

综述

共培养技术促干细胞向类髓核细胞分化的研究进展

Development of research in co-culture technology to promote the stem cells to the nucleus pulposus-like cells differentiation

姜刚强, 阮狄克

(第二军医大学海军临床医学院骨科 100048 北京市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2013.09.18

中图分类号: Q813.1, R681.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2013)-09-0856-04

椎间盘退变(intervertebral disc degeneration, IDD)是一系列脊柱退行性疾病的病理生理基础,并可由此导致椎间盘突出、椎管狭窄、脊椎滑脱及退行性侧凸等^[1],是引起腰痛的主要原因之一。对于椎间盘退变性疾病的治疗,目前主要有保守治疗及手术治疗两种方法,但均不能从组织学上根本逆转椎间盘退变。通过细胞治疗等生物学方法修复退变椎间盘是脊柱外科基础研究的热点。近年来,国内外学者在共培养技术促干细胞向类髓核细胞分化方面取得了较大进展,笔者就干细胞与髓核细胞(nucleus pulposus cells, NPCs)体外共培养的研究进展综述如下。

1 共培养技术的原理及应用

共培养技术主要用于诱导细胞向另一种细胞分化、诱导细胞自身的分化、维持细胞的功能和活力、对细胞增殖进行调控和提高代谢产物等。目前,细胞之间的共培养方法主要包括直接共培养和间接共培养,直接共培养是将 2 种或 2 种以上的细胞同时或分别接种于同一孔中,不同种类的细胞之间直接接触;间接共培养是将 2 种或 2 种以上的细胞分别接种于不同的载体上,然后将这两种载体置于同一培养环境中,使不同种类的细胞共用同一培养体系而不直接接触。有文献报道共培养细胞之间的作用是通过一种细胞向环境中分泌生长因子和细胞因子促进另一种细胞分化完成的^[2-3]。近年来,随着共培养技术的发展,已经涌现出多种共培养方式,包括单层共培养、三维共培养、接触式共培养、非接触式共培养和微团共培养等,每种共培养方式各有其优缺点。共培养技术在其他领域的应用已有报道, Liu 等^[4]利用骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)来源的内皮细胞(bone marrow derived endothelial progenitor cells, EPCs)与活化的肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)非接触式 Tanswell 共培养(细胞比例为 1:1),共培养后第 2 天即发

现基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、肝源性生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)水平显著升高,表明 EPCs 可以促进活化 HSCs 的凋亡、抑制其增殖和成纤维能力,而 HGF 在这一过程中发挥重要作用。

2 BMSCs 与 NPCs 共培养

BMSCs 具有多向分化潜能,在合适的诱导条件下可向成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、骨骼肌细胞和神经元细胞等多种细胞分化^[5];其分化受细胞外环境中多种激素、配体、各种刺激因子的影响,如噻唑烷二酮(TZD)可作用于 MSCs 上的过氧化物酶体增殖因子活化受体(PPAR- γ),促进 MSCs 向脂肪细胞分化,而抑制其向成骨细胞分化^[6]。如果激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,则促进 MSCs 向成骨细胞分化,而抑制其向成软骨及脂肪细胞分化^[7]。MSCs 还具有低免疫原性的优势,可以逃避细胞毒性 T 细胞和 NK 细胞的杀伤作用,适宜进行异体移植。Mochida 等^[8]发现犬的 NPCs 和自体 MSCs 体外共培养后, NPCs 可被激活并延缓椎间盘的退变。为 NPCs 和 MSCs 共培养修复椎间盘退变提供了理论依据。

有文献报道^[9],细胞因子、低氧环境及共培养均可诱导 BMSCs 向类髓核细胞分化,但共培养技术能获得更多数量、且表型稳定的类髓核细胞。Niu 等^[10]利用兔的 BMSCs 与 NPCs 按 50:50 进行接触式共培养,研究了 BMSCs 对 NPCs 的刺激作用,共培养 14d 后发现,实验组 NPCs 的生长速度、端粒酶活性明显高于对照组,蛋白聚糖及 II 型胶原纤维的 mRNA 表达也显著增高;免疫组化分析结果证实共培养条件下 BMSCs 能够促进 NPCs 中蛋白聚糖和 II 型胶原纤维的生成,延缓 NPCs 的退变。

Strassburg 等^[11]对人 BMSCs 和同源 NPCs(50:50)进行接触式单层共培养,按 NPCs 是否有退分为退变组和非退变组,培养 7d 后发现,退变组 NPCs 和非退变组 NPCs 均可诱导 BMSCs 向类髓核细胞分化,并认为在共培养条件

第一作者简介:男(1988-),在读硕士研究生,研究方向:脊柱外科
电话:(010)66958224 E-mail:goshang2011@126.com
通讯作者:阮狄克 E-mail:ruandike@yahoo.com.cn

下 NPCs 可以刺激 BMSCs 中软骨源性骨形态发生蛋白-1 (cartilage-derived morphogenetic protein-1, CDMP-1)、转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-IGF-1)、结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 等生长因子 mRNA 的表达, 从而诱导 BMSCs 向类髓核细胞的分化。

Strassburg 等^[12]应用 BMSCs 和 NPCs 进行接触式共培养对细胞之间的作用机制进行了研究, 发现共培养时两种细胞发生融合, 细胞之间存在双向膜转移、功能性缝隙连接, 扫描式电子显微镜 (SEM) 观察到细胞培养液中存在微泡 (直径为 30nm~1 μ m), 认为 BMSCs 和 NPCs 共培养时细胞之间的相互作用可能是通过上述机制完成的。Watanabe 等^[13]通过 BMSCs 和 NPCs 接触式共培养发现, 接触式培养体系会明显促进 BMSCs 向 NPCs 的分化, NPCs 退变程度会影响 BMSCs 向 NPCs 分化。Wu 等^[14]发现以 75% 的 NPCs 和 25% 的 BMSCs 共培养能更好地刺激 BMSCs 的分化和 NPCs 中 SOX-9、II 型胶原纤维及蛋白多糖的表达, 认为共培养的细胞比例也是影响 BMSCs 和 NPCs 相互作用的一个重要因素。Ehlicke 等^[15]的研究发现, 除了传统因子 TGF- β 3 以外, IGF-1、成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factor-2, FGF-2) 和血小板衍生生长因子 (platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB) 等生物因子也能有效促进 BMSCs 向 NPCs 分化。Stoyanov 等^[16]认为缺氧和生长分化因子-5 (growth and differentiation factor-5, GDF-5) 也是诱导 BMSCs 向 NPCs 分化的主要因素。除此之外, 也有文献表明对培养条件的机械刺激也能有效促进 BMSCs 向 NPCs 的分化和 BMSCs 中蛋白多糖与 SOX-9 的表达^[17]。

3 脂肪干细胞与 NPCs 共培养

脂肪干细胞 (adipose-derived stem cells, ADSCs) 和 BMSCs 具有相似的多向分化潜能, 目前在组织工程和再生医学中被认为是非常有前途的种子细胞。同其他干细胞相比, ADSCs 具有取材方便, 数量充足, 创伤较小, 细胞增殖快速等优点。有研究^[18]表明, ADSCs 能通过作用于机体的树突状细胞发挥免疫负调节作用, 并且当 ADSCs 与异基因外周血细胞共同培养时, 不能刺激混合淋巴细胞的反应, 这表明 ADSCs 能产生免疫耐受, 逃避淋巴细胞的毒副作用。Dosier 等^[19]研究发现, ADSCs 在向成软骨细胞分化时细胞内基质矿化存在物种、药物治疗剂量、时间的差异, 用白芦藜醇预处理后的 ADSCs 可明显增加其成骨潜能。Sugii 等^[20]的研究发现, ADSCs 可再次诱导生成多能干细胞 (induced pluripotent stem cell, IPS), 而 ADSCs 分泌的多功能因子, 如 FGF、TGF β 、纤连蛋白及玻连蛋白对 IPS 提供营养支持。这些结果表明, ADSCs 在椎间盘退变修复治疗中具有较大的应用潜能。

利用细胞因子^[21]或者环境因素^[22]使 ADSCs 向类髓核细胞分化, 同样存在获得类髓核细胞数目较少、表型不稳

定的缺点。Lu 等^[23]将 ADSCs 和 NPCs 分别进行单层 Transwell 和微团 Transwell 共培养, 对培养条件进行了探索, 共培养 2 周后, 发现微团 Transwell 培养下 NPCs 中的蛋白聚糖和 II 型胶原蛋白基因的表达式明显升高, ADSCs 中上述基因及骨调素、I 型胶原蛋白、PPAR- β 基因的表达却不受影响, 提示 ADSCs 可被诱导分化成类髓核细胞, NPCs 分泌的可溶性因子对这种分化有明显调节作用, 而微团培养条件对这种分化是必不可少的。Choi 等^[24]将 ADSCs 和退变或非退变 NPCs 分别进行二维 (2 dimensional, 2D) 和三维 (3 dimensional, 3D) 多孔膜共培养, 2 周后发现, ADSCs 与非退变 NPCs 培养组中蛋白聚糖和 II 型胶原蛋白基因的表达明显高于退变组; 3D 培养组中 NPCs 相关基因表达少于 2D 培养组, 这与 Wang 等^[25]的报道相反, 后者认为 3D 环境更有利于细胞分化。

Yang 等^[26]用腺病毒携带 SOX-9 基因转染的 ADSCs 与 NPCs 在含有 TGF- β 3 的 3D 环境中共培养, 结果显示 ADSCs 向类髓核细胞分化, 同时观察到 NPCs 中蛋白聚糖和 II 型胶原蛋白的表达增加, 由此可见重组表达的 SOX-9 可以促进 ADSCs 向类髓核细胞分化。Tapp 等^[27]的研究发现, 共培养条件下 NPCs 可诱导 ADSCs 表达蛋白多糖和 II 型胶原等软骨样表型基因, 而 NPCs 自身的软骨样表型基因表达也显著增高。由此可见, 共培养条件下 ADSCs 和 NPCs 之间是相互影响的。Li 等^[28]将兔 ADSCs 接种于海藻酸盐三维载体上, 同 NPCs 进行非接触共培养, 结果发现 ADSCs 可被诱导成类髓核细胞, 表达 II 型胶原和蛋白多糖等软骨样表型基因, 而 NPCs 的增殖活性明显提高, 并且蛋白多糖、II 型胶原等基质分子的合成显著增加。这些研究均表明 NPCs 对 ADSCs 确有诱导分化的效应, 同时 ADSCs 对 NPC 具有一定的营养促进效应。而细胞之间的作用机制目前尚存在争议。

因此, 通过与 NPC 共培养, ADSCs 能被诱导分化为类髓核细胞, 在椎间盘退行性疾病的细胞生物学治疗中表现出巨大的潜力。

4 华通胶间充质干细胞与 NPCs 共培养

华通胶间充质干细胞 (Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells, WJMSCs) 来源于脐带华通胶组织, 具有多向分化潜能。Mitchell 等^[29]报道, 相对于其他间充质干细胞, WJMSCs 具有较强的端粒酶活性, 其分化能力更强, 倍增时间更短。有学者通过培养发现, 在细胞传至第 7 代时, 其细胞数量增加 300 倍^[30]。有文献报道^[31], 在单层培养环境中的低氧条件能明显促进 WJMSCs 的增殖能力, 并促进其向中胚层分化, 这点使其更加适合与 NPCs 共培养。由于 WJMSCs 获取方便、相对清洁、容易消毒且较少引起伦理问题。因此, 人 WJMSCs 是一种较为理想的组织工程种子细胞。

Ruan 等^[32]将 WJMSCs 与 NPCs 进行体外单层接触和非接触式共培养, 培养 1 周后发现两种共培养方式

WJMSCs 中蛋白聚糖、Ⅱ型胶原纤维和 SOX9 等基因的表达均明显高于单独培养组,其中单层接触式共培养组中以 WJMSCs:NPCs 为 25:75 组增加最为明显,WJMSCs 诱导分化为类髓核细胞。WJMSCs 向类髓核细胞分化可能是由于 NPCs 分泌的生物活性因子如 TGF- β 、IGF-1、EGF 和 PDGF 等的诱导刺激作用,这些因子透过插入层隔膜,进而促进 WJMSCs 的分化^[31]。

目前关于 WJMSCs 共培养的研究较少。但 WJMSCs 具有免疫特权、免疫耐受,且具有多向分化的空间和潜能。因此,WJMSCs 有望成为治疗特殊疾病的重要细胞来源^[34]。

5 其他干细胞与 NPCs 共培养

除了上述常用干细胞与 NPCs 共培养可诱导干细胞向类髓核细胞分化以外,目前关于其他干细胞与 NPCs 共培养的研究也日益增多。Vadala 等^[35]将人 NPCs 与鼠肌肉来源干细胞(muscle-derived stem cells,MDSCs)进行单层接触式共培养(NPCs:MDSCs 分别为 0:100,25:75,50:50,75:25,100:0),2 周后显示共培养组比 NPCs 单独培养组糖胺聚糖(glycosaminoglycan,GAG)含量明显增高,所有组中 GAG 含量和 DNA 含量比 MDSCs 单独培养组均有增加。这既可以解释为 MDSCs 向类髓核细胞分化,也可解释为 MDSCs 对 NPCs 本身的一种刺激效应。Murrell 等^[36]将鼠的嗅鞘干细胞(olfactory stem cells,OSCs)与 NPCs 进行共培养,4d 后发现,OSCs 表现出向类髓核细胞分化的特性,OSCs 中Ⅱ型胶原纤维、蛋白多糖含量较对照组明显升高,提示 OSCs 具有修复退变椎间盘的潜能。Chen 等^[37]首次报道滑膜干细胞(synovium-derived stem cells,SDSCs)可以向类髓核细胞分化。他将猪的 SDSCs 和同体 NPCs 按 50:50 在无血清培养基中进行接触式共培养,以等量细胞单独培养为对照组,培养基中的 TGF- β 的剂量分别为 0、3、10、30ng/ml,培养 14d 后发现,SDSCs 呈现出向 NPCs 分化特性,培养基中Ⅱ型胶原纤维、蛋白多糖、SOX-9 表达水平明显增高。为椎间盘退行性疾病的生物治疗提供了新的细胞来源。

6 问题和展望

近年来,通过体外共培养及定向诱导干细胞向类髓核细胞分化成为研究的热点,许多研究者在此方面做了大量的工作,取得了较大进展。在共培养环境下,干细胞和特定的成熟分化的细胞(髓核细胞)可相互发挥效应,干细胞最终被诱导分化为类髓核细胞。但是在应用临床之前还有诸多问题需要解决,体外环境与体内环境存在明显差异,如正常椎间盘内呈低氧、低 pH、高渗透压的内环境。通过共培养诱导分化的类髓核细胞能否在人体内存活尚未明确,共培养细胞之间是如何进行信息传递,细胞的诱导分化机制也未阐明,成功诱导的类髓核细胞能否稳定表达髓核细胞特异性标志物也是下一步研究的方向;共培养的条件及诱导方式尚未达成一致意见。其他干细胞与髓核细胞

共培养的研究日益增多,为种子细胞的来源开拓了新的思路。相信随着与干细胞共培养技术的发展,有望在不久的将来使上述问题得到解决。以细胞共培养的方式来促进干细胞向 NPCs 分化,从而获得充分的类髓核细胞,为椎间盘退变的生物学修复提供了美好前景。

7 参考文献

1. Boni M, Denaro V. Cervical Spine I[M]. Pavia: Springer Viena, 1986. 3-20.
2. 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 co-culture system[J]. Spine, 2004, 29(14): 1508-1514.
3. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators[J]. J Cell Biochem, 2006, 98(5): 1076-1084.
4. Liu F, Liu ZD, Wu N, et al. In vitro interactions between rat bone marrow-derived endothelial progenitor cells and hepatic stellate cells: interaction between EPCs and HSCs[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2013, [Epub ahead of print].
5. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. Science, 1999, 284(5411): 143-147.
6. Wei W, Wang X, Yang M, et al. PGC1 β mediates PPAR γ -induced activation of osteoclastogenesis and rosiglitazone-induced bone loss[J]. Cell Metabolism, 2010, 11(6): 503-516.
7. Hill TP, Spater D, Taketo MM, et al. Canonical Wnt/ β -catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes[J]. Developmental Cell, 2005, 8(5): 727-738.
8. Mochida J. New strategies of disc repair: novel preclinical trials[J]. J Orthop Sci, 2005, 10(1): 112-118.
9. Cheng YH, Yang SH, Su WU, et al. Thermosensitive chitosan-gelatin-glycerol phosphate hydrogels as a cell carrier for nucleus pulposus regeneration [J]. Tissue Eng (Part A), 2010, 16(2): 695-703.
10. Niu CC, Yuan LJ, Lin SS, et al. Mesenchymal stem cell and nucleus pulposus cell coculture modulates cell proliferation[J]. Clin Orthop Relat Res, 2009, 467(12): 3263-3272.
11. Strassburg S, Richardson SM, Freemont AJ, et al. Co-culture induces mesenchymal stem cell differentiation and modulation of the degenerate human nucleus pulposus cell phenotype[J]. Regen Med, 2010, 5(5): 701-711.
12. 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.
13. Watanabe T, Sakai D, Yamamoto Y, et al. Human nucleus pulposus cells significantly enhanced biological properties in a coculture system with direct cell-to-cell contact with autologous mesenchymal stem cells[J]. J Orthop Res, 2010, 28(5): 623-630.
14. Wu CC, Yang SH, Huang TL, et al. The interaction between

- co-cultured human nucleus pulposus cells and mesenchymal stem cells in a bioactive scaffold [J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47(6): 922–928.
15. Ehlicke F, Freimark D, Heil B, et al. Intervertebral disc regeneration: influence of growth factors on differentiation of human mesenchymal stem cells(hMSC)[J]. *Int J Artif Organs*, 2010, 33(4): 244–252.
 16. Stoyanov JV, Gantenbein-Ritter B, Bertolo A, et al. Role of hypoxia and growth and differentiation factor-5 on differentiation of human mesenchymal stem cells towards intervertebral nucleus pulposus-like cells[J]. *Eur Cell Mater*, 2011, 20(21): 533–547.
 17. Kim DH, Kim SH, Heo SJ, et al. Enhanced differentiation of mesenchymal stem cells into NP-like cells via 3D co-culturing with mechanical stimulation [J]. *J Biosci Bioeng*, 2009, 108(1): 63–67.
 18. Djouad F, Ponce P, Bony C, et al. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals[J]. *Blood*, 2003, 102(10): 3837–3844.
 19. Dosier CR, Erdman CP, Park JH, et al. Resveratrol effect on osteogenic differentiation of rat and human adipose derived stem cells in a 3-D culture environment[J]. *J Mech Behav Biomed Mater*, 2012, 7(11): 112–122.
 20. 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.
 21. Yang Z, Huang CY, Candiotti KA, et al. Sox-9 facilitates differentiation of adipose tissue-derived stem cells into a chondrocyte-like phenotype in vitro[J]. *J Orthop Res*, 2011, 29(8): 1291–1297.
 22. Gruber HE, Deepe R, Hoelscher GL, et al. Human adipose-derived mesenchymal stem cells: direction to a phenotype sharing similarities with the disc, gene expression profiling, and coculture with human annulus cells[J]. *Tissue Eng(Part A)*, 2010, 16(9): 2843–2860.
 23. Lu ZF, Zandieh Doulabi B, Wuisman PI, et al. Differentiation of adipose stem cells by nucleus pulposus cells: conformation effect[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 359(4): 991–996.
 24. Choi EH, Park H, Park KS, et al. Effect of nucleus pulposus cells having different phenotypes on chondrogenic differentiation of adipose-derived stromal cells in a coculture system using porous membranes[J]. *Tissue Eng(Part A)*, 2011, 17(19–20): 2445–2451.
 25. Wang Y, Kim UJ, Blasioli DJ, et al. In vitro cartilage tissue engineering with 3D porousaqueous-derived silk scaffolds and mesenchymal stem cells[J]. *Biomaterials*, 2005, 26(34): 7082–7094.
 26. Yang Z, Huang CY, Candiotti KA, et al. Sox-9 facilitates differentiation of adipose tissue-derived stem cells into a chondrocyte-like phenotype in vitro[J]. *J Orthop Res*, 2011, 29(8): 1291–1297.
 27. Tapp H, Deepe R, Ingram JA, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells from the sand rat: transforming growth factor beta and 3D co-culture with human disc cells stimulate proteoglycan and collagen type I rich extracellular matrix[J]. *Arthritis Res Ther*, 2008, 10(4): R89.
 28. Li X, Lee JP, Balian G, et al. Modulation of chondrocytic properties of fat-derived mesenchymal cells in cocultures with nucleus pulposus[J]. *Connect Tissue Res*, 2005, 46(2): 75–82.
 29. Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, et al. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia [J]. *Stem Cells*, 2003, 21(1): 50–60.
 30. Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, et al. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(2): 319–331.
 31. Reppel L, Margossian T, Moreau P, et al. Impact of oxygen content on characteristics of mesenchymal stem cells isolated from Wharton's jelly[J]. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2012, 20(1): S278.
 32. Ruan D, Zhang Y, Wang D, et al. Differentiation of human Wharton's jelly cells toward nucleus pulposus-like cells after coculture with nucleus pulposus cells in vitro[J]. *Tissue Eng(Part A)*, 2012, 18(1–2): 167–175.
 33. 张燕, 吴剑宏, 王超锋, 等. 非接触式共培养体系对脐带间充质干细胞向类髓核细胞的诱导分化效应 [J]. *脊柱外科杂志*, 2011, 9(4): 249–252.
 34. Taghizadeh RR, Cetrulo KJ, Cetrulo CL. Wharton's jelly stem cells: future clinical applications[J]. *Placenta*, 2011, 32(4): S311–315.
 35. Vadalà G, Sobajima S, Lee JY, et al. In vitro interaction between muscle-derived stem cells and nucleus pulposus cells[J]. *Spine*, 2008, 8(5): 804–809.
 36. Murrell W, Sanford E, Anderberg L, et al. Olfactory stem cells can be induced to express chondrogenic phenotype in a rat intervertebral disc injury model[J]. *Spine*, 2009, 9(7): 585–594.
 37. Chen S, Emery SE, Pei M. Coculture of synovium-derived stem cells and nucleus pulposus cells in serum-free defined medium with supplementation of transforming growth factor-beta1: a potential application of tissue-specific stem cells in disc regeneration[J]. *Spine*, 2009, 34(12): 1272–1280.

(收稿日期:2013-04-26 修回日期:2013-07-03)

(本文编辑 卢庆霞)