

综述

椎间盘组织工程学细胞培养的研究进展

宁 斌, 刘 勇, 胡有谷

(青岛大学医学附属医院骨科 266003 山东省青岛市)

中图分类号: R681.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2005)-06-0368-04

椎间盘组织工程学是骨科生物学研究的新领域。1988年,美国科学基金会(NSF)对组织工程作出如下定义:应用工程科学和生命科学的原理和方法,认识哺乳动物正常和病理组织与器官的结构功能关系,并开发具有生物活性的人工替代物,以恢复、维持或改善组织、器官的功能^[1]。组织工程学的基本原理和方法是:将体外培养的高浓度组织细胞,吸附于一种生物相容性良好并可被人体逐步降解吸收的生物材料上进行扩增,使细胞能按照预制设计的三维支架的形态生长,形成细胞生物材料复合体,然后,将此细胞生物材料复合体植入机体组织病损部位。移植细胞在生物支架逐步降解吸收过程中,继续增殖并分泌基质,形成新的与机体自身功能和形态相近的组织器官。这种具有生命力的活体组织能对病损组织进行形态、结构和功能的重建并达到永久性替代^[2]。在椎间盘组织工程的研究中,种子细胞培养是椎间盘组织工程构建的起始和关键,作者就其研究进展综述如下。

1 椎间盘组织工程三维细胞培养的载体材料

1.1 载体支架材料的基本功能

生物载体材料在椎间盘组织工程中起着替代细胞外基质或组织、器官基质的作用。其主要功能包括以下两点:(1)为组织或器官体外构建工程提供三维的细胞生长支架,使细胞间形成适宜的空间分布和细胞联系;(2)提供特殊的生长和分化信号,维持细胞的定向分化^[3]。

1.2 载体支架材料的特性

(1)良好的组织相容性。材料应对移植细胞和邻近组织无免疫原性,不引起排斥反应。(2)良好的生物可降解性。材料在完成支架作用后应能降解,降解率应与组织生长率相适应,降解时间应根据组织生长特性进行调控。(3)良好的细胞界面。材料应有利于细胞的粘附生长,更重要的是应能激活特异基因的表达,维持正常的细胞形态。(4)三维立体多孔结构。生物材料应可加工成三维立体结构,孔隙率应达90%以上,要有较高的面积体积比,利于细胞黏附生长、血管神经长入、营养成分渗入和代谢产物排除。(5)可塑性和一定的机械强度。生物材料应可预制成所需的形状,并有一定的机械强度,为新生组织提供支持,在

植入宿主体内后可保持一定时间,直至新生组织形成并具有一定的外形之后再降解^[4,5]。

1.3 载体支架材料的种类

细胞种植载体包括天然和人工合成两种基质材料。以前应用海藻酸钙进行椎间盘细胞三维培养的研究居多,现在多应用高分子聚合材料来做椎间盘组织工程支架。

2 椎间盘细胞的培养

2.1 椎间盘细胞的单层培养

1991年Ichimura等^[6]和1998年Shinmei等^[7]进行了椎间盘细胞的单层培养,观察影响细胞培养的因素,检测蛋白多糖、胶原和DNA的合成。1999年刘勇等^[8]也成功地进行了胎儿椎间盘细胞的单层培养。目前,国内外进行椎间盘细胞单层培养的实验研究较多,技术方法已经成熟。

2.2 椎间盘细胞的三维培养

2.2.1 静止性三维细胞培养 由于重力作用,静止培养时细胞多聚集到载体的底部和载体之外,载体内部黏附生长的细胞数量很少,导致载体内部移植细胞数量的不足。Holy等^[9]的研究发现,静止性三维细胞培养对载体内部的最大细胞量占最初种植细胞量的25%,其余75%的细胞均在载体的底部。载体中细胞的数量对体外和体内椎间盘组织的形成起关键的作用,静止细胞培养方法限制了载体内部细胞的数量,从而会影响椎间盘组织的形成。除了细胞数量的限制外,还限制了细胞生长的深度。尽管三维结构的载体适合于椎间盘组织工程的应用,但是采用静止细胞培养方法时培养液很难扩散渗透到载体的中心,使氧气、营养物质扩散和代谢物排出受限,从而影响载体内部细胞的代谢活性。因此,需要改善培养条件或细胞种植方法来解决细胞数量不足和分布不均匀的问题。

2.2.2 动力性三维细胞培养 现在许多动力性三维细胞培养的研究是在应用旋转生物反应器(RCCS)模拟微重力的条件下进行的。Botchwey等^[10]在生物反应器中培养了成骨性细胞,与静止细胞培养比较发现,可以保持成骨性细胞显型,并且可增加细胞碱性磷酸酶表达和基质矿化。Qiu等^[11]在微载体上培养鼠骨髓基质细胞,探讨了模拟微重力下骨相关性生化标志物的表达,并计算液体流动在载体表面所产生的不同剪切力的大小。应用生物反应器悬浮培养方式,能够产生层流以减少使细胞发生聚集的机械应力,其流体动力性和自由的三维空间,易于氧气扩散,可利用

力学的培养条件保持培养细胞的特性。力学培养条件对细胞的影响是一个多因素的作用机制,剪切力能够对细胞周期和细胞凋亡方式产生影响,也具有上调第二信使的作用。

动力性三维细胞培养有许多静止细胞培养所不具备的优点:(1)在三维载体中,能够产生有效的、均匀的细胞种植,允许移植最大数量的细胞;(2)能够促进氧气和营养物质向载体内部输送,保持载体内部细胞的活性和功能的发挥;(3)能够促进载体中黏附生长细胞的增殖,分泌更多细胞外基质,促进椎间盘细胞再生;(4)椎间盘细胞能够沿着三维载体的孔隙生长;(5)能够排出更多的 CO_2 ,维持生理性 pH 值,为细胞代谢和功能发挥提供更有利的微环境;(6)培养液流动能够对细胞产生机械应力刺激,调节成纤维性细胞功能的发挥。目前,还没有用微重力旋转培养系统培养椎间盘细胞的报道,这可能是今后进行椎间盘细胞实验研究的一个重要方向。

2.3 细胞基质的表达

Gruber 等^[12]从人的椎间盘细胞形态、分裂和细胞外基质形成等方面研究了单层培养和三维培养的异同,发现在单层培养中,椎间盘细胞显示了同纤维母细胞相似的纺锤形外观;硫酸软骨素和硫酸角质素很丰富;在血小板源性生长因子存在的情况下,单层培养的细胞增殖能力明显高于三维培养的细胞。Sato 等^[13]进行大鼠椎间盘单层细胞培养时,鼠内、外纤维环细胞均有明显分裂,内纤维环细胞呈多角形,有丰富细胞外基质,而外纤维环细胞呈纺锤形,细胞外基质稀少。Wang 等^[14]用猪椎间盘细胞进行单层培养时,发现与藻酸盐培养相比,内纤维环细胞和外纤维环细胞表型发生可逆性改变,表现为聚集蛋白多糖和 II 型胶原 mRNA 水平下降。Horner 等^[15]用牛椎间盘细胞进行单层培养时,髓核细胞产生长的、明显的突起,蛋白多糖是内环细胞的 2 倍,原代培养第 1 天髓核细胞即有蛋白多糖合成减少,5d 内蛋白多糖抗原决定簇 C-4-S 消失。

Gruber 等^[12]的研究发现,应用藻酸盐载体的三维培养中,细胞形态变圆并形成多聚细胞群,在细胞间及其周围形成细胞外基质成分;利用免疫组织化学的方法只有在三维培养中才能检测出 I 型和 II 型胶原;二者的硫酸软骨素和硫酸角质素都很丰富。Sato 等^[13]发现当大鼠椎间盘细胞在应用琼脂载体的三维培养中,两种细胞都呈球形,蛋白多糖合成无差异,细胞外基质合成增多。Wang 等^[14]将椎间盘细胞单层培养并经 2 次传代后行藻酸盐培养,内纤维环细胞和外纤维环细胞聚合素及 II 型胶原 mRNA 水平重新上升。以上实验给出一种既能扩增纤维环细胞数量又能保持细胞表型的方法。但髓核细胞对培养环境不敏感。Horner 等^[15]应用藻酸盐作载体培养时,髓核细胞呈软骨样细胞形态,蛋白多糖是内环细胞的 10 倍。无论在单层培养还是应用藻酸盐作载体培养,蛋白多糖在髓核细胞表达最高,而在外纤维环细胞表达最低。与蛋白多糖相比,胶原表达始终较低,可能与体外培养时反馈抑制或缺乏机械刺激

有关。Sato 等^[16]用 ACHMS 支架三维培养人的椎间盘细胞,利用 Western blot 和 Northern blot 检测经三维培养后的椎间盘细胞的 II 型胶原及其 mRNA 表达,发现其比单层培养的细胞表达的水平高;Western blot 分析显示,三维培养中葡糖胺聚糖的表达、蛋白多糖的积累明显比单层培养的细胞水平高。Gan 等^[17,18]通过成年兔的椎间盘髓核和纤维环细胞单层培养,当大多数细胞开始融合时,将细胞转移到试管中并形成片状沉淀物。这时细胞还原为最初的形态,在广泛的细胞外基质周围形成类似体内的细胞巢,这些细胞没有增殖。在片状培养中有聚合多糖的表达,同时 CD_{44} , I 型、II 型胶原也有表达,但是没有 X 型胶原的表达,碱性磷酸酶活性降低。Gruber 等^[19]将 29 例不同的椎间盘分别在胶原海绵、胶原凝胶、琼脂糖、藻酸盐、纤维蛋白凝胶中进行三维培养,利用原位杂交方法对不同培养载体材料培养的细胞外基质的 I 型和 II 型胶原、6-磺基转移酶软骨素进行检测,对细胞增殖、细胞形态、附属产物及细胞外基质的产生进行评价。结果显示不同微载体三维培养椎间盘细胞后,基因的表达有明显差异,验证了组织工程学技术利用体外椎间盘细胞对疾病进行治疗的可行性。

3 细胞因子对椎间盘细胞培养的影响

细胞因子是一类由多种细胞产生并分泌到细胞外的糖蛋白分子。研究表明^[20-22],细胞因子广泛参与椎间盘细胞的增殖、代谢,从而影响椎间盘的病变和修复。

3.1 胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor-I, IGF-I)

Gruber 等^[12]在单层培养的椎间盘细胞中应用 IGF 和血小板衍生长因子(PDGF),发现其能够延缓甚至逆转纤维环细胞的凋亡。通过磷酸酯肌醇 3-激酶及有丝分裂活性蛋白激酶途径,50~500ng/ml 的 IGF-I 可以明显降低纤维环细胞凋亡率,其效应与浓度无关。Osada 等^[23]发现 IGF 能够刺激牛椎间盘细胞的蛋白多糖合成,揭示了椎间盘细胞有一个 IGF 自分泌/旁分泌的调控机制。Okuda 等^[24]也评价了细胞培养中 IGF-I 依赖性蛋白多糖合成减少和椎间盘退变的关系。年龄相关性蛋白多糖合成的下调不仅与 IGF 和 IGF 受体(IGF-R)有关,而且与 IGF 结合蛋白-I (IGF BP-I)表达增多有关。在早期阶段,蛋白多糖合成的下调是由于 IGF BP-I 表达增多;在晚期阶段,蛋白多糖合成的下调是由于 IGF BP-I 表达增多及 IGF-R 数量和敏感性下降。Hoelscher 等^[25]的椎间盘细胞培养也显示了脊柱手术后大剂量应用抗生素对于椎间盘细胞的生存和增殖具有毒害作用。

3.2 转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor-beta one, TGF- $\beta 1$)

Gruber 等^[26]证实,TGF- $\beta 1$ 能显著促进以藻酸盐作载体三维培养 4~10d 的人纤维环细胞的增殖。应用免疫组织化学在体外检测到细胞外基质成分的表达,包括 I、II、III 和 IV 型胶原,4-巯基-硫酸软骨素和硫酸角质素等。在应用

TGF- β 1 后 4d 细胞增生明显增多,10d 后开始减弱。蛋白多糖基因表达的分子水平研究显示,应用 TGF- β 14d 后双糖链蛋白多糖增加,但是核心蛋白多糖没有明显变化。陈岩等^[27]实验表明,对于原代培养的椎间盘细胞,TGF- β 1 呈剂量依赖型方式促进 II 型胶原表达;而对于传代培养的细胞,随着类软骨细胞及脊索细胞表型的丧失,II 型胶原基因表达水平明显减弱,此时加入 TGF- β 1 后作用发生逆转,以剂量依赖方式正向调节 II 型胶原 mRNA。TGF- β 1 对 I、III 型胶原 mRNA 可发挥剂量依赖性正向调节作用,这种调节作用在传代细胞更为明显,对 III 型胶原其调节作用明显弱于 I 型。Alini 等^[28]利用胶原/透明质酸复合体(Collagen/Hyaluronan)支架三维培养牛的椎间盘髓核和纤维环细胞,在培养的细胞中应用 TGF- β 1 后各种蛋白多糖及 I 型和 II 型胶原表达增加。

3.3 其它细胞因子

如血小板源性生长因子(PDGF)、重组人骨形态发生蛋白-2(rhBMP-2)等。Kim 等^[29]利用藻酸盐载体三维培养人的椎间盘细胞,通过中国仓鼠卵巢细胞 BMP-2 cDNA 基因转导制造出 rhBMP-2。在用 rhBMP-2 的细胞培养中(67%的 300ng/ml,200%的 1500ng/ml),蛋白多糖有新的增加;相对于对照组,I 型、II 型胶原的表达增加。但是其作用机理尚不十分明确,有待于进一步研究。

4 应力对椎间盘细胞外基质表达的影响

椎间盘是由凝胶状的髓核和几层同心排列的纤维轴环构成,当椎间盘承受外负荷时,髓核静水压升高,向各方向均匀作用,使纤维环承受张应力。然而,不同椎间盘细胞对不同力学刺激反应差异很大。

Handa 等^[30]测试表明,生理水平压力(0.3MPa)可刺激椎间盘细胞蛋白多糖和金属蛋白酶-1 组织抑制剂(TIMP-1)的合成,高压(3MPa)或低压(0.1MPa)降低蛋白多糖合成和增加金属蛋白酶-3(MMP-3)更明显。但椎间盘细胞在压力作用下不会分裂增殖。Ishihara 等^[31]证实,2.5Mpa 压力刺激内纤维环细胞和髓核细胞蛋白多糖的合成,而 10Mpa 压力则抑制内纤维环细胞和髓核细胞蛋白多糖合成。Hutton 等^[32]进一步证实,1Mpa 压力(相当于日常活动椎间盘静水压)时,可刺激髓核细胞胶原和蛋白多糖的合成,抑制纤维环细胞胶原和蛋白多糖的合成,但纤维环细胞和髓核细胞胶原和蛋白多糖 mRNA 却上升,纤维环细胞胶原和蛋白多糖 mRNA 与细胞外基质蛋白合成的差异可能与翻译水平调节或 MMP-3 上调、TIMP 下调有关。Hutton 等^[33]还证明,在 0.35MPa 压力下,髓核细胞和纤维环细胞蛋白多糖合成均下降,但髓核细胞聚合素核心蛋白(aggrecan coreprotein)mRNA 上升,纤维环细胞聚合素核心蛋白 mRNA 下降;I 型胶原和 II 型胶原表达在髓核细胞上升,在纤维环细胞下降,髓核细胞 I 型胶原 mRNA 上升,II 型胶原 mRNA 下降,纤维环细胞 I 型胶原和 II 型胶原 mRNA 均下降。这些测试表明,椎间盘细胞对静水压的反应与其

高低有关。Liu 等^[34]体外研究了椎间盘组织的碎片,评价了流体静力压下蛋白多糖合成改变的介导因素一氧化氮(NO)的作用。他们证实,高压(0.3MPa)可降低椎间盘细胞蛋白多糖合成,促进 NO 产生,而 NO 合成酶竞争性抑制剂(1-NMA)能解除这种抑制,同时,NO 合成的有机原料(SNAP)呈剂量依赖方式促进 NO 产生,抑制蛋白多糖合成,这表明 NO 是静水压引起椎间盘细胞蛋白多糖合成改变的介质之一。体内椎间盘细胞由于受到拉力、压力、剪力而不断产生机械变形并影响其细胞外基质代谢。

综上所述,目前椎间盘细胞培养的组织工程学已经取得初步成果,但是对椎间盘细胞表型研究尚不充分,更多特异标志型表型尚不可知。由于椎间盘中细胞含量稀少,来源不明确,差异甚大,建立表型稳定的体外细胞模型存在诸多困难。尽管在载体结构和细胞培养方法改进等方面已经取得了较大的进展,但是椎间盘组织工程细胞载体复合物的体外构建仍然难以模拟真正的体内微环境,还有待于更深入的研究。

5 参考文献

1. Langer R, Vacanti JE. Tissue engineering[J]. Science, 1993, 260(5110): 920-926.
2. Edelman ER. Vascular tissue engineering: designer arteries[J]. Circ Res, 1999, 85(12): 1115-1117.
3. Pappas NA, Robert L. New challenges in biomaterials[J]. Science, 1994, 263(6307): 1715-1720.
4. Freed CE, Vunjak-Novakovic G, Iron KJ. Biodegradable polymer-scaffolds for tissue engineering [J]. Biotechnology NY, 1994, 12(7): 689-693.
5. Kim BS, Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering[J]. Trends Biotechnol, 1998, 16(5): 224-230.
6. Ichimura K, Tsuji H, Matsui H, et al. Cell culture of the intervertebral disc of rats: factors influencing culture, proteoglycan, collagen, and deoxyribonucleic acid synthesis [J]. J Spinal Disord, 1991, 4(4): 428-436.
7. Shinmei M, Kikuchi T, Yamagishi, et al. The role of interleukin on proteoglycan metabolism of rabbit annulus fibrous cells cultured invitro[J]. Spine, 1988, 13(11): 1284-1289.
8. 刘勇, 胡有谷, 吕振华. 腰椎间盘细胞的培养及形态学观察[J]. 中华医学杂志, 1999, 79(2): 109-111.
9. Holy C, Sheichet M, Davies J. Engineering three dimension a bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds in vestigation initadell seeding lens it and culture period[J]. J Biomed Mater Res, 2000, 51(3): 376-382.
10. Botchwey E, Pollack S, Levine E, et al. Bone tissue engineering in a rotating bioreactor using a microcarried matrix system [J]. J Biomed Mater Res, 2001, 55(2): 242-253.
11. Qiu Q, Ducheyne P, Ayyaswamy P. 3D bone tissue engineered with bioactive microspheres in simulated microgravity[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2001, 37(3): 157-165.

12. Gruber H, Hanley E. Human disc cells in monolayer vs 3D culture: cell shape, division and matrix formation [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2000, 1(1): 1.
13. Sato M, Kikuchi T, Asazuma T, et al. Glycosaminoglycan accumulation in primary culture of rabbit intervertebral disc cells [J]. *Spine*, 2002, 26(24): 2653–2660.
14. Wang J, Bacr A, Kraus V, et al. Intervertebral disc cells exhibit differences in gene expression in alginate and monolayer culture [J]. *Spine*, 2001, 26(16): 1747–1751.
15. Horner H, Roberts R, Menage J, et al. Cell from different regions of the intervertebral disc: effect of culture system matrix expression and cell phenotype [J]. *Spine*, 2002, 27(10): 1018–1028.
16. Sato M, Asazuma T, Ishihara M, et al. An atelocollagen honeycomb-shaped scaffold with a membrane seal (ACHMS-scaffold) for the culture of annulus fibrosus cells from an intervertebral disc [J]. *J Biomed Mater Res*, 2003, 64(2): 248–256.
17. Gan JC, Ducheyne P, Vresilovic EJ. Intervertebral disc tissue engineering II: cultures of nucleus pulposus cells [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2003, 6(411): 315–324.
18. Gan JC, Ducheyne P, Vresilovic EJ, et al. Intervertebral disc tissue engineering I: characterization of the nucleus pulposus [J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2003, 6(411): 305–314.
19. Gruber HE, Leslie K, Ingram J. Cell-based tissue engineering for the intervertebral disc: in vitro studies of human disc cell gene expression and matrix production within selected cell carriers [J]. *Spine*, 2004, 29(1): 44–55.
20. Thompson JP, Oegema TR, Bradford DS. Stimulation of mature canine intervertebral disc by growth factors [J]. *Spine*, 1991, 16(3): 253–260.
21. Kang JD, Georgescu H, McIntyre-Larkin L, et al. Herniated cervical intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric oxide, interleukin-6, and prostaglandin E2 [J]. *Spine*, 1995, 20(22): 2373–2378.
22. Okuda S, Nakase T, Yonenobu K, et al. Age-dependent expression of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) and its receptors, and age-related stimulatory effect of TGF- β 1 on proteoglycan synthesis in rat intervertebral discs [J]. *J Musculoskeletal Res*, 2000, 4(2): 151–159.
23. Osada R, Ohshima H, Ishihara H, et al. Autocrine/paracrine mechanism of insulin-like growth factor-1 secretion, and the effect of insulin-like growth factor-1 on proteoglycan synthesis in bovine intervertebral discs [J]. *J Orthop Res*, 1996, 14(5): 690–699.
24. Okuda S, Myoui A, Ariga K, et al. Mechanisms of age-related decline in insulin-like growth factor-I dependent proteoglycan synthesis in rat intervertebral disc cells [J]. *Spine*, 2002, 27(22): 2421–2426.
25. Hoelscher GL, Gruber HE, Coldham G, et al. Effects of very high antibiotic concentrations on human intervertebral disc cell proliferation, viability and metabolism in vitro [J]. *Spine*, 2000, 25(15): 1871–1877.
26. Gruber HE, Fisher EC, Desai B, et al. Human intervertebral disc cells from the annulus: three-dimensional culture in agarose or alginate and responsiveness to TGF- β 1 [J]. *Exp Cell Res*, 1997, 235(1): 13–21.
27. 陈岩, 胡有谷. 转化生长因子 β 对椎间盘细胞 II 型胶原基因表达的调节作用 [J]. *中华外科杂志*, 2000, 38(9): 703–706.
28. Alini M, Li W, Markovic P, et al. The potential and limitations of a cell-seeded collagen/hyaluronan scaffold to engineer an intervertebral disc-like matrix [J]. *Spine*, 2003, 28(5): 446–453.
29. Kim D, Moon S, 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.
30. Handa T, Ishihara H, Ohshima H, et al. Effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis and matrix metal of proteinase production in the human lumbar intervertebral discs [J]. *Spine*, 1997, 22(10): 1085–1091.
31. Ishihara H, McNally D, Urban J, et al. Effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis in different regions of the intervertebral disk [J]. *J Appl Physiol*, 1996, 80(3): 839–846.
32. Hutton WC, Elmer WA, Boden SD, et al. The effect of hydrostatic pressure on intervertebral disc metabolism [J]. *Spine*, 1999, 24(15): 1507–1515.
33. Hutton W, Elmer W, Bryce L, et al. Do the intervertebral disc cells respond to different levels of hydrostatic pressure [J]? *Clinical Biomechanics*, 2001, 16(9): 728–734.
34. Liu GZ, Ishihara H, Osada R, et al. Nitric oxide mediates the change of proteoglycan synthesis in the human lumbar intervertebral disc in response to hydrostatic pressure [J]. *Spine*, 2001, 26(2): 134–141.

(收稿日期: 2004-06-23 修回日期: 2004-10-11)

(本文编辑 彭向峰)