

# 骨髓基质细胞在椎间盘退变中的应用

闫亮, 陈其昕

(浙江大学医学院附属第二医院骨科, 浙江 杭州 310009)

**【摘要】**骨髓基质细胞具有很强的自我更新和多向分化潜能, 在不同体外环境下, 可诱导多胚层来源的细胞, 如: 骨细胞、软骨细胞、神经细胞等。椎间盘退变是脊柱退行性疾病及继发病变的基础, 临床上十分多见, 目前的治疗方法虽然很多, 但均不是真正针对椎间盘退变的病理生理过程。骨髓基质细胞的细胞治疗和基因治疗作为椎间盘退变治疗的一种新方法, 从根本上阻止和逆转椎间盘退变, 必将成为治疗椎间盘退变的最佳途径。

**【关键词】** 椎间盘退变; 骨髓基质细胞; 基因, bcl2

**Application of marrow stromal cells on intervertebral disc degeneration** YAN Liang, CHEN Qixin. Department of Orthopaedics, the Affiliated Second Hospital of Medical College of Zhejiang University, Hangzhou 310009, Zhejiang, China

**ABSTRACT** Marrow stromal cells (MSC) have the ability of self-renewing and differentiation. In different vitro environments it can be induced into various cells such as osteoblast, chondrocyte, nerve cell and so on. Intervertebral disc degeneration as the basis of spinal degenerative diseases is very common in clinics. Although there are various therapeutic methods at present, none of them aims at the pathophysiology of disc degenerative. The cell and gene therapy using MSC, as a new method for the treatment of intervertebral disc degeneration, can cease and reverse disc degeneration. It will be the best therapeutic method of the intervertebral disc degeneration.

**Key words** Intervertebral disc degeneration; Marrow stromal cell (MSC); Genes bcl2

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma 2007, 20(7): 504-505 www.zgssz.com

随着分子生物学、遗传学、免疫学的发展及其在临床医学中的应用, 使得我们对椎间盘退变的发展过程有了更加深入的了解, 与此同时, 近年来已有学者开始采用新的治疗方法来干预和调控椎间盘退变的发展和进程。

## 1 椎间盘退变的原因和发病机制

椎间盘退变的原因和发病机制尚未明确, 多数学者认为是多因素协同作用的结果, 与年龄、椎间盘营养、遗传、环境等因素有关。目前研究已达分子水平, 主要是基质代谢失衡引起。椎间盘是人体最大的无血管组织, 其营养途径有: ①主要来源于终板, 营养物质通过椎体髓腔血窦-软骨界面进行扩散、渗透; ②次要部分来自纤维环, 纤维环表面有少量血供, 可将营养物质扩散至纤维环外层<sup>[1]</sup>。营养不足被认为是造成椎间盘退变的基本因素, 其他因素对椎间盘退变的影响最终通过营养的缺乏而实现。流行病学研究发现: 从青春期到中年后期椎间盘退变的发生率与年龄之间呈直线关系。老年退行性变化几乎达到“饱和”状态, 症状性椎间盘退变的发生率与年龄关系呈倒U形分布, 症状性椎间盘退变的发生高峰在中年。与年龄相关的椎间盘结构变化最主要表现在髓核、活性细胞数量减少, 蛋白聚糖和水含量减少, 非胶原蛋白(纤维化)增加。遗传因素在椎间盘退变中究竟发挥多大作用及机

制尚不清楚。从发病学上看, 很少是由单纯的遗传或环境因素引起的, 而受遗传因素影响椎间盘结构在环境因素作用下更易发生退变。应力作用被认为是最主要的环境因素, 长期反复的应力刺激是导致椎间盘退变的最主要外界因素。椎间盘内存在少量的细胞, 主要是髓核中的类软骨细胞, 分泌II型胶原和蛋白聚糖, 而纤维环中的细胞为类成纤维细胞, 分泌I型胶原和蛋白聚糖。健康的椎间盘髓核组织中富含蛋白聚糖, 由于它的聚水作用使得髓核组织的水含量极高。椎间盘细胞代谢正常是维持椎间盘细胞外基质代谢平衡的基础, 也是维持椎间盘正常生物力学功能的基础。随着椎间盘退变的发展, 蛋白聚糖基质丢失, 髓核的水含量也逐渐减少, 由凝胶样结构变成纤维软骨样结构, 从而导致椎间盘的力学和生化特征发生改变, 最终引起临床症状。我们以往的研究也发现, 在椎间盘退变过程中, 髓核组织的蛋白聚糖基质病理改变包括胶原纤维、硫酸软骨素、硫酸角质素等的改变, 进一步通过Aakian blue CEC染色对上述各基质含量进行半定量分析, 结果发现基质含量与水含量呈显著正相关关系<sup>[2]</sup>。这一研究结果进一步阐明了椎间盘退变的病理学基础。最近的研究表明, 蛋白聚糖基质的丢失是由于椎间盘退变时活性细胞数量减少, 椎间盘的合成、分解代谢不平衡所导致的, 即合成代谢减少、分解代谢增加, 合成和修复细胞外基质的能力下降<sup>[3]</sup>。因此, 如果能增加椎间盘内活性细胞的数量, 改变这种失衡状态, 就能够干预椎间盘退变的进程。

## 2 骨髓基质细胞

人体骨髓中主要存在 2 种干细胞, 造血干细胞和骨髓基质细胞 (bone marrow stromal cells MSC)。MSC 具有很强的自我更新和多向分化的潜能, 不同来源的 MSC 体外培养的生物特性大致相似, 只要培养条件合适, 细胞增殖能力极强。MSC 还具有很强的多向分化潜能, 并且经大量传代以后, 有些细胞仍能保持其多潜能性, 而有的细胞则向特定的方向分化或开始衰老。从骨髓中分离得到的 MSC 在不同体外环境下, 可诱导成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞及肌细胞等, 同时, MSC 还可向神经细胞、心肌细胞、上皮细胞、血管内皮细胞、成纤维细胞等分化。目前研究已证明, MSC 的表面抗原具有多样性, 但是没有找到其特异性抗原标记, 所以目前鉴定 MSC 主要依赖其形态水平, 因此对于 MSC 的识别也只能依靠其功能特征。目前 MSC 的分离方法主要有 4 种, 即: ①密度梯度离心法: 其机制是根据 MSC 与其他细胞的密度不同而将它分离出来; ②贴壁筛选法: 根据 MSC 在培养瓶中贴壁生长的特性, 将该细胞与其他类型的细胞进行分离; ③流式细胞仪分离法: 根据 MSC 体积小、相对缺少颗粒的特性, 对该类细胞进行分离; ④免疫磁珠分离法。流式细胞仪分离法和免疫磁珠分离法对细胞活性影响较大, 甚至导致细胞完全失去活性, 并且实验条件要求高, 需要骨髓量大; 而密度梯度离心法比贴壁筛选法复杂, 但纯度高。

## 3 MSC 在椎间盘退变中的应用

以往研究认为椎间盘细胞无合成活性, 但近年来研究表明, 椎间盘细胞积极地参与各种物质的合成, 包括不同胶原、蛋白聚糖和酶 (作用于细胞外基质的形成和重塑) 等<sup>[4]</sup>。椎间盘退变过程中由于椎间盘细胞同时丢失, 其基质的形成和降解平衡也受到影响, 因此替代这些丢失的细胞对椎间盘退变过程有积极的干预作用。MSC 作为多向分化潜能细胞已成功地应用于关节软骨缺损的治疗<sup>[5]</sup>、骨缺损的治疗<sup>[6]</sup>、脊髓损伤的治疗<sup>[7]</sup>。由于椎间盘组织与关节软骨有着类似的特征, 因此有学者将动物自体 MSC 移植于退变的椎间盘组织内, 结果发现 MSC 分化为类似椎间盘细胞的纺锤状细胞并能长时间存活, 经细胞移植治疗的退变椎间盘的形态改变、髓核细胞的丢失以及纤维环的排列紊乱等都得到一定程度的修复<sup>[8]</sup>。除此之外, 由于 MSC 还具有易于获取、培养和增殖等优点, 因此它已成为许多基因治疗的靶细胞<sup>[9-12]</sup>。在骨缺损的基因治疗研究中, 近来有学者应用腺病毒载体 BMP-2 基因传导 MSC, 体外、体内研究均发现 MSC 的增殖、分化都得到增强; 同时, 他们将 BMP-2 基因修饰的 MSC 移植到动物的骨缺损处, 结果发现该组动物的新生骨形成量比单独 BMP-2 基因治疗组或单独 MSC 移植组皆显著增加<sup>[13-14]</sup>。这一研究结果表明, 该治疗方法对骨再生或在其他组织工程中的应用都极具前景。综合上述, 基因治疗和细胞移植的研究结果, 如能把 BMP-2 等生长因子基因和 MSC 移植相结合来治疗椎间盘退变, 将有可能使椎间盘退变得到更加有效的治疗。目前, 在椎

间盘退变的基因治疗中以生长因子 BMP-2 基因研究最为深入、成熟; 而在众多的可作为转基因治疗的靶细胞中, MSC 除了自身对椎间盘退变的修复作用外, 对 BMP-2 的反应也最强<sup>[14]</sup>。于体外将生长因子 BMP-2 基因导入动物 MSC, 然后将 BMP-2 基因修饰的 MSC 移植入动物退变的椎间盘内, 使 BMP-2 基因持续地在体内表达, 并产生 BMP-2 因子, 促进蛋白聚糖合成; 同时, BMP-2 因子可增加 MSC 的活性和增殖, 使 MSC 对椎间盘退变的修复作用也得到进一步增强, 最终使椎间盘退变的进程得到进一步的干预、退变椎间盘得以修复。

## 参考文献

- 董凡, 戴克戎, 侯保魁. 椎间盘营养生理研究进展. 中国脊柱脊髓杂志, 1994 4(1): 41-44.
- 楼才俊, 陈其昕, 李方才, 等. 腰椎间盘髓核退变的 MRI 表现与病理学的相关性研究. 中华骨科杂志, 2003, 23(9): 531-535.
- Li J K in K S, Park J S, et al BMP-2 and CDM P-2 stimulation of chondrocyte production of proteoglycan. JO rthop Sci 2003 8(6): 829-835.
- Gruher HE, Hanley EN Jr Ultrastructure of the human intervertebral disc during aging and degeneration comparison of surgical and control specimens Spine 2002 27(8): 798-805
- Caplan A I Elyaderani M, Mochizuki Y, et al Principles of cartilage repair and regeneration Clin Orthop Relat Res 1997, 342(3): 254-269.
- 王贵清, 蔡道章. 骨髓基质细胞移植治疗骨缺损的实验研究. 中华创伤杂志, 2003 19(8): 474-476
- Zurita M, Vaquero J Functional recovery in chronic paraplegia after bone marrow stromal cells transplantation. Neuroreport 2004 5(7): 1105-1108
- 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. Biomaterials 2003, 24(20): 3531-3541.
- Shiner AL, Chadderton RC, Gilbertson LG, et al Gene therapy approaches for intervertebral disc degeneration. Spine 2004 29(23): 2770-2778
- Kawano Y, Kobune M, Yamaguchi M, et al Ex vivo expansion of human umbilical cord hematopoietic progenitor cells using a coculture system with human telomerase catalytic subunit (hTERT)-transfected human stromal cells. Blood, 2003 101(2): 532-540
- Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. Exp Hematol 2004, 32(5): 414-425.
- Nakanuma K, Ito Y, Kawano Y, et al Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. Gene Ther 2004 11(14): 1155-1164
- Tsuda H, Wada T, Ito Y, et al Efficient BMP-2 gene transfer and bone formation of mesenchymal stem cells by a fiber mutant adenoviral vector. Mol Ther 2003, 7(3): 354-365.
- Tsuda H, Wada T, Yamashita T, et al Enhanced osteoinduction by mesenchymal stem cells transfected with a fiber mutant adenoviral BMP-2 gene. J Gene Med 2005, 7(10): 1322-1334.

(收稿日期: 2006-05-26 本文编辑: 连智华)