

基础研究

两种同源间充质干细胞在接触式共培养体系下
对退变髓核细胞生物学影响的比较周明越^{1,2}, 姜刚强¹, 张 燕¹, 刘子双¹, 阳普山¹, 白雪东¹, 李 威¹, 张 超¹, 阮狄克¹

(1 海军总医院骨科 100048 北京市; 2 第二军医大学研究生院 200433 上海市)

【摘要】目的:比较两种人间充质干细胞在接触式共培养体系下对退变髓核细胞生物学功能的影响。**方法:**取同一例腰椎间盘突出症患者的退变髓核组织、脂肪组织和骨髓组织,分别分离培养退变髓核细胞(NPCs)、脂肪间充质干细胞(ADSCs)和骨髓间充质干细胞(BMSCs)。取3种细胞传代至第3代的细胞进行接触式共培养。共培养前,利用PKH26对第3代退变NPCs进行染色标记,然后按1:1的细胞比例,将NPCs分别与ADSCs和BMSCs在普通6孔板内进行接触式共培养。实验分为3组,A组为单独培养的NPCs,为对照组;B组为与ADSCs共培养的NPCs;C组为与BMSCs共培养的NPCs。共培养第7天时,利用MoFlo高速流式细胞分选仪将共培养的细胞进行分选,获取各组NPCs。然后提取各组NPCs的总RNA,进行反转录后,再利用Real-Time PCR技术检测各组NPCs的Ⅱ型胶原、蛋白多糖和SOX-9基因的相对表达量。将Ⅱ型胶原、蛋白多糖和SOX-9基因的相对表达量按分组进行组间 t 检验, $P<0.05$ 为有统计学差异。**结果:**从退变髓核组织、骨髓组织和脂肪组织中,均成功分离培养出NPCs、BMSCs和ADSCs。待各细胞传至第3代时,成功利用PKH26对NPCs进行染色标记。按实验分组将各细胞进行接触式共培养后第7天,成功利用MoFlo高速流式细胞分选仪将共培养细胞进行分选,获取各组NPCs。经提取各组NPCs的总RNA,反转录并进行Real-time PCR后,获取各组NPCs的Ⅱ型胶原、蛋白多糖和SOX-9基因相对表达量,A组分别为 1.03 ± 0.04 , 1.05 ± 0.07 , 1.04 ± 0.17 ;B组分别为 5.26 ± 0.24 , 7.71 ± 0.21 , 3.84 ± 0.25 ;C组分别为 9.33 ± 0.39 , 11.07 ± 0.34 , 5.64 ± 0.26 ;B、C组NPCs的Ⅱ型胶原、蛋白多糖和SOX-9基因相对表达量与A组比较显著性增加($P<0.05$);C组与B组比较,各指标基因相对表达量显著性增加($P<0.05$)。**结论:**在接触式共培养条件下,BMSCs和ADSCs对退变NPCs均具有营养激活效应;BMSCs对退变NPCs的激活效应比ADSCs更好,对于椎间盘退行性疾病的生物学治疗可能更具优势。

【关键词】接触式共培养;间充质干细胞;退变髓核细胞;比较研究

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2014.06.10

中图分类号:R681.5,Q813.1,Q786 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2014)-06-0542-08

Comparative study of the biological effects from two kinds of human stromal stem cells to degenerative nucleus pulposus cells under the condition of contact co-culture/ZHOU Mingyue, JIANG Gangqiang, ZHANG Yan, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2014, 24(6): 542-549

【Abstract】 Objectives: To compare the biological effects of degenerative nucleus pulposus cells when co-cultured with two kinds of people's mesenchymal stem cells under a contact system. **Methods:** The degenerative nucleus pulposus tissue, dipose tissue and bone marrow were obtained from the same patient who suffered from lumbar disc herniation during the surgery, and then degenerative nucleus pulposus cells (NPCs), adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) and bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) were isolated and cultured. The third generation of cells had the direct cell-cell contact co-culture. First, the third generation of degeneration NPCs was labled by PKH26, and then the NPCs with ADSCs and BMSCs were put in 6-well plates to contact co-culture at the ratio of 1:1. There were three groups: group A was NPCs cultured alone, as the control group; group B was NPCs co-cultured with ADSCs; group C was NPCs co-cultured with BMSCs. On the seventh day after co-culture, BMSCs, ADSCs and NPCs were seperated by the

基金项目:国家自然科学基金(编号:81250019)

第一作者简介:男(1986-),医师,硕士在读,研究方向:脊柱外科

电话:(010)68780323 E-mail:zmy15040496805@163.com

通讯作者:阮狄克 E-mail:ruandikengh@163.com;张超 E-mail:zhangchaongh@163.com

co-culture flow cytometry, the total RNA of each group was extracted, then the Real-Time PCR technology was used to detect the relative gene expression of type II collagen, proteoglycan and SOX-9. The results were statistical analyzed by *t* test between every two groups, $P < 0.05$ meant statistically significant. **Results:** After obtained the degenerative nucleus pulposus tissue, fat tissue and bone marrow tissue, the NPCs, ADSCs and BMSCs were successfully isolated and cultured. When cells were transmitted to the third generation, the NPCs labeled by PKH26 were got successfully. On the seventh day after co-culture, MoFlo high-speed flow cytometry was used to separate and obtain the NPCs in group B and group C. Total RNA was extracted, after reversing transcription and Real-time PCR, the collagen protein II, proteoglycan and SOX-9 gene relative expression of NPCs in each group were obtained. Collagen protein II, proteoglycan and SOX-9 of NPCs in group A was 1.03 ± 0.04 , 1.05 ± 0.07 , 1.04 ± 0.17 ; 5.26 ± 0.24 , 7.71 ± 0.21 , 3.84 ± 0.25 respectively in group B; and 9.33 ± 0.39 , 11.07 ± 0.34 , 5.64 ± 0.26 respectively in group C. Compared with group A, the nucleus pulposus cells of group B and C had a significant increase of collagen protein II, proteoglycan and SOX-9 gene expression ($P < 0.05$); The group C had a higher significant increase of gene expression of collagen protein II, proteoglycan and SOX-9 than group B ($P < 0.05$). **Conclusions:** BMSCs and ADSCs can both stimulate and activate the degenerative NPCs under the condition of contact co-culture. Compared with ADSCs, BMSCs have a stronger activation effect on degenerative NPCs, it may be more suitable for degenerative disc diseases' biological treatment.

[Key words] Contact co-culture; Mesenchymal stem cells; Degenerative nucleus pulposus cells; Comparative study

[Author's address] Department of Orthopaedics, Navy General Hospital, Beijing, 100048, the Second Military Medical University, Shanghai, 200433, China

椎间盘退行性疾病 (disc degeneration disease, DDD) 是临床上引发腰腿痛的主要原因之一, 且随着人口老龄化的加剧, 其发生率逐年升高。目前, 其主要治疗方法为保守治疗和手术治疗, 虽取得了一定疗效, 但都未从根本上延缓或逆转椎间盘的退变。随着对椎间盘退变研究的逐步深入以及共培养技术的广泛应用, 发现髓核细胞 (nucleus pulposus cells, NPCs) 与干细胞在共培养条件下, 可明显促进 NPCs 的细胞外基质蛋白和基因的表达^[1-3], 能够在一定程度上改善椎间盘退变过程中细胞外基质分泌、液体含量及髓核内微环境改变这些关键因素。既往研究表明, 来源于骨髓的骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 和来源于脂肪的脂肪间充质干细胞 (adipose-derived stem cells, ADSCs) 在共培养条件下对退变 NPCs 都具有一定的营养、激活效应^[4,5], 但两种间充质干细胞对 NPCs 的生物学作用的差别, 鲜有报道。本研究拟通过人 ADSCs 和 BMSCs 分别与退变 NPCs 进行接触式细胞共培养, 比较两种人来源间充质干细胞对退变 NPCs 的激活能力, 为干细胞移植治疗椎间盘退行性疾病探索出理想的种子细胞。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂

6 孔培养板 (Corning, 美国); PBS (Sigma, 美国), DMEM/F12 培养基 (Hyclone, 美国), 胰蛋白酶 (Solaibo), 特级胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (Gibco 公司, 美国), Trizol Riagent 试剂 (Invitrogen, 美国); 引物由上海生工公司合成; Real-Time PCR 试剂盒 (Takara, 日本)。Real-Time PCR 仪 (BIO-RAD MJ Miniption detector for PTC1148, 美国); PKH26 试剂盒 (Sigma 公司, 美国) 荧光显微镜 (Olympus 公司, 日本), MoFlo 高速流式细胞分选仪 (贝克曼库尔特公司, 美国)。

1.2 细胞来源

选取 1 例腰椎间盘突出症患者, 向患者及家属告知相关情况, 取得其同意并签字。患者术前腰椎影像学检查显示 L4/5 椎间盘突出, 椎间盘 Pfirrmann 分级为 IV 级 (图 1)。术中经椎弓根向椎体穿刺, 获取骨髓组织, 取手术切口周围皮下脂肪组织, 同时取退变髓核组织。所有组织均来自同一例患者。

1.3 细胞的分离培养

1.3.1 人 NPCs 的分离培养 术中取退变髓核组织。在超净台中分离髓核组织, 用 PBS 冲洗 2 遍,



图 1 患者男性, 45 岁, 术前 MRI 示 L4/5 椎间盘突出, Pfirrmann 分级为 IV 级

Figure 1 Male, 45 years, pre-op MRI showed the intervertebral disc of L4/5 showed herniation, the degree of degeneration is Pfirrmann grade IV

将髓核组织剪成约 1.0mm^3 大小, 置入含 0.2mg/ml II 型胶原酶溶液的离心管中, 在 37°C 恒温箱中消化 4h, 用无菌不锈钢丝网 (200mm) 过滤组织碎片。2500r/min 离心 5min, 弃上清液, 收集的细胞加入含 10%FBS 的 DMEM/F12 培养基, 于 37°C 、5% CO_2 恒温箱中培养。每 2~3d 换液, 细胞 1 周左右贴壁, 待细胞融合至 80% 左右时进行常规传代培养。

1.3.2 人 ADSCs 的分离培养 术中取皮下脂肪组织。用 PBS 冲洗 2 遍, 眼科剪去除其纤维及血管成分, 剪碎脂肪组织, 置入含 0.1mg/ml I 型胶原酶溶液的离心管中, 在恒温 37°C 消化 40min 后, 无菌不锈钢丝网 (200mm) 过滤组织碎片。2500r/min 离心 5min, 弃上清液, 重复此操作 1 次。收集 ADSCs, 种于 25cm^2 培养瓶内, 加入含 10%FBS 的 DMEM/F12 培养基, 于 37°C 、5% CO_2 恒温箱中培养。细胞 5~7d 贴壁, 贴壁后每 2~3d 换液, 待细胞融合至 80% 左右时进行传代。

1.3.3 人 BMSCs 的分离培养 术中经椎弓根取骨髓组织。无菌条件下, 用含肝素 0.01% PBS 稀释至 15ml 后移入离心管中, 2500r/min、常温离心 20min, 弃上清; 沉淀物用不含血清的 DMEM/F12 培养基混匀, 取 6ml 混合液叠加于 3ml Ficoll 淋巴细胞分离液 (密度为 $1.077 \times 10^3\text{g/L}$) 上, 2500r/min、常温离心 20min。用无血清 DMEM/F12 培养基洗涤 2 次, 收集 BMSCs, 种于 25cm^2 培养瓶内, 加入含 10%FBS 的 DMEM/F12 培养基, 于 37°C 、5% CO_2 恒温箱中培养。3d 后半量换液, 贴壁后每 2~3d 换液, 待细胞融合至 80% 左右时进行

传代。

1.4 细胞形态学观察 在对 NPCs、ADSCs 和 BMSCs 分离培养过程中, 利用倒置显微镜, 每天对细胞形态及细胞融合率进行观察, 并适时进行换液及传代, 确保培养的细胞正常生长。

1.5 细胞接触式共培养及分选

进行接触式共培养的细胞均为培养至第 3 代的细胞。待细胞传至第 3 代后, 利用 PKH26 对 NPCs 进行标记, 再分别与 ADSCs 及 BMSCs 共培养, 此后, 利用荧光显微镜每天对共培养的不同种细胞的形态进行观察并记录, 适时给予换液。单独培养的 NPCs 为 A 组, 作为对照组, 与 ADSCs 共培养的 NPCs 为 B 组, 与 BMSCs 共培养的 NPCs 为 C 组。

取第 3 代 NPCs, 接种于普通 6 孔板, 接种密度为 $6 \times 10^3/\text{cm}^2$, 加入含有 10% 小牛血清的 DMEM/F12 培养基, 于 37°C 、5% CO_2 恒温箱中培养。待细胞贴壁后, 更换为无血清 DMEM/F12 培养基继续培养。

取第 3 代 NPCs, PBS 清洗 2 遍, 计数后用 DMEM/F12 培养基重悬, 调整细胞浓度为 $1.0 \times 10^6/\text{ml}$, 加入浓度为 $4\mu\text{mol/L}$ 的 PKH26 染料混匀, 室温反应 5min, 加入 2ml FBS 终止标记反应, 离心 10min, 再用无 FBS 的 DMEM/F12 培养基离心 3 次。分别按 1:1 加入 ADSCs 和 BMSCs 进行共培养。加入含 10% 小牛血清的 DMEM/F12 培养基, 于 37°C 、5% CO_2 恒温箱中培养。3d 后半量换液, 贴壁后每 2~3d 换液。并于培养后第 7 天消化收集细胞, 通过直径 $30\mu\text{m}$ 的无菌滤网, 除去细胞团块, 利用 MoFlo 高速流式细胞分选仪进行细胞分选。激发波长为 551nm, 发射波长为 567nm。荧光阳性细胞为标记的 NPCs, 阴性细胞为 BMSCs、ADSCs。细胞收集于含 PBS 液的离心管中。

1.6 细胞总 RNA 提取和 Real-Time PCR 检测

共培养后第 7 天, 收集 A 组单独培养的 NPCs, 利用 MoFlo 高速流式细胞分选仪分别收集 B、C 组与 BMSCs 及 ADSCs 共培养的 NPCs, 应用 Trizol 溶液提取技术提取各组 NPCs 总 RNA。弃上清后加入 1ml Trizol 溶液, 吹打并混匀, 在室温下静置 5min, 加入氯仿 0.2ml 混匀, 室温静置 5min, 在 4°C 、12000r/min 条件下离心 5min, 吸取上层水相加入 1.5ml EP 管中, 加入等体积的异丙醇, 混匀后室温静置 10min; 在 4°C 、12000r/min 条件下

离心 10min, 弃上清后加入冰冷的 75% 无水乙醇 1ml 洗涤, 在 4℃、7500r/min 条件下离心 10min, 弃上清, 然后上述操作重复一次。底层可见白色透明物, 即为提取的 RNA, 空气中干燥约 20min, 溶于 20μl DEPC 水中。紫外分光光度仪检测提取的 RNA 的纯度和浓度, OD260/OD280 比值在 1.8~2.0, 将提取的细胞总 RNA 置入 -80℃ 冰箱中保存。

取 3μl RNA 模板, 加入 1μl 随机引物, 1μl AMV 反转录酶, 8μl dNTP, 4μl 缓冲液, 3μl DEPC 水, 使反应体系总体积达到 20μl, 于 42℃ 反转录 1h, 获取 cDNA, 再通过 Real-Time PCR 对 II 型胶原、蛋白多糖、SOX-9 进行扩增, 引物序列根据文献报道合成^[9]。管家基因 GAPDH 作为内参, 由 Primer 5.0 软件生成引物序列: 人 GAPDH (上游: CTTG-GTATCGTGGAAGGACTC; 下游: GTAGAGGCA-GGGATGATGTTCT) (NM_002046.4)。Real-Time PCR 反应步骤: 95℃ 20s 激活酶; 95℃ 5s, 60℃ 20s, 重复 40 个循环, 每次循环读取 CT (cycle threshold) 值。裂解反应为 95℃~60℃, 每 0.2℃ 读取 CT 值, 得到裂解曲线。反应体系为 20μl 体系, 包括上游引物 0.5μl (20μM)、下游引物 0.5μl (20μM)、模板 1.0μl、SYBR MIX 10μl 及水 8.0μl。采用三复孔检测, 取 CT 平均值。用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算目的基因的相对表达量。共培养实验单独重复 3 次 ($n=3$)。

1.7 统计学分析

用 SPSS 18.0 进行统计学分析, 检测结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 将 3 组 NPCs 的 II 型胶原、蛋白多糖、SOX-9 相对基因表达量分别按实验分组进行组间的 Student *t* 检验, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 NPCs、ADSCs 和 BMSCs 形态

BMSCs 和 ADSCs 原代接种 24h 后开始贴壁生长, 细胞形态由圆形变成长梭形、多角形, 1 周左右形成集落; 2 周后细胞 80% 左右达到融合, 即可传代; 传至第 2 代, 细胞为长梭形, 呈漩涡状, 形态均匀 (图 2a、b)。NPCs 接种后 4~5d 可贴壁生长, 细胞形态呈现长梭形, 10d 细胞融合至 80% 左右即可传代, 传至第 2 代, 细胞呈多角形, 形态一致, 分布均匀 (图 2c)。细胞接触式共培养后, BMSCs 与 NPCs 及 ADSCs 与 NPCs 均相互接触, 贴壁生长, 在荧光显微镜下可见 PKH26 标记的

NPCs 呈红色荧光 (图 3)。MoFlo 高速流式细胞分选仪根据荧光强度, 对细胞进行快速分析及分选, 共培养细胞可被完全分离并成功分选 (图 4)。

2.2 接触式共培养后 NPCs 的基因相对表达

各组 NPCs 的基因相对表达量见表 1。Real-Time PCR 结果显示, 与 A 组比较, B 组和 C 组 II 型胶原、蛋白多糖和 SOX-9 基因表达均显著升高 ($P < 0.05$); C 组与 B 组比较, 三种基因的相对表达量具有统计学差异 ($P < 0.05$), C 组 II 型胶原、蛋白多糖和 SOX-9 的相对表达量分别是 B 组的 16.8 倍、10.2 倍和 3.4 倍 (在计算倍数的时候, 用 C 组的 CT 值减去 B 组的 CT 值, 然后作为 2 的指数获得的倍数, 即: 倍数 = $2^{C \text{ 组的数值} - B \text{ 组的数值}}$)。

3 讨论

椎间盘退变源于椎间盘细胞数量的减少和功能的异常, 继而出现蛋白多糖合成减少、II 型胶原减少变性和椎间盘含水量下降等变化, 椎间盘分散脊柱压缩力、维持椎间隙高度的生物力学功能降低, 最终导致节段不稳、椎管狭窄、神经根受压并产生腰腿痛^[7]。干细胞移植治疗椎间盘退变, 是基于增加椎间盘内 NPCs 的数量、促进其分泌蛋白多糖及细胞外基质等途径, 达到延缓甚至逆转椎间盘退变的目的。间充质干细胞具有多向分化潜能、旺盛的增殖能力和较低的免疫原性, 故成为细胞治疗和组织工程学理想的种子细胞。BMSCs 与 ADSCs 因其来源广泛, 取材方便, 与 NPCs 共培养后, 刺激激活效应及诱导分化效果显著^[6, 8-10], 近年来备受关注, 研究人员分别从不同方法, 如采用不同动物, 接触及非接触共培养方式, 以及体内、体外共培养等角度, 对这两种细胞与 NPCs 共培养进行分析研究。

3.1 本研究的特点

本研究采用同源自体人 NPCs、BMSCs、ADSCs, 相对于既往研究有以下优势: (1) 取材方便, 通过一次手术便可获取 3 种实验细胞的组织。尤其是退变髓核组织的获取, 避免了既往动物实验的造模过程, 免除了重复操作, 同时, 骨髓组织和脂肪组织也可在术中方便获得, 且数量充足, 污染几率小。(2) 由于共培养细胞来自同一患者, 属同源自体细胞, 免除了细胞之间的免疫原性, 可排除免疫排斥反应及不同物种细胞之间外源性细胞因子的影响。(3) 本研究细胞来源于患者, 相对于

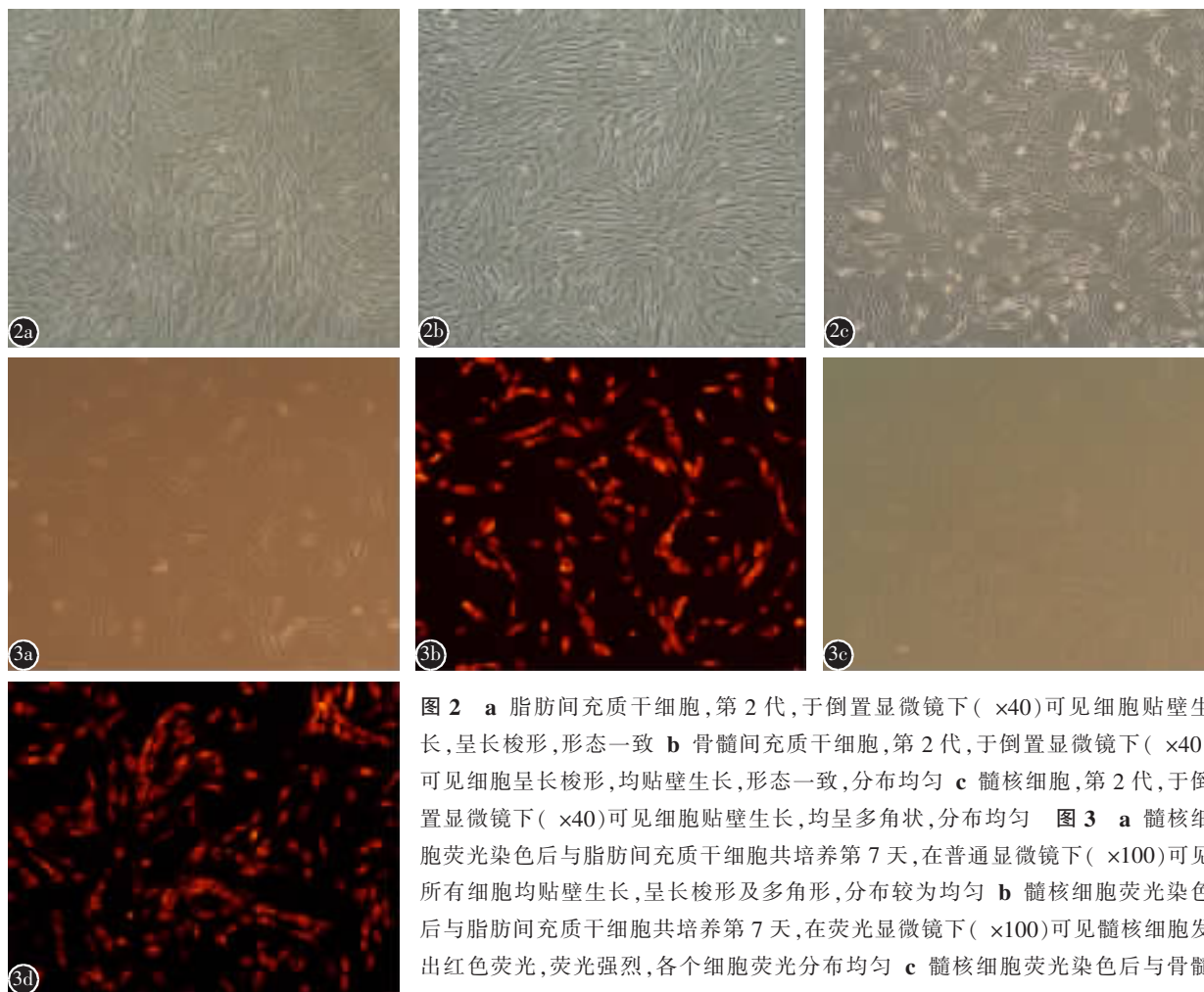


图 2 **a** 脂肪间充质干细胞,第 2 代,于倒置显微镜下(×40)可见细胞贴壁生长,呈长梭形,形态一致 **b** 骨髓间充质干细胞,第 2 代,于倒置显微镜下(×40)可见细胞呈长梭形,均贴壁生长,形态一致,分布均匀 **c** 髓核细胞,第 2 代,于倒置显微镜下(×40)可见细胞贴壁生长,均呈多角状,分布均匀 **图 3** **a** 髓核细胞荧光染色后与脂肪间充质干细胞共培养第 7 天,在普通显微镜下(×100)可见所有细胞均贴壁生长,呈长梭形及多角形,分布较为均匀 **b** 髓核细胞荧光染色后与脂肪间充质干细胞共培养第 7 天,在荧光显微镜下(×100)可见髓核细胞发出红色荧光,荧光强烈,各个细胞荧光分布均匀 **c** 髓核细胞荧光染色后与骨髓间充质干细胞共培养第 7 天,在普通显微镜下(×100)可见所有细胞均贴壁生长,呈长梭形及多角形,分布较为均匀 **d** 髓核细胞荧光染色后与骨髓间充质干细胞共培养第 7 天,在荧光显微镜下(×100)可见髓核细胞发出红色荧光,荧光强烈,各个细胞荧光分布均匀,NPCs 簇状分布

Figure 2 **a** Cellular morphology of ADSCs: the second generation, adherent growth, and appeared as long fusiform with the inverted microscope(×40) **b** Cellular morphology of BMSCs: the second generation, adherent growth, and as long fusiform with the inverted microscope(×40) **c** Cellular morphology of NPCs: the second generation, adherent growth, and shown as multi angle and homogenous distribution with the inverted microscope(×40) **Figure 3** **a** The PKH26 labled NPCs with ADSCs co-cultured on the seventh day, showed adherent growth, long fusiform, multi angle and homogenous distribution under the microscope in ordinary imaging(×100) **b** The PKH26 labled NPCs with ADSCs co-cultured on the seventh day, the NPCs showed red fluorescence strongly, and individual cell fluorescence homogenous distribution under a fluorescence microscope (×100) **c** The PKH26 labled NPCs with BMSCs co-cultured on the seventh day, showed adherent growth, long fusiform, multi angle and homogenous distribution under the microscope in ordinary imaging(×100) **d** The PKH26 labled NPCs with BMSCs co-cultured on the seventh day, the NPCs showed red fluorescence strongly, and individual cell fluorescence homogenous distribution, NPCs were clustered distribution under a fluorescence microscope(×100)

利用动物的细胞进行实验而言,更加贴近临床,使得研究结果在未来的生物学治疗中更具有说服力。既往研究多采用动物作为实验细胞来源,虽均取得理想效果,但由于存在物种差异,使得这种共培养效果的说服力较为局限。此外,有研究利用人

脐带华通胶间充质干细胞与 NPCs 进行共培养^[1],虽然也取得良好的结果,但人脐带华通胶间充质干细胞获取相对困难。(4)共培养技术是目前研究细胞间相互影响的主要技术之一,非接触式共培养和接触式共培养是众多共培养技术的两个主要

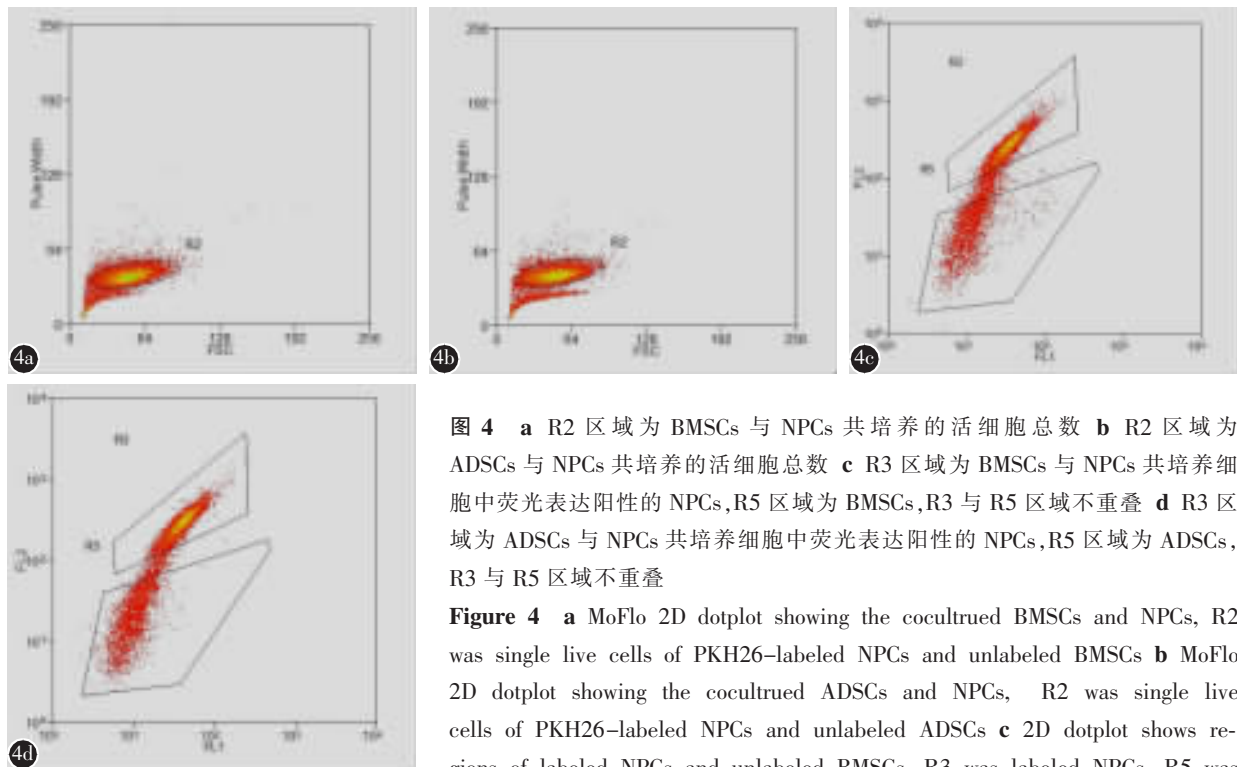


图 4 a R2 区域为 BMSCs 与 NPCs 共培养的活细胞总数 b R2 区域为 ADSCs 与 NPCs 共培养的活细胞总数 c R3 区域为 BMSCs 与 NPCs 共培养细胞中荧光表达阳性的 NPCs, R5 区域为 BMSCs, R3 与 R5 区域不重叠 d R3 区域为 ADSCs 与 NPCs 共培养细胞中荧光表达阳性的 NPCs, R5 区域为 ADSCs, R3 与 R5 区域不重叠

Figure 4 a MoFlo 2D dotplot showing the cocultured BMSCs and NPCs, R2 was single live cells of PKH26-labeled NPCs and unlabeled BMSCs b MoFlo 2D dotplot showing the cocultured ADSCs and NPCs, R2 was single live cells of PKH26-labeled NPCs and unlabeled ADSCs c 2D dotplot shows regions of labeled NPCs and unlabeled BMSCs, R3 was labeled NPCs, R5 was BMSCs d 2D dotplot shows regions of labeled NPCs and unlabeled ADSCs, R3 was labeled NPCs, R5 was ADSCs

表 1 各组退变髓核细胞的基因相对表达量

($n=3, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Relative gene expression of degenerative NPCs in group A, group B, group C

	A组 Group A	B组 Group B	C组 Group C
Ⅱ型胶原 Type II collagen	1.03±0.04	5.26±0.24 ^①	9.33±0.39 ^{①②}
蛋白多糖 Aggrecan	1.05±0.07	7.71±0.21 ^①	11.07±0.34 ^{①②}
SOX-9	1.04±0.17	3.84±0.25 ^①	5.64±0.26 ^{①②}

注:单独培养的 NPCs 为 A 组,与 ADSCs 共培养的 NPCs 为 B 组,与 BMSCs 共培养的 NPCs 为 C 组。①与 A 组比较, $P<0.05$; ②与 B 组比较, $P<0.05$

Note: Group A was NPCs cultured alone, as the control group; Group B was NPCs co-cultured with ADSCs; Group C was NPCs co-cultured with BMSCs. ①compared with Group A, $P<0.05$; ②compared with group B, $P<0.05$

方面。非接触式共培养的异种细胞虽然共同置于同一培养环境,但因接种的载体不同,而无法进行细胞间直接接触,彼此的相互作用可能是通过细胞分泌的细胞因子等作为媒介,使异种细胞发生相应的生物学效应^[8,12]。直接共培养的异种细胞相互接触,除通过细胞因子发挥作用外,还可通过细胞之间相互接触,直接在细胞之间发生作用^[13],从

而产生相关效应。本研究采用接触式共培养技术,充分模拟种子细胞植入椎间盘后,不同细胞间相互接触的微环境,从而研究其可能发生的生物学效应,为未来临床应用奠定了良好的基础。

3.2 ADSCs 和 BMSCs 激活退变 NPCs 的可能机制

NPCs 是一种类软骨样细胞,主要分泌蛋白多糖、Ⅱ型胶原等细胞外基质。由于其缺乏特异性细胞标志,国内外研究中通常选用Ⅱ型胶原、蛋白多糖和 SOX-9 作为其特异性标记^[14]。本研究结果表明,在接触式共培养体系下,ADSCs 和 BMSCs 均可激活退变 NPCs,使退变 NPCs 内Ⅱ型胶原、蛋白多糖和 SOX-9 的基因表达明显增加($P<0.05$)。说明退变 NPCs 与 BMSCs 和 ADSCs 接触式共培养方式后,其标记基因表达显著上调,提示 ADSCs 和 BMSCs 与退变 NPCs 在接触式共培养条件下,均可对退变 NPCs 产生营养激活的生物学效应。

本研究在接触式共培养条件下,模拟干细胞治疗退变椎间盘微环境,促进退变 NPCs 上调相关基因表达的机制可能为:(1)在共培养过程中,干细胞可上调合成转化生长因子- $\beta 1$ (transform-

ing growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF-1)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)等营养因子,从而发挥营养效应来改善微环境;随着时间推移,干细胞可逐渐上调表达Ⅱ型胶原等软骨表型,具有向椎间盘软骨细胞分化来提高软骨基质的合成能力^[8,15]。(2)干细胞可拮抗退变NPCs凋亡。椎间盘退变后,NPCs凋亡率显著增加,过度凋亡是导致NPCs活性丢失的主要原因^[16,17]。干细胞可降低Fas在髓核区的表达^[18],从而延缓死亡受体途径介导的NPCs凋亡;退变NPCs在下调Bax表达同时,上调Bcl-2表达,而凋亡拮抗基因Bcl-2在与人BMSCs非接触共培养后也显著上调。(3)退变NPCs也极有可能反作用于外源性干细胞,以特殊的微环境诱导干细胞向NPCs分化,同样参与了退变髓核组织的修复过程。(4)干细胞通过出芽形式产生的膜微粒^[19],可能是细胞治疗过程中的主要参与者。膜微粒作为一种细胞死亡或活化信号,通过自身包含的大量内容物与目的细胞融合,及通过其表面的分子与相应抗体结合这两种途径来激活目的细胞^[20],启动相应的信号传导通路,使目的细胞产生应答。这可能是干细胞激活退变NPCs的重要机制之一。(5)在共培养时,干细胞与NPCs相互接触并发生融合^[13],细胞之间存在双向膜转移、功能性缝隙连接,并用扫描式电子显微镜(SEM)观察到细胞培养液中存在微泡(30nm~1 μ m)。故上述机制可能参与细胞之间的相互作用。

3.3 BMSCs 优于 ADSCs 对退变 NPCs 激活作用的可能机制

本研究结果显示,相比ADSCs,BMSCs对退变NPCs的激活效应更强,更能促进其Ⅱ型胶原、蛋白多糖和SOX-9基因表达的上调。分析原因可能是:(1)虽然BMSCs和ADSCs在形态学和组织学上具有高度相似性,但两者在多向分化途径上存在差异^[21],可能导致对NPCs的刺激效果不同。(2)本研究中BMSCs取自椎体骨髓腔,相对较为纯净;ADSCs取自皮下,可能会混入少量平滑肌细胞或内皮细胞,导致ADSCs的纯度下降,影响共培养效果。(3)本研究BMSCs及ADSCs与退变NPCs均以50:50的比例进行共培养,既往研究^[9]显示,两种细胞按不同比例进行共培养,其结果有

所差异,当NPCs:MSCs为75:25和50:50时,其蛋白多糖和葡萄糖胺聚糖含量增加较多,但ADSCs与NPCs的最佳共培养比例尚无明确结果,本研究采用的比例可能未达到其最佳比例,故可能在一定程度上影响ADSCs对NPCs的激活作用。另外,还有学者通过实验证明,这两种干细胞向软骨细胞分化的能力相似,无明显差别^[21,22]。因此,这方面结论还存争议,具体原因及机制还需进一步深入研究。

总之,MSCs与NPCs接触式共培养较真实地模拟干细胞治疗退变椎间盘微环境,方法简单可行,具有良好的实用价值和前景。通过接触式共培养,BMSCs和ADSCs均能刺激自身退变NPCs产生明显的激活和营养作用,使退变NPCs中Ⅱ型胶原、蛋白多糖、SOX-9等细胞外基质表达显著升高。同时,相对于ADSCs,BMSCs对退变NPCs的激活效应更强。因而,BMSCs可能更加适合于椎间盘退行性疾病的生物学治疗。

4 参考文献

1. Yang SH, Wu CC, Shih TT, et al. In vitro study on interaction between human nucleus pulposus cells and mesenchymal stem cells through paracrine stimulation[J]. Spine, 2008, 33(18): 1951-1957.
2. Tao F, Li F, Li G, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells into nucleus pulposus cells in vitro[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2008, 28(2): 156-158.
3. Allon AA, Butcher K, Schneider RA, et al. Structured coculture of mesenchymal stem cells and disc cells enhances differentiation and proliferation[J]. Cells Tissues Organs, 2012, 196(2): 99-106.
4. Niu CC, Yuan LJ, Lin SS, et al. Mesenchymal stem cell and nucleus pulposus cell coculture modulates cell profile[J]. Clin Orthop Relat Res, 2009, 467(12): 3263-3272.
5. Lu ZF, Zandieh DB, Wuisman PI, et al. Differentiation of adipose stem cells by nucleus pulposus cells: configuration effect[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 359(4): 991-996.
6. Jeong JH, Lee JH, Jin ES, et al. Regeneration of intervertebral discs in a rat disc degeneration model by implanted adipose-tissue-derived stromal cells [J]. Acta Neurochir (Wien), 2010, 152(10): 1771-1777.
7. Wang F, Wu XT, Zhuang SY, et al. Ex vivo observation of human nucleus pulposus chondrocytes isolated from degenerated intervertebral discs[J]. Asian Spine J, 2011, 5(2): 73-81.
8. Yamamoto Y, Mochida J, Sakai D, et al. Upregulation of the viability of nucleus pulposus cells by bone marrow-derived

- stromal cells: significance of direct cell-to-cell contact in coculture system[J]. Spine, 2004, 29(14): 1508-1514.
9. Sobajima S, Vadala G, Shimer A, et al. Feasibility of a stem cell therapy for intervertebral disc degeneration [J]. Spine J, 2008, 8(6): 888-896.
10. Ganey T, Hutton WC, Moseley T, et al. Intervertebral disc repair using adipose tissue-derived stem and regenerative cells: experiments in a canine model[J]. Spine, 2009, 34(21): 2297-2304.
11. 张燕, 阮狄克, 张超, 等. 接触式细胞共培养诱导人脐带华通胶间充质干细胞向类髓核细胞分化 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2012, 22(10): 936-942.
12. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediation[J]. J Cell Biochem, 2006, 98(5): 1076-1084.
13. Strassburg S, Hodson NW, Hill PI, et al. Bi-directional exchange of membrane components occurs during co-culture of mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells [J]. PLoS One, 2012, 7(3): e33739.
14. Risbud MV, Guttapalli A, Tsai TT, et al. Evidence for skeletal progenitor cells in the degenerate human intervertebral disc[J]. Spine, 2007, 32(23): 2537-2544.
15. Sugii S, Kida Y, Kawamura T, et al. Human and mouse adipose-derived cells support feeder-independent induction of pluripotent stem cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(8): 3558-3563.
16. 樊守刚, 吴小涛, 王运涛, 等. 移植骨髓间充质干细胞对兔退变椎间盘髓核细胞凋亡的影响 [J]. 中华实验外科杂志, 2010, 27(7): 979-982.
17. Zhao CQ, Jiang LS, Dai LY. Programmed cell death in intervertebral disc degeneration[J]. Apoptosis, 2006, 11(12): 2079-2088.
18. 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.
19. Lai RC, Arslan F, Lee MM, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. Stem Cell Res, 2010, 4(3): 214-222.
20. Del CI, Shrimpton CN, Thiagarajan P, et al. Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation[J]. Blood, 2005, 106(5): 1604-1611.
21. Winter A, Breit S, Parsch D, et al. Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells[J]. Arthritis Rheum, 2003, 48(2): 418-429.
22. Lee RH, Kim B, Choi I, et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue[J]. Cell Physiol Biochem, 2004, 14(4-6): 311-324.
- (收稿日期: 2014-01-21 末次修回日期: 2014-04-14)
(英文编审 蒋欣/贾丹彤)
(本文编辑 李伟霞)

消息

第六届全国脊髓脊柱外科高级学习班通知

北京大学第三医院(北医三院)神经外科主办的国家级继续教育项目 2014-04-04-015 (国)“全国脊髓脊柱外科高级学习班”拟于 2014 年 10 月 12~15 日在北京召开。学习班将邀请国内脊髓脊柱领域知名专家王振宇教授、刘忠军教授、刘晓光教授、王超教授、孙宇教授、王少波教授、郭邵庆教授、谢京城教授、刘彬教授、李振东教授、马长城教授等共同参与授课。授课内容紧密结合临床实际,通过专题讲座、交流讨论、手术演示互动等全面介绍复杂脊髓肿瘤、脊髓空洞、脊髓拴系综合征、脊髓血管性疾病的显微外科治疗;脊髓手术术中电生理监测、脊髓手术后脊柱稳定性问题及相关的内固定技术、脊柱肿瘤的手术治疗、寰枢椎疾病外科治疗以及与神经外科相关的椎管狭窄、颈椎病等脊髓脊柱外科疾病的新进展、新技术与新方法。诚挚邀请神经外科和骨科医生参加此次学习班,为了保证授课质量,每期限招学员 20 名,录取以报名先后排序,学习班结束授予国家级继续医学教育项目 I 类 8 学分。

会议时间及地点:2014 年 10 月 12~15 日,北京大学第三医院科研楼。

报到时间及地点:2014 年 10 月 12 日,北京赢家商务酒店(北京大学医学部内)。

请于 2014 年 10 月 1 日前将回执发到 liubin301@163.com 或邮寄到:北京大学第三医院神经外科殷淑珍收,邮政编码:100191。联系电话:15611908096,15611908272,(010)82267350。

学习班费用:现场注册 1200 元;提前注册,2014 年 10 月 1 日前 1000 元(以汇款时间为准)。邮局汇款:北京大学第三医院神经外科 殷淑珍(收),邮编:100191。