

综述

骨髓基质干细胞治疗椎间盘退变性疾病的研究进展

王超锋, 阮狄克

(海军总医院 100037 北京市)

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2009.04.15

中图分类号:R681.5

文献标识码:A

文章编号:1004-406X(2009)-04-0304-03

椎间盘(intervertebral disc, IVD)退变能导致脊柱的生物力学功能紊乱,从而影响脊柱的正常功能。对于椎间盘退变机制的研究及认识是找到能有效治疗或者阻止椎间盘退变的前提,目前认为椎间盘退变是一种与椎间盘内炎症介质和金属蛋白酶的增多引起的髓核细胞、蛋白聚糖和水含量的减少有关的疾病,其最终形态表现在椎间盘形态和功能的改变。基于这些认识,能阻断椎间盘退变或者恢复椎间盘形态和功能的生物治疗,将会在椎间盘退变性疾病的治疗中发挥重要作用。而生物疗法中利用修复受损的椎间盘组织和促进其功能恢复正成为热点之一。

在体外,髓核细胞增殖能力比较弱,传代时间较长,要培养到实验研究的细胞数量需要较长的时间,限制了它的研究及应用。骨髓基质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)相对于髓核细胞具有较强的增殖能力,且能向多种特定细胞分化^[1-3],是目前研究的热点之一。MSCs 还具有逃避正常异体移植的免疫排斥反应的能力,目前许多研究显示, MSCs 的髓核移植有可能成为治疗椎间盘退变疾病的一种新的治疗方法^[4-6]。现就国内外利用 MSCs 应用于椎间盘退变治疗的研究及工作进展综述如下。

1 自体 MSCs 在椎间盘退变治疗中的应用

许多动物实验研究显示,利用自体 MSCs 来阻止退变椎间盘的进一步发展或治疗已经退变的椎间盘,都获得了非常满意的疗效。Sakai 等^[4,5,7]研究发现,将 MSCs 注射植入胶原基质中, MSCs 可存活超过 4 周,将 MSCs-胶原基质复合体植入经髓核吸出术诱导退变的兔椎间盘后,椎间盘内蛋白多糖含量明显增加。在他们的进一步研究中发现,植入标记了绿色荧光蛋白的自体 MSCs 对纤维环结构具有保护作用,重建的椎间盘髓核能增加葡萄糖胺聚糖、硫酸角蛋白和蛋白聚糖的合成,也使得椎间盘高度有部分恢复,椎间盘含水量有部分增加。而且他们认为,重建后的椎间盘中的 MSCs 分化成了能表达 II 型胶原、硫酸角蛋白和 4-硫酸软骨素的软骨样细胞或髓核细胞。

上述研究结果表明,虽然自体 MSC 植入不能完全再生椎间盘,但是它确实能在某种程度上延缓甚至阻止椎间

盘的退变过程。为了充分发挥 MSCs 的潜在治疗作用,或许应该考虑到一些其他的影响因素,如:机械刺激因素、退变后产物的有效清除和促退变因子的失活等。然而,最重要的可能还是要使得 MSCs 正确的分化成“真正”的椎间盘细胞,或者是能有效地帮助内源性椎间盘细胞增生和分化,但是直到目前仍然未在动物实验中观察到。

2 异体 MSCs 在椎间盘退变治疗中的应用

随着干细胞治疗概念的进一步深化,研究者已经了解到异体干细胞的许多用途。而且,由于椎间盘退变是多因素导致的,自身促发因素是指个体的遗传基因具有发生椎间盘退变的倾向性及易感性,是目前比较肯定地引起椎间盘退变的主要因素之一,所以通过异体干细胞的移植能消除诸如基因遗传倾向等可能的自身促发因素^[8,9],使趋于衰老的机体自身干细胞再现活力^[10]。

事实上,由于 IVD 的无血管本质,使得它被认为是具有免疫豁免的组织,研究显示异体髓核细胞移植没有产生淋巴细胞浸润,这和 IVD 是免疫豁免组织是一致的^[11]。由于 MSCs 能逃避免疫应答,所以异体 MSCs 移植的免疫排斥问题可能会很少,甚至忽略不计。用 β -半乳糖苷酶(LacZ)标记的异体 MSCs 植入兔子的正常椎间盘髓核中,发现 6 个月时 MSCs 仍存活,且能表达蛋白聚糖和 II 型胶原^[12]。这显示出异体 MSCs 能像自体 MSCs 一样具有潜在的再生能力。在成年大鼠的正常尾骨椎间盘研究中发现,植入异体骨髓基质干细胞-透明质酸凝胶复合体后,骨髓基质干细胞能在髓核中存活超过 4 周^[13]。在比格犬等大型动物模型中也观察到,移植了异体 MSCs 8 周后,能明显促进椎间盘的再生,并能表达 FasL 蛋白(Fas-ligand),这是一种只在免疫豁免组织(如椎间盘)中发现的蛋白^[14]。但是对于异体干细胞在更长时间点的存活、在椎间盘内怎样行使功能及其转归机制值得进一步深入研究。

3 IVD 退变治疗中的 MSCs 生物诱导

在 MSCs 移植前给予生物诱导^[15,16],使其向特定的方向分化,能增加干细胞的治疗作用。在一些研究中,研究人员在细胞移植前,尝试利用细胞因子来刺激 MSCs 向软骨样细胞或者髓核样细胞分化。Steck 等^[17]研究发现,转化生长因子 β 3(TGF- β 3)能促进 MSCs 向髓核细胞表型分化。Shen 等^[18]也发现用骨形成蛋白 2(BMP-2)和 TGF- β 3 协同

第一作者简介:男(1978-),在读博士研究生,研究方向:脊柱外科
电话:(010)66958211 E-mail:fengwcf2007@163.com

通讯作者:阮狄克

作用,可以使 MSCs 细胞表达更高量 II 型胶原和蛋白聚糖,这比单独用 TGF- β 3 有明显的增加。在其他研究中,在低氧环境下,用 TGF- β 1 诱导后的以藻酸盐为支架的 MSCs 能表达更多的转录因子 9(SOX9)、II 型胶原和蛋白聚糖^[19,20]。

除了细胞因子之外,共培养也可以诱导 MSCs 向髓核(NP)细胞分化^[21-23],在二维或三维培养环境下,NP 细胞同未分化的 MSCs 共同培养都可以明显诱导 MSCs 表达髓核细胞特征性表型,如 II 型胶原和蛋白聚糖,而未观察到细胞融合;而且椎间盘细胞能通过直接接触和共培养影响 MSCs 分化,使得软骨样标志物增加,增加的多少依赖于两细胞的比率。相反的, MSCs 也能通过直接的细胞接触刺激 NP 细胞的增生及蛋白聚糖的表达。因此,利用椎间盘细胞与 MSCs 共培养或者各种相关细胞因子体外诱导分化能使得 MSCs 在体外培养过程中向“髓核样细胞”分化,提高了 MSCs 植入机体后对 IVD 退变的修复作用。

4 基因修饰的 MSCs 在椎间盘退变治疗中的应用

随着基因技术的不断发展,许多学者通过各种方法将具有促进 MSCs 向髓核细胞分化的基因或者直接表达髓核细胞表型的基因转入 MSCs,以期能更加有效地在退变的椎间盘中发挥作用。Paul 等^[24]利用含有 SOX9 表达基因的腺病毒转染人的 MSCs 后,同人工合成的聚左旋乳酸(PLLA)支架材料共培养,在 4 周的培养期间,研究者发现这种方法能增加并持续诱导蛋白聚糖及 II 型胶原的表达。李华壮等^[25]研究发现,采用腺病毒介导的 hTGF- β 1 基因转染骨髓间充质干细胞椎间盘移植后,免疫组织化学染色结果显示,与对照组比较 Ad-hTGF- β 1 转染 MSCs 移植各组阳性细胞数量和灰度值均有非常显著性差异($P<0.01$)。认为腺病毒介导的 hTGF- β 1 基因转染骨髓间充质干细胞后,移植入椎间盘后能高表达 hTGF- β 1 蛋白。李旭等^[26]进一步研究发现,利用腺病毒将 hTGF- β 1 基因转染入山羊的 MSCs 中,用来修复山羊退变的椎间盘,24 周后发现能明显减缓植入节段高度的降低,且在 4 周内组织学上表现出能高表达 hTGF- β 1、II 型胶原和蛋白聚糖。由此可见,基因修饰的 MSCs 可能是将来利用 MSCs 治疗退变椎间盘的主要研究方向。

5 椎间盘退变的修复时机

在椎间盘退变性疾病的治疗中,研究者总是假设基于细胞或者分子的再生治疗在椎间盘退变的早期应该最有效,尤其是在解剖紊乱相对出现较轻时。然而这一假设至今未能有一个科学的证实。反倒是在以兔子为研究对象的实验中发现,在退变的后期 MSCs 能取得更有效的治疗效果^[27]。虽然这一现象产生的原因还不得而知,需要进一步深入研究,但这个发现对进一步的临床实验及临床应用时机的选择具有重大的指导意义。

6 展望

基于目前的研究已经证实,在体外,通过低氧刺激、含髓核组织培养液培养、直接与髓核细胞接触等方法均能使 MSCs 表达与髓核细胞相同的细胞外基质(II 型胶原和蛋白聚糖)^[21-23],而且还可以通过向 MSCs 中引入外源性细胞因子基因(如 SOX9、TGF- β 1 等)^[24-26],自用 MSCs 自身表达这些外源性的因子来诱导其向髓核细胞分化,而表达或者提高 II 型胶原和蛋白聚糖等基质的表达。由此可见,多种方法能使 MSCs 向髓核细胞分化,行使髓核细胞的生物学功能。在将来的研究中,需要找到能使 MSCs 更高效、精确的向髓核细胞分化的方法。这将为 MSCs 应用于椎间盘退变性疾病治疗提供坚实的基础。

Crevensten^[13]和 Zhang^[12]等将异体 MSCs 植入研究动物体内分别在移植后 4 周和 6 个月都观察到了 MSCs 的存活,并检测到了 II 型胶原和蛋白聚糖等基质的表达,这不仅说明 MSCs 能耐受椎间盘中低氧、低养分、高压力的环境,而且说明 MSCs 能在这种环境下分化并行使髓核细胞的功能。这为异体 MSCs 移植治疗椎间盘退变提供很好的证据。但也有研究^[27]认为,IVD 中的低糖环境能增强细胞基质的生物合成,并对细胞的表型的维持有很大影响,而其中的高渗透性及低 PH 值可能对 MSCs 修复退变的椎间盘起到负面的作用。总而言之, MSCs 能在 IVD 中存活,并表达 II 型胶原和蛋白聚糖等,但 IVD 中的高渗透性及低 PH 值可能对 MSCs 的治疗作用有负面影响,因此需要进一步深入研究。

再生医学及组织工程研究中, MSCs 以其多向分化特性及广阔的应用前景正成为各机构的研究热点。在动物实验中,无论是自体还是异体 MSCs 都表现出了能阻止 IVD 退变,甚至是部分再生的能力。虽然 MSCs 在椎间盘退变性疾病的治疗中显示了巨大的潜力,但是在它被用到临床上为患者服务之前,还有许多亟待解决的问题。

首先,需要彻底研究清楚椎间盘退变的病因学,因为很有可能多种内源性因子会对 MSCs 细胞治疗产生影响。第二,研究年龄与椎间盘中细胞和分子生长代谢之间的关系,以便指导退变椎间盘治疗的最佳年龄及时机。第三,进一步研究髓核细胞精确的表型及生物学特性,以便确定 MSCs 细胞等细胞是否在体外或移植机体后被诱导分化成了髓核细胞,这将是进一步研究所亟须解决的问题之一。第四,研究及制备更加接近人类椎间盘退变的动物模型,以便更好地评价动物实验对人类的安全性及有效性。第五,由于异体 MSCs 在临床上更具有应用前景,所以对于异体 MSCs 移植治疗是否能像自体 MSCs 具有一样的疗效,也需要进一步的深入研究。最后,携带有外源性功能基因的 MSCs 是否能发挥更加有效的治疗效果也是下一步需要研究和解决的重点问题。

在目前的研究中,有许多细胞因子被用来对 MSCs 进行定向诱导,但还没找到一种能确实、高效地将 MSCs 诱导成髓核细胞的因子,目前迫切的需要找到一种或多种有

效的细胞因子定向诱导分化 MSCs 向髓核细胞分化。随着基因技术和组织工程技术的飞速发展, 有理由相信给 MSCs 转入具这些细胞因子的基因将是今后椎间盘退变性疾病研究及治疗的热点, 而利用椎间盘自身的微环境诱导 MSCs 细胞分化为具有髓核细胞功能的细胞也将是下一步研究的重点及热点。

由此可以看出在椎间盘退变性疾病的治疗中, 上述问题是目前利用 MSCs 研究和治疗的瓶颈问题, 也是研究者应该重点研究解决的问题。总而言之, 虽然在目前的椎间盘退变性疾病治疗中, 干细胞治疗取得了很大的进步, 但是, MSCs 相关治疗方法在临床上推广之前, 仍然有很多难题需要研究工作者努力解决。

7 参考文献

1. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411):143-147.
2. Pountos I, Jones E, Tzioupis C, et al. Growing bone and cartilage: the role of mesenchymal stem cells[J]. J Bone Joint Surg Br, 2006, 88(4):421-426.
3. Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, et al. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis [J]. Arthritis Rheum, 2003, 48(12):3464-3474.
4. Sakai D, Mochida J, Yamamoto Y, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells embedded in Atelocollagen gel to the intervertebral disc: a potential therapeutic model for disc degeneration[J]. Biomaterials, 2003, 24(20):3531-3541.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Bhardwaj R, Midha R. Synchronous lumbar disc herniation in adult twins: case report[J]. Can J Neurol Sci, 2004, 31(4):554-557.
9. Jim JJ, Noponen-Hietala N, Cheung KM, et al. The TRP2 allele of COL9A2 is an age-dependent risk factor for the development and severity of intervertebral disc degeneration[J]. Spine, 2005, 30(24):2735-2742.
10. Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells [J]. Ageing Res Rev, 2006, 5(1):91-116.
11. Hiyama A, Mochida J, Iwashina T, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells in a canine disc degeneration model [J]. J Orthop Res, 2008, 26(5):589-600.
12. 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.
13. 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.
14. Hiyama A, Mochida J, Iwashina T, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells in a canine disc degeneration model [J]. J Orthop Res, 2008, 26(5):589-600.
15. Noel D, Gazit D, Bouquet C, et al. Short-term BMP-2 expression is sufficient for in vivo osteochondral differentiation of mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells, 2004, 22(1):74-85.
16. 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.
17. Steck E, Bertram H, Abel R. Induction of intervertebral disc-like cells from adult mesenchymal stem cells [J]. Stem Cells, 2005, 23(3):403-411.
18. Shen B, Wei A, Tao H, et al. BMP-2 enhances TGF-beta3-mediated chondrogenic differentiation of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in alginate bead culture[J]. Tissue Eng Part A, 2008, 14(10):1089-1099.
19. 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.
20. 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.
21. Richardson SM, Walker RV, Parker S, et al. Intervertebral disc cell-mediated mesenchymal stem cell differentiation [J]. Stem Cells, 2006, 24(3):707-716.
22. Niu CC, Yuan LJ, Lin SS, et al. Mesenchymal stem cell and nucleus pulposus cell coculture modulates cell profile [J]. Clin Orthop Relat Res, 2008 Nov 26. [Epub ahead of print].
23. Vadalà G, Studer RK, Sowa G, et al. Coculture of bone marrow mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells modulate gene expression profile without cell fusion [J]. Spine, 2008, 33(8):870-876.
24. Paul R, Haydon RC, Cheng H, et al. Potential use of Sox9 gene therapy for intervertebral degenerative disc disease [J]. Spine, 2003, 28(8):755-763.
25. 李华壮, 周跃, 郭志良. hTGF-beta1 基因转染骨髓间充质干细胞椎间盘移植术后的表达 [J]. 颈腰痛杂志, 2006, 27(3):179-182.
26. 李旭, 侯筱魁, 汤亭亭, 等. hTGF-beta1 基因增强组织工程化髓核修复退变腰椎间盘的实验研究 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2007, 17(9):700-705.
27. Wuertz K, Godburn K, Neidlinger-Wilke C, et al. Behavior of mesenchymal stem cells in the chemical microenvironment of the intervertebral disc [J]. Spine, 2008, 33(17):1843-1849.

(收稿日期: 2008-09-11 修回日期: 2008-12-30)

(本文编辑 彭向峰)