

组织工程髓核种子细胞的研究进展

Development of research in tissue-engineering nucleus seed cells

张 涛,阮狄克,王德利,王超锋

(海军总医院骨科 100048 北京市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2012.02.18

中图分类号:R681.5, Q813.1 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2012)-02-0175-04

颈肩痛和腰腿痛是现代社会中的一种临床常见病,据统计在人的一生中超过 50% 的人会出现腰痛的症状^[1],椎间盘退行性变是其主要病因。近年来国内外众多学者应用组织工程学的技术与方法构建组织工程髓核,作为一种新的技术路线为椎间盘退变性疾病的治疗提供了新的思路,其中最基本、最关键的环节是种子细胞的选择。作者就脊索细胞、髓核细胞、软骨细胞、骨髓间充质干细胞、脂肪干细胞、胚胎干细胞在组织工程髓核种子细胞研究中的进展作一简要综述。

1 椎间盘退变特点

椎间盘的退变是一渐进且复杂的过程,主要表现为椎间盘细胞数量的减少和功能的降低,导致髓核水分丢失,Ⅱ型胶原和蛋白多糖等细胞外基质合成减少^[2,3],最终引起椎间盘正常的生理及生物力学特性发生改变。常规保守治疗和手术治疗方法只能在一定程度上缓解临床症状,并不能从根本上修复已退变的椎间盘,远期治疗效果并不理想^[4]。随着组织工程学技术的发展,构建组织工程髓核植入物实现退变椎间盘的生物学修复,已成为目前国内外脊柱外科领域基础研究的重点及热点^[5]。

2 种子细胞的种类及特点

辛洪奎等^[6]认为构建组织工程椎间盘时比较理想的细胞接种密度应不低于 10^5 个/ $150\mu\text{l}$ 。理想的组织工程髓核种子细胞需满足:(1)取材方便,来源较广,对机体损伤小;(2)增殖性强,在体外扩增能够达到所需的数量以及维持原有的表型;(3)植入体内时能适应受体环境,且易于向类髓核细胞分化;(4)生物毒性低,组织相容性好,免疫活性低,致癌性低。

2.1 脊索细胞

脊椎动物的脊索细胞存在于发育的特定时期,散布于椎间盘的黏液样基质中,呈圆形或多边形,胞核为卵圆

形,胞浆内有大小不等的空泡。脊索细胞在人出生后数量逐渐减少,人类大约在 10 岁左右髓核内的脊索细胞消失,然而在有些动物如兔体内脊索细胞可终生存在^[7]。Guehring 等^[8]阐明脊索细胞的生长增殖比软骨样髓核细胞需要更多能量,且营养应激抵抗力比髓核细胞差,这可能是脊索细胞容易凋亡的原因。Le Maitre 等^[9]认为来源于内胚层的脊索细胞逐渐减少,最终被来源于中胚层的软骨样细胞所替代,这是椎间盘退变的起始点。

Rastogia 等^[10]通过研究生物化学、营养状态、物理因子对未成熟髓核细胞的调节作用,认为脊索细胞与周围环境可相互调节,为椎间盘的老化、病变和修复提供了新线索。Mollenhaue 等^[11]实验研究证实,脊索细胞分泌的结缔组织生长因子可促进软骨样细胞蛋白多糖、多能蛋白聚糖和透明质酸合酶的基因表达上调,故结缔组织生长因子是髓核内的合成代谢促进因子,其表达强度有赖于髓核内脊索细胞的数量。由此可见,脊索细胞促进与其共培养的细胞的蛋白多糖等细胞外基质合成的机制是分泌可溶性细胞因子,而不是依赖于两种细胞的接触作用。赵献峰等^[12]将单纯软骨样细胞培养组与脊索细胞、软骨样细胞(1:1)共培养组做对比试验研究,结果表明脊索细胞能促进髓核软骨样细胞的增殖及表型维持,提示脊索细胞可能在防止椎间盘退变中具有重要意义。Moon 等^[13]实验研究发现在脊索细胞条件培养基中培养的脊索细胞一氧化氮合酶(iNOS)、环氧化酶 2(COX-2)的 mRNA 水平明显低于对照组,表明来自脊索细胞的可溶性因子对于纤维环内的炎症介质的基因表达起着重要下调作用。但目前脊索细胞最大的问题是其来源非常有限。

2.2 髓核细胞

作为髓核组织工程种子细胞的髓核细胞包括自体髓核细胞和异体髓核细胞,髓核细胞已成为组织工程椎间盘研究最常用的种子细胞之一,正常髓核细胞的功能主要是合成Ⅱ型胶原和蛋白多糖。

Meisel 等^[14]从已退变的椎间盘中取出髓核进行体外扩增培养,然后将体外培养后的髓核细胞通过微创穿刺注入原手术节段椎间隙,2 年后进行组织学和影像学评价分析发现,自体髓核细胞移植组手术节段和邻近 1~2 个节段

第一作者简介:男(1986-),在读硕士研究生,研究方向:脊柱外科
电话:(010)66958224 E-mail:zhangtao1986815@126.com
通讯作者:阮狄克 E-mail:ruandike@yahoo.com.cn

椎间隙的含水量明显高于未移植组,同时移植组患者疼痛显著缓解。但自体髓核细胞的获取是对椎间盘的一种损害,髓核细胞体外增殖能力低,成活率低,较难获取大量的细胞,限制了其广泛应用。Kim 等^[15]将髓核细胞和 MSC 置于力学刺激下的三维共培养体系中观察,发现细胞比例为 2:1 时 MSC 向髓核样细胞分化最为明显。同时已有大量研究证实髓核细胞在三维立体培养条件下细胞活性较高。Zhang 等^[16]将兔髓核细胞与聚乳酸-羟基乙酸共聚物体外复合后,实验组置于旋转式生物反应器中培养,对照组静态培养,4 周后检测发现实验组的组织工程髓核比对照组的厚且大,同时糖胺聚糖、II 型胶原等细胞外基质的产量高于对照组,实验表明旋转式生物反应器能促进椎间盘髓核细胞 II 胶原及糖胺聚糖的合成分泌,有利于在体外构建组织工程髓核。Minogue 等^[17]首次采用基因表达的方法来研究人髓核细胞表型,发现髓核细胞阳性基因表达有 PAX1、FOXF1、HBB、CA12、OVOS2,可利用这些基因标记成体干细胞向髓核样细胞分化。

2.3 软骨细胞

软骨细胞的表型及其分泌的细胞外基质均与髓核细胞相类似,因此也将髓核细胞称为类软骨样细胞。Gorensek 等^[18]从兔耳软骨取自体软骨细胞体外培养增殖后,植入摘除髓核的退变椎间盘中,6 个月后进行椎间盘组织学检测,发现移植的软骨细胞可存活增殖并分泌功能基质蛋白,产生类髓核样组织,在一定程度上可以代替髓核细胞的移植治疗。Gomez-Camarillo 等^[19]试验研究发现软骨细胞在藻酸盐和富集培养基中的增殖能力较单纯单层培养时强,可能是 TGF β -1 和 IGF-1 对软骨细胞的增殖起调节作用。Arana 等^[20]将体外构建的髓核组织与软骨终板组织共培养,2 周后检测发现蛋白多糖和胶原基因表达明显高于髓核组织单独培养组,可能是软骨细胞通过抑制 TNF α 的产生刺激髓核细胞产生更多的蛋白多糖和胶原。张艳等^[21]研究发现耳软骨细胞前 3 代及肋软骨细胞前 4 代细胞形态良好,增殖能力强,软骨细胞特征性表型 II 型胶原和蛋白多糖表达稳定,因此他们认为可以用第 2 代的耳软骨细胞和第 3 代肋软骨细胞作为目前组织工程的种子细胞。软骨细胞在体外单层培养过程中易发生去分化现象,但对于其体外功能老化过程目前尚不明确。

2.4 骨髓间充质干细胞(bone marrow derived mesenchymal stem cells, BMSCs)

BMSCs 是骨髓内造血干细胞以外的非造血干细胞,具有多向分化潜能和较强的增殖能力,大量的研究证实 BMSCs 在不同诱导条件下可分化为透明软骨细胞、成骨细胞、脂肪细胞、成纤维细胞、神经细胞、血管内皮细胞等^[22]。此外它免疫原性低、自我复制能力强、取材方便、来源充足且分离培养较为简单,因此是组织工程髓核理想的种子细胞之一。

Richardson 等^[23]将 BMSCs 和温敏型于壳聚糖-甘油磷酸酯凝胶体外复合培养,4 周后,将 BMSCs 的标记基因

与髓核细胞和关节软骨细胞的标记基因对比发现, BMSCs 的表型与对照组的表型很相似,且 BMSCs 分泌的蛋白多糖和胶原的量更接近于髓核细胞。因此在将来可以利用 BMSCs 获取大量的椎间盘样细胞构建细胞支架复合物应用于临床治疗椎间盘退行性疾病。Sobajima 等^[24]将髓核细胞与 MSC 在体外三维环境中共培养,2 周后二甲苯亚甲基染色发现髓核细胞:MSC 在 75:25 和 50:50 时髓核细胞合成蛋白多糖和糖胺聚糖的量明显增加,将异体 MSC 植入兔退变的腰椎间盘内 24 周后,椎间盘组织切片证实植入的 MSC 存活并转移至纤维环内;认为 MSC 可以用于椎间盘退行性疾病的治疗。Richardson 等^[23]将人 BMSCs 与壳聚糖-甘油磷酸水凝胶体外复合培养,发现骨髓间充质干细胞可转化为髓核样细胞,RT-PCR 技术检测发现 Sox-9、II 型胶原和蛋白聚糖基因表达水平与髓核细胞相似,ALP 检测证实骨髓间充质干细胞未向骨细胞方面分化。Le Maitre 等^[25]将人 MSC 体外单层培养至一定数量后,移植至牛髓核组织内,观察 28d,示移植的椎间盘内蛋白多糖及 II 型胶原成分明显增加,移植的 MSC 向类软骨样髓核细胞分化。综上,大量研究证实 BMSCs 在椎间盘退变修复中具有很好的应用前景,可作为组织工程髓核种子细胞。

2.5 脂肪干细胞(Adipose-derived stem cells, ADSCs)

脂肪干细胞是存在于脂肪组织中的间充质干细胞,具有多向分化的潜能。由于脂肪组织在体内广泛存在,取材方便,提取方法简单、增殖能力强、对供体造成的创伤相对较小、获得的细胞数量大,故近几年对 ADSCs 的研究较多^[26,27]。

ADSCs 与 BMSCs 在多向分化潜能、表面标记等方面没有明显的差别,如 CD29、CD44、CD105、CD166 与 CD49e 二者均阳性表达;CD31、CD34、CD45、HLA-DR、CD133 与 CD11b 均阴性表达,其中的差别就在于 ADSCs 表达 CD49d,不表达 CD106;而 BMSCs 则相反。Gaetani 等^[28]将人 ADSCs 和髓核细胞进行体外三维复合培养,15d 后免疫组化染色见有大量蛋白多糖和少量的 I 型胶原产生,证实 ADSCs 可向髓核样细胞表型分化。Minogue 等^[17]研究表明,ADSCs 与 BMSCs 在向类髓核细胞分化时,两者均表达髓核标记基因 PAX1 和 FOXF1,同时 ADSCs 不表达关节软骨细胞的标记基因 IBSP 和 FBLN1,但是 BMSCs 虽不表达 IBSP 但表达 FBLN1,还有学者发现 ADSCs 比 BMSCs 更能耐受无血清引起的凋亡,其增殖能力更强^[29],说明 ADSCs 比 BMSCs 更适合应用于组织工程椎间盘的研究与应用。Jeong 等^[30]将 ADSCs 移植入鼠退变的椎间盘中,6 周后 MRI 显示细胞移植组的椎间盘降低的高度明显低于对照组且有恢复的迹象,同时椎间盘染色证实有抗人核抗体、II 型胶原、蛋白多糖的表达,该项实验表明 ADSCs 可应用于椎间盘退行性疾病的治疗。

2.6 胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)

胚胎干细胞来源于胚胎囊胚期的内细胞团,高度未分化,具有全能分化潜能。Reubinoff 等^[31]从人囊胚中分离

出第一个 hESC 细胞系, 通过试验研究发现 ESCs 是细胞移植治疗的重要潜在细胞, 同时是组织工程研究具有前景的种子细胞之一, 但因涉及伦理学问题而对其研究应用很少。少量研究表明人的胚胎干细胞在特定诱导条件下可分化为椎间盘样细胞^[32]。岳伟等^[33]认为组织工程血管构建所需要的平滑肌细胞数量巨大, 因此宜选用免疫磁珠分选法从 ESCs 分化细胞中分选获得, 而血管内皮细胞宜选用流式细胞仪分选获得, 这对髓核组织工程中髓核样细胞的分选有一定的借鉴意义。虽然 ESCs 有诸多优点, 但是 ESCs 也存在明显的不足如: 对体外培养条件要求较为苛刻, 致瘤性高, 定向诱导分化条件要求高等, 只有将这些问题逐一解决, ESCs 才能成为组织工程领域优秀的“全能细胞库”。

3 问题与展望

目前国内外有关组织工程髓核的研究已经取得了较大的进展, 但是在组织工程髓核成功应用于临床治疗椎间盘退行性病变之前, 我们仍然面临着许多困难与挑战。尽管众多学者为组织工程髓核种子细胞的来源及培养进行了大量的研究, 但对多种种子细胞的特异性表型尚不清楚, 目前也没有一种能为髓核组织工程提供大量表型稳定种子细胞的方法, 相信随着干细胞技术、生长因子的应用及基因修饰等技术的成熟, 这一问题的解决将指日可待。另外髓核区域无血供, 缺乏营养, 椎间盘的这一特殊结构影响细胞的增殖, 如何利用基因转染技术促使种子细胞永生是下一步研究的方向。根据椎间盘退变的临床分期如何采用合适的方式进行组织工程髓核的移植, 以保证满意修复缺损、保持细胞活性并发挥髓核的功能及生物力学特性, 还有待进一步研究。随着椎间盘组织工程学及相关研究的不断深入, 相信组织工程髓核的临床应用是将来解决椎间盘退行性疾病的有效途径之一。

4 参考文献

- McBeth J, Jones K. Epidemiology of chronic musculoskeletal pain[J]. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2007, 21(3): 403-425.
- Richardson SM, Mobasheri A, Freemont AJ, et al. Intervertebral disc biology, degeneration and novel tissue engineering and regenerative medicine therapies [J]. Histol Histopathol, 2007, 22(9): 1033-1041.
- Freemont AJ. The cellular pathobiology of the degenerate intervertebral disc and discogenic back pain [J]. Rheumatology, 2009, 48(1): 5-10.
- Putzier M, Schneider SV, Funk JF, et al. The surgical treatment of the lumbar disc prolapsed: nucleotomy with additional transpedicular dynamic stabilization versus nucleotomy alone [J]. Spine, 2005, 30(5): 109-114.
- O'Halloran DM, Pandit AS. Tissue-engineering approach to regenerating the intervertebral disc[J]. Tissue Eng, 2007, 13

- (8): 1927-1954.
- 辛洪奎, 张超, 阮狄克. 不同细胞接种密度构建组织工程椎间盘的实验研究[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2008, 18(12): 925-928.
- Alini M, Eisenstein SM, Ito K, et al. Are animal models useful for studying human disc disorders/degeneration[J]? Eur Spine, 2008, 17(1): 2-19.
- Guehring T, Wilde G, Sumner M, et al. Notochordal intervertebral disc cells: sensitivity to nutrient deprivation[J]. Arthritis Rheum, 2009, 60(4): 1026-1034.
- 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.
- Rastogi A, Thakore P, Leung A, et al. Environmental regulation of notochordal gene expression in nucleus pulposus cells[J]. Cell Physiol, 2009, 220(3): 698-705.
- Mollenhauer JA. The notochord in the mammalian adult: a paradox[J]. Arthritis Rheum, 2006, 54(12): 3728-3729.
- 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.
- Moon HJ, Joe H, Kwon TH, et al. Notochordal cells influence gene expression of inflammatory mediators of annulus fibrosus cells in proinflammatory cytokines stimulation [J]. Neurosurg, 2010, 48(1): 1-7.
- Meisel HJ, Siodla V, Ganey T, et al. Clinical experience in cell-based therapeutics: disc chondrocyte transplantation A treatment for degenerated or damaged intervertebral disc [J]. Biomol Eng, 2007, 24(1): 5-21.
- Kim DH, Kim SH, Heo SJ, et al. Enhanced differentiation of mesenchymal stem cells into NP-like cells via 3D co-culturing with mechanical stimulation [J]. Biosci Bio eng, 2009, 108(1): 63-67.
- Zhang WJ, Zhang L, Zhao CM, et al. Effects of rotating cell culture system on constructing of tissue engineering intervertebral nucleus pulposus [J]. Zhonghua Yixue Zazhi, 2010, 90(31): 2215-2218.
- Minogue BM, Richardson SM, Zeef LA, et al. Characterization of the human nucleus pulposus cell phenotype and evaluation of novel marker gene expression to define adult stem cell differentiation[J]. Arthritis Rheum, 2010, 62(12): 3695-3705.
- Gorensek M, Jaksimoic C, Kregarvelikonja N, et al. Nucleus pulposus repair with cultured autologous elastic cartilage derived chondrocytes[J]. Cell Mol Biol Lett, 2004, 9(2): 363-373.
- Gomez-Camarillo MA, Almonte-Becerril M, Vasquez Tort M, et al. Chondrocyte proliferation in a new culture system[J]. Cell Prolif, 2009, 42(2): 207-218.
- Arana CJ, Diamandis EP, Kandel RA. Cartilage tissue enhances proteoglycan retention by nucleus pulposus cells in

- vitro[J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(11): 3395-3403
21. 张艳, 柴岗, 崔磊, 等. 不同类型人软骨细胞体外生物学特性比较[J]. *中华实验外科杂志*, 2003, 20(6): 497-498.
 22. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation[J]. *Arthritis Res Ther*, 2007, 9(1): 204-213.
 23. 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.
 24. Sobajima S, Vadala G, Shimer A, et al. Feasibility of a stem cell therapy for intervertebral disc degeneration [J]. *Spine*, 2008, 8(6): 888-896.
 25. Le Maitre CL, Baird P, Freemont AJ, et al. An in vitro study investigating the survival and phenotype of mesenchymal stem cells following injection into nucleus pulposus tissue[J]. *Arthritis Res Ther*, 2009, 11(1): R20.
 26. 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 A*, 2008, 14(8): 1415-1423.
 27. Tapp H, Deepe R, Ingram JA, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells from the sand rat: transforming growth factor beta and 3D co-culture with human disc cells stimulate proteoglycan and collagen type I rich extracellular matrix[J]. *Arthr Res Ther*, 2008, 10(4): R89.
 28. 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 A*, 2008, 14(8): 1415-1423.
 29. Peng L, Jia Z, Yin X, et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue[J]. *Stem Cells Dev*, 2008, 17(4): 761-773.
 30. Jeong JH, Lee JH, Jin ES, et al. Regeneration of intervertebral discs in a rat disc degeneration model by implanted adipose-tissue-derived stromal cells[J]. *Acta Neurochir*, 2010, 152(10): 1771-1777.
 31. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, et al. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro[J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18(4): 399-404.
 32. Ahmed N, Stanford WL, Kandel RA. Mesenchymal stem and progenitor cells for cartilage repair[J]. *Skeletal Radiol*, 2007, 36(10): 909-912.
 33. 岳伟, 曹谊林, 张文杰. 从分化胚胎干细胞中分选血管构建种子细胞的实验研究[J]. *组织工程与重建外科杂志*, 2011, 7(1): 1-5.
- (收稿日期: 2011-08-16 修回日期: 2011-10-02)
(本文编辑 彭向峰)