

综述

骨髓间充质干细胞移植治疗腰椎间盘突出退变的研究进展

赵 鑫, 侯铁胜

(第二军医大学附属长海医院骨科 200433 上海市)

中图分类号: Q813.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2007)-06-0464-03

腰痛是骨科的常见症状, 给患者和社会带来了沉重的负担。研究表明大多数腰痛和椎间盘退变有关^[1], 而目前的治疗都只能缓解症状, 不能逆转椎间盘退变。随着对椎间盘退变病理认识的深入, 采用生物学方法逆转椎间盘退变成为可能。细胞治疗和组织工程就是其中方法之一。笔者对骨髓间充质干细胞(BMSC)作为种子细胞治疗椎间盘退变的研究进展做一综述。

1 BMSC 作为种子细胞的优势和可行性

生物学治疗中的种子细胞, 要求来源广泛、易得、生物活性好、不引发免疫排斥。在椎间盘退变治疗中, 研究较多的种子细胞有下面几种: (1) 自体椎间盘细胞。存在取材困难, 离体后扩增培养时间长等技术问题; 而且宿主本身椎间盘退变, 相邻节段往往也有不同程度的退变, 因此所获得的椎间盘细胞生物活性差。(2) 胚胎干细胞。具有多向分化的能力, 生物活性强, 但因伦理道德方面的争议, 同样面临来源问题。(3) 成人 BMSC。保留了多向分化的能力, 来源广泛, 生物活性强, 较上述细胞有着不可比拟的优势。同种异基因 BMSC 对宿主的 T 细胞免疫反应有免疫抑制效应, 可减小免疫排斥^[2], 使异基因 BMSC 的临床应用存在可能, 增加了干细胞来源。

在成人骨髓中大约每 $10^4 \sim 10^6$ 个细胞中有 1 个 BM-

SC, 而且 BMSC 的数量随年龄增长逐渐衰减。BMSC 表达 CD44、CD71、CD90、CD105、CD120a、CD124、CD166 等表面抗原, 不表达造血系统细胞的标志^[3,4]。在体外培养可以进行分离、纯化。在培养过程中, 不同条件的诱导刺激对 BMSC 向不同方向的细胞分化有重要影响。多数学者认为 BMSC 有能力向软骨、骨、脂肪和肌肉组织分化^[3,5]。

2 BMSC 治疗椎间盘退变的体外实验研究

体外实验诱导干细胞分化的最常见方法是使用细胞因子刺激。Steck 等^[6]采用三维培养 BMSC, 用转化生长因子 β (transforming growth factor beta, TGF- β) 刺激, 成功诱导 BMSC 向软骨样细胞分化。使用 cDNA-array 技术检测相关的 45 个基因发现, 将分化后的干细胞基因表达特征与软骨细胞和椎间盘细胞比较, 其更接近椎间盘细胞。

细胞因子可以诱导干细胞分化, 周围环境对分化也有一定影响。因成人椎间盘是没有血供的组织, Risbud 等^[7]模拟椎间盘低氧环境, 对 BMSC 向髓核样细胞分化进行了研究。作者在藻酸盐支架中三维培养大鼠 BMSC, 培养液中添加 TGF- β 进行诱导, 分别在低氧 (2% O_2) 和正常氧含量 (20% O_2) 环境下培养, 采用流式细胞仪、半定量逆转录 PCR 和 Western blot 等方法来检测。结果表明在低氧条件下, 分化后的干细胞在基因水平和蛋白水平都表达了髓核细胞在椎间盘内的低氧反应产物以及髓核细胞分泌的细胞外基质, 表达的量高于在正常氧含量环境中分化的干细胞; 并且发现了与细胞增殖有关的信号通道, 分裂原激活

第一作者简介: 男 (1975-), 博士研究生, 研究方向: 脊柱外科
电话: (021) 25072075 E-mail: zhaoxin2067@163.com

- tation therapy[J]. Spine J, 2004, 29(23): 2627-2632.
27. Yamamoto Y, Mochida J, Sakai D, et al. Reinsertion of nucleus pulposus cells activated by mesenchymal stem cells using coculture method decelerated intervertebral disc degeneration [J]. Spine J, 2004, 29(14): 1508-1522.
 28. Sobajima S, Shimer A, Kim J, et al. Feasibility of stem cell therapy for intervertebral disc degeneration [J]. Spine J, 2004, 4(2): 117-125.
 29. Le Visage C, Kim SW, Tateno K, et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with disc cells: changes in extracellular matrix biosynthesis [J]. Spine J, 2006, 31(18): 2036-2042.
 30. Sakai D, Mochida J, Iwashina T, et al. Regenerative effects of transplanting mesenchymal stem cells embedded in atelocol-

lagen to the degenerated intervertebral disc [J]. Biomaterials, 2006, 27(3): 335-345.

31. 赵梓汝, 吴小涛, 祁亚斌, 等. TGF- β 1 干预下体内兔骨髓间充质干细胞对退变椎间盘治疗的实验研究 [J]. 中国矫形外科杂志, 2006, 14(13): 1019-1022.
32. Serakinci N, Guldberg P, Burns JS, et al. Adult human mesenchymal stem cell as a target for neoplastic transformation [J]. Oncogene, 2004, 23(29): 5095-5098.
33. Ruble D, Garcia-Castro J, Martin MC, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation [J]. Cancer Res, 2005, 65(8): 3035-3039.

(收稿日期: 2006-11-22 修回日期: 2007-01-11)

(本文编辑 彭向峰)

蛋白激酶(MAPK)发生上调。他认为在低氧条件下,BMSC可以向具有髓核样细胞分子表型的细胞分化。

但细胞因子存在半衰期短的问题,如果临床使用需要反复给药;转基因的方法可以达到长时间表达目的蛋白。Richardson等^[9]研究了转基因方法诱导 BMSC 分化。他们以腺病毒介导向 BMSC 转染 SOX-9 基因(SOX-9 是一种转录因子,与干细胞向软骨细胞分化有关并且可能保持软骨细胞的表型,椎间盘组织中也有表达^[9]),分别在平面贴壁培养和聚乳酸复合物三维培养,通过实时 PCR 和 Western blot 检测,显示蛋白多糖和Ⅱ型胶原的表达明显高于对照组,而Ⅰ型胶原表达变化不明显;分化后的干细胞表现出类似髓核细胞的生物学特性,被认为向髓核细胞发生了分化。

Richardson等^[10]用人椎间盘髓核细胞与 BMSC 接触共培养。培养 7d 后用实时 PCR 的方法测定,在 BMSC 中,蛋白多糖和胶原的基因表达(椎间盘组织中的主要细胞外基质)类似髓核细胞,认为髓核细胞可以诱导 BMSC 向髓核细胞分化。Sobajima等^[11]也进行过类似的研究,得到了同样的结论。在椎间盘髓核细胞与 BMSC 共培养过程中,有学者发现干细胞同样也作用于髓核细胞,共培养过的髓核细胞移植回椎间盘内后髓核细胞增殖及基质合成能力增强^[12]。

在 BMSC 向椎间盘细胞或软骨细胞分化过程中,Nelea等^[13]认为主要困难是分化过程中很快出现了被认为是软骨肥大、软骨内骨化标志的 X 型胶原。他们研究了不同材料的培养皿对分化过程中的 X 型胶原表达的影响,发现在表面经过辉光放电等离子技术处理(glow discharge plasma treatment)过的聚丙烯和尼龙 6 两种聚合物材料的培养皿中,X 型胶原的表达受到不同程度的抑制,其中使用聚丙烯材料几乎完全可以抑制。他认为等离子处理过的聚丙烯和尼龙 6 可能是 BMSC 向椎间盘细胞表型分化的合适表面材料。

目前多数学者认为髓核细胞是修复椎间盘组织的关键。因此,体外研究多集中在摸索和研究刺激诱导条件,使人或动物的 BMSC 向髓核细胞发生分化。

3 BMSC 治疗椎间盘退变的体内实验研究

Sakai等^[14,15]对 BMSC 修复椎间盘退变进行了动物体内实验。基于干细胞分化依赖局部环境^[9],他们用新西兰大白兔建立腰椎椎间盘退变模型,以端胶原(atelocollagen)为支架将绿色荧光蛋白标志的自体 BMSC 植入退变的椎间盘内,48 周内进行 BMSC 的连续计数,采用免疫组化的方法分析 BMSC 的分化情况,二甲基亚甲兰显色法测定蛋白多糖含量,逆转录半定量 PCR 法测量Ⅰ型、Ⅱ型胶原和蛋白多糖 mRNA 表达情况。实验结果表明,移植 2 周后椎间盘内有許多细胞绿色荧光标记阳性,48 周后明显增多,与对照组比较,蛋白多糖的含量显著恢复,细胞外基质的基因明显高表达,分化的 BMSC 表现出髓核细胞的表型。

在随后的研究中,用 LacZ 基因标志自体 BMSC,同样种植在 atelocollagen 支架上植入兔退变的椎间盘内,24 周后 X 线检查发现治疗组较对照组椎间隙高度增大,MRI 检查椎间盘信号强度恢复;免疫组化和基因水平分析蛋白多糖含量增加。根据研究结果,作者认为 BMSC 可以用来做为修复退变椎间盘细胞治疗的种子细胞。

国内也有学者进行了类似的实验研究。Zhang等^[17]将 LacZ 基因标志的同种异基因 BMSC 植入新西兰大白兔退变的椎间盘内,术后 1、3、6 个月在植入组的椎间盘内可识别到 LacZ 基因标志的 BMSC 并进行了定位,检测蛋白多糖和Ⅱ型胶原的含量以及相应 m-RNA 表达均比对照组增多,认为 BMSC 可以修复退变的椎间盘组织。

在其他种类的动物实验中,Crevensten等^[18]以透明质酸凝胶为支架将荧光标记了的异基因 BMSC 注入大鼠椎间隙内,7d 和 14d 后 BMSC 数量明显减少,但 28d 后恢复到与开始相同,并且增殖能力为 100%。与对照组比较,治疗组椎间隙高度恢复,提示基质合成增加,说明 BMSC 具有修复椎间盘退变的能力。

目前体内实验还都停留在动物实验阶段,而且是将未分化的 BMSC 直接移植到椎间盘内(没有在体外诱导为髓核或纤维环细胞再移植体内的),依赖局部环境诱导 BMSC 分化为能够分泌蛋白多糖和Ⅱ型胶原等细胞基质、具有椎间盘细胞功能的细胞,从而修复退变的椎间盘。而 BMSC 在体内如何分化为椎间盘细胞的细节及如何调节控制还不清楚。

4 相关支架的研究

在 BMSC 治疗椎间盘退变的研究中,无论体内还是体外实验,支架都起着重要作用。在前文所述的研究中,分别使用了藻酸盐、透明质酸、聚乳酸、端胶原等支架材料。理想的支架材料应该类似椎间盘基质成分,能够模拟体内椎间盘环境,具有生物相容性、生物降解性、三维立体多孔结构和一定的力学特性。为了寻找使用方便的支架材料,有学者研究了对温度敏感的复合物,壳聚糖结合羧基丁基,常温下该复合物为凝胶状,而低于常温时为液态,便于注射使用。实验观察在该复合物中培养的椎间盘细胞生物性能良好^[19]。这种可注射性的复合物支架可以作为 BMSC 的载体进行修复椎间盘退变的研究。

5 展望

BMSC 来源广泛、有多向分化能力、生物活性强,可做为椎间盘退变细胞治疗的种子细胞。尽管目前这种方法还处于基础研究阶段,但实验结果令人满意,相信不久的将来会进入临床实验阶段,成为解决椎间盘退变疾病治疗的有效方法。

6 参考文献

1. Luoma K, Riihimäki H, Luukkainen R, et al. Low back pain in

- relation to lumbar disc degeneration [J]. Spine, 2000, 25 (4): 487-492.
2. Krampera M, Glennie S, Dyson J, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide [J]. Blood, 2003, 101 (9): 3722-3729.
3. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow [J]. Blood, 2001, 98 (8): 2396-2402.
4. Risbud MV, Shapiro IM, Vaccaro AR, et al. Stem cell regeneration of the nucleus pulposus [J]. The Spine J, 2004, 4 (Suppl 6): 348-353.
5. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. Science, 1999, 284 (5411): 143-147.
6. Steck E, Bertram H, Abel R, et al. Induction of intervertebral disc-like cells from adult mesenchymal stem cells [J]. Stem Cells, 2005, 23 (3): 403-411.
7. Risbud MV, Albert TJ, Guttapalli A, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells towards a nucleus pulposus-like phenotype in vitro: implications for cell-based transplantation therapy [J]. Spine, 2004, 29 (23): 2627-2632.
8. Richardson SM, Curran JM, Chen R, et al. The differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into chondrocyte-like cells on poly-L-lactic acid (PLLA) scaffolds [J]. Biomaterials, 2006, 27 (22): 4069-4078.
9. Gruber HE, Norton HJ, Ingram JA, et al. The SOX9 transcription factor in the human disc: decreased immunolocalization with age and disc degeneration [J]. Spine, 2005, 30 (6): 625-630.
10. Richardson SM, Walker RV, Parker S, et al. Intervertebral disc cell-mediated mesenchymal stem cell differentiation [J]. Stem Cells, 2006, 24 (3): 707-716.
11. Vadala G, Denaro V, Sobajima S, et al. Stem cell therapy for intervertebral disc degeneration: in vitro study [J]. J Bone Joint Surg Br, 2005, 87 (Suppl 2): 204-205.
12. Yamamoto Y, Mochida J, Sakai D, et al. Reinsertion of nucleus pulposus cells activated by mesenchymal stem cells using coculture method decelerated intervertebral disc degeneration [J]. Spine J, 2003, 3 (Suppl 5): 101-102.
13. Nelea V, Luo L, Demers CN, et al. Selective inhibition of type X collagen expression in human mesenchymal stem cell differentiation on polymer substrates surface-modified by glow discharge plasma [J]. J Biomed Mater Res A, 2005, 75 (1): 216-223.
14. Sakai D, Mochida J, Iwashina T, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells transplanted to a rabbit degenerative disc model: potential and limitations for stem cell therapy in disc regeneration [J]. Spine, 2005, 30 (21): 2379-2387.
15. Sakai D, Mochida J, Iwashina T, et al. Regenerative effects of transplanting mesenchymal stem cells embedded in atelocollagen to the degenerated intervertebral disc [J]. Biomaterials, 2006, 27 (3): 335-345.
16. Gerson SL. Mesenchymal stem cells no longer second class marrow citizens [J]. Nature Medicine, 1999, 5 (3): 262-264.
17. Zhang YG, Guo X, Xu P, et al. Bone mesenchymal stem cells transplanted into rabbit intervertebral discs can increase proteoglycans [J]. Clin Orthop Relat Res, 2005, 430: 219-226.
18. Crevensten G, Walsh AJ, Ananthakrishnan D, et al. Intervertebral disc cell therapy for regeneration: mesenchymal stem cell implantation in rat intervertebral discs [J]. Ann Biomed Eng, 2004, 32 (3): 430-434.
19. Dang JM, Sun DD, Shin-Ya Y, et al. Temperature-responsive hydroxybutyl chitosan for the culture of mesenchymal stem cells and intervertebral disc cells [J]. Biomaterials, 2006, 27 (3): 406-418.

(收稿日期: 2006-10-18 修回日期: 2007-01-31)

(本文编辑 卢庆霞)

消息

第七期“脊柱外科新进展”学习班通知

近年来, 脊柱外科领域发展迅速, 新概念、新技术层出不穷。为了让更多的医务人员了解近年来脊柱外科最新理论和技术, 更好地为患者服务, 经国家卫生部继续教育委员会批准, 由上海交通大学医学院附属瑞金医院和上海市伤骨科研究所共同主办的国家级医学继续教育项目 (项目编号: 2007-04-07-030) 第七期“脊柱外科新进展”学习班将于 2007 年 10 月 8 日~12 日在上海举行。

学习班将邀请国内外知名脊柱外科专家教授授课。作为职务续聘及职称晋升的必备条件之一, 参加学习者经考试合格可取得国家级 I 类学分 13 分。现将有关事项通知如下。

地点: 上海市瑞金二路 197 号瑞金医院。费用: 600 元/人 (含注册费、教材资料费、学分证书费), 食宿统一安排, 费用自理。联系方式: 瑞金医院继续教育办公室 沈以刚; 地址: 上海市瑞金二路 197 号, 邮编: 200025; 电话: (021) 64370045 转 662955; E-mail 地址: r662955@yahoo.com.cn。

主要授课内容: (1) 腰椎滑脱症的诊治新进展; (2) 椎间盘源性腰痛的诊治进展; (3) 胸腰椎骨折的诊断和治疗; (4) 经皮椎体强化技术; (5) 颈椎病手术治疗策略; (6) 非融合及半坚强固定技术治疗腰椎疾患; (7) 前路脊柱手术进展; (8) 下颈椎骨折脱位的治疗策略选择; (9) 计算机导航技术在脊柱外科中的应用; (10) 脊柱肿瘤的外科治疗; (11) 青少年特发性侧凸的手术治疗。