

干细胞治疗椎间盘退变研究进展

赵达旺 蔚建鲁 程雷

摘要 椎间盘退变后,其自身修复能力较弱。随着再生医学理念兴起,干细胞治疗椎间盘退变在脊柱外科领域获得广泛关注,目前常用的外源性干细胞包括骨髓间充质干细胞、脂肪干细胞和脐带间充质干细胞。近年,有关干细胞治疗椎间盘退变的作用机制、所用生物工程材料以及生物安全性等方面取得一定的研究进展,该文对此作一综述。

关键词 干细胞;椎间盘退变;治疗

DOI: 10.3969/j.issn.1673-7083.2019.04.010

椎间盘退变引起的腰背痛严重影响患者生活质量^[1]。椎间盘退变的治疗包括保守治疗和手术治疗,但两者均不能逆转椎间盘退变的病理状态^[2]。近年,干细胞再生疗法为治疗椎间盘退变提供了新选择,其具有以下特点:通过产生细胞外基质重新填充椎间盘,恢复受损组织;不引起额外的椎间盘损伤^[3];可分泌生长因子调节炎症反应,加强组织再生。

随着干细胞研究不断深入,干细胞治疗椎间盘退变的体内外实验获得持续进展,生物支架得到广泛运用,同时也开展了一些临床试验,评估治疗的有效性和安全性。椎间盘退变的干细胞治疗中,种子细胞选择是首要考虑的问题,常用的外源性干细胞包括骨髓间充质干细胞、脂肪干细胞和脐带间充质干细胞。本文对应用干细胞治疗椎间盘退变的研究进展作一综述。

1 骨髓间充质干细胞

1.1 体外实验

骨髓间充质干细胞相对容易获取且具有免疫调节功能^[4],近年来很多学者将其作为种子细胞用于椎间盘退变治疗的研究中。Gan等^[5]的研究探索了相对宽幅度动态压缩对3D骨髓间充质干细胞培养系统的影响,发现该培养系统在无压缩组和低幅度压缩组均表现出良好的细胞相容性和细胞活力,而在中等幅度和高幅度压缩组则出现细胞活力下降,这表明低压机械环境有利于骨髓间充质干细胞的成骨分化;与无压缩组相比,低幅度压缩组的糖胺聚糖

和羟脯氨酸的 mRNA 和蛋白表达均增加,这将更有利于细胞外基质沉积。他们推测,低幅度压缩促进3D培养系统的合成代谢可能是通过瞬时感受器电位香草素4通道依赖途径完成的。Gao等^[6]探究了机械应力促进髓核细胞外基质合成的作用机制,采用0~0.2 MPa和0.1 Hz的周期性机械应力作用于髓核细胞,发现周期性机械应力能够有效促进Ⅱ型胶原 $\alpha 1$ 链、聚集蛋白聚糖和整合素 $\alpha 1$ 的 mRNA 表达,并促进磷脂酶C $\gamma 1$ 的磷酸化。

外泌体是细胞分泌的特异性膜泡,在细胞通讯中发挥重要作用。Lu等^[7]研究发现,髓核细胞和骨髓间充质干细胞均可分泌外泌体,髓核细胞来源外泌体可促进骨髓间充质干细胞迁移并诱导其分化为髓核样表型的细胞;骨髓间充质干细胞来源外泌体可促进髓核细胞增殖并产生新的细胞外基质。深入研究退变髓核细胞与外源性干细胞之间的外泌体通讯机制具有重要意义。

1.2 体内实验

骨形态生成蛋白(BMP)-7是转化生长因子(TGF)- β 超家族的一员,其可增加髓核细胞活力,促进细胞外基质产生,增高椎间盘高度,上调髓核蛋白聚糖的表达^[8]。Xu等^[9]的研究发现,慢病毒介导的过表达BMP-7可诱导骨髓间充质干细胞向髓核表型分化,Smad1沉默可抑制以上作用,表明BMP-7在细胞外基质重构方面的作用由Smad信号转导通路介导。

张子琦等^[10]将微囊化软骨细胞与骨髓间充质干细胞共培养,结果显示共培养后骨髓间充质干细胞的增殖能力未受明显影响,但增加了软骨细胞的部分表面特征,并且能够合成蛋白多糖及Ⅱ型胶原

基金项目:国家自然科学基金(81572191)

作者单位:250012 济南, 山东大学齐鲁医院(赵达旺、蔚建鲁、程雷);250012 济南, 山东大学齐鲁医学院(赵达旺)

通信作者:程雷 E-mail: chengleiyx@126.com

蛋白;将共培养后的骨髓间充质干细胞植入椎间盘退变的动物模型,与对照组相比,植入干细胞后椎间盘显示更好的形态、结构及力学特征。

在组织工程中,生物支架能够维持细胞功能并为细胞提供机械保护。Gan 等^[11]成功建立葡萄聚糖-明胶水凝胶装载 TGF- β 的生物支架,并使用该支架有效诱导小鼠骨髓间充质干细胞向髓核样细胞分化,促进相关细胞外基质基因的表达。Wu 等^[12]制作功能性自组装肽纳米纤维支架,并验证该支架具有促进骨髓间充质干细胞髓核样分化、增殖以及趋化性迁移的能力。生物材料负载干细胞的策略是再生医学的研究重点,材料植入后的体内免疫排斥反应需得到更多关注。

1.3 临床试验

目前,已有学者将骨髓间充质干细胞用于临床试验。Elabd 等^[13]研究低氧条件下培养自体骨髓间充质干细胞治疗慢性腰背痛的可行性和长期安全性,发现 5 例患者中 4 例突出物体积减小,在长期随访中 5 例患者均达到可保持椎间盘高度或仅轻度降低,生活质量问卷调查显示大多数患者达到病情总体改善,力量和活动能力均有提高。尽管该研究为小样本(5 例患者)临床试验,但也证实了骨髓间充质干细胞治疗人椎间盘退变的有效性和生物安全性。

2 脂肪干细胞

脂肪干细胞也是一类具备再生椎间盘潜力的干细胞,其在标准培养条件下即可扩增,并展现出多能分化潜力。

2.1 体外实验

Sun 等^[14]的研究是首个在非生理机械刺激环境下评估脂肪干细胞对髓核细胞作用的体外实验。研究表明,脂肪干细胞通过抑制 caspase-9 和 caspase-3 阻止髓核凋亡;通过增加细胞外基质的产生促进金属蛋白酶组织抑制因子的表达,抑制基质金属蛋白酶、聚蛋白多糖酶和促炎因子的表达,显示出对髓核细胞的有益作用。尽管研究中未发现脂肪干细胞对髓核标记物表达的影响,但其可抑制细胞角蛋白 8 的减少。

2.2 组织工程学实验

在干细胞治疗椎间盘退变的研究中选择合适的干细胞支架仍是重要问题之一,可注射性黏弹性支架是较好的选择。水凝胶样支架在递送细胞过程中呈低黏度,注射后可原位凝胶化,起到填充微观、宏

观裂缝以及恢复椎间盘高度的作用^[15],因此水凝胶样支架是理想的支架系统。

交联是稳定生物材料最常用的方法^[16-17],许多水凝胶样支架的凝胶速度由交联调节。交联方式主要有物理交联和化学交联,物理交联(如光交联)可能对递送细胞产生毒性,化学交联(如戊二醛等)能有效提高生物支架稳定性,但交联剂的毒性和诱导钙化性限制了其长期植入的可能^[18-19]。

京尼平因具有天然低毒性而被广泛应用于研究中。Zhou 等^[20]使用不同浓度京尼平交联 II 型胶原生成支架,通过检测支架的微观结构、表面形貌、机械强度、孔隙率、溶胀性质和生物学稳定性评估支架性质,通过测定细胞增殖、基因和蛋白质表达量评估支架对脂肪干细胞的生物学效应。他们的研究证实:①京尼平可增加 II 型胶原支架稳定性,但也改变了支架构型和 II 型胶原的内在特性;②含 0.1% 京尼平的交联支架在保持支架构型基础上可提升生物稳定性;③含 0.1% 京尼平的交联支架可促进脂肪干细胞增殖和髓核样分化,并促进音猬因子基因和蛋白的表达。

Zhou 等^[21]制作的京尼平交联 II 型胶原-硫酸软骨素复合支架具备原位凝胶化能力,并在体内外实验中验证该支架具有诱导脂肪干细胞髓核样分化及再生椎间盘的能力。他们首先在研究中确定含 0.02% 京尼平的交联支架能提供最好的细胞相容性。体外实验发现,与对照组(仅含脂肪干细胞)和交联支架负载脂肪干细胞组相比,含 0.02% 京尼平的交联支架负载脂肪干细胞组的聚集蛋白聚糖基因、Sox9 基因及其蛋白表达均更高,Krt19 表达量在第 14 天分别为对照组的 4.87 倍和交联支架负载脂肪干细胞组的 3.29 倍,Pax1 表达量在第 7 天和第 14 天分别是对照组的 4.99 倍和 11.62 倍(聚集蛋白聚糖、Sox 9 基因和蛋白的表达水平代表脂肪干细胞基质的合成能力,Krt19 和 Pax1 则是髓核细胞的特异性基因标志物)。在动物实验中,他们对大鼠尾退变椎骨注射载有脂肪干细胞的支架系统,通过 X 线和 MRI 检查测定椎间盘高度指数,进行组织学分析、免疫组化分析,以及硫酸盐黏多糖及羟脯氨酸含量测定,发现该支架系统有利于髓核组织再生。

在该类支架的相关研究中,交联剂的种类和浓度、水凝胶样支架的成分、缓释生物粒子以及材料的表面改性等均是需进一步研究的方向,这些研究可

为治疗椎间盘退变提供最佳的生物材料。

除水凝胶样支架外,生物支架也有应用。Zhou等^[22]通过模拟天然髓核成分制作脱细胞髓核支架,并将其加载脂肪干细胞后注射于兔椎间盘退变模型,结果证实脱细胞髓核递送系统具有与新鲜髓核组织相似的机械性能和生物相容性,并能够诱导脂肪干细胞的髓核样分化,增加细胞外基质合成。生物支架因具有低免疫原性和良好的生物相容性,是治疗人椎间盘退变的理想支架系统。

2.3 临床试验

Kumar等^[23]开展了脂肪干细胞治疗椎间盘退变的I期临床试验。他们将Tissuefill®(韩国食品药品安全部批准其用作细胞递送和缺损组织填充的材料)联合自体脂肪干细胞注射入10例椎间盘退变患者的退变部位,在治疗及12个月的随访中未发现细胞移植引起的不良事件和其他严重不良事件,未观察到骨赘形成和椎间盘缩小;治疗前患者的疼痛视觉模拟评分(VAS)为(6.50±1.27)分,治疗后1个月和12个月VAS降低至(4.60±1.07)分和(2.90±1.66)分;治疗前患者的腰椎功能障碍指数(ODI)为42.80%±15.03%,治疗后1个月和12个月ODI下降至31.20%±13.86%和16.80%±9.77%;表观弥散系数图显示,3例患者的椎间盘含水量增加。该临床试验的成功表明了脂肪干细胞治疗椎间盘退变的有效性和安全性将对干细胞治疗人椎间盘退变的研究产生重要影响。

3 脐带间充质干细胞

与其他种类干细胞相比,脐带间充质干细胞治疗椎间盘退变的研究报道较少。Qi等^[24]的研究发现,脐带间充质干细胞能够通过增加Bcl-2表达,降低Bax表达,调节细胞凋亡和有丝分裂,以保护髓核间充质干细胞免受高糖损伤。脐带间充质干细胞能够显著上调髓核中II型胶原和聚集蛋白聚糖的表达,从而促进细胞外基质的生成。此外,脐带间充质干细胞可通过p38丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号转导通路减轻高糖环境下细胞外基质的降解。这些均有利于椎间盘退变的修复。

Pang等^[25]数年前进行了脐带间充质干细胞治疗慢性椎间盘源性腰痛的临床试验,在治疗后的2年随访中,2例患者的VAS、ODI评分均明显下降。

4 结语

近年来,椎间盘退变的干细胞治疗出现许多新颖研究。在动物模型上进行干细胞治疗椎间盘退变

的有效性已得到广泛证实,但还需要开展更多的体内外实验,进一步了解干细胞的分化机制,确定高效安全的干细胞种类和数量,寻找最佳载体和递送方法。进行临床转化前,必须在动物模型上验证其疗效和安全性。

参考文献

- [1] Maher C, Underwood M, Buchbinder R. Non-specific low back pain[J]. *Lancet*, 2017, 389(10070): 736-747.
- [2] Wang MY, Vasudevan R, Mindea SA. Minimally invasive lateral interbody fusion for the treatment of rostral adjacent -segment lumbar degenerative stenosis without supplemental pedicle screw fixation[J]. *J Neurosurg Spine*, 2014, 21(6): 861-866.
- [3] 王挽涛, 祁全, 赵大航. 椎间盘退变的再生修复治疗[J]. *中国矫形外科杂志*, 2018, 26(13): 1210-1214.
- [4] Liu Y, Wei J, Zhao Y, et al. Follistatin-like protein 1 promotes inflammatory reactions in nucleus pulposus cells by interacting with the MAPK and NF- κ B signaling pathways [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(26): 43023-43034.
- [5] Gan Y, Tu B, Li P, et al. Low magnitude of compression enhances biosynthesis of mesenchymal stem cells towards nucleus pulposus cells via the TRPV4-dependent pathway [J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 7061898.
- [6] Gao G, He J, Nong L, et al. Periodic mechanical stress induces the extracellular matrix expression and migration of rat nucleus pulposus cells by upregulating the expression of integrin α 1 and phosphorylation of downstream phospholipase C γ 1[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(3): 2457-2464.
- [7] Lu K, Li HY, Yang K, et al. Exosomes as potential alternatives to stem cell therapy for intervertebral disc degeneration: in-vitro study on exosomes in interaction of nucleus pulposus cells and bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 108.
- [8] An HS, Takegami K, Kamada H, et al. Intradiscal administration of osteogenic protein-1 increases intervertebral disc height and proteoglycan content in the nucleus pulposus in normal adolescent rabbits[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2005, 30(1): 25-31.
- [9] Xu J, XQ E, Wang NX, et al. BMP7 enhances the effect of BMSCs on extracellular matrix remodeling in a rabbit model of intervertebral disc degeneration[J]. *FEBS J*, 2016, 283(9): 1689-1700.
- [10] 张子琦, 杨佩, 王春生, 等. 微囊化软骨细胞诱导间充质干细胞定向分化治疗兔椎间盘退变的实验研究[J]. *西安交通大学学报: 医学版*, 2019, 40(1): 49-54.
- [11] Gan Y, Li S, Li P, et al. A controlled release codelivery system of mscs encapsulated in dextran/gelatin hydrogel with TGF- β 3-loaded nanoparticles for nucleus pulposus

- regeneration[J]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016: 9042019.
- [12] Wu Y, Jia Z, Liu L, et al. Functional self-assembled peptide nanofibers for bone marrow mesenchymal stem cell encapsulation and regeneration in nucleus pulposus[J]. *Artif Organs*, 2016, 40(6): E112-E119.
- [13] Elabd C, Centeno CJ, Schultz JR, et al. Intra-discal injection of autologous, hypoxic cultured bone marrow-derived mesenchymal stem cells in five patients with chronic lower back pain: a long-term safety and feasibility study[J]. *J Transl Med*, 2016, 14: 253.
- [14] Sun Z, Luo B, Liu ZH, et al. Adipose-derived stromal cells protect intervertebral disc cells in compression; implications for stem cell regenerative disc therapy[J]. *Int J Biol Sci*, 2015, 11(2): 133-143.
- [15] Thorpe AA, Boyes VL, Sammon C, et al. Thermally triggered injectable hydrogel, which induces mesenchymal stem cell differentiation to nucleus pulposus cells; potential for regeneration of the intervertebral disc[J]. *Acta Biomater*, 2016, 36: 99-111.
- [16] Martinez AW, Caves JM, Ravi S, et al. Effects of crosslinking on the mechanical properties, drug release and cytocompatibility of protein polymers[J]. *Acta Biomater*, 2014, 10(1): 26-33.
- [17] Zhou X, Tao Y, Wang J, et al. Three-dimensional scaffold of type II collagen promote the differentiation of adipose-derived stem cells into a nucleus pulposus-like phenotype[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2016, 104(7): 1687-1693.
- [18] Jayakrishnan A, Jameela SR. Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices[J]. *Biomaterials*, 1996, 17(5): 471-484.
- [19] Jorge-Herrero E, Fernández P, Turnay J, et al. Influence of different chemical cross-linking treatments on the properties of bovine pericardium and collagen[J]. *Biomaterials*, 1999, 20(6): 539-545.
- [20] Zhou X, Tao Y, Chen E, et al. Genipin-cross-linked type II collagen scaffold promotes the differentiation of adipose-derived stem cells into nucleus pulposus-like cells[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2018, 106(5): 1258-1268.
- [21] Zhou X, Wang J, Fang W, et al. Genipin cross-linked type II collagen/chondroitin sulfate composite hydrogel-like cell delivery system induces differentiation of adipose-derived stem cells and regenerates degenerated nucleus pulposus[J]. *Acta Biomater*, 2018, 71: 496-509.
- [22] Zhou X, Wang J, Huang X, et al. Injectable decellularized nucleus pulposus-based cell delivery system for differentiation of adipose-derived stem cells and nucleus pulposus regeneration[J]. *Acta Biomater*, 2018, 81: 115-128.
- [23] Kumar H, Ha DH, Lee EJ, et al. Safety and tolerability of intradiscal implantation of combined autologous adipose-derived mesenchymal stem cells and hyaluronic acid in patients with chronic discogenic low back pain: 1-year follow-up of a phase I study[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 262.
- [24] Qi L, Wang R, Shi Q, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cell conditioned medium restored the expression of collagen II and aggrecan in nucleus pulposus mesenchymal stem cells exposed to high glucose[J]. *J Bone Miner Metab*, 2019, 37(3): 455-466.
- [25] Pang X, Yang H, Peng B. Human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation for the treatment of chronic discogenic low back pain[J]. *Pain Physician*, 2014, 17(4): E525-E530.

(收稿:2019-01-25)

(本文编辑:杨晓娟)