

基础研究

模拟微重力下转化生长因子 $\beta 1$ 诱导骨髓间充质干细胞向髓核样细胞分化

韩成龙, 姜 超

(哈尔滨医科大学附属第一医院骨科 150001 哈尔滨市)

【摘要】目的:观察模拟微重力条件下体外转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)诱导骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs)向髓核样细胞表型分化的效果。**方法:**取成年兔骨髓间充质干细胞分离培养并增殖至第 3 代后建立 3 个培养组:微重力诱导培养组(A 组),将经 TGF- $\beta 1$ 转染后的 BMMSCs 在藻酸钙凝胶微球及旋转式细胞培养系统内进行模拟微重力条件下动态培养;诱导培养组(B 组),将经 TGF- $\beta 1$ 转染后的 BMMSCs 在藻酸钙凝胶微球内培养;模拟微重力自然分化组(C 组),将 BMMSCs 在藻酸钙凝胶微球内置于旋转式细胞培养系统内培养。在培养的第 3、7、14、21 天分别检测以上各组 BMMSCs 中 TGF- $\beta 1$ 的含量变化及 BMMSCs 的增殖能力,应用免疫组化、甲苯胺蓝染色检测各组 II 型胶原表达情况,采用 RT-PCR 法检测各组 BMMSCs 的蛋白聚糖及 II 型胶原蛋白 mRNA 的表达。**结果:**培养至第 14 天, A、B 组中已可观察到呈多角形的类髓核样细胞, C 组呈不规则形。从第 3 天开始,上清液中 TGF- $\beta 1$ 的含量和 BMMSCs 中 DNA 的含量 A 组较 B、C 两组明显增高($P < 0.05$),且随时间的延长而逐渐增高。A 组在免疫组化染色中可见 II 型胶原蛋白染色阳性, B 组呈弱阳性, C 组无明显变化。RT-PCR 结果显示 A、B 组的 BMMSCs 中已有蛋白聚糖和 II 型胶原蛋白 mRNA 的表达。**结论:**模拟微重力条件下 TGF- $\beta 1$ 转染的 BMMSCs 在一定时间内可增加合成蛋白聚糖及 II 型胶原蛋白的能力。

【关键词】骨髓间充质干细胞;分化;髓核;TGF- $\beta 1$;微重力

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2011.05.02

中图分类号:Q813.1 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2011)-05-0358-07

Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells(BMMSCs) to nucleus-like pulposus transfected by TGF- $\beta 1$ in the mimic microgravity environment/HAN Chenglong,JIANG Chao//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord,2011,21(5):358~364

【Abstract】 Objective:To observe the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) to nucleus-like pulposus phenotype transfected by TGF- $\beta 1$ and cultured in the mimic microgravity in vitro. **Method:**Bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) obtained from adult rabbit were cultured and proliferated to the third generation, which were assigned into 3 groups as follows: micro-gravity inducing group (group A), BMMSCs transfected by TGF- $\beta 1$ were cultured in calcium alginate gel beads and rotary cell culture system; inducing group (group B), BMMSCs transfected by TGF- $\beta 1$ were cultured in calcium alginate gel beads; microgravity differentiation group (group C), BMMSCs were cultured in calcium alginate gel beads and rotary cell culture system. At 3, 7, 14, 21d, the content of TGF- $\beta 1$ in BMMSCs and the proliferation potency of BMMSCs were detected in all groups respectively, collagen type II was detected by immunohistochemical and Toluidine blue staining, the expression of mRNA of proteoglycan and collagen type II protein was detected by RT-PCR. **Result:** At the 14th day, the polygonal nucleus-like pulposus was observed in group A and B, and abnormal cells were observed in group C. From the 3rd day, the content of TGF- $\beta 1$ in supernate and its DNA in BMMSCs in group A were higher than those in group B and C, and also increased gradually with time. Immunohistochemistry staining of collagen type II protein in BMMSCs climbing film showed positive in group A, weak positive in group B, and negative in group C. RT-PCR results

基金项目:黑龙江省青年科学基金(QC2008C32)、黑龙江省博士后启动金、哈医大一院青年基金(2007097)

第一作者简介:男(1973-),医学博士(后),副主任医师,研究方向:脊柱外科

电话:(0451)85555828 E-mail:hanchenglong1973@126.com 通讯作者:姜超 E-mail:jiangchao0885@163.com

showed expression of proteoglycan and collagen type II mRNA in group A and B. **Conclusion:** BMMSCs transfected by TGF- β 1 and cultured in the mimic microgravity can increase the synthesis potential of proteoglycan and collagen type II.

【Key words】 Bone marrow mesenchymal stem cells; Differentiation; Nucleus pulposus; TGF- β 1; Microgravity

【Author's address】 Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, 150001, China

由椎间盘退变引起的颈肩痛、腰腿痛在临床上十分常见,组织学上其典型特征是细胞减少且功能退化,髓核脱水,合成蛋白聚糖和 II 型胶原蛋白能力减弱。骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMMSCs) 是组织工程中较为理想的种子细胞之一, BMMSCs 具有高度自我更新能力和多向分化潜能,在体外适当的培养条件下可以向成软骨细胞转化^[1]。而髓核细胞为类软骨细胞,本研究拟将转化生长因子 β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 导入 BMMSCs 并应用三维组织细胞旋转培养系统 (rotary cell-culture system, RCCS) 模拟微重力培养,观察其是否可诱导 BMMSCs 向髓核样细胞分化,并增加蛋白聚糖和 II 型胶原蛋白的含量,从而为椎间盘退变的治疗提供一条新途径。

1 材料与方法

1.1 实验动物及材料

2 月龄新西兰大白兔 8 只,雌雄不限,体重 2.5~3.0 kg (哈尔滨医科大学附属第一医院动物中心提供,合格证号:黑动字第 P00102008)。USA 旋转式细胞培养系统 (RCCS, Synthecon)、PTC-200 型 PCR 仪 (MJ Research)、RF-5000 荧光分光光度计 (日本岛津公司); 质粒 pcDNA3.1-TGF- β 1、Trizol Reagent 及 Lipofectamine TM2000 (Invitrogen)、DMEM 培养基、标准胎牛血清 (Hyclone)、Percoll 分离液 (Pharmacia)、II 型胶原酶、Hoechst33258 和 Calf Thymus DNA 等试剂、D-Hanks 液 (Gibco)、小鼠抗兔 II 型胶原抗体、聚集蛋白聚糖多克隆抗体、分析纯低粘度藻酸钠、胰蛋白酶、转化生长因子 β 1、ELISA 试剂盒 (Sigma)、鼠抗兔单克隆抗体 (Neomaker)、木瓜蛋白酶 (E. Merck)。

1.2 BMMSCs 的分离培养及分组

3% 戊巴比妥钠静脉麻醉大白兔,穿刺抽取胫骨骨髓血 (含肝素),与 Hanks 液 1:1 混匀,800 r/min 离心 5 min 去脂。用 DMEM 冲洗,反复几

次,将此冲洗液缓慢加入含有 percoll (密度 1.073) 的 10 ml 离心管中,1500 r/min 离心 15 min,取界面细胞,用 DMEM 反复洗涤细胞 2 次,离心收集细胞。用含 10% 胎牛血清的 DMEM 吹打细胞成单个细胞并接种于 50 ml 培养瓶,37℃、5% CO₂、饱和湿度培养。72 h 后,更换新鲜培养液,未贴壁细胞经反复换液去除,待集落形成,细胞生长至 85% 融合后传代。传代培养时加入 0.25% 胰酶消化,相差显微镜下观察长梭形 BMMSCs 变圆,倾去消化液,加入培养基,并吹打分散细胞。细胞计数板计数,以 1×10^5 个/ml 密度接种于 50 ml 的培养瓶中。此时细胞记作 P1, P3 作为髓核组织工程种子细胞。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,培养至第三代经流式细胞仪鉴定,取细胞制成细胞悬液,3 支 75 ml 规格的塑料管内分别加下列荧光标记的小鼠抗兔单克隆抗体: CD29-FITC, CD44-FITC, CD45-FITC, 同型阴性对照小鼠抗人 IgG1-FITC/IgG2a-FITC 各 20 μ l, 每管加入细胞悬液 100 μ l, 混匀,室温下反应 20 min, 每管加入 1.5 ml PBS, 混匀,1800 r/min 离心 5 min 后弃上清液, 每管加入 500 μ l PBS, 流式细胞仪检测。BMMSCs 分离培养后建立 3 个培养组: 微重力诱导培养组 (A 组) 将 TGF- β 1 转染后在藻酸钙凝胶微球及旋转式细胞培养系统内进行模拟微重力条件下动态培养; 诱导培养组 (B 组) 将 TGF- β 1 转染后的 BMMSCs 在藻酸钙凝胶微球内培养; 微重力自然分化组 (C 组) 将 BMMSCs 在藻酸钙凝胶微球内置于旋转式细胞培养系统内培养。

1.3 BMMSCs 的转染

取 1 μ g 质粒转化大肠杆菌感受态细胞,做单克隆挑取单克隆细胞培养、小提质粒、酶切鉴定并测序。试剂盒大量提取质粒,保存于 -20℃ 备用。骨髓间充质干细胞 1×10^5 个/ml 密度传代于 100 ml 培养皿中,5% CO₂、饱和湿度培养至细胞融合至 90%~95% 时进行转染。转染方法及步骤按

照美国 Invitrogen 公司生产的 Lipofectamine-TM2000 提供的说明书进行。24h 后将转染细胞于倒置显微镜下观察。

1.4 复合支架的制备

BMMSCs 第三代经胰酶消化后,离心、去上清,将所得细胞加入到 12g/L 的藻酸钠溶液中,形成单细胞悬液;10ml 的注射器将此细胞悬液滴加于 35g/L 的 CaCl_2 溶液中,浸泡 10min,即制得包裹有骨髓间充质干细胞的藻酸钠凝胶微球(直径 3.0~4.0mm,均质透亮,黏滞度高于 100mPa^[2]),然后将藻酸钠凝胶微球在 0.5g/L 的多聚赖氨酸溶液中浸泡 10min,制成多聚赖氨酸微胶囊膜,同时置换出凝胶微球中的 Ca^{2+} 。当包裹有骨髓间充质干细胞的藻酸钠微球培养完毕时,回收微球中的骨髓间充质干细胞,用 22g/L 的柠檬酸钠溶液将微球溶解即可。

1.5 模拟微重力状态下培养细胞

使用 RCCS 中 50ml 容积的高截面纵横比容器(high aspect ratio vessel, HARV)进行培养。细胞接种前,将容器所有部件在温和中性洗涤液中浸泡 1h,双蒸漂洗并浸泡过夜,重新组装,100%乙醇浸泡 24h,双蒸水浸泡 24h。高压蒸汽灭菌,无血清培养基浸泡过夜后备用。将 A 组、B 组、C 组的 BMMSCs/藻酸钠凝胶微球置于 50ml HARV 容器中,补充培养液充满整个容器,排净气泡,固定反应器于旋转制动装置,并放入细胞培养箱内,在 37℃、5% CO_2 条件下,以 25r/min 的速度低速转动生物反应器。在旋转培养 BMMSCs 初期,定期观察反应器内气泡产生情况,随时停止转动,补充培养液以排空气泡。48h 全量更换培养液,培养时限 3d、7d、14d、21d 时分别进行各项检测。

1.6 检测指标

1.6.1 TGF- β 1 含量测定 ELISA 法检测 A 组、B 组、C 组在不同时间点各孔内细胞培养上清液中 TGF- β 1 的含量。

1.6.2 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。

1.6.3 组织学检测 甲苯胺蓝染色:分别于诱导的第 3、7、14、21 天时取出盖玻片。爬片用 10%中性甲醛固定,水洗,1%甲苯胺蓝室温染色 30min。

加入 95%酒精,洗去多余的染液,封片。Ⅱ型胶原免疫组化染色^[3]:分别于诱导的第 3、7、14、21 天时取出盖玻片,按免疫组化试剂盒说明操作。

1.6.4 聚集蛋白聚糖及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俊生物公司合成,引物序列与扩增长度见表 1。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。

1.7 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,组间两两比较使用 t 检验,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 细胞形态观察及鉴定结果

BMMSCs 分离培养 48h 后少量细胞贴壁,呈纺锤形,7d 后可见明显的细胞集落形成,14d 出现致密贴壁层,铺满瓶底。传代细胞呈均匀一致长梭形,24~48h 出现细胞克隆,排列紧密呈漩涡状,7d 出现致密贴壁层,细胞体积增大,呈草束状排列;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。培养至第 14 天,TGF- β 1 转染的 A、B 组中已可观察到趋向于多角形的类髓核样细胞,C 组呈不规则形,至第 21 天,A 组用柠檬酸钠溶液溶解藻酸钠凝胶微球成为澄清的液体,离心收获细胞,观察细胞增殖活跃,细胞形态为梭形、多角形、不规则

形,数量较多,B组部分细胞呈多角形、梭形及不规则形,C组呈不规则形贴满瓶壁。

2.2 细胞因子含量测定结果

A组从第3天起,上清液中TGF- β 1的含量较B组高,且明显高于C组($P<0.05$),上清液中TGF- β 1的含量变化随培养时间的延长而逐渐增高,第21天达最高。各个时间点差异有统计学意义($P<0.05$,表2)。

2.3 DNA含量测定结果

培养第3天A组细胞DNA含量随时间延长而逐渐高于B组,且明显较C组升高($P<0.05$),各个时间点差异有统计学意义($P<0.05$,表3)。

2.4 免疫组化检测结果

甲苯胺蓝染色:A组BMMSCs诱导第14天,BMMSCs变成多边形,胞浆呈紫蓝色。诱导第21天,BMMSCs变成多边形或圆形,胞浆呈明显的紫蓝色,异染性明显,胞核清晰,可见核仁(图2a);B组BMMSCs培养第21天胞浆呈浅紫蓝染色,异

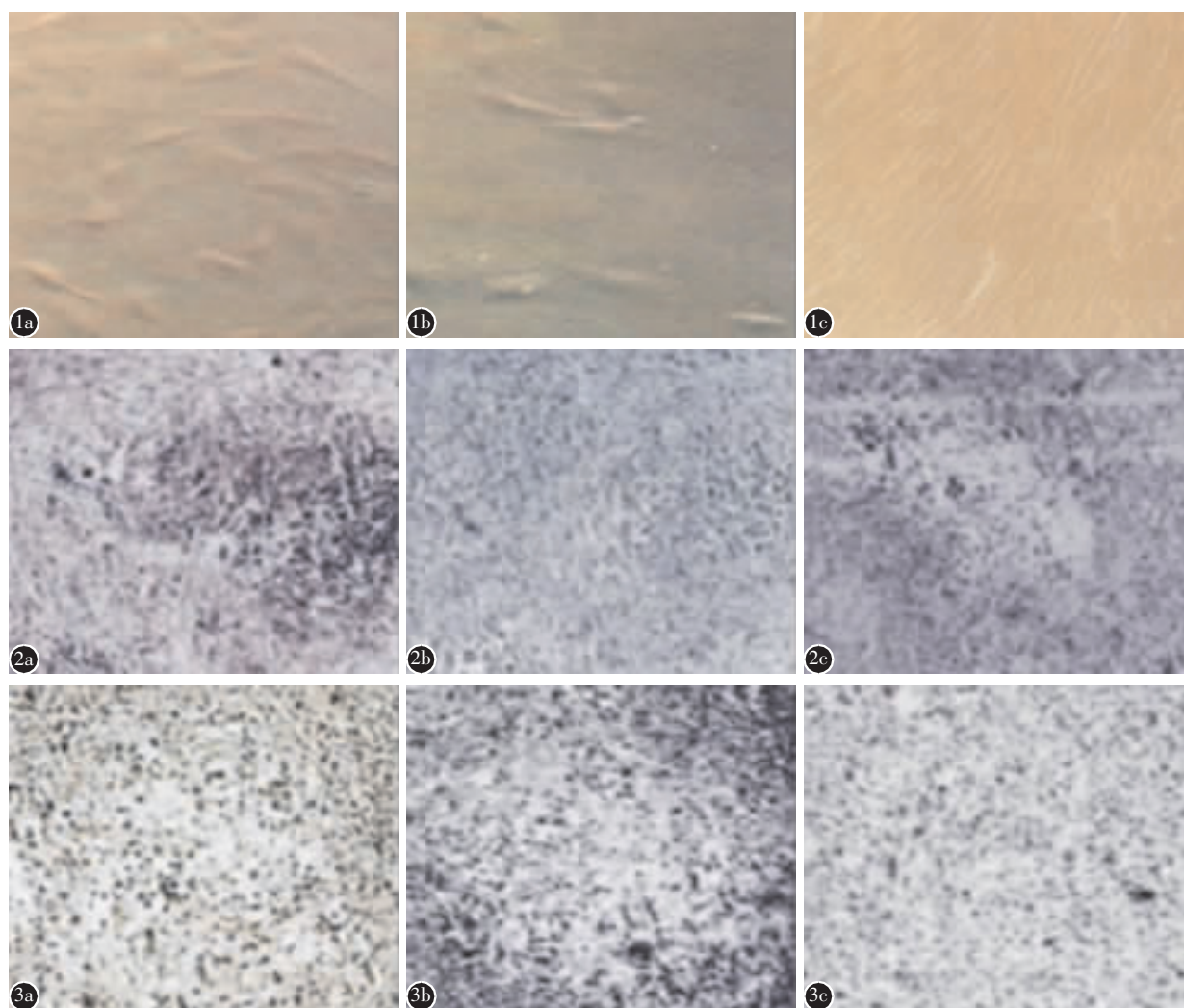


图1 a A组培养第21天细胞增殖活跃,细胞形态为梭形、多角形、不规则形,数量较多($\times 100$) b B组BMMSCs培养第21天时部分细胞呈多角形、梭形及不规则形($\times 100$) c C组培养第21天细胞呈不规则形贴满瓶壁 **图2** a A组培养第21天BMMSCs变成多边形或圆形,胞浆呈明显的紫蓝色,异染性明显,胞核清晰,可见核仁(甲苯胺蓝染色 $\times 100$) b B组培养第21天BMMSCs胞浆呈浅紫蓝染色,异染不明显,胞核清晰,可见核仁(甲苯胺蓝染色 $\times 100$) c C组培养第21天BMMSCs呈长梭形,未见明显的异染性(甲苯胺蓝染色 $\times 100$) **图3** a A组培养第21天BMMSCs呈多边形,胞核清晰,胞浆可见着色较棕褐色颗粒(Ⅱ型胶原免疫组化染色 $\times 100$) b B组培养第21天BMMSCs胞浆可见着色浅褐色颗粒,胞核清晰(Ⅱ型胶原免疫组化染色 $\times 100$) c C组培养第21天BMMSCs绝大多数呈长梭形,胞核清晰蓝染,胞浆未见棕褐色颗粒(Ⅱ型胶原免疫组化染色 $\times 100$)

然不明显,胞核清晰,可见核仁(图 2b);C 组培养第 21 天可见 BMMSCs 细胞呈长梭形,未见明显的异染性(图 2c)。Ⅱ型胶原免疫组化染色:A 组 BMMSCs 诱导第 7 天,BMMSCs 呈多边形,胞核清晰,胞浆可见着色较棕褐色颗粒;诱导第 14 天,BMMSCs 呈圆形或多边形;诱导第 21 天时 BMMSCs 同诱导第 14 天的 BMMSCs(图 3a)。B 组 BMMSCs 培养第 21 天胞浆可见着色浅褐色颗粒,胞核清晰(图 3b)。C 组第 21 天时 BMMSCs 绝大多数呈长梭形,胞核清晰蓝染,胞浆未见棕褐色颗粒(图 3c)。

2.5 RT-PCR 检测结果

各组细胞聚集蛋白聚糖与Ⅱ型胶原蛋白 mRNA 的表达及 RT-PCR 检测结果见表 3。从第 14 天开始,A 组 BMMSCs 的蛋白聚糖、Ⅱ型胶原条带与 B 组比较差别明显,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($P<0.05$)。C 组无明显变化各时间点几乎无蛋白聚糖及Ⅱ型胶原表达(图 4)。

表 1 引物序列与扩增长度

mRNA	引物	序列	片段长度 (bp)
Ⅱ型胶原蛋白	上游	ACGCCACGCTCAAGTCCCTCAA	558bp
	下游	TGTGTTTCGTGCAGCCATCCTG	
蛋白聚糖 Aggrecan	上游	GAACCTACGGCATCCGGGACA	411bp
	下游	CCTCACCGCCCACTCCAAAGA	
β-actin	上游	TCACCATGGATGATGATATCGC	225bp
	下游	CGTGCTCGATGGGGTACTTCA	

3 讨论

3.1 TGF-β1 转染的 BMMSCs 向髓核样细胞的分化

椎间盘退变是一类高发病率的疾病,其主要

表 2 不同时间点各组细胞培养上清液中 TGF-β1 和 DNA 含量测定 ($\bar{x}\pm s, n=6, \mu\text{g/ml}$)

	C组		B组		A组	
	TGFβ1 含量	DNA 含量	TGFβ1 含量	DNA 含量	TGFβ1 含量	DNA 含量
3d	101.13±7.16	0.255±0.025	203.62±12.33	0.319±0.011	313.82±15.81 ^{①②}	0.337±0.016 ^{①②}
7d	114.24±5.32	0.261±0.036	264.26±13.35	0.277±0.05	425.93±17.10 ^{①②}	0.447±0.015 ^{①②}
14d	145.12±6.27	0.311±0.055	268.35±14.61	0.365±0.013	515.81±20.69 ^{①②}	0.550±0.016 ^{①②}
21d	173.53±10.45	0.245±0.065	252.91±18.26	0.438±0.016	616.75±21.37 ^{①②}	0.618±0.030 ^{①②}

注:①与 B 组及 C 组比较 $P<0.05$,②同组各个时间点两两比较 $P<0.05$

表 3 不同时间各组细胞聚集蛋白聚糖及Ⅱ型胶原蛋白 mRNA 的表达量 ($\bar{x}\pm s, \mu\text{g/ml}$)

	C组		B组		A组	
	Aggrecan	Ⅱ型胶原蛋白	Aggrecan	Ⅱ型胶原蛋白	Aggrecan	Ⅱ型胶原蛋白
3d	0	0	0	0	0	0
7d	0	0	0	0	0.907±0.013 ^{①②}	0.706±0.026 ^{①②}
14d	0.016±0.011	0	0.516±0.026	0.706±0.031	0.990±0.011 ^{①②}	0.800±0.039 ^{①②}
21d	0.134±0.017	0	0.706±0.031	0.706±0.031	1.113±0.024 ^{①②}	0.883±0.037 ^{①②}

注:①与 B 组及 C 组比较 $P<0.05$,②同组各个时间点两两比较 $P<0.05$

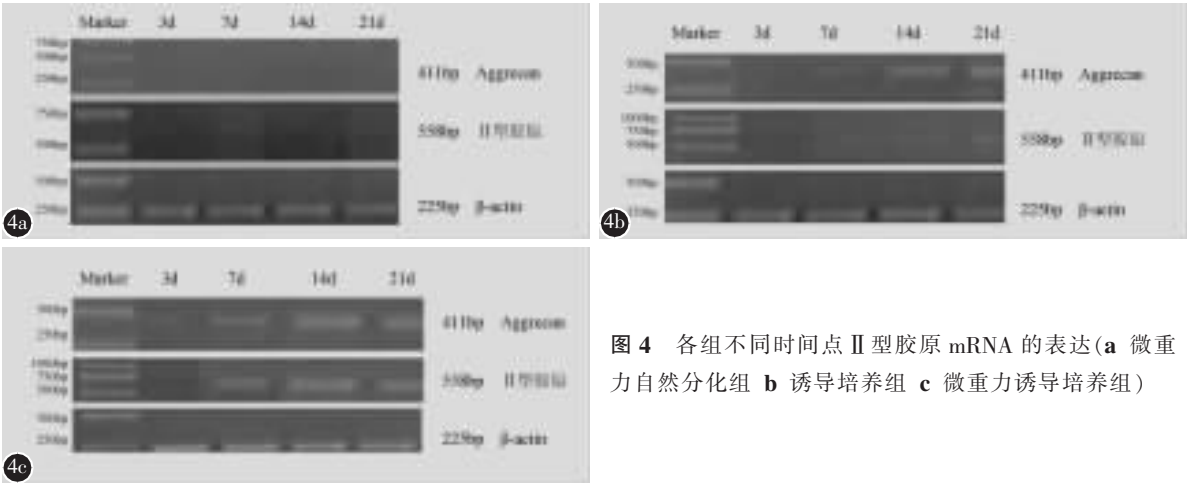


图 4 各组不同时间点Ⅱ型胶原 mRNA 的表达(a 微重力自然分化组 b 诱导培养组 c 微重力诱导培养组)

表现为髓核细胞和细胞外基质 I、III 型胶原的增加,蛋白聚糖和 II 型胶原减少,以及髓核细胞数减少且被成纤维细胞代替,进而导致含水量的降低,椎间盘功能丧失^[4-6]。髓核细胞为类软骨细胞,软骨细胞表型的改变有赖于支架材料的选择、机械性刺激、加入生长因子等细胞外环境的变化^[7-11]。而生长因子和 BMMSCs 可促进体外培养椎间盘的增殖和分化^[12]。研究发现 BMMSCs 接种培养前,不表达分化相关标记,如 I、II、III 型胶原、碱性磷酸酶、骨桥蛋白等^[13];依据这些特点采用基因转染技术将某些生物活性因子的基因通过组织工程的方法导入目标细胞,可使细胞比较稳定地合成和分泌某生物因子,从而达到促进细胞增殖和分化等目的。Risbud 等^[14]的研究证实,BMMSCs 能分化成髓核样细胞,且在低氧环境及 TGF- β 1 存在的条件下,能使 BMMSCs 趋于与髓核表型一致的方向分化;将诱导后的 BMMSCs 应用于损伤及退变椎间盘动物模型中,能促进退变组织的再生。Steck 等^[15]通过在 TGF- β 1 介导的培养基上培养成体 BMMSCs,证实经诱导后的 BMMSCs 基因表型与髓核细胞相似。本实验结果显示培养 21d 后, TGF- β 1 转染的 A、B 组细胞形态已经发生明显改变,从最初的长梭形、纺锤形变为多角形,其外形已经十分接近髓核细胞。我们将细胞培养上清液中 TGF β 1 的表达量作为 BMMSCs 转染效应的指标,结果显示培养后第 3 天, A 组 BMMSCs 中 TGF β 1 的含量较 B 组高,且较 C 组明显增高($P < 0.05$),并随时间的延长而逐渐增高,第 21 天达最高。同时将 DNA 的含量检测作为 BMMSCs 增殖活性的标志,培养第 3 天 A 组细胞 DNA 含量随时间延长而逐渐高于 B 组,较 C 组明显升高($P < 0.05$),说明 A 组中 BMMSCs 具有更高的生物活性,因此其增殖及合成细胞外基质的能力更强。A 组在 BMMSCs 的细胞爬片免疫组化染色中可见 II 型胶原染色阳性、BMMSCs 胞体着色,呈现出典型的类髓核细胞表型;而 B 组呈弱阳性,仅少数细胞表达 II 型胶原蛋白;C 组未见明显异染,这表明 BMMSCs 胞体中已有 II 型胶原蛋白的合成。我们将 BMMSCs 中蛋白聚糖及 II 型胶原 mRNA 的含量作为其髓核样细胞分化效应指标,RT-PCR 检测从基因水平证实 II 型胶原蛋白和聚集蛋白聚糖 mRNA 在 A、B 两组 BMMSCs 胞体中存在,这些主要存在于髓核细胞中的物质在 BMMSCs 中

已有明显表达,提示 TGF- β 1 转染的 BMMSCs 已向髓核细胞分化,且随着时间的延长这种分化越来越明显。

3.2 模拟微重力三维培养对 BMMSCs 合成蛋白聚糖及 II 型胶原蛋白的影响

动态三维培养可最大程度地发挥细胞的功能,为 BMMSCs 的体外培养提供了一种全新模式。Sikavitsas^[16]采用动态和静态的三维培养体系的比较,发现动态三维可降解材料上的老鼠的 BMMSCs 在增殖分化和三维细胞培养体系中能够有效地保持旺盛的细胞活性。为了更好地提供三维细胞培养体系,本实验中将 BMMSCs 包裹于藻酸钠凝胶微球之中进行培养,这既可以为体外培养的 BMMSCs 提供一种三维微环境,又有利于其生长^[17,18];另一方面,美国航空航天局(NASA)发明的旋转细胞培养系统(RCCS)可以在地面模拟出微重力环境,这两方面技术的结合为贴壁生长的 BMMSCs 进行模拟微重力三维培养提供了适宜的环境。组织细胞处于稳定的流体悬浮状态,流体动力抵消了重力沉降现象,细胞生长受到持续低剪切力刺激,且不断改变方向的重力向量可能直接影响基因表达,或者间接促进细胞的自分泌/旁分泌,有利于细胞间的信号传递,从而提高细胞分化质量^[19]。本实验结果显示在模拟微重力三维培养条件下 TGF- β 1 转染的 BMMSCs 中 TGF- β 1 的含量及 RT-PCR 法检测蛋白聚糖及 II 型胶原 mRNA 的表达均明显高于其他两组,提示模拟微重力条件下可促进 BMMSCs 合成蛋白聚糖及 II 型胶原蛋白的能力。

3.3 BMMSCs 修复椎间盘退变的展望

微环境对 BMMSCs 诱导的影响机制是复杂的,本研究结果提示模拟微重力条件下 TGF- β 1 的刺激是 BMMSCs 定向分化为髓核细胞的必要因素。但是,这种刺激如何转换成胞内的信号通路等尚有待进一步研究。随着研究深入,通过体外模拟椎间盘微环境的模型将有助于探索干细胞分化为髓核细胞的条件,并且通过模拟这些环境因素使尽可能多的 BMMSCs 分化为髓核细胞样的甚至是成熟的髓核细胞,为应用于临床治疗椎间盘退变奠定基础。

4 参考文献

1. Abdallah BM, Kassem M. Human mesenchymal stem cells;

- from basic biology to clinical applications[J].Gene Ther,2008,15(2):109-116.
2. Markusen JF, Mason C, Hull DA, et al. Behavior of adult humanmesenchymal stem cells entrapped in alginate-GRGDY beads[J].Tissue Eng,2006,12(4):821-830.
3. Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, et al. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse[J].J Bone Miner Res,1999,14(5):700-709.
4. Feng H, Danfelter M, Stromqvist B, et al. Extracellular matrix in disc degeneration [J].J Bone Joint Surg Am,2006,88 (Suppl 2):25-29.
5. Colombini A, Lombardi G, Corsi MM, et al. Pathophysiology of the human intervertebral disc [J].Int J Biochem Cell Biol, 2008,40(5):837-842.
6. Le Maitre CL, Pockert A, Buttle DJ, et al. Matrix synthesis and degradation in human intervertebral disk degeneration [J]. Biochem Soc Trans,2007,35(Pt 4):652-655.
7. Kuo YC, Ku IN. Effect of fet concentration human fibronectin, and cation supplement on the tissue-engineered carrilafe [J]. Biotechmol Prog,2007,23(1):238-245.
8. Porter RM, Akers RM, Howard RD, et al. Alfinatencapsulation impadts the insulin-like frowth factors system of monolayer-expanded equine articular chondrocytes and cell response to interleukin-1 β [J].Tissue Eng,2007,13(6):1333-1345.
9. Liu G, kawafuchi H, Ogasawata T, et al. Optimal combination of suluble facters for tissue engineering of permanent cartilage from cultured human chondrocytes [J].J Biol Chem,2007,282 (28):20407-20415.
10. Yoon DM, Fisher JP. Effects of exogenous IFG-1 delivery on the early expression of IFG-1 sifnaling molecules by alginate embedded chondrocytes [J].Tissue Eng,2008,14(7):1263-1273.
11. Fen G, Wan Y, Balian G, et al. Adenovirus-mediated expression of growth and differentiation factor-5 promotes chondrogenesis of adipose stem cells [J].Growth Factors,2008,26(3):132-142.
12. Chen WH, Liu HY, Lo WC, et al. Intervertebral disc regeneration in an ex vivo culture system using mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma [J].Biomaterials,2009,7(19):1-11.
13. Zohar R, Sodek J, McCulloch CA. Characterization of s tromal progenitorcells enriched by flow cytometry [J].Blood,1997,90 (9):3471-3481.
14. Risbud MV, Albert TJ, Vresilovic EJ, 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.
15. 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.
16. Sikavitsas VI, Bancroft GN, Mikos AG. Formation of three-dimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor [J].J Biomed Mater Res,2002,62(1):136-148.
17. Markusen JF, Mason C, Hull DA, et al. Behavior of adult humanmesenchymal stem cells entrapped in alginate-GRGDY beads [J].Tissue Eng,2006,12(4):821-830.
18. 侯天勇, 许建中, 吴雪峰, 等. 藻酸盐微球的制备及其对共培养的 MSCs 的影响 [J].第三军医大学学报,2007,29(3):199-202.
19. 张莉, 郭全义, 眭翔, 等. 羊软骨细胞在生物反应器中的培养和扩增 [J].中国矫形外科杂志,2006,14(6):446-448.
- (收稿日期:2010-7-22 修回日期:2010-11-27)
(英文编审 蒋欣/贾丹彤)
(本文编辑 彭向峰)

消息

第三届中国国际腰椎外科学术会议通知

由解放军总医院第一附属医院、解放军 306 医院、《中华外科杂志》和《中国脊柱脊髓杂志》编辑部联合主办,天津医科大学总医院骨科和天津市医学会骨科学分会承办的“第三届中国国际腰椎外科学术会议”定于 2011 年 6 月 3~5 日在天津举行,恰逢天津医科大学 60 华诞,特借此次学术会议,共同分享国内外腰椎外科最新学术研究成果。

本次会议将就腰椎外科的热点问题邀请国内外腰椎外科领域著名学者作中心发言,进行病例讨论,并结合资深专家点评,进行深入研讨和经验交流。欢迎脊柱外科同道踊跃出席本次会议,积极参与讨论和交流,阐述大家的观点和见解。注册参会者可获全国继续教育 12 学分。

投稿须知:尚未公开发表的论文结构式摘要(限 800 字),注明作者单位、通信地址、邮政编码、手机、电子邮箱地址。

详情请登录:www.chinalumbar.org; 联系人:刘涛 (13602194058), 李晖 (13302032123), 冯世庆 (13920286292)。