括自体或异体的椎间盘细胞及各种组织干细胞, 如骨髓来源的间充质干细胞和脂肪来源干细胞等。

Cruber 等^[10]将体外培养的自体髓核细胞行荧光标记后, 与明胶海绵复合, 回植入沙鼠 (随年龄可自发产生腰椎间盘突出退变) 椎间盘内, 移植的细胞可存活, 植入的细胞可以合成蛋白多糖和 I、II 型胶原等细胞外基质成分, 但自体髓核细胞来源受限。Nomura 等^[11]将自体髓核细胞注射到兔退变髓核内, 16 周后, 组织学观察和免疫组化检查显示 II 型胶原含量增加, 阻止了进一步退变, 通过 CD4 和 CD5 抗体检查 T 和 B 淋巴细胞反应, 未见免疫排斥现象。但无论

第一作者简介: 男 (1975-), 博士, 研究方向: 脊柱外科
电话: (021) 64041990 E-mail: wei95960@126.com
通讯作者: 董健 E-mail: wanghui ren340@163.com

e69.

26. Graham EJ, Lenke LG, Lowe TG, et al. Prospective pulmonary function evaluation following open thoracotomy for anterior spinal fusion in adolescent idiopathic scoliosis [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2000, 25(18): 2319-2325.
27. Newton PO, Marks M, Faro F, et al. Use of video-assisted thoracoscopic surgery to reduce perioperative morbidity in scoliosis surgery [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2003, 28(20): S249-S254.
28. Faro FD, Marks MC, Newton PO, et al. Perioperative changes in pulmonary function after anterior scoliosis instrumentation: thoracoscopic versus open approaches [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2005, 30(9): 1058-1063.
29. Kim YJ, Lenke LG, Bridwell KH, et al. Prospective pulmonary

function comparison of anterior spinal fusion in adolescent idiopathic scoliosis: thoracotomy versus thoracoabdominal approach [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2008, 33(10): 1055-1060.

30. Newton PO, Perry A, Bastrom TP, et al. Predictors of change in postoperative pulmonary function in adolescent idiopathic scoliosis: a prospective study of 254 patients [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2007, 32(17): 1875-1882.
31. Lonner BS, Auerbach JD, Estreicher MB, et al. Pulmonary function changes after various anterior approaches in the treatment of adolescent idiopathic scoliosis [J]. J Spinal Disord Tech, 2009, 22(8): 551-558.

(收稿日期: 2010-07-13 修回日期: 2010-10-03)

(本文编辑 李伟霞)

是自体还是异体髓核细胞体外培养条件要求比较高,成活率较低,限制了其广泛应用。

目前学者多选择成体干细胞作为研究对象,如骨髓间充质干细胞和脂肪源性干细胞。骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cell, BMSC)可进行自体移植,取材方便,且可避免排斥反应等。Hiyama 等^[12]将自体 BMSC 作为椎间盘组织工程的种子细胞,认为 BMSC 既然可以向成骨、软骨和脂肪细胞分化,在适当条件下同样可分化为具有软骨细胞表型的椎间盘细胞。他们选用猎兔犬(10~13 个月)作为实验动物,认为这个年龄段猎兔犬的髓核内脊索细胞已经退化消失,与人类退变髓核环境相似,通过抽取髓核的方法制作椎间盘退变模型。将 GFP 标记自体 BMSCs 后,与前胶原凝胶载体复合并注射入退变的椎间隙内,8 周后的组织学检查证实,退变椎间盘基本恢复正常结构,并且与宿主组织有较好的相容性。

最近研究发现,自体脂肪源性干细胞也可作为退变椎间盘的种子细胞,其优点是:取材方便、来源充分、分离容易,扩增速度快。与骨髓基质干细胞相比,在骨科临床应用中有较大优势,可避免骨髓取材带来的诸多问题^[13]。Lu 等^[14]报道人脂肪源性干细胞与髓核细胞进行共培养,体外模拟髓核环境,脂肪源性干细胞分化为髓核样细胞。Gaetani 等^[15]将自体脂肪源性干细胞与退变髓核细胞在藻酸盐支架内体外共培养,脂肪源性干细胞形态上向软骨样细胞分化,细胞外基质成份蛋白多糖、Ⅱ型胶原含量明显增加,显示其在修复退变椎间盘方面具有良好前景。髓核细胞是软骨样细胞,与间充质干细胞均来源于中胚层,有同源性,而且体外大量实验也证实脂肪源性干细胞可以转化为软骨细胞^[16,17]。

2.2 支架材料

为避免单层培养种子细胞的弊端,如细胞本身特殊形态的消失、衰老、基因突变等发生,目前多在三维环境中培养(如支架内),以期提高细胞的数量和质量^[18]。支架作为载体,用以模拟细胞外基质环境,提供适当的生物力学环境和生物化学信号,促进种子细胞分化并维持表型,有助于移植细胞粘附、增生、基因表达及辅助合成新的、有功能的组织。理想的组织工程支架材料应具备以下条件^[19]:良好的组织相容性;具有可塑性,并有一定的机械强度;具有三维立体结构,一方面有利于细胞的植入黏附,另一方面有利于营养成分的渗入和细胞代谢产物的排出;此外,还应该具有较好的生物可降解性,在组织形成过程中逐渐分解,不影响新形成组织的结构和功能。

目前各种生物材料制成的支架已经应用到髓核组织工程中,包括壳聚糖、藻酸盐、胶原、凝胶、透明质酸、磷酸钙、脱钙骨基质等等支架材料^[20]。而可注射型支架是研究热点^[21],因为它可在外科干预后或微创操作时进行髓核修复,从文献报道来看,可注射型支架主要集中在透明质酸、纤维蛋白、弹性蛋白、Ⅱ型胶原、藻酸盐和壳聚糖身上,其中壳聚糖支架的研究较多。

Seguin 等^[22]将牛髓核细胞与多聚磷酸钙(CPP)复合,体外培养 6 周后,在 CPP 上端形成具有一定厚度、分层的正常髓核样组织,其组织学表现、生化成分和力学性能也都与正常的髓核组织相似。Mizuno 等^[23]以聚乙醇酸/聚-L-乳酸(PGA/PLLA)制成椭圆形的纤维环外形支架,复合羊纤维环细胞,其中心部注以藻酸盐凝胶复合的髓核细胞,从而制成组织工程化复合物并植入裸鼠体内。观察 12 周证实,复合物的形态和组织学结构类似于正常的椎间盘组织,且纤维环样组织中富含Ⅰ型胶原而髓核样组织中富含Ⅱ型胶原,并随时间延长而呈渐增趋势。聚-L-乳酸(PLLA)支架有良好的生物力学强度,但降解时间难以控制,尤其是降解中间产物乳酸有毒副作用,扰乱了椎间盘组织所需 pH 值条件。

Huang 等^[24]将Ⅱ型胶原与透明质酸混合后,通过化学共价键结合硫酸软骨素-6(Chondroitin 6-sulfate)构成混合型组织工程髓核支架,然后将兔的髓核细胞种植到该支架上,28d 后评估髓核细胞增生情况及活力、细胞外基质(ECM)成分相关基因的表达和黏多糖含量(s-GAG),都得到了阳性结果。此外兔髓核细胞的Ⅱ型胶原和蛋白聚糖聚合物(aggrecan)基因呈现高表达,Ⅰ型胶原基因低表达。组织学观察和扫描电镜显示细胞外基质广泛沉积在这个混合支架上。

水凝胶类支架,藻酸盐是比较理想的选择,与髓核的胶体性状类似,但需要额外的化学物质或交联剂才能使其凝结,所以无法在体内自行凝结成胶状。Richardson 等^[25]研究发现,人骨髓间充质干细胞与壳聚糖-甘油磷酸水凝胶(chitosan-glycerophosphate hydrogels)体外复合培养,干细胞可转化为类软骨细胞特性,不需要添加额外诱导物质,RT-PCR 检测发现 Sox-9(Ⅱ型胶原)和聚集蛋白聚糖基因表达水平与髓核细胞相似,称为髓核样细胞,ALP 检测证实骨髓间充质干细胞不向骨细胞方面分化。壳聚糖-甘油磷酸水凝胶支架模拟髓核组织的胶状环境,为干细胞分化起到支持和保护的作用,相当于细胞外基质的功能,同时支架成分壳聚糖可以降解,更重要的是,它具有温度敏感特性,在常温下它是液体状,当在体内 37℃时自行凝结成胶状,利于细胞在支架内分布,也便于移植注射,为微创手术操作提供了方便。

为使细胞因子更好的发挥作用,与支架有机结合是目前研究热点,随着支架降解,期望细胞因子稳定、缓释并作用于宿主细胞,避免细胞因子集中释放效应、持续时间短的缺点。文献报道^[26]可借助肝磷脂,使细胞因子(如 BMP-2 等)通过共价键结合到聚己内酯(PCL)或聚 L-乳酸(PLLA)等支架上,制成细胞因子缓释支架。Li 等^[27]对肝磷脂与支架结合方法进行了改进,聚丙烯胺和肝磷脂聚合后通过 Ca^{2+} 共价键连接到藻酸盐微球支架上,然后再通过化学作用被聚乳酸包装,因为存在 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)和 N-羟基丁二酰亚胺(NHS)这两种偶联剂,使其细胞因子与支架结合的更加

牢固,且缓释效果更好。同时作者也指出应用此种方法也可使不同细胞因子聚合到壳聚糖水凝胶支架上,所以进一步深入研究肝磷脂修饰的功能性支架可能在髓核组织工程中发挥重要作用。

2.3 细胞因子

细胞因子在组织工程中有较重要的作用,它们通过内分泌、旁分泌、自分泌系统发挥功能^[28],调节椎间盘细胞的代谢活动。研究显示^[29,30],有一系列细胞因子来调节椎间盘新陈代谢,其中一部分通过体内或体外实验的方法已证实可以减缓或逆转椎间盘退变。在合成代谢中,转化生长因子(TGF- β)、骨形态发生蛋白(BMPs)、胰岛素样生长因子(IGF-1)、Sox-9 等被证实具有促进蛋白多糖和Ⅱ型胶原合成的作用;在分解代谢中,白细胞介素(IL-1)、肿瘤坏死因子(TNF- α)、基质金属蛋白酶(MMPs)等可促进蛋白多糖和Ⅱ型胶原的降解。

1991 年,Thompson 等^[31]首次报道在体外培养的髓核细胞内添加细胞因子 TGF- β ,可促进椎间盘细胞分泌蛋白多糖。目前研究比较多的是 BMPs 家族成员,包括 BMP-2 (Bone morphogenetic protein -2)、BMP-7 和 GDF-5 (Growth and differentiation factor-5)等。Kim 等^[32]报道 BMP-2 有利于人椎间盘细胞软骨素原显性基因表达,增加蛋白多糖合成,同时上调Ⅰ型胶原和Ⅱ型胶原 mRNA 的表达。BMP-7 也就是 OP-1 (Osteogenic protein-1),已证实具有骨诱导活性^[33],发现 OP-1 在退变椎间盘修复中可发挥重要作用,并可阻止椎间盘细胞凋亡。Takegami 等^[34]将 OP-1 (100 μ g/每个间盘)注射到退变椎间盘髓核内可以成倍促进细胞增殖,并有助于细胞外基质成份Ⅱ型胶原、聚集蛋白聚糖及 sox-9 的基因表达和同时促进内层纤维环的修复,且证实 OP-1 在髓核内不会引起成骨蛋白的表达,说明其在髓核内保持软骨细胞表型的作用,而非成骨作用。对 OP-1 深入研究发现^[35],注射到髓核内的 OP-1 抑制了 MMP-13、P 物质、及 TNF- α 、IL-1 β 等这些炎症和疼痛因子的表达,OP-1 延缓椎间盘退变可能与其抑制聚蛋白多糖酶(Aggreganase)有关。Park 等^[36]通过免疫组化的方法证明突出的椎间盘中存在 Fas 及 FasL,可引起椎间盘细胞凋亡。Wei 等^[37]发现,体外分离、培养髓核细胞,预先经过 OP-1 处理,可明显阻止凋亡诱导因子 TNF- α 诱导的凋亡过程,机制可能是通过沉默 Caspase-3 的活性实现的。Gruber 等^[38]报道在体外培养的椎间盘髓核细胞内添加胰岛素样生长因子-1 和血小板源性生长因子后可阻止细胞凋亡。GDF-5 也是 BMP 家族成员之一,研究表明其可促进蛋白多糖和Ⅱ型胶原的生成,并可提高髓核和纤维环细胞增殖活力^[39]。Walsh 等^[40]通过实验动物大鼠尾椎退变间盘模型发现 GDF-5 主要作用内层纤维环细胞,并可使其向髓核细胞方向分化。Robert 等^[41]对 46 例需要接受外科手术患者,分别按退变性椎间盘疾病、椎间盘后侧纤维环破损、脊椎滑脱和腰椎间盘突出进行分类后取材,应用免疫组化方法检测基质金属蛋白酶的含量,实验发现基质金属

蛋白酶(MMPs) 1、2、3、9 普遍存在于病变的椎间盘内,对比发现在椎间盘突出病例中基质金属蛋白酶含量最高,示 MMPs 可能是椎间盘退变进程的生物调节因子,参与了髓核细胞外基质的降解。

无论在体外细胞培养和活体内动物实验,细胞因子(主要作用于髓核细胞)都显示了良好的修复作用,但多数研究所用的实验动物(大鼠或兔子)多处于青壮年期(5~6 个月),除考虑脊索细胞对实验结果的影响,需要特别考虑的是实验动物年龄因素。如果选择成熟期或老年(相当于 1~4 岁)的实验动物(大鼠或兔子),其髓核中含水量和蛋白多糖成分降低,是否能显示出等同的实验结果,还有待实验进一步证实。

2.4 转基因持续表达细胞因子

细胞因子直接注射于退变椎间盘髓核内进行修复,存在一定的弊端,如直接注射到退变髓核内,在未与退变细胞有机结合之前有些细胞因子已经渗漏出来,此外这些蛋白有半衰期,不能起到长期作用效果,如何借助载体在退变椎间盘内持续表达细胞因子,已成为研究热点^[42]。基因治疗是将携带目的基因的种子细胞移植到(或借助支架)退变髓核内,以增加目的基因 mRNA 转录表达,最终通过旁分泌途径作用于转染细胞和周围细胞,其目的是通过改变蛋白聚糖合成与降解之间失平衡状态而达到蛋白聚糖合成的增加;调节Ⅱ型胶原合成的性别决定区(sex determining region Y-Box 9, Sox9),导致Ⅱ型胶原的合成增加,达到对退变椎间盘的修复作用。

目前应用的载体主要分为病毒载体和非病毒载体两大类。病毒载体^[43],包括:逆转录病毒、腺病毒(及腺相关病毒)、慢病毒等,后两者感染力强,不管是体内还是体外,非细胞分裂期的细胞均可受到感染,其中慢病毒可以与感染的宿主细胞 DNA 整合,所以其持续表达时间较长^[44]。病毒载体的优点为转染率高、突变率低,但同时可引起病毒自身基因的表达,有全身病毒感染的危险,而且病毒蛋白的免疫源性有可能激发免疫反应影响基因治疗的效果。非病毒载体的方法包括裸 DNA 注射、质粒等,其转染效率要低于病毒载体,但不会带来病毒基因表达的副作用,免疫源性也相对较低。

Zhang 等^[45]报道通过腺病毒载体转染骨形态发生蛋白系列(BMP-2、3、4、5、7、8、10、11、12、13、14 及 15)和 Sox-9 于牛髓核细胞后进行体外培养 6d,含 BMP-2 和 BMP-7 基因的髓核细胞蛋白多糖分泌量较多,而 BMP-2 基因修饰的髓核细胞活力及细胞增殖数量较多。含 Sox-9、BMP-4 和 BMP-14 基因的髓核细胞有助于胶原分泌增加,相比较而言后两者对其影响更加显著(与对照组相比分别增加 552%和 661%)。Paul 等^[46]采用针刺纤维环方法制作兔腰椎间盘退变模型,将携带 Sox-9 基因的病毒载体注射到病变髓核内,逆转了髓核退变并且髓核细胞形态也趋于正常。Wallach 等^[47]将 TIMP-1 基因通过病毒载体成功转染人退变髓核细胞,在细胞聚集成团的聚丙烯培养管中

进行培养(被称为“pellet culture”三维环境培养),实验结果显示转染基质金属蛋白酶抑制因子(TIMP-1)与转染 BMP-2 基因相比同样使退变髓核细胞蛋白多糖含量显著增加。在椎间盘退变动物模型中,基因治疗取得了令人鼓舞的成果,但仍然有许多问题需要解决^[48],如病毒载体的构建,如何使其更加安全、稳定、高效;以及如何使目的基因在宿主长期表达;应用到人身上,能否取得实验动物同样的效果等等,需要进一步的研究来证实。

3 目前存在的问题

应用组织工程学方法,对退变髓核进行干预,是为了延缓或逆转椎间盘退变,目前还处于研究的初期阶段。椎间盘中心区域无血供,营养差^[49],移植的细胞存活问题较为突出,而注射到退变间盘内的细胞因子也不易发挥有效作用,因此如何解决退变间盘的营养供应有待于进一步研究。椎间盘退变是一个渐进过程,何时进行生物组织工程干预及如何干预还需要进一步研究。研究显示^[50],退变早期对病变髓核应用细胞移植联合细胞因子或基因治疗是比较恰当的,但当退变累及到纤维环破损严重,甚至软骨终板出现钙化等,则适合进行椎间盘置换。椎间盘处于低氧水平、高乳酸浓度、分解代谢比较旺盛的这样一种特殊内环境^[51],理想的支架环境能提供分子信号,有助于移植细胞表型的表达及向髓核样细胞方向转化,还应该兼顾机械负荷因素。

通过组织工程学的方法,有机结合细胞移植、细胞因子及/或转基因技术复合支架植入病变髓核,修复甚至重塑髓核,改善细胞外基质营养成分,增加髓核含水量,恢复变窄、塌陷腰椎间隙,修复受损的纤维环裂口,改善软骨终板的营养供应,是髓核组织工程研究的价值所在。

4 参考文献

- Buckwalter JA. Aging and degeneration of the human intervertebral disc [J]. *Spine*, 1995, 20(11):1307-1314.
- Fujiwara A, Lim TH, An HS, et al. The effect of disc degeneration and facet joint osteoarthritis on the segmental flexibility of the lumbar spine [J]. *Spine*, 2000, 25(23):3036-3044.
- Putzier M, Schneider SV, Funk JF, et al. The surgical treatment of the lumbar disc prolapse - nucleotomy with additional transpedicular dynamic stabilization versus nucleotomy alone [J]. *Spine*, 2005, 30(5):E109-E114.
- Madigan L, Vaccaro AR, Spector LR, et al. Management of symptomatic lumbar degenerative disk disease [J]. *J Am Acad Orthop Surg*, 2009, 17(2):102-111.
- 徐丁, 陈一衡, 曾哈冰, 等. Coflex 棘突间动态固定系统治疗腰椎间盘突出症的短期疗效评价 [J]. *中华外科杂志*, 2009, 47(18):1379-1382.
- Sharp CA, Roberts S, Evans H, et al. Disc cell clusters in pathological human intervertebral discs are associated with increased stress protein immunostaining [J]. *Eur Spine J*, 2009, 18(11):1587-1594.
- Richardson SM, Hoyland JA. Stem cell regeneration of degenerated intervertebral discs; current status [J]. *Curr Pain Headache Rep*, 2008, 12(2):83-88.
- Beattie PF. Current understanding of lumbar intervertebral disc degeneration: a review with emphasis upon etiology, pathophysiology, and lumbar magnetic resonance imaging findings [J]. *J Orthop Sports Phys Ther*, 2008, 38(6):329-340.
- Hohaus C, Ganey TM, Minkus Y, et al. Cell transplantation in lumbar spine disc degeneration disease [J]. *Eur Spine J*, 2008, 17(Suppl 4):492-503.
- 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.
- Nomura T, Mochida J, Okuma M, et al. Nucleus pulposus allograft retards intervertebral disc degeneration [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2001, 389:94-101.
- Hiyama A, Mochida J, Iwashina T, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells in a canine disc degeneration model [J]. *J Orthop Res*, 2008, 26(5):589-600.
- Hoogendoorn RJ, Lu ZF, Kroeze RJ, et al. Adipose stem cells for intervertebral disc regeneration; current status and concepts for the future [J]. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(6):2205-2216.
- Lu ZF, Doulabi BZ, Wuisman PI, et al. Differentiation of adipose stem cells by nucleus pulposus cells; configuration effect [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 359(4):991-996.
- Gaetani P, Torre ML, Klinger M, et al. Adipose-derived stem cell therapy for intervertebral disc regeneration; an in vitro reconstructed tissue in alginate capsules [J]. *Tissue Eng Part*, 2008, 14(8):1415-23.
- Hoogendoorn R, Doulabi BZ, Huang CL, et al. Molecular changes in the degenerated goat intervertebral disc [J]. *Spine*, 2008, 33(16):1714-1721.
- Tapp H, Hanley EN, Patt JC, et al. Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopaedic tissue repair [J]. *Exp Biol Med*, 2009, 234(1):1-9.
- Kandel R, Roberts S, Urban JP. Tissue engineering and the intervertebral disc: the challenges [J]. *Eur Spine J*, 2008, 17(Suppl 4):480-491.
- Halloran DO, Grad S, Stoddart M, et al. An injectable cross-linked scaffold for nucleus pulposus regeneration [J]. *Biomaterials*, 2008, 29(4):438-447.
- O'Halloran DM, Pandit AS. Tissue-engineering approach to regenerating the intervertebral disc [J]. *Tissue Eng*, 2007, 13(8):1927-1954.
- Boyd LM, Carter AJ. Injectable biomaterials and vertebral endplate treatment for repair and regeneration of the intervertebral disc [J]. *Eur Spine J*, 2006, 15(Suppl 3):S414-S421.
- Seguin CA, Grynblas MD, Pilliar RM, et al. Tissue engineered

- nucleus pulposus tissue formed on a porous calcium polyphosphate substrate [J].*Spine*, 2004, 29(12):1299-1306.
23. Mizuno H, Roy AK, Zaporozhan V, et al. Biomechanical and biochemical characterization of composite tissue-engineered intervertebral discs [J].*Biomaterials*, 2006, 27(3):362-370.
 24. Huang B, Li CQ, Zhou Y, et al. Collagen II/hyaluronan/chondroitin-6-sulfate tri-copolymer scaffold for nucleus pulposus tissue engineering [J].*J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2010, 92(2):322-331.
 25. Richardson SM, Hughes N, Hunt JA, et al. Human mesenchymal stem cell differentiation to NP-like cells in chitosan-glycerophosphate hydrogels [J].*Biomaterials*, 2008, 29(1):85-93.
 26. Edlund U, Danmark S, Albertsson AC. A strategy for the covalent functionalization of resorbable polymers with heparin and osteoinductive growth factor [J].*Biomacromolecules*, 2008, 9(3):901-905.
 27. Li J, Zhu B, Shao Y, et al. Construction of anticoagulant poly(lactic acid) films via surface covalent graft of heparin-carrying microcapsules [J].*Colloids Surf B Biointerfaces*, 2009, 70(1):15-19.
 28. Clouet J, Vinatier C, Merceron C, et al. The intervertebral disc: from pathophysiology to tissue engineering [J].*Joint Bone Spine*, 2009, 76(6):614-618.
 29. Masuda K. Biological repair of the degenerated intervertebral disc by the injection of growth factors [J].*Eur Spine J*, 2008, 17:S441-S451.
 30. 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 annular puncture model [J].*Spine (Phila Pa 1976)*, 2006, 31(7):742-754.
 31. Thompson JP, Oegema TJ, Bradford DS. Stimulation of mature canine intervertebral disc by growth factors [J].*Spine*, 1991, 16(3):253-260.
 32. Kim DJ, Moon SH, Kim H, et al. Bone morphogenetic protein-2 facilitates expression of chondrogenic, not osteogenic, phenotype of human intervertebral disc cells [J].*Spine*, 2003, 28(24):2679-2684.
 33. Hsu WK, Wang JC. The use of bone morphogenetic protein in spine fusion [J].*Spine J*, 2008, 8(3):419-425.
 34. Takegami K, An HS, Kumano F, et al. Osteogenic protein-1 is most effective in stimulating nucleus pulposus and annulus fibrosus cells to repair their matrix after chondroitinase ABC-induced in vitro chemonucleolysis [J].*Spine J*, 2005, 5(3):231-238.
 35. Chubinskaya S, Kawakami M, Rappoport L, et al. Anti-catabolic effect of OP-1 in chronically compressed intervertebral discs [J].*J Orthop Res*, 2007, 25(4):517-530.
 36. Park JB, Kim KW, Han CW, et al. Expression of Fas receptor on disc cells in herniated lumbar disc tissue [J].*Spine*, 2001, 26(2):142-146.
 37. Wei A, Brisby H, Chung SA, et al. Bone morphogenetic protein-7 protects human intervertebral disc cells in vitro from apoptosis [J].*Spine*, 2008, 8(3):466-474.
 38. Gruber HE, Norton HJ, Hanley EN Jr. Anti-apoptotic effects of IGF-1 and PDGF on human intervertebral disc cells in vitro [J].*Spine*, 2000, 25(17):2153-2157.
 39. Chujo T, An HS, Akeda K, et al. Effects of growth differentiation factor-5 on the intervertebral disc-in vitro bovine study and in vivo rabbit disc degeneration model study [J].*Spine*, 2006, 31(25):2909-2917.
 40. Walsh AJL, Bradford DS, Lotz JC. In vivo growth factor treatment of degenerated intervertebral discs [J].*Spine*, 2004, 29(2):156-163.
 41. Roberts S, Caterson B, Menage J, et al. Matrix metalloproteinases and aggrecanase: their role in disorders of the human intervertebral disc [J].*Spine*, 2000, 25(23):3005-3013.
 42. Nishida K, Suzuki T, Kakutani K, et al. Gene therapy approach for disc degeneration and associated spinal disorders [J].*Eur Spine J*, 2008, 17(suppl 4):S459-S466.
 43. Hubert MG, Vadala G, Sowa G, et al. Gene therapy for the treatment of degenerative disk disease [J].*J Am Acad Orthop Surg*, 2008, 16(6):312-319.
 44. Miyazaki M, Sugiyama O, Zou J, et al. Comparison of lentiviral and adenoviral gene therapy for spinal fusion in rats [J].*Spine*, 2008, 33(13):1410-1417.
 45. Zhang Y, An HS, Thonar EJ, et al. Comparative effects of bone morphogenetic proteins and sox9 overexpression on extracellular matrix metabolism of bovine nucleus pulposus cells [J].*Spine*, 2006, 31(19):2173-2179.
 46. Paul R, Haydon RC, Cheng HW, et al. Potential use of Sox9 gene therapy for intervertebral degenerative disc disease [J].*Spine*, 2003, 28(8):755-763.
 47. Wallach CJ, Sobajima S, Watanabe Y, et al. Gene transfer of the catabolic inhibitor TIMP-1 increases measured proteoglycans in cells from degenerated human intervertebral discs [J].*Spine*, 2003, 28(20):2331-2337.
 48. Lee JY, Hall R, Pelinkovic D, et al. New use of a three-dimensional pellet culture system for human intervertebral disc cells-Initial characterization and potential use for tissue engineering [J].*Spine*, 2001, 26(21):2316-2322.
 49. Choi YS. Pathophysiology of degenerative disc disease [J].*Asian Spine J*, 2009, 3(1):39-44.
 50. Sobajima S, Vadala G, Shimer A, et al. Feasibility of a stem cell therapy for intervertebral disc degeneration [J].*Spine J*, 2008, 8(6):888-896.
 51. Wuertz K, Godburn K, Iatridis JC. MSC response to pH levels found in degenerating intervertebral discs [J].*Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 379(4):824-829.

(收稿日期:2010-04-06 修回日期:2010-11-04)

(本文编辑 刘彦)