

基础研究

非接触式共培养下两种同源间充质干细胞对退变髓核细胞生物学影响的比较研究

姜刚强, 阮狄克, 周明越, 张 燕, 阳普山, 刘子双一, 王德利, 张 超

(第二军医大学海军临床医学院骨科 100048 北京市)

【摘要】目的:比较非接触式共培养条件下两种同源间充质干细胞对退变髓核细胞生物学功能的影响。**方法:**取同一腰椎间盘突出症患者骨髓间充质干细胞(BMSCs)、脂肪间充质干细胞(ADSCs)和退变髓核细胞(NPCs), 两种间充质干细胞分别与髓核细胞在 Transwell 6 孔板中进行非接触式共培养, 与 ADSCs 共培养的 NPCs 为 A 组, 与 BMSCs 共培养的 NPCs 为 B 组, 以单独培养的 NPCs 为对照组。共培养 7d 后, 提取 3 组髓核细胞总 RNA, 进行反转录后, 利用 Real-Time PCR 检测其 II 型胶原、蛋白多糖和 SOX-9 基因的相对表达量。**结果:**非接触式共培养 7d 后, II 型胶原、蛋白多糖和 SOX-9 基因相对表达量对照组分别是 1.03 ± 0.28 、 1.21 ± 0.40 和 0.94 ± 0.34 , A 组分别是 3.49 ± 0.55 、 3.88 ± 2.11 和 2.41 ± 0.91 , B 组分别是 7.60 ± 1.89 、 6.26 ± 2.96 和 4.55 ± 1.88 。与对照组相比, A、B 组髓核细胞 II 型胶原、蛋白多糖和 SOX-9 基因相对表达显著增加 ($P < 0.05$); A、B 两组间相比也有显著性差异 ($P < 0.05$)。**结论:**非接触式共培养条件下骨髓间充质干细胞和脂肪间充质干细胞对退变髓核细胞均有一定的激活效应; 骨髓间充质干细胞对退变髓核细胞的激活效应更强, 可能更加适合于椎间盘退行性疾病的生物学治疗。

【关键词】非接触式共培养; 同源间充质干细胞; 退变髓核细胞; 比较研究

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2014.03.10

中图分类号: Q813.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2014)-03-0251-06

Comparison of the biological effects of two kinds of homologous mesenchymal stem cells on degenerative nucleus pulposus cells under the condition of non-contact co-culture/JIANG Gangqiang, RUAN Dike, ZHOU Mingyue, et al/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2014, 24(3): 251-256

【Abstract】 Objectives: To compare the biological effects of degenerative nucleus pulposus cells when co-culturing two kinds of people's mesenchymal stem cells under a non-contact system. **Methods:** Bone marrow mesenchymal stem cells(BMSCs), adipose mesenchymal stem cells(ADSCs) and nucleus pulposus cells(NPCs) were obtained from the same patient, then the two kinds of stem cells were co-cultured respectively with degenerative nucleus pulposus cells in Transwell six-well plates under the non-contact condition, NPCs co-cultivation with ADSCs as group A, and NPCs co-cultivation with BMSCs as group B, nucleus pulposus cells cultured alone as control. One week later, the total RNA of 3 groups were extracted, then the Real-Time PCR technology was used to detect the relative gene expression of type II collagen, proteoglycan and SOX-9. **Results:** The relative gene expression of type II collagen protein, proteoglycan and SOX-9 in control group was 1.03 ± 0.28 , 1.21 ± 0.40 and 0.94 ± 0.34 respectively, in group A was 3.49 ± 0.55 , 3.88 ± 2.11 and 2.41 ± 0.91 respectively, while 7.60 ± 1.89 , 6.26 ± 2.96 and 4.55 ± 1.88 respectively in group B, The Real-Time PCR results showed that compared with the control group, the nucleus pulposus cells of group A and B presented a significant increase of type II collagen protein, proteoglycan and SOX-9 gene expression ($P < 0.05$), which also showed significant difference between groups A and B ($P < 0.05$). **Conclusions:** Bone marrow mesenchymal stem cells and adipose mesenchymal stem cells can both stimulate and activate the degenerative nucleus pulposus cells under the condition of noncontact co-culture; with stronger effect on the former, which may act as a

基金项目: 基金支持项目国家科学自然科学基金(编号: 81250019)

第一作者简介: 男(1987-), 硕士研究生在读, 研究方向: 脊柱外科

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

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

better option for biological treatment for degenerative disc diseases.

【Key words】 Non-contact co-culture; Homologous mesenchymal stem cells; Degenerative nucleus pulposus cells; Comparative study

【Author's address】 Department of Orthopaedics, Navy General Hospital, the Second Military Medical University, Beijing, 100048, China

随着现代生活节奏的加快,椎间盘退行性疾病(disc degeneration disease,DDD)的发生率逐年升高,传统的治疗主要是针对疼痛症状而非退变的椎间盘。随着组织工程及再生医学的发展,以细胞为基础的生物学治疗修复退变的椎间盘逐渐成为脊柱外科领域重要的发展方向^[1,2]。实验研究表明,通过来源于骨髓的间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)和来源于脂肪的脂肪干细胞(adipose derived stem cells, ADSCs)在共培养条件下对退变髓核细胞(nucleus pulposus cells, NPCs)具有一定的营养、激活效应^[3,4],但两种间充质干细胞哪种对髓核细胞的生物学作用更强,目前鲜有文献报道。本实验拟通过人 BMSCs 和 ADSCs 分别与退变 NPCs 进行非接触式细胞共培养,比较两种人来源间充质干细胞对退变 NPCs 的激活能力,为干细胞移植治疗脊柱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

Tanswell 6 孔培养板(Corning, 美国);DMEM/F12 培养基(Hyclone, 美国),PBS(Sigma, 美国),胰蛋白酶(Solaiibo),特级胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(Gibco 公司, 美国),Trizol Riagent 试剂(Invitrogen, 美国);Real-Time PCR 试剂盒(Takara, 日本);引物由上海生工公司合成。Real-Time PCR 仪(BIO-RAD MJ Miniption detector for PTC1148, 美国)。

1.2 细胞来源

术前经患者及家属知情同意。临床行腰椎髓核摘除及脊柱融合的患者,术中获取皮下脂肪组织,经椎弓根抽取骨髓组织,摘除髓核时获得髓核组织。

1.3 人髓核细胞的分离培养

取手术摘除的人髓核组织,椎间盘退变程度按照 Pfirrmann MRI 分级为Ⅳ级(图 1)。无菌条件下超净台中分离髓核,PBS 冲洗 2 遍,清洗血块。剔除纤维环及软骨终板,将髓核组织剪成约 1×1×

1mm 大小,置入含 0.2mg/ml Ⅱ型胶原酶溶液的离心管中,在 37℃恒温箱中消化 6h,无菌不锈钢丝网(200mm)过滤组织碎片。2500r/min 离心 5min,弃上清液,收集髓核细胞种于 25cm² 培养瓶内,加入含 10%FBS 的 DMEM/F12 培养基,于 37℃、5%CO₂ 恒温箱中培养。细胞 1 周左右贴壁,贴壁后每 2~3d 换液,待细胞融合至 80%左右时进行传代。

1.4 人脂肪间充质干细胞的分离培养

术中取皮下脂肪组织。PBS 冲洗 2 遍,眼科剪去除纤维及血管成分,剪碎脂肪组织,加入含 0.1mg/ml Ⅰ型胶原酶溶液的离心管中,恒温 37℃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。收集脂肪间充质干细胞种于 25cm² 培养瓶内,加入含 10%FBS 的 DMEM/F12 培养基,于 37℃、5%CO₂ 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。

1.5 人骨髓间充质干细胞的分离培养

经椎弓根抽取骨髓组织。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,弃上清液;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 1.077×10³g/L)上,2500r/min、常温离心 20min。无血清 DMEM/F12 培养基洗涤 2 次,收集骨髓间充质干细胞种于 25cm² 培养瓶内,加入含 10%FBS 的 DMEM/F12 培养基,于 37℃、5%CO₂ 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。

1.6 细胞非接触式共培养

将分离培养的第三代 NPCs 和 BMSCs 与 ADSCs 分别用带有插入层的 Transwell 六孔板进行非接触式共培养,插入层孔径为 0.4μm。插入层底部接种 NPCs,6 孔板底层接种 BMSCs 与 ADSCs(图 2)。细胞密度为 6.0×10³ 个/cm²,接种比例为 1:1。加入含 10%小牛血清的 DMEM/F12 培

培养基,于 37℃、5%CO₂ 恒温箱中培养。3d 后半量换液,贴壁后每 2~3d 换液。与 BMSCs 共培养的 NPCs 为实验 A 组,与 ADSCs 共培养的 NPCs 为实验 B 组,单独培养的 NPCs 作为对照组。

1.7 细胞总 RNA 提取和 Real-Time PCR 检测

取共培养 7d 后 3 组 NPCs,运用 Trizol 溶液提取技术提取总 RNA。弃上清,加入 1ml Trizol 溶液,吹打混匀,室温静置 5min,加入氯仿 0.2ml,混匀,室温静置 5min,4℃、12000r/min 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,4℃、12000r/min 离心 10min,弃上清,加入冰冷的 75%无水乙醇 1ml 洗涤,4℃、7500r/min 离心 10min,弃上清,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 之间,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,加入 4μl 缓冲液,3μl DEPC 水,使反应体系总体积达到 20μl,于 42℃反转录 1h,换得 cDNA。逆转录后获得的 cDNA 通过 Real-Time PCR 对蛋白多糖、Ⅱ型胶原、SOX9 进行扩增,引物序列根据文献报道合成^[6]。管家基因 GAPDH 作为内参,引物序列由 Primer 5.0 软件生成:人 GAPDH (上游:CTTGGTATCGTGGAAG-GACTC;下游:GTAGAGGCAG-GGATGATGTTCT) (NM_002046.4)。Real-Time PCR 反应步骤为 95℃(20s) 激活酶;95℃(5s),60℃(20s),重复 40 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 (20μM),下游引物 (20μM),模板 1.0μl,SYBR MIX10μl,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($n=3$)。

1.8 统计学分析

用 SPSS 18.0 对结果进行统计学分析,检测结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,共培养实验重复 3 次,结果用 Student *t* 检验, $P<0.05$ 有统计学差异。

2 结果

2.1 人 NPCs、ADSCs 和 BMSCs 的形态学观察

BMSCs 和 ADSCs 原代接种后,24h 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;获取的髓核细胞接种后 4~5d 可贴壁生长,细胞形态呈现长梭形(图 3),10d 细胞融合至 80%左右即可传代。

2.2 非接触式共培养后 NPCs 的相对基因表达

以单独培养的 NPCs 为对照组,A 组和 B 组为实验组。GAPDH 作为内参基因,Real-Time PCR 结果显示:相对于对照组,A 组和 B 组Ⅱ型胶原、蛋白多糖和 SOX-9 基因表达显著升高($P<0.05$);A 组与 B 组相比,三种基因的相对表达量均有统计学差异($P<0.05$,表 1),B 组Ⅱ型胶原、蛋白多糖和 SOX-9 的相对表达量分别是 A 组的 18.8 倍、5.39 倍和 6.11 倍。

3 讨论

椎间盘退变的主要病理改变为髓核细胞数量的减少,蛋白多糖的分解及间盘内水容量的丢失。以干细胞移植技术为基础的生物学方法修复退变椎间盘,是通过增加椎间盘内髓核细胞的数量、促进其分泌蛋白多糖及细胞外基质,以延缓甚至逆转椎间盘的退变。间充质干细胞因其具有多向分化潜能、旺盛的增殖能力和较低的免疫原性,成为细胞治疗和组织工程学理想的种子细胞。由于目前尚缺乏特异性的细胞标记,多数学者采用Ⅱ型胶原、蛋白多糖和 SOX-9 作为 NPCs 的特异标记。

Henriksson 等^[5]通过动物试验证明,将 BMSCs 移植入退变椎间盘内均可获得良好的生存、增殖

表 1 各培养组中退变髓核细胞的基因相对表达量变化 ($n=3, \bar{x}\pm s$)

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

	对照组 Control group	A 组 Group A	B 组 Group B
Ⅱ型胶原 Type Ⅱ collagen	1.03±0.28	3.49±0.55 ^①	7.60±1.89 ^{①②}
蛋白多糖 Aggrecan	1.21±0.40	3.88±2.11 ^①	6.26±2.96 ^{①②}
SOX-9	0.94±0.34	2.41±0.91 ^①	4.55±1.88 ^{①②}

注:①与对照组比较 $P<0.05$;②与 A 组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with control group, $P<0.05$; ②Compared with group A, $P<0.05$

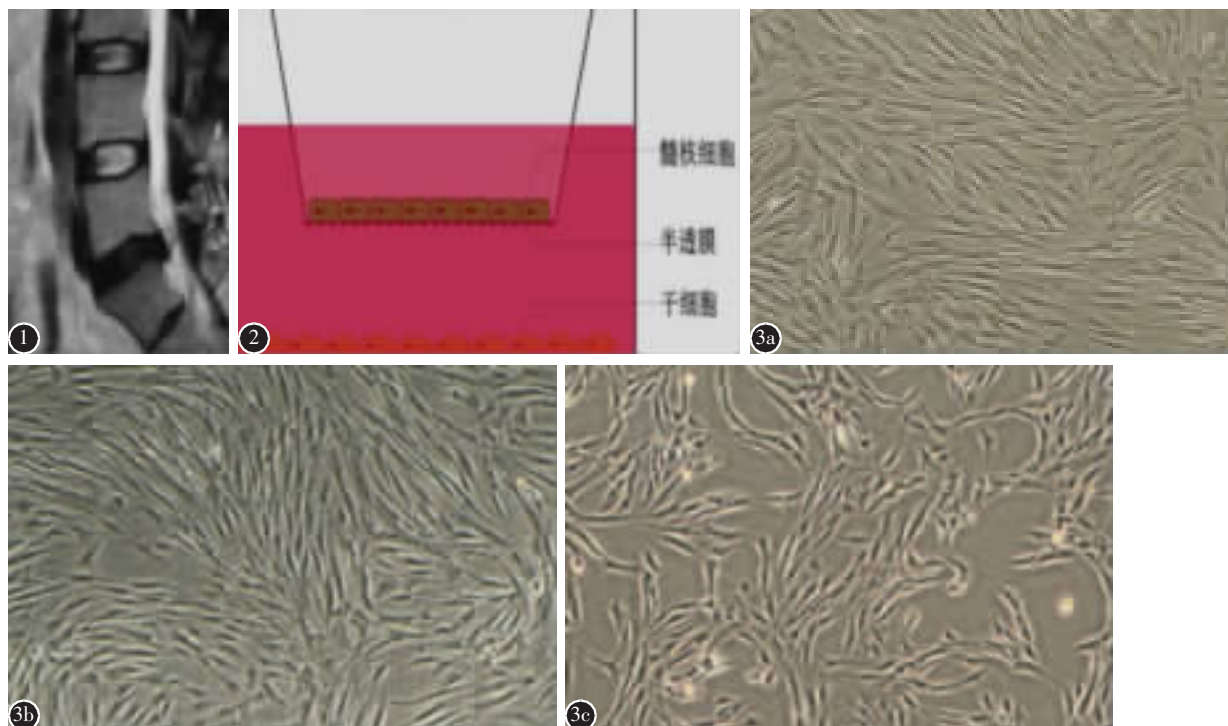


图 1 所取病例标本核磁共振表现,提示 L5-S1 椎间盘退变,间盘内信号不均一,不能分清纤维环及髓核组织,椎间隙高度轻度下降,退变程度为 Pfirrmann IV 级 **图 2** Transwell 6 孔板非接触式培养体系示意图 **图 3 a** 骨髓间充质干细胞,细胞贴壁生长,呈长梭形($\times 40$), **b** 脂肪间充质干细胞,细胞形态均一,旋涡状($\times 40$) **c** 髓核细胞,细胞呈多角状,分布均匀($\times 40$)

Figure 1 The MRI (magnetic resonance imaging) of specimen obtained from patient, indicating the degeneration of L5/S1 intervertebral disc, the structure of the disc is inhomogeneous, the distinction between the nucleus and annulus was lost, the disc height moderately decreased, and the degree of degeneration is Pfirrmann Grade IV **Figure 2** The sketch map of Transwell 6 non-contact co-culture system **Figure 3 a** bone marrow mesenchymal stem cells, adherent growth, and shown as long fusiform ($\times 40$) **b** adipose mesenchymal stem cells, form uniform and spiral shaped ($\times 40$) **c** nucleus pulposus cells, shown as multi angle and homogeneous distribution ($\times 40$)

能力,并可激活退变椎间盘内的髓核细胞,促进其合成 II 型胶原、蛋白多糖、SOX-9 等。ADSCs 由于取材方便,获取量大,患者痛苦小,体外培养增殖能力强等特点,近年也受到广泛关注。Jeong 等^[6]将 ADSCs 注射移植入大鼠退变椎间盘中,2 周后发现髓核细胞中 II 型胶原、蛋白多糖的合成较对照组中明显增加,ADSCs 在椎间盘退行性疾病的治疗中表现出巨大的潜力。

Strassburg 等^[7]通过接触式共培养发现 BMSCs 对退变髓核细胞具有明显的营养支持作用,并认为这种作用是通过 BMSCs 刺激髓核细胞内 CDMP-1 和 TGF- β 的合成,进而增强髓核细胞合成细胞外基质的能力。Li 等^[8]将兔 ADSCs 同 NPCs 非接触式共培养,结果发现 ADSCs 可被诱导成髓核样细胞,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。这些研究表明 NPC 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。而非接触式共培养体系在这一过程中起到桥梁作用。

本实验通过对主要基因检测表明,在非接触式共培养体系下,BMSCs 和 ADSCs 均可激活退变髓核细胞,使退变髓核细胞内蛋白多糖、II 型胶原和 SOX-9 的基因表达明显增加 ($P < 0.05$),取得与接触式共培养类似的效果,同时非接触式共培养体系具有简单易行,无需对细胞进行染色标记及流式分选等优势。非接触式共培养方式通过模拟体内微环境,使细胞之间发生相互作用,可能的机制为:(1)在共培养条件下,干细胞可能通过分泌

细胞因子,刺激退变的髓核细胞,退变髓核细胞实现“再活化”,呈现出更强的类软骨表型,从而使Ⅱ型胶原、蛋白多糖和 SOX-9 基因的表达增加^[9]。(2)有学者报道^[10,11]髓核组织内存在“前体细胞”或者“髓核来源干细胞”,Henriksson 等^[12]研究表明,向椎间盘内移植的干细胞,可以募集位于椎间盘周围的“前体细胞”,这些“前体细胞”具有更强的分泌细胞外基质的能力,从而使得髓核细胞中Ⅱ型胶原、蛋白多糖和 SOX-9 基因的表达显著增加。(3)退变髓核细胞也极有可能反作用于外源性的干细胞,以特殊的微环境诱导干细胞向髓核细胞分化,同样参与了退变髓核组织的修复过程。

文献报道共培养的细胞比例也明显影响细胞的相互作用,研究发现以 75%的 NPCs 和 25%的干细胞共培养能更好地刺激 NPCs 的激活^[13,14],本实验中采用共培养细胞的比例为 50%:50%,仍取得了良好的共培养效果,NPCs 中 SOX-9、Ⅱ型胶原纤维及蛋白多糖的表达显著升高,足以证明间充质干细胞在共培养条件下对退变 NPCs 的刺激、激活效应。

在以往的研究中,有学者采用动物作为共培养细胞来源^[3,5,6,15],虽然可行性较强,但需要创建良好的实验动物模型。另外,由于和人类在物种上的差异,使得这种共培养效果的说服力较为局限。本实验采用采用同源自体人 NPCs、BMSCs、ADSCs 有以下 3 种优势:(1)取材方便,通过一次手术可取患者三种细胞,避免了重复操作。(2)由于是同源自体细胞,免除了共培养细胞之间的免疫原性,可排除不同个体之间的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)实验取材细胞来源于就诊患者,更加贴近临床,使得实验结果更具有说服力。

BMSCs 最早被证实能够诱导分化为类髓核细胞^[16,17],并与多种生物材料相复合在动物中体现出对椎间盘再生的修复作用^[18,19]。而且已经有最新的临床应用报道^[20]。Sugii 等^[21]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,如纤维细胞生长因子、TGFβ、纤连蛋白及玻连蛋白对 IPS 提供营养支持,使 ADSCs 在椎间盘退变修复治疗中具有更大的应用潜能。Winter 等^[22]通过三维培养的方式诱导 ADSCs 和 BMSCs 向成软骨细胞分化,结果发现 BMSCs 和 ADSCs

的成软骨能力没有明显区别,而 Danisovic 等^[23]则认为 BMSCs 的成软骨能力要强于 ADSCs。本实验中,相对于 ADSCs,BMSCs 对退变 NPCs 的激活效应更强,更能促进其分泌Ⅱ型胶原、蛋白多糖和 SOX-9 的能力($P<0.01$)。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^[22],导致对 NPCs 的刺激效果不同。(2)Choi 等^[24]和 Wang 等^[25]认为共培养方式能影响干细胞和 NPCs 之间的相互作用,本实验采用单层非接触式共培养,而这种共培养可能更加有利于 BMSCs 对 NPCs 的作用。(3)本实验中 BMSCs 取自椎弓根髓腔,相对较为纯净;ADSCs 取自皮下,可能会混入少量平滑肌细胞或者内皮细胞,导致 ADSCs 的纯度下降,影响共培养效果。尽管 ADSCs 具有取材方便,数量充足,创伤较小等优点。但是 BMSCs 对 NPCs 的刺激、激活效应更强,在干细胞移植治疗椎间盘退行性疾病中具有更高的应用价值。

人 BMSCs 和 ADSCs 通过和自身退变 NPCs 细胞非接触式共培养,两者对 NPCs 具有明显的激活效应,使 NPCs 中Ⅱ型胶原、蛋白多糖、SOX-9 等细胞外基质表达显著升高。为干细胞移植治疗椎间盘退行性疾病奠定了一定理论基础。但是本实验也有自身不足之处,即检测指标在基因层面体现出这种趋势,尚需在其他方面,比如蛋白水平、观察时间等进行验证,这是下一步研究的重点;另外,对于不同退变程度的髓核细胞,干细胞是否对其的影响是否还存在这种差异呢?将是进一步探索的方向。总之,在非接触式共培养体系下,相对于 ADSCs,BMSCs 对退变 NPCs 的激活效应更强,BMSCs 有可能是更加适合于椎间盘退行性疾病的生物学治疗的种子细胞。

4 参考文献

1. Kepler CK, Anderson DG, Tannoury C, et al. Intervertebral disk degeneration and emerging biologic treatments [J]. J Am Acad Orthop Surg, 2011, 19(9): 543-553.
2. 赵庆华, 田纪伟. 椎间盘再生基于细胞的治疗策略[J]. 中国矫形外科杂志, 2011, 19(5): 392-394.
3. 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: 3263-3272.
4. Lu ZF, Zandieh Doulabi B, Wuisman PI, et al. Differentiation of adipose stem cells by nucleus pulposus cells: Conguration effect[J]. Biochemical and Biophysical Research Communica-

- tions, 2007, 359(4): 991-996.
5. Henriksson HB, Svanvik T, Jonsson M, et al. Transplantation of human mesenchymal stem cells into intervertebral discs in a xenogeneic porcine model[J]. *Spine*, 2009, 34(2): 141-148.
 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. 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.
 8. 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.
 9. Okuma M, Mochida J, Nishimura K, et al. Reinsertion of stimulated nucleus pulposus cells retards intervertebral disc degeneration: an in vitro and in vivo experimental study[J]. *J Orthop Res*, 2000, 18(6): 988-997.
 10. 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.
 11. Erwin WM, Islam D, Eftekarpour E, et al. Intervertebral disc-derived stem cells: implications for regenerative medicine and neural repair[J]. *Spine*, 2013, 38(3): 211-216.
 12. Henriksson H, Thormemo M, Karlsson C, et al. Identification of cell proliferation zones, progenitor cells and potential stem cell niche in the intervertebral disc region: a study in four species [J]. *Spine*, 2009, 34(21): 2278-2287.
 13. Wu, C, Yang S, Huang T, 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.
 14. 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 Engineering Part A*, 2012, 18(1-2): 167-175.
 15. Mochida J. New strategies of disc repair; novel preclinical trials[J]. *J Orthop Sci*, 2005, 10(1): 112-118.
 16. Purmessur D, Schek RM, Abbott RD, et al. Notochordal conditioned media from tissue increases proteoglycan accumulation and promotes a healthy nucleus pulposus phenotype in human mesenchymal stem cells [J]. *Arthritis Res Ther*, 2011, 13(3): R81.
 17. 顾蕊, 陈伯华. 骨髓间质干细胞移植在延缓和逆转椎间盘退变中的研究[J]. *中国骨与关节外科*, 2009, 2(1): 57-61.
 18. Le Maitre CL, Baird P, Freemont AJ, et al. An in vitro study investigating the survival and phenotype of mesenchymal stem cells following injection into nucleus pulposus tissue[J]. *Arthritis Res Ther*, 2009, 11(1): R20.
 19. Bertolo A, Mehr M, Aebli N, et al. Influence of different commercial scaffolds on the in vitro differentiation of human mesenchymal stem cells to nucleus pulposus-like cells [J]. *Eur Spine J*, 2012, 21(Suppl 6): S826-838.
 20. Orozco L, Soler R, Morera C, et al. Intervertebral disc repair by autologous mesenchymal bone marrow cells: a pilot study[J]. *Transplantation*, 2011, 92(7): 822-828.
 21. 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.
 22. 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.
 23. Danisovic L, Varga I, Polák S, et al. Comparison of in vitro chondrogenic potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue[J]. *Gen Physiol Biophys*, 2009, 28(1): 56-62.
 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 porous aqueous-derived silk scaffolds and mesenchymal stem cells [J]. *Biomaterials*, 2005, 26(34): 7082-7094.

(收稿日期: 2013-11-20 修回日期: 2014-02-07)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 彭向峰)