

犬同种异体椎间盘复合髓核细胞移植初探

辛洪奎, 张超, 王德利, 吴剑宏, 王超峰, 何勃, 阮狄克

(海军总医院骨科暨全军腰椎间盘突出病诊治中心 100048 北京市)

【摘要】目的:探讨同种异体椎间盘复合髓核细胞移植的转归, 观察转人端粒酶逆转录酶 (human telomerase reverse transcriptase, hTERT) 基因髓核细胞介入椎间盘移植的生物学效应。**方法:**常规分离 8 周龄比格犬髓核细胞, 将 PKH-26 标记的传 2 代髓核细胞 (NPc) 和转 hTERT 基因髓核细胞 (hTERT-NPc) 分别注入冷冻保存的同种异体椎间盘内构建组织工程化同种异体椎间盘。选择 12 月龄同种犬 18 只随机分为 3 组, 分别植入 hTERT-NPc 组织工程化的同种异体椎间盘 (A 组)、NPc 组织工程化的同种异体椎间盘 (B 组) 以及未组织工程化的同种异体椎间盘 (C 组)。每只犬于术后 4、8、12 周行正侧位 X 线片及 MRI 检查, 观察移植椎间盘同宿主椎体愈合情况、移植椎间盘高度和信号变化情况; 手术后 12 周麻醉状态下处死实验动物取 L1~L7 段脊柱标本进行生物力学测试, 取移植椎间盘进行组织学观察。**结果:**X 线及 MRI 检查结果显示 3 组移植椎间盘与宿主椎体均实现了良好的骨性融合, 其中 C 组椎间盘术后出现了呈进展趋势的退行性改变, 至移植后 12 周, 其椎间盘高度及髓核信号比灰度值明显低于 A、B 两组 ($P<0.05$)。生物力学显示术后 12 周时, C 组移植椎间盘在屈伸和旋转方向的活动度显著性大于 A、B 两组 ($P<0.05$), A 组与 B 组无显著性差异 ($P>0.05$)。激光共聚焦显微镜观察到 A、B 组移植椎间盘髓核区域内有红色荧光细胞; 光学显微镜下观察 A、B 两组移植椎间盘结构保持较好, 外形类似软骨细胞的髓核细胞数量较多, 排列较为规则; C 组髓核形态保持欠佳, 结构较为紊乱, 髓核细胞数量明显减少, 细胞形态欠饱满, 退行性改变明显。RT-PCR 分析显示术后 12 周时 A 组髓核内可检测到 hTERT mRNA 的阳性表达。**结论:**犬同种异体椎间盘移植后可在宿主体内存活, 通过复合 NPc 可延缓椎间盘移植后的退行性改变; hTERT-NPc 介入具有更好的保持异体椎间盘功能的潜力, 有望保证同种异体椎间盘移植的远期疗效。

【关键词】椎间盘退变; 椎间盘移植; 同种异体; 人端粒酶逆转录酶; 基因转染; 髓核细胞; 犬

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2012.09.14

中图分类号: R318, R681.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2012)-09-0835-08

Tissue engineered allograft total disc transplantation using exogenous nucleus pulposus cells: an experimental study in a beagle model/XIN Hongkui, ZHANG Chao, RUAN Dike, et al/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2012, 22(9): 835-842

【Abstract】Objectives: To investigate in vivo reoperation of the transplanted tissue engineered allograft total disc and to explore the biological effect of nucleus pulposus (NP) cells or hTERT gene transfected NP cells on allograft total disc transplantation. **Methods:** Eighteen canine lumbar intervertebral discs were obtained from 5 canines and cryopreserved in liquid nitrogen. Canine nucleus pulposus cells were isolated and transduced with rAAV-hTERT. The cells were injected into the discs to construct a "tissue-engineered" allograft disc (group A). NP cells and DMEM/F12 were used for positive control (group B) and blank control (group C) respectively. 18 beagle dogs received the 3 groups of allograft IVD composites implantation respectively. Radiographic examination was performed at 4, 8 and 12 weeks after implantation. At 12 weeks after operation, all dogs were sacrificed and the lumbar spines were harvested for the biomechanical test and histological analysis, ectogenic NP cell tracing and hTERT mRNA analysis. **Results:** Bony fusion between intervertebral disc allograft and adjacent host intervertebral body was observed in all animals. The disc height and T2 signal intensity preservation in group A and B were better than group C. MRI showed typical degenerative changes in group C. In

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (编号: 30730095)

第一作者简介: 男 (1978-), 主治医师, 医学博士, 研究方向: 脊柱外科

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

通讯作者: 阮狄克 E-mail: ruandike@yahoo.com.cn

group A, the normalized grayscale of the transplanted disc in MRI image was significant higher than that of the controls at 12 weeks. Biomechanical test showed a poor stability preservation in group C compared with group A and B. PKH-26 positive cells were identified within the allograft discs in group A at 12 weeks, which provided matrix for cell survival. Histological analysis showed the NP cell morphology, cell number and distribution of the allograft discs were better preserved in group A and B than group C at 12 weeks of follow-up. **Conclusions:** NP cells or hTERT loaded NP cells intervention can effectively resist the degeneration of the allogenic transplanted intervertebral discs in beagle model. The hTERT loaded NP cells show better anti-degeneration effect than NP cells. This modified disc regeneration technique through NP cell injection may preserve the disc function better, which can ensure the long-term outcome of allograft disc transplantation.

[Key words] Intervertebral disc degeneration; Intervertebral disc transplantation; Human telomerase reverse transcriptase; Viral transfection; Nucleus Pulposus cells; Beagle dogs

[Author's address] Department of Orthopaedic Surgery, Navy General Hospital, Beijing, 100048, China

椎间盘退行性疾病的治疗是骨科临床工作中的重点和难点, 现有的外科治疗手段均存在一定不足, 如髓核摘除术改变了手术节段的结构及稳定性, 导致椎间隙高度降低以及椎间盘的承重能力下降, 从而在远期的随访中出现较为严重的继发性退变以及脊柱不稳^[1]; 融合手术以牺牲融合节段的活动度为代价来获得相对满意的临床疗效, 其相邻节段的活动度及承受的应力均明显增大, 退行性改变加速^[2]。运用生物技术手段延缓甚至逆转椎间盘退变, 从结构及功能上实现椎间盘的重建具有明显的理论优势。本研究小组既往开展了以髓核细胞(nucleus pulposus cells, NPc)为基础的组织工程技术修复退变椎间盘的探索性研究^[3]。应用人端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)延长细胞的生命周期是近年来发现的促进细胞增殖的新方法, 学者们利用 hTERT 基因成功构建了“永生细胞”^[4]; 相关研究结果证实 hTERT 基因转染的确可以促进 NPc 的活性^[5]。本研究将椎间盘生物治疗技术与椎间盘移植技术相结合, 选择同种异体椎间盘作为椎间盘组织工程支架材料, 通过复合 NPc 和转 hTERT 基因髓核细胞(hTERT-NPc)构建组织工程椎间盘并进行动物体内移植, 观察 NPc 及 hTERT-NPc 介入椎间盘移植的生物学效应, 探讨该技术路线对于同种异体椎间盘移植的意义。

1 材料与方法

1.1 同种异体椎间盘的收集与冷冻保存

1 岁龄比格犬 4 只, 肌肉注射氯胺酮与速眠新麻醉后处死, 按背部正中切口备皮及消毒, 切开

皮肤及皮下组织, 分离椎旁肌, 切断肋骨, 离断胸段及腰段脊柱。自椎间盘软骨终板上下两侧用钢锯锯断椎体, 保留约 3mm 终板下骨。取材后的同种异体椎间盘由髓核、纤维环、软骨终板及终板下骨组成。取出后用生理盐水反复冲洗, 置于 50ml 离心管, 加入含 10% 胎牛血清(FBS)和(二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO))DMEM/F12(1:1)的培养基后逐级冷冻, 冷冻顺序为: 4℃过夜, -20℃、2h, -40℃、2h, -80℃、2h, 液氮保存。

1.2 犬 NPc 的体外培养

无菌条件下处死 8 周龄普通幼犬, 取胶冻状髓核置于 15ml 离心管中, 2g/L 胶原酶(GIBCO, 美国)消化 2h 后 1000 转/min 离心 5min, 磷酸缓冲液(PBS)冲洗 2 次, 收集细胞接种于 100ml 培养瓶, 加入含 10% FBS (GIBCO) 的 F12 培养基(GIBCO), 37℃、5% CO₂、饱和湿度下培养; 倒置显微镜观察生长情况。

1.3 rAAV2-hTERT 体外转染 NPc

rAAV2-hTERT 病毒载体由北京五加和生物技术有限公司完成, 病毒滴度=1×10¹²v.g/ml。使用 rAAV2-hTERT 病毒载体以转染复数(multiplicity of infection, MOI)为 1×10⁵v.g/cell 转染犬 NPc。转染后的细胞 3d 换液 1 次, 细胞达到传代要求后用胰酶消化制备成细胞悬液。

1.4 同种异体椎间盘的组织工程化

根据预实验结果, 每个椎间盘注射的细胞悬液量定为 25μl, 细胞悬液的密度为 5×10⁶ 个/ml。18 个冷冻保存的同种异体椎间盘随机分为 3 组: hTERT-NPc 椎间盘(A 组), 以 PKH-26 荧光标记的 rAAV2-hTERT-NPc 为种子细胞构建组织工程

化椎间盘;NPc 椎间盘(B 组),以 NPc 为种子细胞构建组织工程化椎间盘;对照组(C 组),向椎间盘内注射等体积 F12 培养液。复合细胞悬液的异体椎间盘于置于 50ml 离心管,加入 15ml 含 10% FBS 的 F12 培养基,37℃、5% CO₂、饱和湿度下培养,每 2d 更换培养液 1 次。于体外培养 1 周后进行体内动物实验(图 1)。

1.5 同种异体椎间盘移植

12 月龄比格犬 18 只随机分成 3 组,肌肉注射全身麻醉后,按腰椎前方入路手术备皮。常规消毒,铺无菌单。沿肋弓下缘自后上斜向前下切开皮肤及皮下组织,切口长约 8cm。切断腹外斜肌和腹内斜肌,花生米分离腹膜并向前方牵开,进入腹膜后间隙,将腰大肌牵向后方,显露腰椎椎体及椎间盘。分别于 L4 及 L5 椎体中点钻孔,置入 2 枚螺钉后用 Caspar 撑开器撑开椎间隙,尖刀片环形切开纤维环,微小髓核钳取出髓核组织,刮勺刮除纤维环,终板刮刀刮除上下软骨终板,将 3 组同种异体椎间盘植入 L4/5 间隙,并于上一椎体钻孔处放置米粒大小钛金属作为标记。逐层缝合切口。术后连续 3d 肌注青霉素 160 万单位预防感染。

1.6 移植椎间盘转归的影像学观察

每只实验动物于术后 4、8、12 周行正侧位 X 线片及 MRI 检查,观察各组移植椎间盘同宿主椎体愈合情况和移植椎间盘形态、高度保持情况。根

据 X 线检查结果测量椎间盘高度变化,椎间隙高度取椎间隙前、中、后部高度的平均值(图 2);根据 MRI 检查结果测量椎间盘 T2 像信号强度,使用 Photoshop version 7.0(Adobe, San Jose, CA, USA) 图像处理软件测量 MRI T2 加权像中手术节段髓核的灰度值并与同节段椎管内脑脊液的灰度值进行比较,得出手术节段髓核的比灰度值(图 3),用以判断髓核的含水量。每项测量均由有经验的临床医师测量 3 次,取平均值进行统计学分析。

1.7 生物力学分析

手术后 12 周麻醉状态下处死实验动物,取 L1~L7 段脊柱标本,剔除椎旁软组织,保留前纵韧带、棘上韧带、棘间韧带及小关节囊。骨水泥包埋标本,保留 L4/5 椎间盘及上下各两节椎体。将包埋好的标本连接到生物力学试验机(MTS 858 Mini Bionix II),加载 1.0Nm 的扭矩触发标本左右旋转运动,测量 L4/5 椎体的相对位移动度;使用三维运动加载系统加载 3.0Nm 的扭矩触发标本进行屈伸、左右侧弯及旋转运动,测量 L4/5 椎体的相对位移动度。各向运动均测量 5 次,取平均值进行统计学分析。

1.8 组织学观察

用线锯将 L4/5 椎间盘从脊柱标本中取出,保留 L4 下终板及 L5 上终板,每组各取 2 个椎间盘行冰冻切片后在激光共聚焦显微镜观察 PKH-26

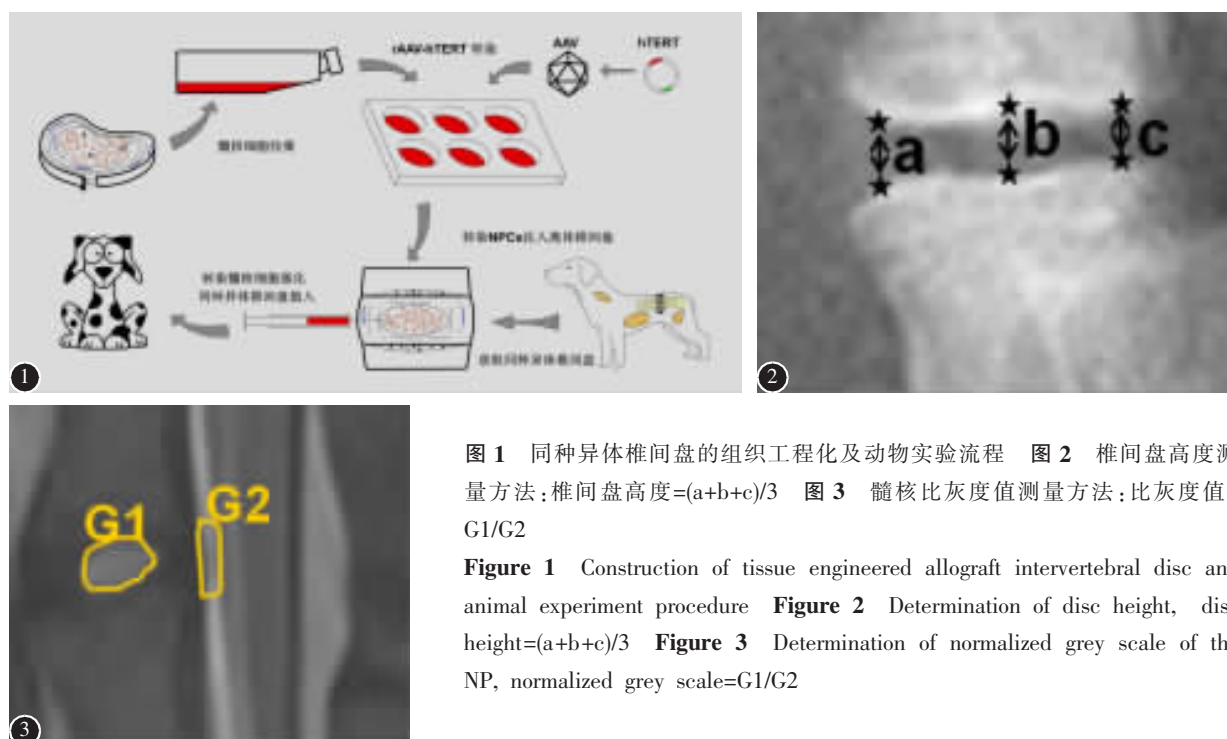


图 1 同种异体椎间盘的组织工程化及动物实验流程 图 2 椎间盘高度测量方法:椎间盘高度=(a+b+c)/3 图 3 髓核比灰度值测量方法:比灰度值=G1/G2

Figure 1 Construction of tissue engineered allograft intervertebral disc and animal experiment procedure **Figure 2** Determination of disc height, disc height=(a+b+c)/3 **Figure 3** Determination of normalized grey scale of the NP, normalized grey scale=G1/G2

标记细胞。每组各取 3 个移植椎间盘用福尔马林固定 24h, 脱钙液脱钙 2 周后石蜡包埋, 常规切片, HE 染色, 显微镜下观察椎间盘组织结构。

1.9 移植椎间盘内 hTERT mRNA 表达的检测

每组各取 1 个移植椎间盘, Trizol 法常规提取组织细胞中的总 RNA。RT-PCR 法检测椎间盘组织中的 hTERT mRNA 的表达情况。

1.10 统计学分析

应用统计软件 SPSS 13.0 进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组均数间的比较用方差分析, 均数间两两比较用 q 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 犬髓核细胞的分离培养及荧光标记

常规方法可顺利完成犬髓核细胞的分离培养。使用 PKH-26 标记细胞后, 荧光显微镜观察可见髓核细胞膜呈现出均匀的红色荧光(图 4)。

2.2 椎间盘移植手术

所有动物椎间盘移植手术均顺利完成。手术时间 40~85min, 出血量 20~55ml。3 只动物术后出现不同程度切口疝, 4 只出现一过性下肢神经功能障碍, 均在术后 5d 内得到恢复。手术切口均愈合良好。

2.3 X 线观察

术后 4 周 X 线片检查结果显示移植椎间盘与宿主椎体均实现了良好的骨性融合。C 组在术后 4 周的 X 线片上即出现了较为明显的椎体前缘骨赘形成、椎间隙狭窄等退行性改变, 在 8 周及

12 周时表现出逐渐进展趋势; A、B 组在各观察点未出现上述退行性改变(图 5)。术后 3 组移植椎间盘椎间隙高度均呈下行趋势, C 组下降幅度较为明显, 至移植后 8 周, 其高度已明显低于 A、B 两组 ($P < 0.05$), 术后 12 周观察其高度进一步下降, 而 A、B 组椎间隙高度在术后各时间点无显著性差异(表 1)。

2.4 MRI 观察分析

MRI 观察结果显示移植后, 3 组移植椎间盘均呈现不同程度的退行性改变, 其中以 C 组尤为明显, 至 12 周时移植椎间盘髓核结构形态及信号特点消失, 取而代之的是髓核信号的显著降低, 呈典型的“黑间盘”样改变; A 组及 B 组移植椎间盘

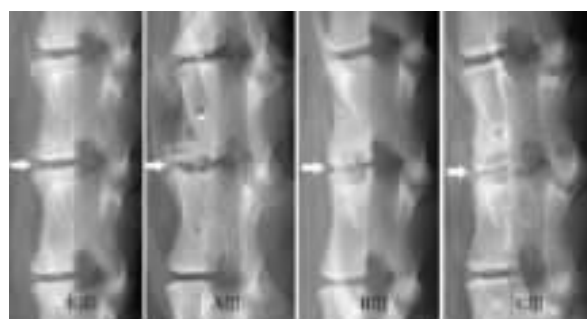


图 5 术后 12 周 X 线侧位片观察显示 hTERT-NPc 椎间盘移植组(A 组)及 NPc 椎间盘移植组(B 组)移植椎间盘均未出现典型的退行性改变, 椎间隙高度保持较好; 对照组(C 组)移植椎间盘出现椎体前缘骨赘形成、椎间隙狭窄、终板硬化等退行性改变

Figure 5 Lateral view radiographic analysis at 12 weeks follow up. Typical degenerative changes such as space narrowing, endplate sclerosis and osteophyte formation could be detected in group C. In group A and B, however, the height and the overall morphology of the intervertebral space was preserved at a status close to a healthy intervertebral disc

表 1 术后不同时间点 3 组移植椎间盘高度($\bar{x} \pm s, n=6, \text{mm}$)

Table 1 Disc height analysis at various time points

	4周 4w	8周 8w	12周 12w
hTERT-NPc 椎间盘移植组 (A 组) Group A	2.62±0.45	2.43±0.25	2.32±0.43
NPc 椎间盘移植组(B 组) Group B	2.68±0.37	2.54±0.35	2.43±0.27
对照组(C 组) Group C	2.19±0.43	2.00±0.37 ^①	1.87±0.30 ^①

注: ①与 A、B 组比较 $P < 0.05$

Note: ①Compared with group A and B, $P < 0.05$

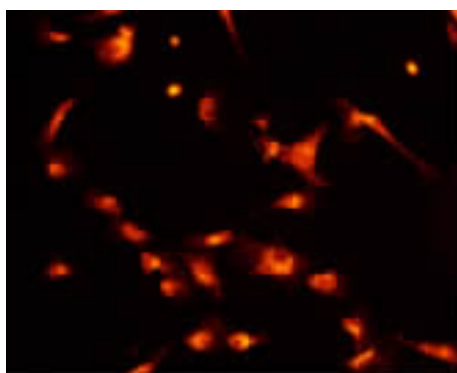


图 4 PKH-26 标记的传 2 代犬髓核细胞, 髓核细胞膜呈现均匀的红色荧光

Figure 4 NP cell demonstrated characteristic membrane-associated distribution and intense fluorescence of PKH

髓核信号有部分降低,但仍较好地保持了髓核的形态结构及 MRI T2 像高信号的特点(图 6)。术后 3 组椎间盘信号比灰度值均呈下行趋势,以 C 组尤为明显,A、B 两组信号比灰度值保持相对较平稳。术后 4 周,C 组髓核 T2 信号比灰度值已明显低于 A、B 组($P<0.05$);至第 12 周时,A 组髓核 T2 信号比灰度值的保持明显优于 B 组 ($P<0.05$, 表 2)。说明 hTERT 基因转染对于髓核细胞的活性及功能具有相对较为长期的促进作用。

2.5 生物力学分析

生物力学测试结果显示,术后 12 周 3 组移植椎间盘在左右侧弯活动度上无明显差别,A、B 两组在屈伸及旋转稳定性的保持上明显优于 C 组,差异有统计学意义 ($P<0.05$);A、B 两组各个方向的活动度未见显著性差异(表 3)

2.6 组织学观察

术后 12 周,A、B 组移植椎间盘内部可观察到红色荧光细胞(图 7)。A、B 两组移植椎间盘结构保持较好,外形类似软骨细胞的髓核细胞数量较多,排列较规则;C 组髓核形态保持欠佳,结构较紊乱,髓核细胞数量明显减少,细胞形态欠饱满,退行性改变明显(图 8)。

2.7 移植椎间盘内 hTERT mRNA 表达的检测

术后 12 周 A 组移植椎间盘组织中可检测到

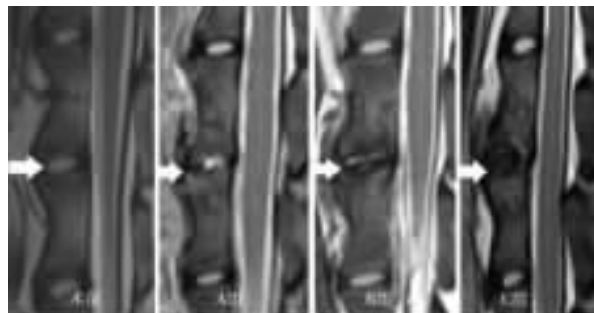


图 6 术后 12 周,MRI 观察显示 A 组和 B 组移植椎间盘髓核信号有部分降低,但仍较好地保持了髓核的形态结构及 T2 像高信号的影像学特点;C 组移植椎间盘髓核结构形态及信号特点消失,是髓核信号的显著降低,呈典型的“黑间盘”样改变

Figure 6 MRI examination of all groups at 12 weeks follow up. The T2 signal intensity and the morphology of the NP in group A was well preserved. In group B, the T2 signal intensity was also kept at a relative high level. However, typical signs of "black disc" changes which indicated the decreasing of the water content in the NP were found in group C

hTERT 阳性表达,而其余两组未检测到阳性条带(图 9)。

3 讨论

作为天然组织工程支架材料,同种异体椎间

表 2 术后不同时间点 3 组移植椎间盘髓核信号比灰度值 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Normalized greyscale of the L4/5 disc MRI signal analysis at various time points

	4周 4w	8周 8w	12周 12w
A组 Group A	0.46±0.08	0.44±0.12	0.43±0.11
B组 Group B	0.42±0.11	0.38±0.08	0.30±0.08 ^②
C组 Group C	0.29±0.10 ^①	0.24±0.09 ^①	0.18±0.07 ^①

注:①与 A、B 组比较 $P<0.05$;②与 A 组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with group A and B, $P<0.05$; ②Compared with group A, $P<0.05$

表 3 术后 12 周时 3 组移植椎间盘活动度 ($\bar{x}\pm s, n=6, ^\circ$)

Table 3 Range of motion of the transplanted disc at 12 weeks follow up

	屈伸 Flexion-extension	旋转 Left-right rotation	侧弯 Left-right bending
A组 Group A	10.58±1.52	6.26±1.03	9.54±0.96
B组 Group B	11.23±1.32	5.86±0.85	8.34±0.81
C组 Group C	14.65±1.82 ^①	10.36±1.43 ^①	9.62±1.10

注:①与 A、B 组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with group A and B, $P<0.05$

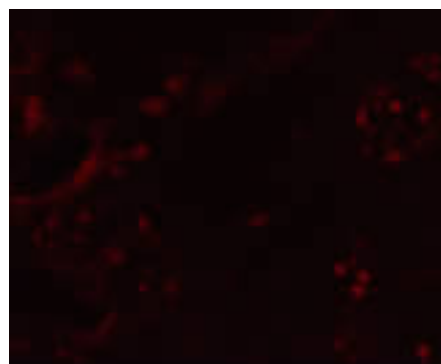


图 7 术后 12 周 A 组移植椎间盘髓核区域内可见红色荧光细胞

Figure 7 12 weeks after implantation, a large number of PKH-26 positive cells were found within the nucleus pulposus area which provide survival evidence for the seeding cells

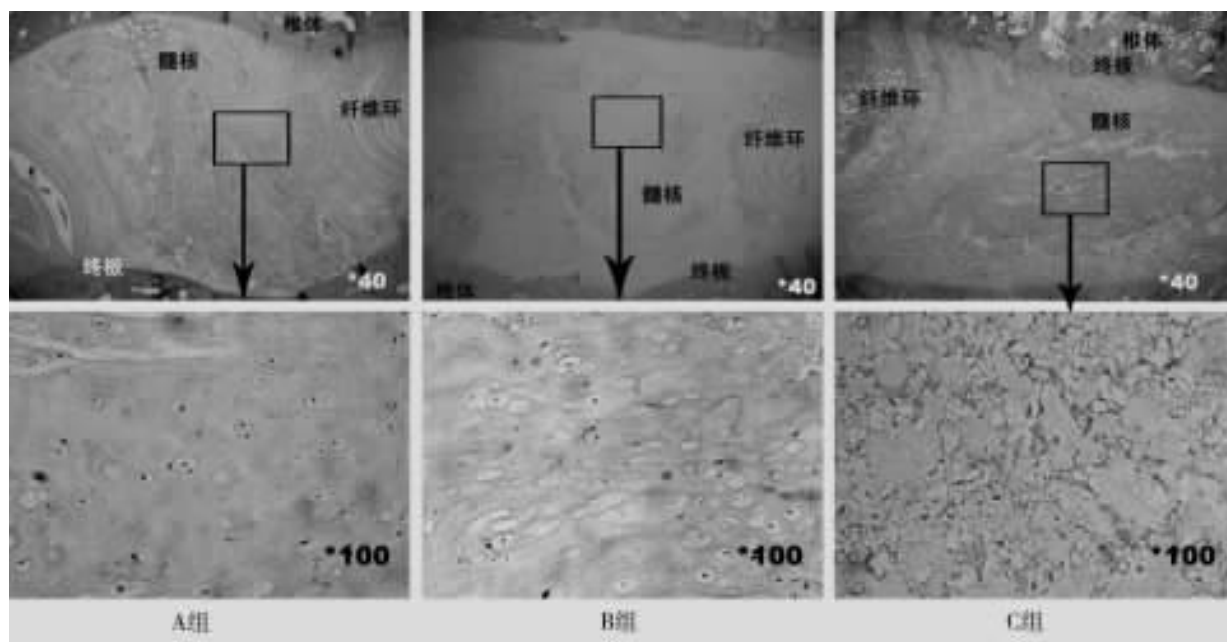


图 8 术后 12 周组织学观察显示 A 组及 B 组移植椎间盘的整体形态及髓核、纤维环、软骨终板等结构得到了较好的保持,髓核区域内可见大量类软骨细胞; C 组髓核形态保持欠佳,结构较为紊乱,髓核细胞数量明显减少,细胞形态欠饱满,退行性改变明显

Figure 8 Histological analysis at 12 weeks follow up, the morphology of the NP and the structure of the total transplanted disc including the NP, AF and CE was well preserved in group A and B, large amounts of chondrocyte-like cells were observed in the NP area. In group C, the normal structure of the transplanted disc was poor kept and the cells within the NP area lost their chondrocyte-like phenotype

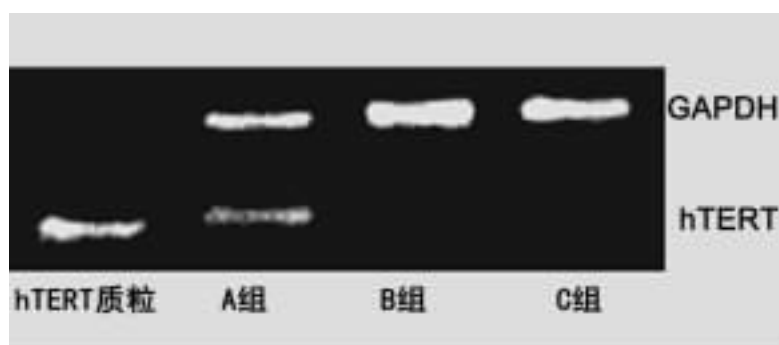


图 9 术后 12 周 A 组髓核内检测到 hTERT mRNA 的阳性表达, B、C 组无阳性表达

Figure 9 RT-PCR analysis for hTERT mRNA of nucleus pulposus tissue at 12 weeks follow up. The positive band of hTERT was detected within the nucleus pulposus tissue of intervertebral disc allograft in group A

盘可以通过复合外源性种子细胞完成组织工程化并实现活性增强的目的。组织工程产品是否具备相应的生理功能需通过完整的动物实验予以验证。椎间盘内环境复杂,外源性种子细胞存活、增殖及功能发挥面临诸多不利条件。不能排除种子细胞植入后在体内高应力、低营养条件下出现细胞凋亡或者去分化等现象而限制其发挥生理功能,从而无法实现组织工程化异体椎间盘移植的预期治疗目的。本研究通过对移植椎间盘影像学、组织学及生物力学三个评估椎间盘退变重要指标的分析及比较,观察细胞干预技术是否可以有效

延缓同种异体椎间盘移植后的退行性改变。

端粒酶是一种 RNA 和蛋白质构成的复合体,具有逆转录酶的活性,它能以自身 RNA(hTR)为模板,从头合成端粒 DNA 并加到染色体末端,维持端粒长度以及染色体的稳定性。针对单纯髓核细胞体外培养中存在的增殖能力有限以及去分化现象^[6,7],本研究选择使用 rAAV-hTERT 病毒载体转染实现髓核细胞生命周期的延长及生理功能的增强,以期提高其修复椎间盘退变的生物学效应。hTERT 对于髓核细胞生物学活性促进作用的可能机制在于 hTERT 蛋白对于细胞周期中同细胞

增殖、DNA 修复及染色质重组相关的基因表达水平的上调,同时通过端粒酶的过表达下调细胞凋亡相关基因的表达水平^[8,9],但体内环境下 rAAV-hTERT-NPc 的作用需要进一步探讨。在移植后 12 周时,我们通过 RT-PCR 分析观察到了 hTERT mRNA 在椎间盘内的阳性表达,说明 hTERT 基因在体内条件下可持续表达至少 12 周。这一目的基因的持续表达可以有效阻止种子细胞的凋亡并通过上调种子细胞的功能来实现更为长期的抗退变效应。

为了判断植入后细胞在椎间隙内部的转归情况,我们对实验组所使用的种子细胞进行了 PKH-26 红色荧光标记。PKH-26 是一种无放射性、无细胞毒性的细胞膜标记物,可以在细胞中存在 100d 以上,携带 PKH-26 的细胞仅将染料传给子代细胞而不会传递给与其相邻的细胞。体内植入后 12 周,我们在实验组动物移植的椎间盘内观察到了 PKH-26 阳性细胞,说明植入的种子细胞在体内条件下可以存活至少达 12 周。种子细胞在体内的存活不但可以实现自身的增殖,表达细胞外基质以补充细胞外基质的减低,更可以为椎间盘内提供有益的分子信号以延缓椎间盘退变的进展^[10,11]。组织学观察结果进一步证实了细胞介入技术对于椎间盘退变的拮抗效应。复合了种子细胞的移植椎间盘髓核形态结构保存良好,这为种子细胞对于退行性变的修复作用提供了又一证据。同时,组织工程化异体椎间盘植入后 12 周髓核内发现大量均匀分布的类软骨细胞,没有明显的纤维组织侵入,而对照组椎间盘髓核形态欠佳,结构松散,髓核细胞丧失类软骨细胞外观,这些组织学改变必将导致椎间盘结构及生理功能的变化,从而形成退行性变的不断进展。这一组织学发现同时验证了我们前期的临床研究结果,即单纯椎间盘移植后,将出现移植椎间盘的逐渐退变^[12]。

X 线及 MRI 检查是临床上评估椎间盘退变及其严重程度的两个重要检查项目。本研究中我们通过 X 线检查观察到了移植的同种异体椎间盘发生了退行性改变。单纯异体椎间盘移植后这一退行性改变呈逐渐进展趋势,移植椎间盘出现了高度降低、终板硬化等退变征象;而将其与种子细胞复合后,移植椎间盘未观察到明显的退行性改变,终板硬化、骨赘形成等征象均不明显。同时,MRI 观察可以看到单纯异体椎间盘移植 12 周后

呈现出典型的“黑间盘”样改变,说明髓核含水量显著下降,椎间盘退变程度较重;而与 hTERT-NPc 及 NPc 复合的椎间盘移植组虽然移植椎间盘髓核信号有部分降低,但其形态结构相对完好,T2 像高信号的影像学特点保持较好。基于上述观察到的影像学改变,延缓退变进展,保持移植椎间盘功能的目的可以通过复合髓核细胞的组织工程技术得以实现。对于 3 组椎间盘均在术后出现的不同程度的退行性改变,我们认为,其原因在于椎间盘植入之初,终板下骨与宿主椎体骨界面之间尚未建立起完整的骨性融合,此时椎间盘的营养供给主要依靠骨界面之间营养物质的扩散作用来实现,椎间盘内部处于营养相对匮乏状况,因此会在移植后直接出现退行性改变。

对于健康的脊柱而言,节段稳定性具有重要的意义,稳定性的丧失将加速椎间盘退变的进展并引起一系列严重的临床症状^[13,14]。稳定性的保持是衡量脊柱运动单元功能的重要指标。因此,设计生物力学实验来直接观察移植椎间盘的稳定性就显得尤为重要。通过生物力学研究我们分析了移植椎间盘 6 个运动方向的稳定性,复合细胞的两组其移植椎间盘的稳定性明显优于对照组,进一步证实了细胞干预技术对于延缓椎间盘退变具有积极意义。

本研究中,组织学、生物力学及基于 X 线检查的椎间盘高度分析显示,hTERT-NPc 椎间盘移植组和 NPc 椎间盘移植组无明显差别,二者之间主要的区别在于 12 周时 hTERT-NPc 椎间盘移植组 MRI T2 像髓核信号比灰度值明显高于 NPc 椎间盘移植组。对这一现象的解释应该以椎间盘退变的机制及进程为依据。临床上,当椎间盘退变开始出现时,最先出现的现象同时也是最为敏感的评价指标是 MRI T2 像髓核信号的降低^[15]。椎间隙狭窄、椎体前后缘骨赘形成及椎体滑脱等改变均需在 MRI 出现改变后的数月甚至数年之后方可观察到。因此我们认为 NPc 椎间盘移植组出现了较为早期的退行性改变,仅通过对 MRI T2 像髓核信号比灰度值分析方可明确,其原因在于髓核细胞的活性在 12 周时可能已出现一定程度的下降,而 hTERT-NPc 椎间盘移植组种子细胞在 hTERT 基因持续表达的基础上,可望实现更为持久的功能维持。

本研究结果表明,通过复合种子细胞实现异

体椎间盘的组织工程化可延缓椎间盘移植后的退行性改变,而 hTERT-NPc 在术后 12 周表现出较单纯髓核细胞更为有效的抗退变效应,组织工程技术的运用有望保证同种异体椎间盘移植的远期疗效。但还需要开展更为长期的动物实验研究予以进一步验证。

4 参考文献

1. Goel VK, Clark CR, Gallaes K, et al. Moment-rotation relationships of the ligamentous occipito-atlanto-axial complex [J]. *Spine*, 1988, 21(8): 673-680.
2. Hanley EN Jr, Herkowitz HN, Kirkpatrick JS, et al. Debating the value of spine surgery[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2010, 92(5): 1293-1304.
3. Ruan DK, Xin H, Zhang C, et al. Experimental intervertebral disc regeneration with tissue-engineered composite in a canine model[J]. *Tissue Eng(Part A)*, 2010, 16(7): 2381-2389.
4. Zhao CF, Hu HY, Meng L, et al. Immortalization of bovine mammary epithelial cells alone by human telomerase reverse transcriptase[J]. *Cell Biol Int*, 2010, 34(6): 579-586.
5. Wu J, Wang D, Zhang C, et al. Extending the activities of human nucleus pulposus cells with recombinant adeno-associated virus vector-mediated human telomerase reverse transcriptase gene transfer[J]. *Tissue Eng(Part A)*, 2011, 17(19-20): 2407-2415.
6. Kluba T, Niemeyer T, Gaissmaier C, et al. Human anulus fibrosis and nucleus pulposus cells of the intervertebral disc: effect of degeneration and culture system on cell phenotype[J]. *Spine*, 2005, 30(24): 2743-2748.
7. Hu MH, Hung LW, Yang SH, et al. Lovastatin promotes redifferentiation of human nucleus pulposus cells during expansion in monolayer culture[J]. *Artif Organs*, 2011, 35(4): 411-416.
8. Sharma GG, Gupta A, Wang H, et al. hTERT associates with human telomeres and enhances genomic stability and DNA repair[J]. *Oncogene*, 2003, 22(1): 131-46.
9. Smith LL, Collier HA, Roberts JM. Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation[J]. *Nat Cell Biol*, 2003, 5(5): 474-479.
10. 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 3): 406-413.
11. Sakai D. Future perspectives of cell-based therapy for intervertebral disc disease[J]. *Eur Spine J*, 2008, 17(Suppl 4): 452-458.
12. 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.
13. Dickey JP, Pierrynowski MR, Bednar DA, et al. Relationship between pain and vertebral motion in chronic low-back pain subjects[J]. *Clin Biomech*, 2002, 17(5): 345-352.
14. Maigne JY, Lapeyre E, Morvan G, et al. Pain immediately upon sitting down and relieved by standing up is often associated with radiologic lumbar instability or marked anterior loss of disc space[J]. *Spine*, 2003, 28(12): 1327-1334.
15. Luoma K, Vehmas T, Riihimäki H, et al. Disc height and signal intensity of the nucleus pulposus on magnetic resonance imaging as indicators of lumbar disc degeneration [J]. *Spine*, 2001, 26(6): 680-686

(收稿日期:2012-06-20 修回日期:2012-07-20)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 卢庆霞)