

腰椎间盘突出纤维环修复的研究进展

Research progress of lumbar intervertebral disc annulus fibrosus repair

宁 庆, 李 明, 李玉希, 黄 霖

(中山大学孙逸仙纪念医院骨科 510120 广州市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2023.08.10

中图分类号: R681.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2023)-08-0753-07

椎间盘是脊柱的重要组成部分,它包括髓核、纤维环和软骨终板,在脊柱的功能活动中起着重要的作用,共同承受由脊柱的压缩、伸展、弯曲和旋转引起的复杂压力。腰椎间盘突出是一个复杂的过程,年龄、氧化应激、生化平衡失调、炎症和创伤都会引起椎间盘的退变^[1]。纤维环作为包绕髓核的重要组织结构,其损伤会加速椎间盘退变,削弱髓核承受压力的能力,进而导致髓核突出,引起炎症或压迫神经引发腰痛,是导致椎间盘源性慢性腰痛的主要因素。纤维环是一个相对封闭的无血管组织,自我修复能力有限,研究中常用针刺大鼠椎间盘即可破坏纤维环,进行椎间盘退变造模^[2]。近来开展的椎间盘微创手术导致的医源性纤维环损伤也是椎间盘突出复发,再次出现腰痛的重要因素。因此,寻找纤维环修复的措施显得尤为重要。近年来针对纤维环的修复措施包括机械闭合装置、脉冲射频热凝、聚合物材料置入等^[3]。对于纤维环再生修复技术(细胞、生物分子和基因治疗)的关注也日渐增加^[4]。笔者就腰椎间盘突出纤维环修复的进展做一综述,总结目前修复以及再生的措施,为未来研究指明方向。

1 椎间盘纤维环的结构及生理特点

哺乳动物的髓核起源于轴向脊索,纤维环起源于近轴向中胚层。脊索细胞在发育过程中由椎体内移动到椎间盘组织中发生粘液退变和增生形成髓核,未进行软骨化细胞的致密部将其包绕,进而形成纤维环。纤维环发育成内纤维环(inner annulus fibrosus, IAF)和外纤维环(outer annulus fibrosus, OAF)^[5]。纤维环的发育受到许多关键分子的调控。Pax1/9 募集发育关键基因,诱导转录因子 SOX 蛋白的表达,继而刺激胶原蛋白的积累^[6]。而 SOX9 和 SCX 阳性细胞对于内外纤维环的分裂有着重要作用。骨形态发生蛋白可以促进椎间盘细胞中的蛋白聚糖产生并促进软骨生成基因表达^[7]。纤调蛋白聚糖、硫酸乙酰肝素蛋白聚糖等对于纤维环的板层结构形成也很重要^[8]。

纤维环是包绕髓核组织的环形结构,由 15~25 个同心圆式排列的高度有序的薄层组织构成。外层主要是胶原纤维,紧密连接于上下椎体骺环,内层主要是纤维软骨带连接于软骨板,中心部髓核与纤维环融合。薄层间充满了由弹性纤维、细胞、水、脂质和蛋白聚糖组成的层间基质,起到黏附作用^[9]。层间纤维相互交叉,具有较强的抗牵拉和抗压性能。纤维环的前侧、两侧的纤维层最厚,后侧的纤维层较薄,只有约两侧的一半,与后纵韧带融合。内外层纤维环细胞形态各异,外层细胞属于纤维细胞呈梭形,内层纤维环细胞属于软骨细胞呈圆形。纤维环的细胞外基质大致也可以分为内外两层,外层较硬主要含有 I 型胶原蛋白,而内层较软主要是 II 型胶原蛋白^[10]。这种内外成分的差异对于维持椎间盘的功能和形态十分重要。

2 腰椎间盘突出纤维环退变的机制

腰椎间盘突出涉及多种病理生理过程,年龄、机械因素、环境变化是主要的相关因素。主要包括细胞衰老和死亡,合成分解代谢失衡,营养供给障碍。退变常始于髓核,继而引起纤维环的损伤。纤维环损伤和炎症是椎间盘退变加速的主要因素。Yang 等^[11]应用叔丁基过氧化氢(tert-butyl hydroperoxide, TBHP)诱导体外模型椎间盘中的髓核细胞以及纤维环细胞凋亡,推断铁凋亡参与椎间盘退变。异常细胞和椎间盘生化因素的改变会使细胞外基质合成分解失衡,继而引起炎症反应,导致白细胞介素(IL-1、6、17、21)、肿瘤坏死因子 α 等炎症因子分泌增加。基质金属蛋白酶 MMPs-1、-3、-8 和-13 在退变的椎间盘中含量增加,异常增加的降解产物再诱导炎症介质产生^[12],引起的炎症级联反应也是椎间盘退变中的重要机制。这些改变导致髓核含水量下降,弹性减低,传导应力的能力也下降,导致纤维环代偿增加,薄层组织排列紊乱,韧性降低,在机械因素作用下出现裂隙。纤维环结构的改变导致其限制髓核的能力下降,髓核可能从破裂的纤维环中突出,压迫神经或引起炎症而导致腰痛。软骨终板的钙化导致营养物质供给障碍,pH 值的变化等也会加速椎间盘的退化^[13]。

3 纤维环的修复措施

第一作者简介:男(1999-),硕士研究生在读,研究方向:骨外科
电话:(020)81332523 E-mail:ningq@mail2.sysu.edu.cn
通讯作者:黄霖 E-mail:huangl5@mail.sysu.edu.cn

3.1 纤维环缝合术

纤维环缝合是消除缺损最直接的方法。腰椎间盘突出症患者接受髓核摘除术后进行纤维环缝合已在一些医院开展^[13,14]。关于纤维环缝合后疗效的研究结论尚不统一,这可能与手术技术和器具的限制有关。Ahlgren 等^[15]对羊纤维环作了三种不同切口模拟不同损伤情况,在 2、4、6 周对比修复和未修复纤维环椎间盘压力容积值以及最大椎间盘内压力,每种切口修复与未修复样本压力容积值差异在 36~62kPa(无显著性差异),因此认为直接缝合纤维环并不会显著改变椎间盘的愈合强度。而另一些研究显示缝合会带来一定正向效果,丁元飞等^[16]对 83 例腰椎间盘突出症患者进行回顾性研究,其中 38 例观察组(椎间孔镜下髓核摘除+纤维环缝合术)和 45 例对照组(椎间孔镜下髓核摘除术),结果发现,在末次随访时(24 个月)MacNab 疗效评价优良率两组无统计学差异(观察组 89.47%,对照组 86.67%),提示缝合对预后无显著影响;观察组 1 例复发(2.63%)保守治疗好转,对照组术后 5 例(11.11%)复发,再手术者 3 例(6.67%),与对照组相比,观察组的复发率及再手术率均明显降低,说明纤维环缝合可以降低髓核摘除术后突出率,但此研究属于小样本单中心的回顾性研究,需要更长期大样本的临床对照研究。Bateman 等^[17]利用猪椎间盘进行离体生物力学测试和体内研究,生物力学测试将三组椎间盘分别用 2 个、3 个和 4 个半挂钩支撑的 Dines 结缝合纤维环,体内研究分别做髓核切除加纤维环缝合以及单纯髓核切除,4 周后观察愈合情况,结果显示在 4000 次弯曲伸展测试后,4 个半挂钩支撑的 Dines 结缝合组没有出现滑移的现象,仍保持缺损闭合;体内测试显示 4 周时纤维环仍保持闭合,无软组织和炎症反应,并且没有观察到髓核突出,证明了此种穿线装置有助于纤维环缝合的潜力。直接缝合纤维环虽然可以降低复发率,但由于长期效果未知,无法恢复椎间盘的结构以及生物力学,且是否能延缓椎间盘退变尚无明确报道,因此目前临床使用很少。

3.2 闭合装置修补

Inclose 和 Xclose 组织修复系统是 2006 年前后推出的环形闭合装置,后因效果不佳,目前已经停止使用^[18]。此类国产缝合装置包括 FAST-FIX 半月板缝合器、efit 等。Barricaid 装置作为另一种闭合装置,由一个编织的聚对苯二甲酸乙二醇酯网组成,与 Inclose 和 Xclose 不同,聚合物网连接到一个钛骨锚,该钛骨锚固定在椎间盘的任一相邻椎体中,通过聚酯网的机械屏障作用阻止椎间盘内容物再次突出。Miller 等^[19]的 Meta 分析纳入了 4 项对照研究(两项随机),包括 801 例患者,其中 381 例进行了腰椎间盘突出术和 Barricaid 装置治疗,420 例仅进行腰椎间盘突出术,Barricaid 环形闭合装置在有较大环形缺损的高危患者中比仅行腰椎间盘突出术的患者,症状性再突出和再次手术的风险降低了约 50%。Parker 等^[20]进行了一项多中心前瞻性队列研究,将 46 例只行腰椎间盘突出术的患者纳入

对照组,30 例接受了闭合装置置入的患者纳入纤维环闭合组,随访 24 个月后发现,对照组有 3 例(6.5%)出现症状复发性椎间盘突出,而环形闭合组没有复发病例,椎间盘高度和患者腰腿痛症状缓解优于对照组。证明这种修复方法保持了椎间盘高度,减轻了患者的腰痛症状,但也仅是修补了纤维环的缺损,且近年来此类装置进展有限,长期效果依然未知,价格较高等限制了使用^[21]。

3.3 射频热疗

射频热疗是通过加热线圈对纤维环进行传导加热,使得胶原纤维局部变性、烧灼肉芽组织和凝固神经纤维。从而达到闭合缺损、修复纤维环的目的^[22]。Tsou 等^[23]对 93 例接受椎间盘射频热疗的患者进行前瞻性评估,其结果表明,应用椎间盘射频热疗的患者 1 年时改善率 80.90%,3 年改善率 73.91%。他们的研究证明椎间盘射频热疗可以为一些保守治疗无效的椎间盘源性慢性腰痛患者提供一种安全且微创的治疗方案。但该研究在选择患者时,排除了椎间盘损伤严重的患者,使得研究结论仅适用于症状较轻的病例,且需要长期效果随访。Kloth 等^[22]也提出对于保守治疗无效且具有明确影像学 and 椎间盘造影证据的椎间盘内破裂患者在减轻疼痛以及改善功能和生活质量方面可以从椎间盘电热疗法临床获益。Assietti 等^[24]对 50 例接受椎间盘电热疗治疗的椎间盘源性疼痛患者随访 24 个月,发现在轻度椎间盘退变的手术患者中,使用射频热疗后可以实现持久的临床改善,对完全纤维环撕裂患者则无效。综上所述,椎间盘射频热疗只适用于纤维环破坏程度较轻的患者,适应证范围较小,且远期治疗效果未知。

3.4 聚合物置入

可置入聚合物通常作为纤维环修复组织工程的支架,与细胞或是生物活性分子结合共同起到修复作用。用于纤维环修复的支架需要一定的力学性能、可降解性以及良好的相容性。用于制造支架的材料开发了许多种,聚氨酯、聚 D,L-丙交酯与生物玻璃结合、聚 D,L-乳酸与聚乙醇酸的共聚物或与生物玻璃的组合都是常用的材料,聚己内酯被广泛用作组织工程支架。Gluais 等^[25]利用静电纺丝生产随机和对齐的聚(ϵ -己内酯)纤维支架,并评估其修复羊纤维环缺陷的能力,结果显示两种置入物都很好地融入周围的纤维环,边缘有连续的胶原纤维,置入物和周围区域没有明显的异物反应,对齐的纤维支架植入后其相邻层内的胶原纤维与天然纤维环组织的交叉结构更为相似,但缺乏机械性能的比较,也未评估其在维持椎间盘结构和机械完整性方面的长期效果。考虑到支架结构的复杂性,其制作技术包括静电纺丝^[26]、3D 生物打印、立体光刻、细胞片滚动系统^[27]和基于化学加工的多孔支架,Kang 等^[28]把静电纺丝技术和熔融层积成型技术(fused deposition modeling,FDM)结合,将静电纺丝法制备的聚己内酯纳米纤维片插入熔融层积成型的微纤维中,构建出一种具有分层结构的三维多层支架用于纤维环修复,并用人间充质干细胞体外研究其生物相容性,结果显示这种材料具有

FDM微纤维的稳定性以及模拟纤维环结构的特性,具有电纺纳米片的支架内的细胞活性较高,DNA 含量测定也高于不含电纺片的支架,且细胞排列沿相同方向取向。但该研究未进行体内实验。可以看出,可植入聚合物作为纤维环修复材料前景广阔,材料选择,制作工艺以及置入方法上多种多样,但还需要更多的研究来探索,提出一套有效规范的标准。

3.5 凝胶填充

根据凝胶的来源,可分为天然凝胶和合成凝胶。合成凝胶有 PEG 水凝胶、PCL 合成聚酯等,而天然材料包括纤维蛋白、海藻酸盐、壳聚糖等,在生物相容性和低细胞毒性方面具有很大优势,因此被广泛用于髓核再生修复。然而,其机械性能较弱导致植入物在椎间盘退变进一步进展后,由于长期压缩造成的结构破坏而失效,因此对纤维环力学性能的恢复十分有限^[29]。所以常采用其他化学材料与其交联来提高其力学性能。例如京尼平与核黄素是研究较多的交联剂。京尼平是优良天然交联剂,具有较低的细胞毒性,与纤维蛋白交联时可以提供增强的刚度。Peng 等^[30]制作了可注射的京尼平交联纤维环脱细胞水凝胶,将其作为一种新型的纤维环修复生物材料,对其生物相容性、力学性能进行了评估,同时还评估了骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)在此材料上的分化情况以及其修复 AF 缺损大鼠模型的效果,结果显示,相较于非交联水凝胶,这种新型材料有着更好的生物相容性以及更高的机械强度。证明京尼平交联纤维环脱细胞水凝胶是纤维环损伤修复的有效材料。Likhitpanichkul 等^[31]开发了用于纤维环修复的纤维蛋白-京尼平水凝胶,并评估了该材料在修复离体牛尾部椎间盘纤维环缺损的性能,发现纤维蛋白-京尼平水凝胶将椎间盘的压缩刚度完全恢复到完整水平,但仅恢复了部分的拉伸和扭转刚度,纤维蛋白-京尼平水凝胶与纤维蛋白有着相似的生物相容性,但降解速度要慢得多。另一项研究中,Grunert 等^[32]利用核黄素交联高密度胶原凝胶修复大鼠椎间盘环状缺损,发现交联的高密度胶原凝胶能够修复针刺诱导的大鼠尾纤维环缺损,修复后的椎间盘保留了 62%~73%的髓核组织,并且能够抑制或部分逆转退行性变化,但切片染色显示修复仅发生在外侧纤维环,并且由于鼠尾脊柱所承受的机械力比人类脊柱要低得多,因此需要大型动物实验去进行疗效的综合评估。

再生纤维环的理念逐步发展,许多研究者将凝胶与细胞相结合,结果显示与不含细胞的凝胶相比,载有纤维环细胞的凝胶具有加速修复封闭的作用。Panebianco 等^[33]设计了一种可注射复合材料,利用氧化海藻酸盐微珠承载纤维环细胞,以阻止京尼平交联剂的细胞毒性,并将其与高模量京尼平交联纤维蛋白凝胶整合用于修复离体培养的牛椎间盘模型,发现载有细胞的京尼平交联纤维蛋白凝胶+微珠复合材料比单独的纤维蛋白凝胶具有更好的生物力学稳定性。Moriguchi 等^[34]利用核黄素交联的高密度胶原

凝胶作为搭载细胞的载体,结合纤维环细胞用于修复大鼠纤维环的针刺损伤,结果显示,载有细胞组相比无细胞凝胶组,在椎间盘高度、髓核大小和水合保留方面表现更好,且载有细胞组的凝胶重组更具有组织性,无细胞组的凝胶则显得结构杂乱。Liu 等^[35]将纤维环干细胞置于京尼平交联制备的脱细胞纤维环基质/壳聚糖杂化水凝胶上培养,并添加碱性成纤维细胞生长因子,结果显示凝胶有利于纤维环干细胞的黏附,与未添加碱性成纤维细胞生长因子的水凝胶相比,可以分泌更多的胶原蛋白和聚集蛋白聚糖。说明脱细胞纤维环基质/壳聚糖杂化水凝胶可以作为纤维环修复组织工程支架的材料。从中可以看出,将细胞载入凝胶的方法有一定可行性。

4 纤维环生物学再生措施

纤维环细胞密度在退变过程中不断降低,细胞外基质降解增加,因此要恢复正常的纤维环结构,再生策略是必经之路。细胞、生物分子和基因疗法一直是再生策略的核心。通过用健康细胞重新填充退化的椎间盘或是刺激现有细胞产生细胞外基质以恢复纤维环性能^[36]。

4.1 细胞再生

细胞疗法是通过向椎间盘植入功能正常细胞,替换损伤和凋亡的细胞,继而增加椎间盘中活细胞量,促进细胞外基质生成,是纤维环修复的一种理想方法。可分为三类:(1) 将细胞与生物支架以及生物分子结合植入受损椎间盘内,作为活性移植物填补缺损;(2) 利用植入细胞释放的刺激信号来刺激椎间盘细胞产生细胞外基质,增加常驻细胞的活性达到修复作用;(3) 通过移植细胞调节免疫反应,减少炎症延缓椎间盘退变^[37]。用于椎间盘修复再生的细胞目前有椎间盘细胞、软骨细胞以及干细胞等^[38]。椎间盘细胞对纤维环修复有积极的作用,但是由于取材困难,限制了椎间盘细胞的临床应用:一方面细胞密度较低,数量较少,取材较难;另一方面在取材过程中,供体容易受到损伤,难以从人体获得。用于纤维环修复再生治疗的干细胞有间充质干细胞、椎间盘衍生干细胞、多能干细胞三大类,Zhou 等^[39]将 BMSCs 和脂肪干细胞(adipose-derived stem cells, ADSCs)分别与大鼠纤维环细胞共培养,在 7、14 和 21d 检测两种干细胞的分化情况以及蛋白多糖与胶原蛋白 I、II 的基因表达情况,结果显示两种干细胞都可以形成纤维环样细胞, BMSCs 比 ADSCs 表达更多的蛋白多糖和胶原蛋白 I,提示 BMSCs 更适合作为纤维环修复的细胞。Orozco 等^[40]对 10 例确定为椎间盘退变引起的慢性腰痛患者进行了自体 BMSCs 注入治疗,发现疼痛和残疾快速改善,但没有发现椎间盘高度的恢复。Chen 等^[41]收集椎间盘退变患者的髓核细胞以及髓核源性干细胞,分别将两种细胞注入兔退变椎间盘中进行对照研究,发现 12 周后 MRI 观察到注射髓核干细胞组髓核信号强度更高,蛋白聚糖表达量高于髓核细胞组,表现出更好的纤维环再生效果,证明髓核源性干细胞可以用于纤维环损伤的细胞

疗法。由于椎间盘无血管结构导致的高渗缺氧环境,普通培养条件下培养的移植干细胞的存活率和修复能力较差,Wang 等^[42]将缺氧预处理的 BMSCs 注射到大鼠的变性椎间盘中,观察其治疗效果,结果显示,缺氧预处理可以显著减少 BMSCs 的凋亡,从而增加植入细胞的存活来增强其修复能力。然而最佳细胞来源如何确定,最适合的细胞量,防止细胞渗漏形成骨赘,不同来源的干细胞分化以及干细胞如何有效递送到纤维环内层等问题仍然有待解决。

4.2 生物分子治疗

生物分子通常参与纤维环修复的组织工程构建,模拟自然纤维环的生存环境,从而诱导干细胞的分化和维持细胞表型^[43];通过触发信号通路反应,促进关键基因表达,延缓椎间盘的退变。常用的生物活性因子包括成骨蛋白 1、转化生长因子、胰岛素生长因子、生长分化因子 5/6 (GDF-5/6)以及骨形态发生蛋白等。Wei 等^[44]利用聚乙二醇二丙烯酸酯 (polyethylene glycol diacrylate, PEGDA) 和脱细胞的纤维环基质 (decellularized annulus fibrosus matrix, DAFM) 结合,并加入转化生长因子- β (TGF- β) 开发出一种用于纤维环修复的可注射光固定水凝胶,将其注射到纤维环缺损的大鼠模型中评估修复性能,结果显示,含有 TGF- β 的水凝胶组在 Thompson 评分、髓核信号和椎间盘高度上优于无 TGF- β 组, TGF- β 促进了纤维环细胞的迁移,更有利于水凝胶与组织的结合。Hodgkinson 等^[45]收集慢性腰痛患者的髓核和纤维环细胞观察,发现在不同退化程度的两种细胞上 GDF-6 受体表达不变,利用重组 GDF-6 刺激髓核细胞后发现增加了 SOX9、KRT8 等健康髓核细胞标记基因的表达,增加了糖胺聚糖的产生,说明 GDF-6 有治疗椎间盘退变的潜力。Wei 等^[46]将骨形态发生蛋白 13 注入针刺损伤的羊纤维环组织,发现骨形态发生蛋白 13 可以增加纤维环细胞数量,促进胶原蛋白和蛋白聚糖的合成,从而改善椎间盘退变程度。综上,生物分子可以用在早期损伤的纤维环治疗上,提供动员或是激活内源性细胞生成细胞外基质来重新建立平衡。

4.3 基因治疗

相比于生物分子治疗,基因治疗可以通过转染细胞,改变蛋白的表达获得较为长期的效果。合成代谢因子 (BMPs、GDF-5、LMP-1)、转录因子 SOX-9、抗炎药或金属蛋白酶抑制剂 (TIMP-1) 的治疗基因已被用于椎间盘再生的研究。基因治疗通过基因转移、基因沉默、CRISPR 技术以及雷帕霉素机制靶点调控 (mTOR 信号传导) 等方法来实现^[47]。基因转移需要通过载体递送到靶细胞进行表达,病毒载体凭借其高效重组遗传物质的能力而得到广泛的研究。目前使用的病毒载体有腺病毒、腺相关病毒、杆状病毒和慢病毒等。Chen 等^[48]将腺病毒注入椎间盘退变大鼠的髓核过表达 Mfn2,评估腺病毒-Mfn2 在退变椎间盘中的治疗作用,结果显示,腺病毒 Mfn2 注射减少了退变椎间盘中髓核细胞的凋亡,相比假手术组和对照组表现出更规则的纤维环结构以及更多的蛋白多糖基质,对大鼠无负面影

响,证明腺病毒-Mfn2 可以改善椎间盘退变且具安全性。Fan 等^[49]通过向椎间盘退变的小鼠椎间盘内注射表达 CRISPRCas9 的腺相关病毒来下调 β -连环蛋白,发现 β -连环蛋白功能丧失减缓了椎间盘基质分解代谢反应,减弱了软骨成骨,维持了纤维环的结构并减轻了椎间盘退变期的疼痛。Liu 等^[50]将携带绿色荧光蛋白基因 (AC-CMV-GFP) 的杆状病毒注射到兔椎间盘内,测试杆状病毒是否可以作为基因治疗载体,结果显示,感染复数为 200 的 AC-CMV-GFP 可以达到最高转染效率 (87%),转染后兔椎间盘细胞存活率和健康状况良好,椎间盘内注射后,第 7 天荧光强度最高,可以持续表达且没有观察到兔的异常活动和继发的相关疾病,表明杆状病毒可以作为基因治疗椎间盘退变的一种有效载体。

但病毒基因可能会带来致突变性和病毒感染风险,非病毒基因治疗避免了病毒基因治疗的潜在风险,为基因治疗的应用带来新的可能。非病毒载体的研究例如超声靶向微泡技术、聚合物胶束技术也在进行。Nishida 等^[51]将编码绿色荧光蛋白和荧光素酶的质粒 DNA 与超声造影剂 (微泡) 混合注射到大鼠的椎间盘中,并使用治疗性超声波照射椎间盘,结果显示,与仅使用质粒 DNA 组相比,添加微泡的超声照射组的荧光素酶活性增加了 11 倍,且表达至少持续 24 周,证明超声靶向微泡技术可以提高质粒 DNA 的转移效率,是一种有效的基因治疗方法。但成本高、转染率低和靶向性差是非病毒基因治疗应用所需要解决的问题。

5 椎间盘替换治疗

将椎间盘整个替换也是再生纤维环的方法之一。早期椎间盘替换研究由于只考虑到人工合成椎间盘的力学性能,忽略了其生物相容性,导致效果较差^[9]。随着 3D 打印等制造技术的进步、生物材料的改进以及再生理念的发展,人工合成椎间盘又显示出一定的临床应用潜力。3D 打印是一项新兴的个性化精准的技术,可以个体化模拟纤维环的大小结构,更有利于细胞的浸润和排列。Sun 等^[52]将 BMSCs 分别与装载了结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 和 TGF- β 3 的聚多巴胺纳米微球以及水凝胶混合,3D 打印出髓核和纤维环组织,使用聚己内酯打印整体的框架,发现 BMSCs 在支架中活性良好,两种生长因子在相应区域持续稳定释放,并诱导 BMSCs 分化为髓核样细胞和纤维环样细胞,机械性能测试显示在 100 次压缩后仍能保持良好抗压能力;体内实验显示组织相容性良好。但实验仅在体外和大鼠皮下进行,需进一步评估大型哺乳动物实验效果。Hensley 等^[53]优化了牛椎间盘脱细胞流程,获得了脱细胞的整个椎间盘组织,结果显示脱细胞的椎间盘保留了髓核和纤维环区域的特征性微结构,但脱细胞椎间盘的溶胀性能和无侧限抗压强度有所降低。因此,全椎间盘替换可以作为纤维环再生的潜在方法,但是材料的选择和制作工艺仍然需要进一步探索,也需要更多

的动物实验来验证。

6 展望

综上所述,由于纤维环自我修复能力有限,机械修复虽然能减少髓核再突出,保留椎间盘高度,一定程度上减轻患者疼痛症状等,但是修补后的纤维环仅仅只是机械的闭合,没有恢复其生理结构,其承受压力的机械特性无法恢复到生理状态,且在修补过程中不可避免会对纤维环造成新的伤害,因此仅通过机械修复已无法满足纤维环修复的需求,应更多关注组织工程、细胞移植、基因治疗和生物活性分子治疗等新方法,这些方法不仅修补了纤维环,还部分模拟了纤维环的结构,补充了细胞以及细胞外基质,恢复纤维环的完整性的同时,延缓了椎间盘的退变。应用于纤维环修复的组织工程一方面可以通过支架模拟纤维环的结构提供一定的机械功能,另一方面可以通过细胞和生物分子促进纤维环成分的恢复,是最具临床转化希望的方法。虽然纤维环再生已经取得了一些积极的结果,但是大多仍处于实验室实验阶段,转化到临床还需要进行许多工作。单一的治疗方法仍有不足,因此可以将支架、细胞、基因以及生物活性分子结合起来^[54],研究出最合适的再生修复材料,例如将凝胶与细胞相结合的方法,从多个方面对纤维环进行修复。更好地实现受损纤维环的修复再生,并早期应用于临床治疗。

7 参考文献

1. Silva-Correia J, Correia SI, Oliveira JM, et al. Tissue engineering strategies applied in the regeneration of the human intervertebral disk [J]. *Biotechnol Adv*, 2013, 31(8): 1514–1531.
2. Kim JH, Ham CH, Kwon WK. Current knowledge and future therapeutic prospects in symptomatic intervertebral disc degeneration[J]. *Yonsei Med J*, 2022, 63(3): 199–210.
3. Tavakoli J, Diwan AD, Tipper JL. Advanced strategies for the regeneration of lumbar disc annulus fibrosus[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(14): 4889.
4. Sloan SJ, Lintz M, Hussain I, et al. Biologic annulus fibrosus repair: a review of preclinical in vivo investigations[J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2018, 24(3): 179–190.
5. Wang F, Zhang C, Sinkemani A, et al. A histocytological and radiological overview of the natural history of intervertebral disk: from embryonic formation to age-related degeneration[J]. *Eur Spine J*, 2019, 28(4): 633–648.
6. Ren XF, Diao ZZ, Xi YM, et al. Adeno-associated virus-mediated BMP-7 and SOX9 in vitro co-transfection of human degenerative intervertebral disc cells[J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(2): 3736–3744.
7. Zhang Y, Anderson DG, Phillips FM, et al. Comparative effects of bone morphogenetic proteins and Sox9 overexpression on matrix accumulation by bovine annulus fibrosus cells: implications for annular repair[J]. *Spine(Phila Pa 1976)*, 2007, 32(23): 2515–2520.
8. Williams S, Alkhatib B, Serra R. Development of the axial skeleton and intervertebral disc[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2019, 133: 49–90.
9. Li C, Bai Q, Lai Y, et al. Advances and prospects in biomaterials for intervertebral disk regeneration [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 766087.
10. Oichi T, Taniguchi Y, Oshima Y, et al. Pathomechanism of intervertebral disc degeneration[J]. *JOR Spine*, 2020, 3(1): e1076.
11. Yang RZ, Xu WN, Zheng HL, et al. Involvement of oxidative stress-induced annulus fibrosus cell and nucleus pulposus cell ferroptosis in intervertebral disc degeneration pathogenesis[J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(4): 2725–2739.
12. Wang Y, Che M, Xin J, et al. The role of IL-1 β and TNF- α in intervertebral disc degeneration [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 131: 110660.
13. Li ZZ, Cao Z, Zhao HL, et al. A pilot study of full-endoscopic annulus fibrosus suture following lumbar discectomy: technique notes and one-year follow-up [J]. *Pain Physician*, 2020, 23(5): E497–E506.
14. Ren C, Qin R, Li Y, et al. Microendoscopic discectomy combined with annular suture versus percutaneous transforaminal endoscopic discectomy for lumbar disc herniation: a prospective observational study[J]. *Pain Physician*, 2020, 23(6): E713–E721.
15. Ahlgren BD, Lui W, Herkowitz HN, et al. Effect of annular repair on the healing strength of the intervertebral disc: a sheep model[J]. *Spine(Phila Pa 1976)*, 2000, 25(17): 2165–2170.
16. 丁远飞, 柳申鹏, 宋凯, 等. 椎间孔镜下髓核摘除联合纤维缝合治疗腰椎间盘突出症的疗效分析[J]. *实用骨科杂志*, 2022, 28(5): 436–441.
17. Bateman AH, Balkovec C, Akens MK, et al. Closure of the annulus fibrosus of the intervertebral disc using a novel suture application device—in vivo porcine and ex vivo biomechanical evaluation[J]. *Spine J*, 2016, 16(7): 889–895.
18. Guardado AA, Baker A, Weightman A, et al. Lumbar intervertebral disc herniation: annular closure devices and key design requirements[J]. *Bioengineering(Basel)*, 2022, 9(2): 47.
19. Miller LE, Allen RT, Duhon B, et al. Expert review with meta-analysis of randomized and nonrandomized controlled studies of Barricaid annular closure in patients at high risk for lumbar disc reherniation [J]. *Expert Rev Med Devices*, 2020, 17(5): 461–469.
20. Parker SL, Grahovac G, Vukas D, et al. Effect of an annular closure device (Barricaid) on same-level recurrent disk herniation and disk height loss after primary lumbar discectomy: two-year results of a multicenter prospective cohort study[J]. *Clin Spine Surg*, 2016, 29(10): 454–460.

21. Choy WJ, Phan K, Diwan AD, et al. Annular closure device for disc herniation: meta-analysis of clinical outcome and complications[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2018, 19(1): 290.
22. Kloth DS, Fenton DS, Andersson GB, et al. Intradiscal electrothermal therapy(IDET) for the treatment of discogenic low back pain: patient selection and indications for use [J]. *Pain Physician*, 2008, 11(5): 659-668.
23. Tsou HK, Chao SC, Kao TH, et al. Intradiscal electrothermal therapy in the treatment of chronic low back pain: experience with 93 patients[J]. *Surg Neurol Int*, 2010, 1: 37.
24. Assietti R, Morosi M, Block J E. Intradiscal electrothermal therapy for symptomatic internal disc disruption: 24-month results and predictors of clinical success [J]. *J Neurosurg Spine*, 2010, 12(3): 320-326.
25. Gluais M, Clouet J, Fusellier M, et al. In vitro and in vivo evaluation of an electrospun-aligned microfibrillar implant for Annulus fibrosus repair[J]. *Biomaterials*, 2019, 205: 81-93.
26. Zhu M, Tan J, Liu L, et al. Construction of biomimetic artificial intervertebral disc scaffold via 3D printing and electrospinning[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2021, 128: 112310.
27. Shamsah AH, Cartmell SH, Richardson SM, et al. Tissue engineering the annulus fibrosus using 3D rings of electrospun PCL: PLLA Angle-Ply Nanofiber Sheets [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2019, 7: 437.
28. Kang R, Svend LD, Li H, et al. Engineered three-dimensional nanofibrous multi-lamellar structure for annulus fibrosus repair[J]. *J Mater Chem B*, 2013, 1(40): 5462-5468.
29. Schek RM, Michalek AJ, Iatridis JC. Genipin-crosslinked fibrin hydrogels as a potential adhesive to augment intervertebral disc annulus repair [J]. *Eur Cell Mater*, 2011, 21: 373-383.
30. Peng Y, Huang D, Li J, et al. Genipin-crosslinked decellularized annulus fibrosus hydrogels induces tissue-specific differentiation of bone mesenchymal stem cells and intervertebral disc regeneration[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2020, 14(3): 497-509.
31. Likhitpanichkul M, Dreischarf M, Illien-Junger S, et al. Fibrin-genipin adhesive hydrogel for annulus fibrosus repair: performance evaluation with large animal organ culture, in situ biomechanics, and in vivo degradation tests[J]. *Eur Cell Mater*, 2014, 28: 25-38.
32. Grunert P, Borde BH, Towne SB, et al. Riboflavin crosslinked high-density collagen gel for the repair of annular defects in intervertebral discs: an in vivo study[J]. *Acta Biomater*, 2015, 26: 215-224.
33. Panebianco CJ, Rao S, Hom WW, et al. Genipin-crosslinked fibrin seeded with oxidized alginate microbeads as a novel composite biomaterial strategy for intervertebral disc cell therapy[J]. *Biomaterials*, 2022, 287: 121641.
34. Moriguchi Y, Borde B, Berlin C, et al. In vivo annular repair using high-density collagen gel seeded with annulus fibrosus cells[J]. *Acta Biomater*, 2018, 79: 230-238.
35. Liu C, Jin Z, Ge X, et al. Decellularized annulus fibrosus Matrix/Chitosan Hybrid Hydrogels with basic fibroblast growth factor for annulus fibrosus tissue engineering[J]. *Tissue Eng Part A*, 2019, 25(23-24): 1605-1613.
36. Peredo AP, Gullbrand SE, Smith HE, et al. Putting the pieces in place: mobilizing cellular players to improve annulus fibrosus repair[J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2021, 27(4): 295-312.
37. Binch A, Fitzgerald JC, Gowney EA, et al. Cell-based strategies for IVD repair: clinical progress and translational obstacles[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2021, 17(3): 158-175.
38. Widjaja G, Jalil AT, Budi HS, et al. Mesenchymal stromal/stem cells and their exosomes application in the treatment of intervertebral disc disease: a promising frontier [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 105: 108537.
39. Zhou Y, Hu X, Zheng X, et al. Differentiation potential of mesenchymal stem cells derived from adipose tissue vs bone marrow toward annulus fibrosus cells in vitro[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2017, 12(5): 432-439.
40. Orozco L, Soler R, Morera C, et al. Intervertebral disc repair by autologous mesenchymal bone marrow cells: a pilot study [J]. *Transplantation*, 2011, 92(7): 822-828.
41. Chen X, Zhu L, Wu G, et al. A comparison between nucleus pulposus-derived stem cell transplantation and nucleus pulposus cell transplantation for the treatment of intervertebral disc degeneration in a rabbit model [J]. *Int J Surg*, 2016, 28: 77-82.
42. Wang W, Wang Y, Deng G, et al. Transplantation of Hypoxic-Preconditioned bone mesenchymal stem cells retards intervertebral disc degeneration via enhancing implanted cell survival and migration in rats[J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 7564159.
43. Sakai D, Grad S. Advancing the cellular and molecular therapy for intervertebral disc disease [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, 84: 159-171.
44. Wei Q, Liu D, Chu G, et al. TGF-beta1-supplemented decellularized annulus fibrosus matrix hydrogels promote annulus fibrosus repair[J]. *Bioact Mater*, 2023, 19: 581-593.
45. Hodgkinson T, Gilbert H, Pandya T, et al. Regenerative response of degenerate human nucleus pulposus cells to GDF6 stimulation[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(19): 7143.
46. Wei A, Williams LA, Bhargav D, et al. BMP13 prevents the effects of annular injury in an ovine model [J]. *Int J Biol Sci*, 2009, 5(5): 388-396.
47. Roh EJ, Darai A, Kyung JW, et al. Genetic therapy for intervertebral disc degeneration[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(4): 1579.
48. Chen Y, Lin J, Chen J, et al. Mfn2 is involved in interver

衰老细胞及其与椎间盘退变疾病关系的研究进展

Research updates on senescent cells and their relationships with disc degeneration diseases

吴禹锋^{1,2}, 陈 飞³, 应奇峰⁴, 夏启鑫¹, 徐炯楠¹, 张 骏^{1,2}

[1 浙江省人民医院(杭州医学院附属人民医院)骨科 310014 杭州市; 2 杭州医学院 310053 杭州市;

3 杭州市富阳区第一人民医院骨科 311400; 4 浙江省人民医院骨质疏松诊疗中心 310014 杭州市]

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2023.08.11

中图分类号: R681.5, R363 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2023)-08-0759-06

衰老是生物体的组织器官随着年龄的增长发生不可逆的功能性下降、内环境稳态调控能力减弱、生理应激反应退化、逐步趋向死亡的过程^[1]。随着全球老龄化趋势的加剧,椎间盘退变引起的腰痛是常见的腰椎疾病症状之一。据估计有近 80% 的人群一生中会遭受腰痛的困扰^[2,3]。有调查显示,我国 2016 年患有腰痛的人数达 6730 万,腰痛是伤残所致疾病负担的第二大原因^[4]。在美国,仅 2016 年用于腰背和颈部疼痛的医疗保健支出高达 1345 亿美元^[5]。椎间盘退变疾病(disc degeneration disease, DDD)不仅严重影响患者生活质量,还给社会带来巨大的经济负担。目前,针对 DDD 的治疗方式包括休息、服用止痛药物、手术等。但现有治疗方法仅可缓解症状,而无法延缓疾病进展^[6,7]。如何延缓 DDD 的发生发展成为目前的研究热点。DDD 的发生发展与衰老细胞密切相关,衰老细胞及衰老相关分泌型(senescence-associated secretory phenotype, SASP)通

过多种机制影响局部组织微环境,最终导致椎间盘基质稳态失衡^[8,9]。笔者对衰老细胞与 DDD 发生发展的相关研究进行系统综述,并提出针对衰老椎间盘(intervertebral disc, IVD)细胞延缓 DDD 的潜在策略,为进一步研究及临床防治 DDD 提供参考。

1 衰老细胞及 SASP

1.1 细胞衰老与衰老细胞

细胞衰老通常可以理解为在持续的外源性和内源性应激和损伤的驱动下,细胞出现永久性增殖阻滞状态的过程和细胞在生命活动过程中发生的生理功能紊乱^[1,8,10]。衰老相关 β -半乳糖苷酶(senescence-associated β -galactosidase, SA- β -gal)、p53、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂(p16 和 p21)、视网膜母细胞瘤蛋白(retinoblastoma protein, Rb)、p38 和端粒长度等都可以作为细胞衰老的生物标志物。其中细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 2A(p16INK4a)是公认的慢性衰老关键标志物^[9,11]。

衰老细胞作为细胞衰老过程的产物,具有特殊生物学特征和功能,是导致组织再生受损、慢性衰老相关疾病

第一作者简介:男(2002-),本科在读,研究方向:骨科学
电话:(0571)85893372 E-mail:643369062@qq.com
通讯作者:张骏 E-mail:spinezhangjun@aliyun.com

- tebral disc degeneration through autophagy modulation [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2020, 28(3): 363-374.
49. Fan Y, Zhao L, Lai Y, et al. CRISPR-Cas9-mediated loss of function of beta-catenin attenuates intervertebral disc degeneration[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2022, 28: 387-396.
50. Liu X, Li K, Song J, et al. Efficient and stable gene expression in rabbit intervertebral disc cells transduced with a recombinant baculovirus vector[J]. Spine(Phila Pa 1976), 2006, 31(7): 732-735.
51. 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(Phila Pa 1976), 2006, 31(13): 1415-1419.

52. Sun B, Lian M, Han Y, et al. A 3D-Bioprinted dual growth factor-releasing intervertebral disc scaffold induces nucleus pulposus and annulus fibrosus reconstruction[J]. Bioact Mater, 2021, 6(1): 179-190.
53. Hensley A, Rames J, Casler V, et al. Decellularization and characterization of a whole intervertebral disk xenograft scaffold[J]. J Biomed Mater Res A, 2018, 106(9): 2412-2423.
54. Long RG, Burki A, Zysset P, et al. Mechanical restoration and failure analyses of a hydrogel and scaffold composite strategy for annulus fibrosus repair[J]. Acta Biomater, 2016, 30: 116-125.

(收稿日期:2022-09-01 修回日期:2022-11-06)

(本文编辑 姜雅浩)