

兔骨髓间充质干细胞与髓核细胞共培养后的 营养效应和类髓核分化效应

邵建树, 吴小涛, 王运涛, 曹 烨, 严慧深

(东南大学附属中大医院骨科 210009 江苏省南京市)

【摘要】目的:探讨兔骨髓间充质干细胞(BMMSCs)与髓核细胞(NPCs)共培养时 BMMSCs 的营养效应和类髓核分化效应及其动态变化规律。**方法:**应用 1 月龄新西兰大白兔的骨髓和髓核进行 BMMSCs 及 NPCs 的分离培养与鉴定,建立 3 个细胞培养组,BMMSCs 与 NPCs 共培养组(实验组),BMMSCs 单独培养组和 NPCs 单独培养组作为对照组。在培养的不同时间点(3、6、9、12、15、18、21d)分别检测细胞培养上清液中转化生长因子 $\beta 1$ (TGF $\beta 1$)、血小板衍生生长因子(PDGF)的含量变化及 BMMSCs 与 NPCs 的增殖能力,采用 RT-PCR 法检测培养不同时间点 BMMSCs 与 NPCs 的蛋白聚糖 Aggrecan 及 II 型胶原蛋白 mRNA 的表达变化。**结果:**分离培养的两种细胞经鉴定分别为 BMMSCs 及 NPCs。从第 3 天开始的各个时间点,实验组上清液中 TGF $\beta 1$ 、PDGF 的含量较两对照组明显增高 ($P<0.05$),且随时间的延长而逐渐增高,第 15 天达最高,TGF $\beta 1$ 、PDGF 分别达 $815.81 \pm 25.69 \text{ pg/ml}$ 和 $494.28 \pm 20.01 \text{ pg/ml}$,此后第 18d、21d 逐渐下降。实验组细胞 DNA 含量在各个时间点上均较两对照组明显升高 ($P<0.05$)。从第 3 天开始的各个时间点,实验组 NPCs 的蛋白聚糖 Aggrecan 及 II 型胶原 mRNA 的表达较对照组高 ($P<0.05$);同时从第 15 天开始至第 21 天,实验组 BMMSCs 的蛋白聚糖 Aggrecan 及 II 型胶原 mRNA 的表达较对照组高 ($P<0.05$)。**结论:**BMMSCs 与 NPCs 共培养时 BMMSCs 可通过表达 TGF $\beta 1$ 、PDGF 等细胞因子发挥其营养效应,激活 NPCs,促进其增殖及细胞外基质的合成;在共培养后期,BMMSCs 在髓核局部微环境下,可发挥其类髓核分化效应,开始合成蛋白聚糖 Aggrecan 及 II 型胶原蛋白。

【关键词】骨髓间充质干细胞;髓核细胞;共培养;营养效应;类髓核分化效应;兔

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2009.05.15

中图分类号:R318,Q813.1 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2009)-05-0381-07

Experimental study of the trophic and differential effects of rabbit bone marrow-driven mesenchymal stem cells co-cultured with nucleus pulposus cells/SHAO Jianshu, WU Xiaotao, WANG Yuntao, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2009, 19(5):381~387

【Abstract】 Objective:To investigate the trophic and differential effects and their dynamic protocol of rabbit bone marrow-driven mesenchymal stem cells (BMMSCs) co-cultured with nucleus pulposus cells (NPCs). **Method:**The isolation and identification of BMMSCs and NPCs was performed on bone marrow and nucleus pulposus from Newsealand White Rabbits.Three groups were designed as follows,BMMSCs group and NPCs group as control and co-cultured group termed as test group.In each group,the changes of PDGF and TGF $\beta 1$ in cell supernatants were detected by the enzyme-linked immunosorbent-assay.The proliferation of both BMMSCs and NPCs were observed through Hoechst33258 and the changes of mRNA of type II collagen and proteoglycan of these two types of cells were detected by RT-PCR at 3d,6d,9d,12d,15d,18d and 21d respectively.**Result:**BMMSCs and NPCs were identified.The amount of cytokines(TGF $\beta 1$,PDGF) in co-cultured group were significantly higher than those in two control groups from 3st day to 21st day ($P<0.05$),which transcended from the 3st day,peaked at the 15st day with TGF $\beta 1$ and PDGF of $815.81 \pm 25.69 \text{ pg/ml}$ and $494.28 \pm 20.01 \text{ pg/ml}$ respectively and then descended.The DNA quantities of BMMSCs and NPCs in co-cultured group

基金项目:江苏省自然科学基金资助项目(NO:BK2007107);东南大学国家自然科学基金预研项目(NO:XJ2008342);东南大学新进博士科研启动基金资助项目(NO:9290002359)

第一作者简介:男(1982-),医学硕士,研究方向:脊柱外科

电话:(025)83272225 E-mail:seniortree@163.com

通讯作者:吴小涛

were higher than those in control groups from 3st day to 21st day ($P<0.05$) while the mRNA of type II collagen and proteoglycan of NPCs in co-cultured group increased from 3st day, which was higher than those in control groups ($P<0.05$), and expression of the mRNA of type II collagen and proteoglycan from of BMMSCs cells from 15st day to 21st day was higher than those in control groups ($P<0.05$). **Conclusion:** During co-culture process, the trophic effects of bone marrow-driven mesenchymal stem cells (BMMSCs) play a major part at early stage by expression of cytokines (TGF β 1, PDGF) and the differential effects play a part at later stage by production of type II collagen and proteoglycan.

【Key words】 Bone mesenchymal stem cells; Nucleus pulposus cells; Co-culture; Trophic effects; Differentiated effects; Rabbit

【Author's address】 Department of Orthopaedics, the Affiliated Zhongda Hospital of Southeast University, Nanjing, 210009, China

椎间盘退变所致的腰痛是一种常见的骨科疾患, 临床常用的保守治疗及手术疗法虽能缓解症状, 但并不能改变椎间盘退变本身。近年来细胞移植为退变椎间盘的细胞重建及功能恢复提供了一种全新的治疗策略^[1], 而骨髓间充质干细胞(BMMSCs)移植是研究热点^[2,3]。有研究表明, BMMSCs 修复退变椎间盘可能通过营养支持和类髓核分化行细胞替代而起作用, 但其具体作用机制仍不清楚。本实验将 BMMSCs 与髓核细胞(NPCs)进行了共培养, 探讨共培养时 BMMSCs 的营养效应和类髓核分化效应及其动态变化规律。

1 材料与方法

1.1 实验仪器与材料

PTC-200 型 PCR 仪(MJ 公司), 倒置荧光相差显微镜(德国 Zeiss 公司), RF-5000 荧光分光光度计(岛津公司), 5%CO₂ 细胞培养箱(德国 Heraeus 公司), Transwell 细胞培养板(美国 Corning 公司), 木瓜蛋白酶(E. Merck 公司), 兔转化生长因子 β 1 (TGF β 1) 及血小板衍化生长因子(PDGF)ELISA 试剂盒(美国 ADL 公司), 100%胎牛血清(杭州四季青公司), 胰蛋白酶(美国 Sigma 公司), DMEM/F12 培养基、II 型胶原酶、Hoechst33258 和 Calf Thymus DNA 等试剂(美国 Gibco 公司)。新西兰大白兔由东南大学实验动物中心提供。

1.2 实验步骤

1.2.1 BMMSCs 的分离培养及鉴定 取 1 月龄新西兰大白兔 6 只, 雌雄不拘, 平均体重 1.2kg (1.1~1.25kg), 3%戊巴比妥钠按 1ml/kg 的剂量施以全身麻醉; 无菌操作下于双侧胫骨上端用锐性穿刺锥于骨皮质上开出一直径约 2~3mm 的孔通达髓

腔; 用 18 号骨穿针接注射器, 内含 3000U/ml 的肝素 0.1ml, 沿骨皮质上的孔穿入髓腔抽出骨髓约 2ml; 抽出的骨髓用 PBS 洗涤 2 次, 800r/min 离心 5min; 弃去上清液, 用 DMEM/F12 培养液制成单细胞悬液; 将悬液缓慢加入预先加有密度为 1.077g/L 的 Percoll 单核细胞分离液的离心管中, 2000r/min 离心 20min, 吸取中间的白膜层, 用 PBS 冲洗 2 次, 800r/min 离心 5min, 以 2×10^5 个/ml 密度接种于含 20%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基, 置于 5%CO₂、饱和湿度、37℃培养箱。4~5d 后首次换液, 之后每 3d 换液 1 次, 逐次递减血清浓度, 直至为 10%。倒置显微镜下逐日观察细胞形态并拍照记录。细胞生长密度达 90%以上时, 用 0.25%胰蛋白酶消化, 按 1:2 比例传代培养, 培养至第 3 代经流式细胞仪鉴定, 备用。

1.2.2 NPCs 的分离培养及鉴定 上述实验兔抽取骨髓后立即处死, 无菌条件下将胸腰段脊柱整段取出, 尽量剥尽椎间盘前缘所附着的肌肉, 用 D-HANK'液(含青霉素 100 万 U/L 和链霉素 1g/L)冲洗 2 遍, 尖刀切开椎间盘纤维环, 取出胶冻状椎间盘髓核, 用 DMEM/F12(含青霉素 10 万 U/L 和链霉素 0.1g/L)洗 3 遍, 0.25% II 型胶原酶液中 37℃消化 15~20min, 吸管吹打, 200 目不锈钢网过滤, 悬液 1000r/min 离心 8min, 以 1×10^5 个/ml 浓度接种到培养瓶中, 培养液为 DMEM/F12(含 15%优质胎牛血清、抗坏血酸 30 μ g/ml、青霉素 10 万 U/L、链霉素 0.1g/L, pH 7.0), 置于 37℃、饱和湿度、5%CO₂ 孵箱中培养, 每天观察细胞生长情况, 2d 换液 1 次。另取部分原代培养的细胞爬片行 II 型胶原免疫组化染色鉴定。

1.2.3 共培养模型的建立及分组 取上述培养至第 3 代的 BMMSCs, 接种于 Transwell 6 孔板底部

(1×10^4 个/ cm^2), 将原代 NPCs 接种于 Transwell 6 孔板上层插槽中(1×10^4 个/ cm^2), 中间以聚碳酸酯透水膜(孔隙 $0.4 \mu\text{m}$)分隔(使细胞不能通过, 但 BMMSCs 分泌的细胞因子可以通过半透膜), 分为 3、6、9、12、15、18、21d 7 个时间点, 每个时间点设 6 个复孔。同时取普通 6 孔培养板, 按上述时间点设置 BMMSCs 单独培养组及 NPCs 单独培养组, 各组细胞接种密度均为 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ 。37℃、5% CO_2 的培养箱中培养, 均培养至 21d。每 3d 换液 1 次, 并于不同时间观察、拍照。

1.3 检测指标

1.3.1 细胞因子含量测定 ELISA 法检测共培养组、BMMSCs 单独培养组、NPCs 单独培养组在不同时间点各孔内细胞培养上清液中 TGF β 1 和 PDGF 的含量。

1.3.2 DNA 含量测定 采用 Hoechst33258 法, 收集实验中各组不同时间点各孔细胞, 木瓜蛋白酶消化, 以小牛胸腺 DNA 绘制标准曲线, 荧光分光光度计检测各样品吸光度, 并根据标准曲线计算各样品的 DNA 含量。

1.3.3 聚集蛋白聚糖 Aggrecan 及 II 型胶原蛋白 mRNA 检测 应用 RT-PCR 法检测各组细胞聚集蛋白聚糖 Aggrecan 与 II 型胶原蛋白的 mRNA 表达。分别收集各组不同时间点细胞, 以 Trizol 试剂裂解细胞。抽提细胞总 RNA, 测定 RNA 浓度, 将 RNA 反转录为 cDNA, 然后进行 PCR 扩增。所用引物均由上海英骏生物公司合成。II 型胶原上游引物为 5'-ACGCCACGCTCAAGTCCCTCAA-3', 下游引物为 5'-TGTGTTTCGTGCAGCCATCCTG-3'; 聚集蛋白聚糖 Aggrecan 上游引物为 5'-GAACCTACGGCATCCGGGACA-3', 下游引物为 5'-CCTCACCGCCCACTCCAAAGA-3'; β -actin 上游引物为 5'-TCACCATGGATGATGATATCGC-3', 下游引物为 5'-CGTGCTCGATGGGGTACTTCA-3'。其中 II 型胶原 RT-PCR 反应条件: 94℃预变性 5min, 随后 94℃变性 30s, 60℃退火 30s, 72℃延伸 45s, 共进行 32 个循环, 再 72℃延伸 10min。聚集蛋白聚糖 Aggrecan RT-PCR 反应条件: 94℃预变性 5min, 随后 94℃变性 30s, 60℃退火 45s, 72℃延伸 40s, 共进行 32 个循环, 再 72℃延伸 10min。 β -actin RT-PCR 反应条件: 94℃预变性 5min, 随后 94℃变性 30s, 55℃退火 30s, 72℃延伸 30s, 共进行 28 个循环, 再 72℃延伸 10min。PCR 产物经电泳、

DNA 吸光度扫描检测; 显色条带图像分析系统 (Launch sensiansys 凝胶成像系统) 检测其积分吸光度值, 与内参 β -actin 条带的比值为 mRNA 表达水平参数。

1.4 统计学处理

结果采用 SPSS 11.5 统计学软件分析, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间比较用方差分析, 各组内比较使用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NPCs 形态学观察及鉴定结果

单独 NPCs 培养组细胞贴壁时间较长, 24h 后开始有少量细胞贴壁, 3d 后有 80% 细胞贴壁, NPCs 呈多角形、圆形或梭形(图 1a), 胞浆内含少量空泡, 贴壁后伸出伪足。共培养组 12h 后 NPCs 即开始贴壁, 48h 有 90% 细胞贴壁。第 9 天时已融合, 细胞呈多角形、梭形及不规则形(图 1b)。NPCs II 型胶原免疫组化染色阳性, 符合 NPCs 的特点^[4]。

2.2 BMMSCs 形态学观察及鉴定结果

原代细胞接种后 24h 细胞开始贴壁生长, 此时细胞多呈圆形或卵圆形, 随培养天数的增加, 形态也逐渐变为多角形或梭形, 并形成集落。培养 1 周后细胞集落逐渐增多扩大, 彼此融合, 细胞呈现梭形外观。至 2 周左右, 细胞融合达 90% 以上, 传代接种后 12h 内细胞开始贴壁、伸展、呈长梭形外观, 传代后的细胞增殖加速。培养 6~9d 即可再次传代。BMMSCs 单独培养组细胞形态呈梭形, 数量较少(图 2a), 随时间变化形态无明显变化。共培养组 BMMSCs 增殖活跃, 培养至 2 周时, 细胞形态为梭形、多角形、不规则形, 数量较多(图 2b)。经流式细胞仪检测显示: 第 3 代 BMMSCs 高表达 CD44, 低表达 CD14, 符合 BMMSCs 的特点^[5-7]。

2.3 细胞因子含量测定结果

从第 3 天起, 共培养组上清液中 TGF β 1、PDGF 的含量较 BMMSCs 单独培养组及 NPCs 单独培养组明显增高 ($P < 0.05$), 且共培养组上清液中 TGF β 1、PDGF 的含量随培养时间的延长而逐渐增高, 第 15 天达最高, 18d、21d 逐渐下降, 各个时间点差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 1、2)。

2.4 DNA 含量测定结果

共培养组两种细胞 DNA 含量从共培养第 3 天开始较此两种细胞单独培养组高 ($P < 0.05$), 且

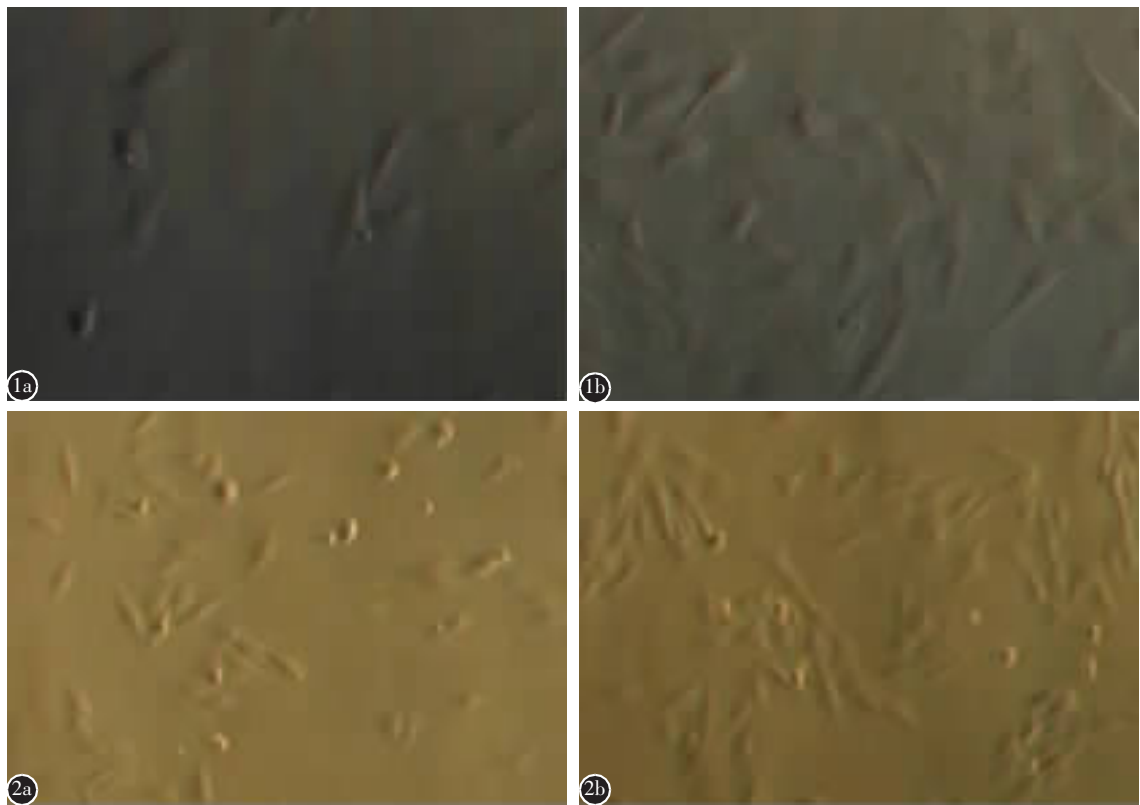


图 1 a 单独 NPCs 培养组贴壁后的 NPCs 呈圆形、多角形和梭形(第 9 天),数量较少($\times 100$) b 共培养组 NPCs 第 9 天时细胞已融合,细胞呈多角形、梭形及不规则形 图 2 a 单独 BMMSCs 培养组细胞形态呈梭形,数量较少($\times 100$) b 共培养组 BMMSCs 增殖活跃,细胞形态为梭形、多角形、不规则形,数量较多($\times 100$)

表 1 不同时间点各组细胞培养上清液中 TGF β 1 含量
($\bar{x} \pm s, n=6, \text{pg/ml}$)

	BMMSCs 单独培养组	NPCs 单独培养组	共培养组
3d	303.62 $\pm$ 24.33	134.28 $\pm$ 17.59	513.82 $\pm$ 18.81 ^{①②}
6d	349.42 $\pm$ 16.89	140.84 $\pm$ 13.71	667.76 $\pm$ 21.17 ^{①②}
9d	364.26 $\pm$ 14.35	151.93 $\pm$ 9.53	725.93 $\pm$ 15.10 ^{①②}
12d	387.69 $\pm$ 16.79	163.72 $\pm$ 14.66	778.99 $\pm$ 30.28 ^{①②}
15d	368.35 $\pm$ 18.61	169.90 $\pm$ 16.07	815.81 $\pm$ 25.69 ^{①②}
18d	371.32 $\pm$ 10.38	162.68 $\pm$ 8.13	759.10 $\pm$ 17.24 ^{①②}
21d	352.91 $\pm$ 20.26	158.32 $\pm$ 18.46	716.75 $\pm$ 21.37 ^{①②}

注:①与 BMMSCs 单独培养组及 NPCs 单独培养组比较 $P<0.05$; ②同组各个时间点两两比较 $P<0.05$

表 2 不同时间点各组细胞培养上清液中 PDGF 含量
($\bar{x} \pm s, n=6, \text{pg/ml}$)

	BMMSCs 单独培养组	NPCs 单独培养组	共培养组
3d	181.71 $\pm$ 10.43	103.89 $\pm$ 11.47	341.32 $\pm$ 19.96 ^{①②}
6d	201.53 $\pm$ 12.85	112.17 $\pm$ 12.83	398.32 $\pm$ 14.33 ^{①②}
9d	207.12 $\pm$ 15.96	103.94 $\pm$ 10.64	423.39 $\pm$ 16.96 ^{①②}
12d	211.72 $\pm$ 8.43	98.36 $\pm$ 6.95	462.26 $\pm$ 25.22 ^{①②}
15d	221.75 $\pm$ 16.88	85.29 $\pm$ 9.22	494.28 $\pm$ 20.01 ^{①②}
18d	208.80 $\pm$ 11.42	82.48 $\pm$ 6.53	470.34 $\pm$ 19.43 ^{①②}
21d	202.08 $\pm$ 10.89	78.51 $\pm$ 7.72	442.31 $\pm$ 15.21 ^{①②}

注:①与 BMMSCs 单独培养组及 NPCs 单独培养组比较 $P<0.05$; ②同组各个时间点两两比较 $P<0.05$

共培养组两种细胞 DNA 含量随培养时间延长而逐渐升高,各个时间点差异有统计学意义 ($P<0.05$,表 3)。

2.5 RT-PCR 检测结果

各组细胞聚集蛋白聚糖 Aggrecan 与 II 型胶原蛋白 mRNA 的表达 RT-PCR 检测结果见表 4 及图 3~6。从第 3 天开始,共培养组 NPCs 的蛋白聚糖 Aggrecan、II 型胶原条带均明显亮于 NPCs

单独培养组,且随培养时间延长而逐渐增亮;两组吸光度值比较差异有显著性 ($P<0.05$)。单独 BMMSCs 培养组各时间点几乎无蛋白聚糖 Aggrecan 及 II 型胶原表达;共培养组 BMMSCs 的蛋白聚糖 Aggrecan 及 II 型胶原条带在第 15 天开始出现,且随培养时间延长而逐渐增亮,两组间吸光度值比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

表 3 培养不同时间各组细胞 DNA 含量测定

 $(\bar{x} \pm s, n=6, \text{pg/ml})$

	BMMSCs 单独培养组	NPCs 单独培养组	共培养组 BMMSCs	共培养组 NPCs
3d	0.319±0.031	0.256±0.013	0.357±0.026 ^{①②}	0.309±0.023 ^{②③}
6d	0.299±0.024	0.264±0.017	0.390±0.032 ^{①②}	0.349±0.014 ^{②③}
9d	0.277±0.015	0.259±0.012	0.427±0.015 ^{①②}	0.438±0.042 ^{②③}
12d	0.249±0.035	0.275±0.015	0.465±0.031 ^{①②}	0.495±0.015 ^{②③}
15d	0.205±0.013	0.294±0.008	0.520±0.016 ^{①②}	0.539±0.019 ^{②③}
18d	0.163±0.019	0.281±0.022	0.565±0.018 ^{①②}	0.567±0.020 ^{②③}
21d	0.138±0.016	0.264±0.013	0.628±0.040 ^{①②}	0.605±0.021 ^{②③}

注:①与 BMMSCs 单独培养组比较 $P<0.05$;②同组各个时间点比较 $P<0.05$;③与 NPCs 单独培养组比较 $P<0.05$

表 4 不同时间各组细胞聚集蛋白聚糖 Aggrecan 及 II 型胶原蛋白 mRNA 的表达量

 $(\bar{x} \pm s)$

	NPCs 单独培养组		BMMSCs 单独培养组		共培养组 NPCs		共培养组 BMMSCs	
	Aggrecan	II 型胶原蛋白	Aggrecan	II 型胶原蛋白	Aggrecan	II 型胶原蛋白	Aggrecan	II 型胶原蛋白
3d	0.907±0.013	0.706±0.026	0	0	1.410±0.099 ^{①②}	1.208±0.027 ^{①②}	0	0
6d	0.961±0.019	0.787±0.035	0	0	1.623±0.097 ^{①②}	1.406±0.057 ^{①②}	0	0
9d	0.990±0.011	0.800±0.039	0	0	1.836±0.142 ^{①②}	1.510±0.035 ^{①②}	0	0
12d	1.071±0.016	0.854±0.036	0	0	2.053±0.156 ^{①②}	1.594±0.036 ^{①②}	0	0
15d	1.113±0.024	0.883±0.037	0	0	2.304±0.148 ^{①②}	1.704±0.029 ^{①②}	0.390±0.023 ^②	0.183±0.014 ^②
18d	1.159±0.032	0.929±0.020	0.016±0.011	0	2.559±0.192 ^{①②}	1.832±0.045 ^{①②}	0.516±0.026 ^{②③}	0.344±0.023 ^②
21d	1.258±0.020	0.988±0.023	0.134±0.017	0	2.791±0.176 ^{①②}	1.960±0.051 ^{①②}	0.706±0.031 ^{②③}	0.523±0.027 ^②

注:①与NPCs单独培养组比较 $P<0.05$;②同组各个时间点两两比较 $P<0.05$;③与BMMSCs单独培养组比较 $P<0.05$ 

图 3 BMMSCs 单独培养组不同时间点 Aggrecan 及 II 型胶原 mRNA 的表达

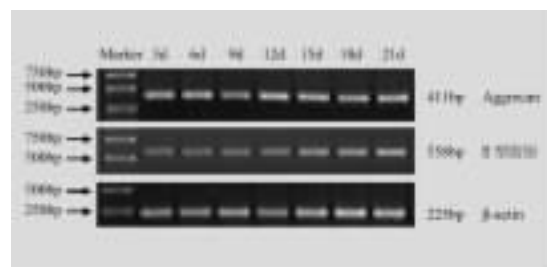


图 4 NPCs 单独培养组不同时间点 Aggrecan 及 II 型胶原 mRNA 的表达

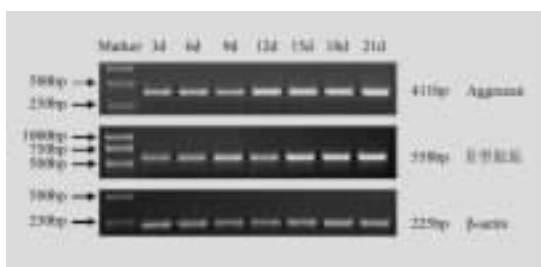


图 5 共培养组中 NPCs 不同时间点 Aggrecan 及 II 型胶原 mRNA 的表达



图 6 共培养组 BMMSCs 不同时间点 Aggrecan 及 II 型胶原 mRNA 的表达

3 讨论

随着对椎间盘退变病理认识的深入,采用生物学方法减缓或逆转椎间盘退变已成为可能。目前,针对椎间盘退变的生物学修复主要集中于细

胞移植治疗。有研究以透明质酸为载体,将 TGFβ1 干预下的兔 BMMSCs 自体移植到退变髓核后,发现在一定时间内髓核组织中蛋白多糖和 II 型胶原的含量增加,延缓了椎间盘的退变^[9]。

Sakai 等^[8]将 BMMSCs 移植入家兔退变椎间盘,结果显示移植 BMMSCs 组椎间盘的高度为正常对照组的 91%、T2 信号强度为正常对照组 81%,蛋白多糖积聚增加。因此 BMMSCs 移植对退变的家兔椎间盘重建是有效的,是一种有价值的治疗方法。

移植 BMMSCs 修复退变椎间盘的机制可能有两种,其一为 BMMSCs 的营养效应(trophic effects)。BMMSCs 作为一种生物活性因子的分泌源(secretory sources),对造血细胞有营养支持功能(trophic mediators)^[9-11]。BMMSCs 通过分泌多种具有生物活性的生长因子/细胞因子,如粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、IL-6 等,直接或间接作用于造血细胞,同时表达的细胞外基质为锚固的造血细胞之间提供了信号交流的平台,在造血细胞增殖、分化过程中起着重要的支持、诱导和调控的作用,但 BMMSCs 本身并不发生分化,此种功能称作 BMMSCs 的营养效应。Yamamoto 等^[12]将 BMMSCs 与 NPCs 直接接触共培养,发现共培养后 BMMSCs 分泌与 NPCs 基质合成相关因子的量明显增加,如 TGFβ1、PDGF、表皮生长因子(EGF)、胰岛素样生长因子-1(IGF-1),且 NPCs 的细胞增殖、DNA 合成、蛋白聚糖合成较单独培养的 NPCs 有明显的上调。在 BMMSCs 移植修复梗死心肌、脑损伤、损伤半月板的研究中,均发现了 BMMSCs 营养效应的存在^[9,13,14]。这些说明,移植的 BMMSCs 可作为生物活性因子的分泌源,它所分泌的某些因子所发生的营养效应,在组织修复中起着关键性的作用。

同时 BMMSCs 作为干细胞具有潜在的多向分化能力。研究^[15]发现 BMMSCs 可以分化为成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞、肝细胞和上皮细胞等。Sakai 等^[16]以 Atelocollagen 凝胶为支架,把分离培养的 BMMSCs 种植到支架上,再自体移植到退变的椎间盘中,结果显示移植后细胞存活并成功繁殖,发育成纵向的纺锤形细胞,这与最初的椎间盘细胞相似。移植 BMMSCs 产生的蛋白多糖延缓了椎间盘退变。将 BMMSCs 与正常 NPCs 体外共培养发现^[17],BMMSCs 中髓核标记基因(Sox-9、aggrecan、II 型胶原等)表达显著增加,提示在 NPCs 所营造的微环境中,BMMSCs 能够发生类髓核分化,从而延缓椎间盘退变,重建椎间盘结构,

进而修复退变椎间盘。但是上述研究均是基于正常髓核微环境下的 BMMSCs 类髓核分化,在实际应用中,均是对处于不同退变程度的椎间盘进行移植修复,髓核细胞的生理特性已经发生改变,细胞数量减少甚至消失,BMMSCs 能否实现类髓核分化修复退变椎间盘需要进一步研究。

基于上述研究,我们将细胞培养上清液中 TGFβ1、PDGF 的表达量作为 BMMSCs 营养效应指标,同时把 BMMSCs 的蛋白聚糖 Aggrecan 及 II 型胶原 mRNA 的表达作为其类髓核分化效应指标。实验发现,BMMSCs 的营养效应及类髓核分化效应在共培养过程中存在动态变化规律:在共培养早期(3~15d),BMMSCs 的营养效应发挥主要作用,通过表达细胞因子(TGFβ1、PDGF),激活 NPCs,促进其增殖和细胞外基质的合成。在共培养后期(15d 开始),BMMSCs 在髓核局部微环境下,发生类 NPCs 分化,合成蛋白聚糖 Aggrecan 及 II 型胶原等细胞外基质。

本实验通过 Transwell 插入式培养皿建立 BMMSCs 与 NPCs 共培养模型,该系统上层插槽底膜为聚碳酸酯透水膜(孔隙 0.4μm),系统中细胞外培养液可相互交接,即 BMMSCs 分泌的细胞因子可以通过隔膜作用于 NPCs,同时 BMMSCs 处于 NPCs 微环境中,本身可能发生类髓核分化,该系统模拟了体内髓核微环境,且较传统三维培养更便于观察细胞的形态学特征,更易检测细胞代谢物质。但是由于仅在体外环境下进行了一些初步探索,深入研究需要在动物模型体内环境中进行。

综上所述,本实验初步研究了 BMMSCs 与 NPCs 共培养后的营养效应与类髓核分化效应的动态变化规律,下一步,我们将把 BMMSCs 移植入退变椎间盘,观察其实时变化轨迹及其营养效应与类髓核分化效应的动态变化规律,以便为更好地选择 BMMSCs 移植治疗退变椎间盘的最佳时间窗、保证受体在不同修复需求下移植的高效性提供新的理论依据和思路,为脊柱退变性疾病的治疗带来新的观念和模式。

4 参考文献

1. Sobajima S, Shimer A, Kim J, et al. Feasibility of a stem cell therapy for intervertebral disc degeneration[J]. Spine J, 2004, 29(4): 117-125.
2. Hiyama A, Mochida J, Iwashina T, et al. Transplantation of mes-

- enchymal stem cells in a canine disc degeneration model[J]. Orthop Res, 2008, 26(5):589-600.
3. Richardson SM, Hughes N, Hunt JA, et al. Human mesenchymal stem cell differentiation to NP-like cells in chitosan-glyc-erophosphate hydrogels[J]. Biomaterials, 2008, 29(1):85-93.
 4. 张传志, 周跃, 李长青, 等. 兔髓核细胞体外培养和重组人转化生长因子- $\beta 1$ 对其代谢影响的研究 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2006, 16(4):280-283.
 5. 赵梓汝, 吴小涛, 祁亚斌, 等. TGF- $\beta 1$ 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.
 6. 张海龙, 傅强, 赵鑫, 等. 兔骨髓间充质干细胞在壳聚糖支架上的诱导培养[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2008, 18(5):385-388.
 7. 邱匀峰, 吴小涛, 赵梓汝, 等. 骨髓间充质干细胞与髓核细胞共培养的实验研究[J]. 东南大学学报(医学版), 2007, 26(4):257-260.
 8. 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.
 9. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators[J]. Cell Biochem, 2006, 98(5):1076-1084.
 10. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine [J]. Cell Physiol, 2007, 213(2):341-347.
 11. Hardy SA, Maitman DJ, Przyborski SA. Mesenchymal stem cells as mediators of neural differentiation [J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2008, 3(1):43-52.
 12. Yamamoto Y, Mochida J, Sakai D, et al. Upregulation of the viability of nucleus pulposus cells by bone marrow-derived stromal cells[J]. Spine, 2004, 29(14):1508-1514.
 13. Li Y, Chen J, Zhang C, et al. Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells[J]. Glia, 2005, 49(3):407-417.
 14. Mangi AA, Noeux N, Kong D, et al. Mesenchymal stem cells modified with akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts [J]. Nature Med, 2003 (9):1195-1201.
 15. Tao H, Ma DD. Evidence for transdifferentiation of human bone marrow-derived stem cells: recent progress and controversies[J]. Pathology, 2003, 35(1):6-13.
 16. 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.
 17. Richardson SM, Walker RV, Parker S, et al. Intervertebral disc cell mediated mesenchymal stem cell differentiation[J]. Stem Cell, 2006, 24(3):707-716.
- (收稿日期: 2008-11-06 修回日期: 2009-03-02)
(英文编审 蒋欣)
(本文编辑 彭向峰)

消息

颈椎外科基础与临床研究新技术学习班通知

宁波市第六医院骨科拟于 2009 年 7 月 23~26 日举办国家级继续医学教育项目“颈椎外科基础与临床研究新技术学习班”[项目编号 2009-04-07-005(国)], 届时将由著名颈椎外科专家贾连顺、胡永成、杨有庚、徐林、徐荣明、陈其昕、倪斌、马维虎等教授授课。

授课内容: 当代颈椎外科研究进展、严重颈椎创伤的治疗、颈椎肿瘤治疗策略、枕颈内固定技术、上颈椎不稳治疗策略、脊柱导航系统、经口咽入路治疗难复性寰枢关节脱位、上颈椎四点内固定技术基础及临床研究(Apofix+Margel 技术)、齿状突骨折的外科治疗策略、下颈椎椎弓根螺钉内固定技术基础及临床研究、下颈椎侧块螺钉内固定技术基础及临床研究、下颈椎关节突螺钉内固定技术基础及临床研究、人工颈椎椎间盘置换技术、严重下颈椎疾病的手术治疗策略、颈椎后纵韧带骨化症治疗策略、颈椎手术失败原因的分析及处理对策、颈椎围手术期处理等。

学习班以具有五年以上骨科临床基础的医师为主要对象, 鼓励学员携带疑难病例资料交流, 计划招收学员 50 名, 按报名先后顺序录取, 额满为止。学习班结束后, 授予国家级 I 类学分 10 分。会务费 800 元(含资料费), 住宿费用自理。同时, 本院常年招收进修医师。

报名截止日期: 2009 年 7 月 15 日。

联系地址: 宁波市中山东路 1059 号, (1) 浙江省宁波市第六医院脊柱外科 马维虎主任、胡勇博士; (2) 浙江省宁波市第六医院科教科 谢辉、魏素华; 邮编: 315040; E-mail: huyong610@163.com。

联系电话: (0574) 87996165, 13065662817, 13291909168; 传真: (0574) 87996165。