

基础研究

人软骨终板干细胞与退变髓核细胞
体外非接触共培养的实验研究

常 献, 周 跃, 李长青

(第三军医大学附属新桥医院骨科 400037 重庆市沙坪坝区新桥正街 183 号)

【摘要】目的:探究人软骨终板干细胞(cartilage endplate stem cells, CESC)与退变髓核细胞(nucleus pulposus cells, NPC)在 Transwell 非接触共培养条件下的相互作用。**方法:**对取自因腰椎退行性疾病行腰椎间盘突出椎弓根螺钉内固定患者的软骨终板、退变髓核进行 CESC 及 NPC 的分离培养及鉴定。通过琼脂糖悬浮培养法获得 CESC 的克隆, 扩增后行流式技术及免疫荧光对 CESC 进行干细胞表面标记的检测, 取第三代 CESC 与第一代 NPC 进行实验, 建立三个细胞培养组: CESC 单独培养组、NPC 单独培养组、CESC 与 NPC 共培养组(分别接种于 Transwell 底部和上层插槽中进行非接触共培养)。在培养之后的不同时间点(3、5、7d), 采用实时荧光定量 PCR(Real-time PCR, RT-PCR)检测各组细胞中蛋白聚糖(Agg)、SOX-9 及 II 型胶原蛋白(Coll II) mRNA 的表达变化情况, 共培养 7d 后, 采用 Western-blot 检测各组细胞中蛋白聚糖、II 型胶原蛋白、Sox-9 蛋白的表达变化。**结果:**经过分离培养及鉴定, 筛选出的细胞为 CESC(流式细胞计数分析, CESC 细胞表面的 CD73、CD90、CD105 阳性率分别为 97.5%、98.7%、98.7%); 共培养后, RT-PCR 显示单独培养的 CESC 在各检测时间点几乎无 Agg、Coll II、SOX-9 基因表达; 而共培养组的 CESC 在第 5 天开始出现 Agg、Coll II、SOX-9 基因表达(其表达量分别为 0.10、0.11、0.15), 与单独培养 CESC 相比有统计学意义($P < 0.05$); 共培养组 NPC 的 Agg、Coll II 及 SOX-9 基因表达量(其表达量分别为 1.32、1.25、0.92)高于单独培养 NPC 的表达量($P < 0.05$), 且随着时间延长逐渐升高, 共培养与单独培养相比, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。共培养 7d 后, Western-blot 结果与 RT-PCR 结果一致, 共培养组 CESC 的 Agg、Coll II、SOX-9 蛋白表达量高于单独培养组($P < 0.05$)。**结论:** CESC 与 NPC 共培养时的相互作用能促使 CESC 表达髓核细胞特异性标记物 Agg、Coll II 和 SOX-9; 通过相互作用, CESC 可增强 NPC 表达自身特异性相关分子。

【关键词】 软骨终板干细胞; 退变髓核细胞; 共培养

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2015.01.09

中图分类号: Q813.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2015)-01-0054-08

An in vitro study on the interaction of human cartilage endplate stem cells with nucleus pulposus cells in co-culture system/CHANG Xian, ZHOU Yue, LI Changqing//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2015, 25(1): 54-61

【Abstract】 Objectives: To investigate the biological effects of Cartilage endplate stem cells (CESCs) and degenerative nucleus pulposus cells (NPCs) when co-cultured under a transwell system. **Methods:** The Cartilage endplate organization and degenerative nucleus pulposus tissue were obtained from the patients undergoing discectomy and fusion for lumbar degenerative disease. The cells were subcultured in the agarose culture and the cell clones were selected and expanded in vitro for the assays of stem cell markers by using immunofluorescence and flow cytometry assay. The third generation of CESC and the primary NPC were co-cultured in a transwell plate. The three groups were assigned as follows: CESC group, NPC group and co-culture group with CESC and NPC. The expressions of type II collagen, aggrecan and Sox-9 of CESC and NPC were detected by RT-PCR at 3 days, 5 days and 7 days respectively. On the 7th day after co-culture, the Western-blot assay was performed to detect the expression of the protein. **Results:** Cultured cells in vitro exhibited a positive expression of the stem cell markers (the percentage of stem cell markers tested by flow

第一作者简介: 男(1986-), 在读硕士研究生, 研究方向: 微创脊柱外科

电话: (023)68755331 E-mail: 1376810950@qq.com

通讯作者: 李长青 E-mail: changqli@163.com

cytometry showed CD73, CD90 and CD105 were detected and their positive rate was 97.5%, 98.7% and 98.7% respectively). The expressions of Agg, Coll II and SOX-9 were not detected in CESC's group by RT-PCR. Higher levels of aggrecan, type II collagen and Sox-9 expressions from RT-PCR were detected in NPCs from the co-cultured group (their value was 1.32, 1.25, 0.92 respectively) than those in control group from the 5th day ($P < 0.05$), similarly, compared with the CESC's that not cultured with NPCs, the CESC's from the co-culture group showed statistically significant expressions of aggrecan, type II collagen and Sox-9 from the 5th day ($P < 0.05$) (the value in co-culture group was 0.10, 0.11, 0.15 respectively). On the 7th day after co-culture, the Western-blot showed that the CESC's from the co-culture group had a significantly higher expression of collagen protein II, proteoglycan and SOX-9. **Conclusions:** During the co-culture process, the existence of NPCs can assist the CESC's differentiation into NPCs-like cells; furthermore, CESC's have the ability to enhance the expression of NPCs's specific molecules.

[Key words] Cartilage endplate stem cells; Degenerative nucleus pulposus cells; Co-culture

[Author's address] Department of Orthopedics, Xinqiao Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing 400037, China

腰椎间盘突出症 (lumbar disc herniation, LDH) 是骨科的常见及多发性疾病,也是骨科领域研究的重点^[1,2]。关于椎间盘的退变,目前大多数学者均认为椎间盘中的髓核细胞的退变是其最主要原因与始动因素^[3,4],髓核细胞的退变表现为蛋白聚糖成分减少,这将会影响髓核组织的吸水能力,从而导致整个椎间盘力学性质的改变^[5]。因此,恢复椎间盘内髓核细胞的数量及功能,改善细胞外基质的生物合成的细胞移植治疗就成为 LDH 治疗的新切入点^[6]。对于目前的细胞移植治疗研究来说,寻找一种合适的种子细胞是其研究热点。本研究所涉及的软骨终板干细胞(cartilage endplate stem cells, CESC's)^[7,8] 来源丰富,取材较为容易,具有重大的潜在临床应用价值。本实验将 CESC's 与 NPCs 进行体外非接触式共培养,探讨 CESC's 分化为 NPCs 的潜能,以期对椎间盘退变性疾病生物学治疗探索一种新的细胞来源。

1 材料和方法

1.1 一般资料

软骨终板及退变髓核均来自因腰椎退行性疾病行腰椎间盘切除椎弓根螺钉内固定患者,其中男性 9 例,女性 6 例,年龄 45.7 ± 7.2 岁 (36~58 岁)。在收集标本之前已征得患者本人及医院伦理委员会的同意,手术节段为 L4/5 和 L5/S1。

1.2 主要实验仪器及试剂

超净工作台 (苏州 YJ-875 型), 5% CO₂ 培养箱 (Chondrex 公司)、倒置相差显微镜 (Leica, 德国)、200 目无菌滤器、Tanswell 小室、PCR 仪、流

式细胞仪、胰蛋白酶 (Hyclone, 美国)、II 型胶原酶 (Sigma, 美国)、DMEM 培养基、胎牛血清 (Invitrogen, 美国)、DMEM/F12 培养基 (Hyclone, 美国)、离心机、Trizol 试剂盒 (Invitrogen, 美国)、CD-34-APC、CD-45-APC、CD73-APC、CD90-APC、CD105-APC 抗体 (R&D Systems parent company)、琼脂糖 (Invitrogen, 美国)、低温离心机 (Sigma 公司, 美国)、PCR System 9700 (Applied Biosystem), FBS (Gibco, USA)

1.3 人软骨终板细胞及退变 NPC's 的分离培养

将术中所取标本 (髓核与软骨终板组织) 放入直径 60mm 培养皿中,用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer, PBS) 反复洗涤标本至液体清亮。用经高温高压灭菌的无菌手术器械 (眼科剪及眼科镊) 将髓核及软骨终板组织分离并分装至两个培养皿中,将其分别剪成 $1 \times 1 \times 1$ mm 大小的组织碎块。向两个培养皿中分别加入适量 II 型胶原酶 (以覆盖组织碎块为准) 后置于 37℃、5% CO₂ 培养箱,孵育 8h 待组织完全消化后取出。用吸管反复吹打消化液,然后将其通过细胞滤器 (70μm),将所得的组织消化液转移至无菌离心管中,1500r/min 离心 10min。弃上清,DMEM/F12 培养基重悬细胞。将细胞悬液分装至细胞培养瓶中,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,每 2d 进行细胞换液一次。

1.4 低熔点琼脂糖进行 CESC's 的筛选

将配制好的 2% 低熔点琼脂糖用高温高压灭菌,将其温度调整至 37℃。将 2×DMEM/F12 与 2% 低熔点琼脂糖以等体积比混合配制出底层琼脂 (1%) 并铺被 6 孔板^[9]。用胰酶消化软骨终板细胞,用 20% FBS 2×DMEM/F12 培养基制成单个细胞

悬液并计数。将含有 3×10^4 个第一代软骨终板细胞的 0.75ml 20% FBS DMEM/F12 培养液及 0.75ml 用 DMEM/F12 配置的 2% 低熔点琼脂糖进行混匀, 加入到事先已经铺被底层琼脂的 6 孔板中, 使得每个孔分散约 3×10^4 个细胞, 最终胎牛血清浓度为 10%, 于 4℃ 放置 15min 凝固。置于 37℃、5% CO_2 培养箱中培养, 每 3d 进行细胞换液一次。培养 5 周后, 将细胞集落(来自同一标本)用吸管转移至 12 孔板中进行培养。

1.5 免疫荧光、流式检测 CESC 表面干细胞标记

PBS 清洗细胞爬片, 山羊血清 37℃ 封闭 0.5h, 加入对应的别藻青蛋白 (APC) 标记的 CD34、CD45、CD73、CD90、CD105 抗体, 4℃ 孵育过夜, 次日避光清洗后, DAPI 衬染核 10min, 抗荧光淬灭封片剂封片, 激光共聚焦显微镜下取图。

消化细胞, 加入 10% FBS DMEM/F12 培养基终止消化并吹打贴壁细胞使之脱落, 离心 (1000r/min, 5min) 后弃上清, 加入 DMEM/F12 重悬。避光条件下分别加入 APC 标记的 CD34、CD45、CD73、CD90、CD105, 37℃ 温箱孵育 1h 后, PBS 洗细胞两次, 流式检测干细胞表面标记。

1.6 CESC 与 NPC 共培养

将生长状态良好、融合度 80% 以上的 3 代 CESC (细胞数目为 1×10^4) 接种于 6 孔 transwell 板底部, 将处于相似生长状态及融合度的 P1 代 NPC (细胞数目为 1×10^4) 接种于 6 孔 transwell 板的上层插槽中, 中间以聚碳酸酯透水膜分割, 分别培养 3、5、7d。同时取普通 6 孔板, 按照上述时间点设置 CESC 及 NPC 单独培养组 (细胞数目均为 1×10^4), 置于 37℃、5% CO_2 培养箱中培养, 每 3d 换液一次。

1.7 实时定量 PCR 检测蛋白聚糖 (Agg)、II 型胶原蛋白 (Coll II)、Sox-9 基因表达

分别于共培养 3、5、7d 后收取各组 CESC 及 NPC, 采用实时定量 PCR 检测各组细胞中 Agg、Coll II、Sox-9 基因表达情况。

提取 RNA, 进行逆转录。Agg 引物: 上游: 5'-TCGAGGACAGCGAGGCC-3', 下游: 5'-TCGAGGGTGTAGCGTGTAGAGA-3'。Coll II 引物: 上游: 5'-GAAGTGGTGGAGCAGCAAG-3', 下游: 5'-CAGCAGGCGTAGGAAGGT-3'; Sox-9 引物: 上游: 5'-GACTTCCGCGACGTGGAC-3', 下游: 5'-GACCAGTACCTGCCGCCCAAC-3', 所得 cDNA

行实时定量 PCR, 检测不同时间点目的基因 Agg、Coll II、Sox-9 的表达变化。PCR 参数为 94℃ 30s; 95℃ 30s, 60℃ 50s, 40 循环; 溶解曲线绘制。

1.8 Western-blot 检测

共培养 7d 后收取细胞, 提取总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 10% SDS-PAGE 电泳, 每孔蛋白上样量为 50μg, 电转至 PVDF 膜, 室温封闭 1h, 加入一抗抗体 (Agg、Coll II、Sox-9、GAPDH), 4℃ 孵育过夜。次日加入 HRP 标记的二抗室温孵育 2h, 显影。Western-blot 检测各组细胞中蛋白聚糖 (Aggrecan)、II 型胶原蛋白、Sox-9 基因表达情况。

1.9 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 利用统计学软件 SPSS 16.0 进行分析, 配对 t 检验进行检测, 以 $P < 0.05$ 作为判定差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 人软骨终板细胞及退变 NPC 分离培养结果

15 例标本经原代分离培养后, 软骨终板细胞在 DMEM/F12 培养基中贴壁生长, 倒置相差显微镜下见细胞细胞成多角形或梭型, 约 28d 后达到 90% 融合, 细胞折光性良好; 髓核细胞贴壁生长, 细胞呈多角形或多角形, 分界清楚, 细胞胞浆较淡, 约 21d 达到 90% 融合 (图 1)。

2.2 低熔点琼脂糖进行 CESC 的筛选

利用低熔点琼脂糖培养基可用于选取具有增殖能力的细胞克隆团, 软骨终板细胞与琼脂糖均匀混合后, 相差显微镜可见软骨细胞呈单细胞状态均匀分布于琼脂糖中。培养 5 周后, 可见部分细胞增殖后形成细胞克隆团 (图 2)。

2.3 免疫荧光鉴定 CESC 表面干细胞标记物

从低熔点琼脂糖培养基取出的软骨终板细胞克隆在孔板中扩展培养, 行免疫荧光检测, 干细胞表面特异性标记 CD73、CD90、CD105 阳性, CD34、CD45 阴性 (图 3)。

2.4 流式技术鉴定 CESC 表面干细胞标记物

经流式细胞计数分析, CESC 细胞表面的 CD73、CD90、CD105 为阳性, 阳性率分别为 97.5%、98.7%、98.7%^[10] (图 4)。

2.5 共培养后各组细胞髓核特异性基因表达情况

RT-PCR 显示单独培养的 CESC 在各检测时间点几乎无 Agg、Coll II、SOX-9 基因表达; 共

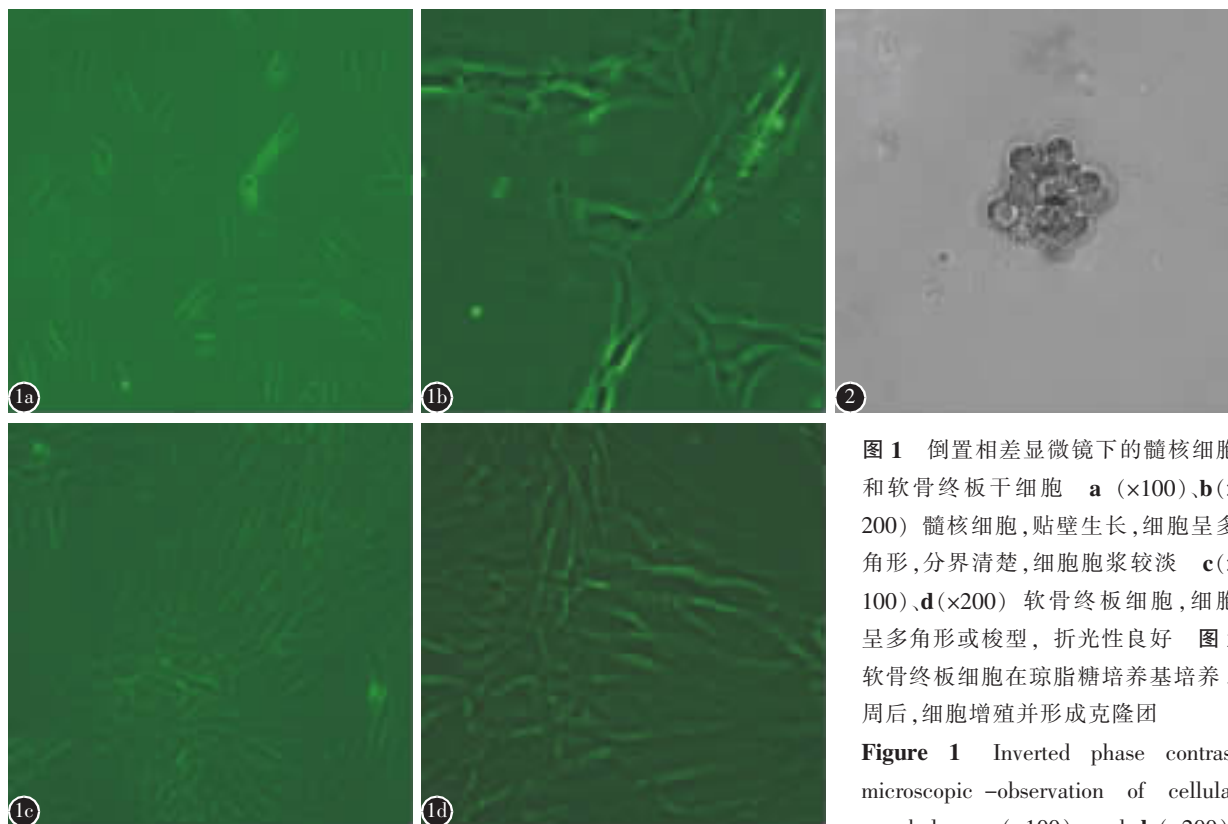


图 1 倒置相差显微镜下的髓核细胞和软骨终板干细胞 a (×100)、b (×200) 髓核细胞, 贴壁生长, 细胞呈多角形, 分界清楚, 细胞胞浆较淡 c (×100)、d (×200) 软骨终板细胞, 细胞呈多角形或梭型, 折光性良好 图 2 软骨终板细胞在琼脂糖培养基培养 5 周后, 细胞增殖并形成克隆团

Figure 1 Inverted phase contrast microscopic observation of cellular morphology a (×100) and b (×200).

NPCs under microscope of different magnifications. The cells were polygonal and grow adhering to the wall. Plasma of these cells looked pale c (×100) and d (×200) are for Cartilage endplate cells. The cells are shuttle-like or polygonal and have high refraction Figure 2 After five weeks' culture in agarose culture medium, the cells proliferate and form clone group

培养的 CESC 在第 5 天开始出现 Agg、Coll II、SOX-9 基因表达, 且基因表达量与单独培养 CESC 相比有统计学意义; 共培养 NPC 的 Agg、Coll II、SOX-9 基因表达量高于单独培养 NPC, 且随着时间延长逐渐升高, 共培养与单独培养相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 1)。

2.6 共培养后各组细胞髓核特异性蛋白表达情况

共培养 7d 后, Western-blot 检测显示单独培养的 CESC 几乎没有 Agg、Coll II、SOX-9 蛋白表达; 共培养的 CESC 有 Agg、Coll II、SOX-9 蛋白表达; 共培养 NPC 的 Agg、Coll II、SOX-9 蛋白表达量高于单独培养 NPC ($P < 0.05$, 图 5)。

3 讨论

椎间盘是由位于中央的髓核、外周的纤维环及两端的软骨终板组成的一个完美的闭合组织, 作为相邻椎体的连接部分, 其结构及功能的稳定

是维护椎间盘内部生物学稳定与缓冲外部生物负荷的保证^[11,12]。对于椎间盘的髓核细胞退变所导致的 LDH, 目前主要有三种治疗策略, 一是以药物、卧床、牵引、理疗、腰背肌锻炼等手段为基础的保守治疗; 第二种是涉及标准开放性髓核摘除术及微创腰椎手术等措施的手术治疗^[13]; 随着分子生物学及组织工程学技术的兴起, 逐渐兴起了通过细胞移植等从根本上延缓髓核细胞退变或直接体外构建人工椎间盘的第三种治疗策略^[6]。作为第三组治疗策略的重要组成部分, 细胞移植治疗能够显著增加椎间盘内的细胞总量, 这将会增加椎间盘组织中胶原蛋白及蛋白聚糖等物质的含量, 被认为是治疗椎间盘退变的一种较为理想的生物学方法。对于细胞移植治疗, 已有学者进行了相关探索, 2000 年, Okuma 等^[14]研究指出, 早期进行髓核细胞移植有逆转及延缓髓核细胞退变的可能。2006 年, Richardson 等^[15]将骨髓间充质干细胞与退变髓核细胞进行体外共培养, 结果显示前者

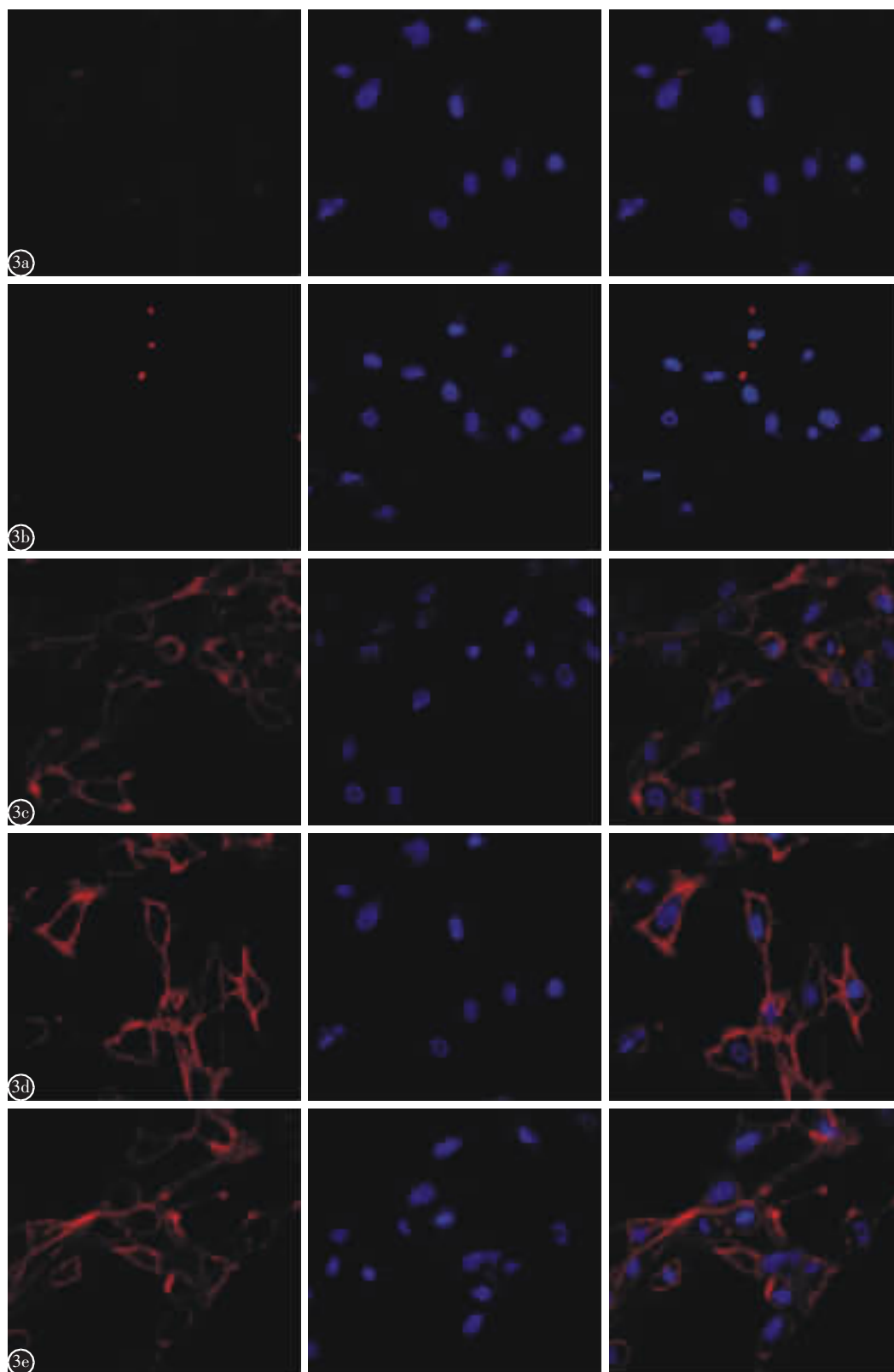


图 3 激光共聚焦观察筛选后软骨终板干细胞表面标记(左:干细胞表面标记;中:细胞核;右:融合图) a、b CD34、CD45 呈阴性 c~e CD73、CD70、CD105 呈阳性(以上均为 APC 直接标记抗体)

Figure 3 Stem cell markers of C ESCs under confocal microscopy(left: stem cell surface marker; middle: nucleus; right: merged graph). The expression of CD34 CD45(a, b) were not detected on C ESCs, while CD73, CD90 and CD105(c, d, e) were positively expressed. All the antibodies were tagged with APC

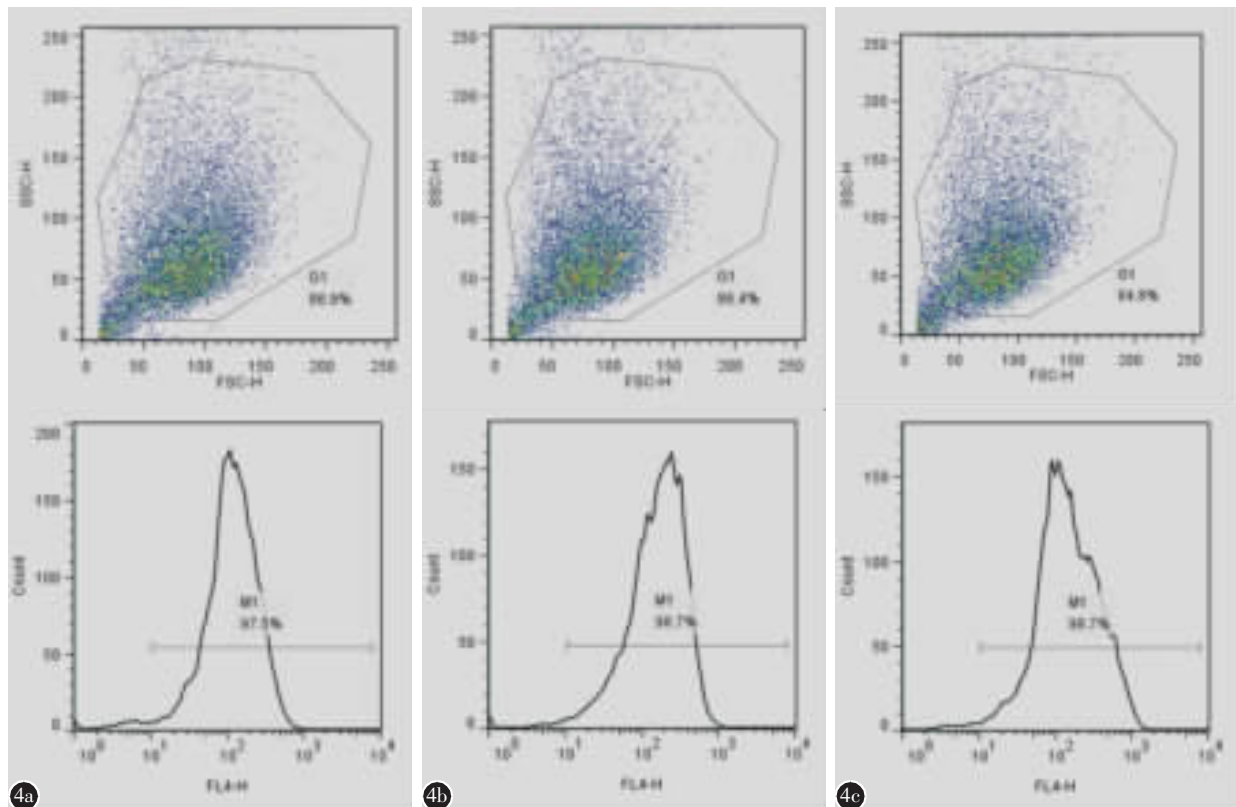


图 4 流式检测干细胞比例。CD73(4a)、CD90(4b)、CD105(4c)阳性率分别为 97.5%、98.7%和 98.7%

Figure 4 The percentage of stem cell markers weretsted by flow cytometry **a**, **b** and **c** showed CD73, CD90 and CD105 were detected and their positive rate were 97.5%, 98.7% and 98.7% respectively

表 1 培养 3、5、7d 后各类细胞相关基因的表达

Table 1 Expression level of relative genes after 3,5,7 days of these cells

基因 Gene	培养天数 day	单独培养 NPCs NPCs	共培养 NPCs co-culture NPCs	单独培养 CESC CESCs	共培养 CESC co-culture CESC
蛋白聚糖 Aggrecan	3	1.15±0.150	1.21±0.100	0±0	0±0
	5	1.19±0.043	1.32±0.050	0±0	0.10±0.001 ^②
	7	1.24±0.060	1.54±0.120 ^①	0±0	0.20±0.012 ^②
Ⅱ型胶原 Collagen Ⅱ	3	1.08±0.146	1.09±0.098	0±0	0±0
	5	1.19±0.036	1.25±0.045	0±0	0.11±0.012 ^②
	7	1.33±0.054	1.45±0.023 ^①	0±0	0.23±0.021 ^②
SOX-9	3	0.73±0.043	0.81±0.036	0±0	0±0
	5	0.82±0.046	0.92±0.041 ^①	0±0	0.16±0.017 ^②
	7	0.98±0.057	1.11±0.035 ^①	0±0	0.28±0.021 ^②

注：①与单独培养的 NPCs 比较, $P<0.05$, ②与单独培养的 CESC 比较, $P<0.05$

Note: ①Compared with NPCs, $P<0.05$, ②Compared with CESC, $P<0.05$

出现类髓核细胞分化的趋势, 而已退变的髓核细胞的髓核特异标记物的表达增强。2010 年, Yoshikawa^[16]将自体骨髓间充质干细胞植入已发生退变的椎间盘组织, 通过两年的随访发现, 进行细胞移植部分的椎间盘含水量增多, 细胞数目增加, 椎体稳定性得到改善, 患者症状也得到相应缓解。

对于细胞移植治疗来说, 寻找较大数量且性

能稳定种子细胞是亟须解决的问题之一。软骨终板干细胞(Cartilage Endplate Stem Cells, CESC)从人退变的软骨终板中分离、纯化出的一种具有向成骨、成脂及成软骨多向诱导分化潜能的干细胞^[7,8], 作为成体干细胞的一种, 除了来源丰富, 取材较为容易, 它还具有较强的增殖能力、多项分化潜能和较低的免疫原性等一般干细胞的特征, 如果能够成为用于细胞治疗的种子细胞, 将具有重

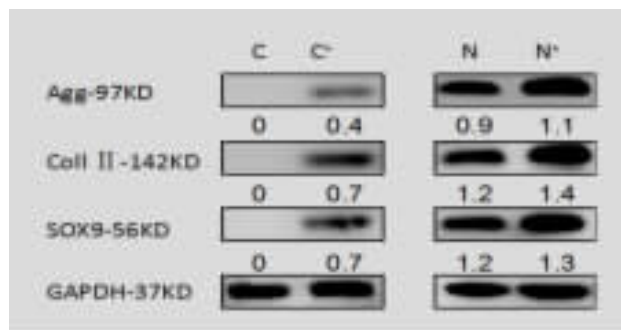


图5 单独培养的 CESC 几乎没有 Agg, Coll II, SOX-9 蛋白表达; 共培养的 CESC 有 Agg, Coll II, SOX-9 蛋白表达; 共培养 NPCs 的 Agg, Coll II, SOX-9 蛋白表达量高于单独培养 NPCs (C: CESC 单独培养组; C+: CESC 共培养组; N: NPCs 单独培养组; N+: NPCs 共培养组)

Figure 5 Protein expression levels of Agg, Coll II and SOX-9 were detected by western blot. They were not expressed in CESC cultured alone group, while after coculture their expression were detected. In NPCs, after coculture the expression of Agg, Coll II and

SOX-9 were higher than single cultivation group (C: CESC cultured alone group; C+: CESC co-culture group; N: NPCs cultured alone group; N+: NPCs co-culture group)

大的潜在临床应用价值。在 CESC 的筛选上, 我们采用了软骨细胞特异性的琼脂糖培养系统, 除了肿瘤细胞及软骨细胞, 其余细胞无法在其内存活, 通过该系统的筛选, 我们排除了软骨细胞外其他类型的细胞, 达到了提纯的目的。在种子细胞的选取上, 由于 CESC 在体外进行扩增时, 扩增时间以第 3 代为最快性能较稳定^[7], 且随着体外培养的进行, 其增值能力也随之减弱。而对于髓核细胞, 由于其本身细胞数量就较为有限, 加之培养扩增 2~3 代后出现“去分化”现象, 易转变为成纤维样细胞、失去 NP 细胞的生物学特性和功能^[17,18], 因此我们选取第三代 CESC 和第 1 代 NPC 进行试验。

在研究方法上, 本实验采用了 Tanswell 小室, 该小室有一层带有微孔的具通透性的聚碳酸酯膜, 使得共培养的两种细胞分别位于膜的两侧, 这种细胞间不进行直接接触的培养模式, 有利于探究细胞间相互作用的机制, 而且也更符合生物学实际。在将 CESC 与 NPC 进行共非接触培养后, 通过与单独培养细胞相比后发现, 共培养组的 CESC 可表达髓核细胞特异性标记物 Agg, Coll II, SOX-9, 促使 CESC 向类髓核细胞表型分化, 而共培养组 NPC 可增强髓核细胞特异性相关分子的表达。这表明两种细胞共培养时存在相互作用, 该作用可诱导并促进 CESC 向 NPC 的分化, 同时也可以延缓甚至逆转 NPC 的退变。因此, 对于 LDH 细胞移植治疗来说, CESC 可能会是一个新的种子细胞来源。这对于临床上开展 CESC 移植进行治疗椎间盘退变具有一定的指导意义。

作为本实验来说, 目前的研究还只是局限于体外, 作为细胞治疗及组织工程的根本落脚点和

意义, 我们最终的目的是希望将 CESC 通过微创注射的方法转移至发生退变的自体椎间盘, 通过外源性细胞与自体 CESC 的共培养, 实现诱导自体 CESC 髓核样分化及延缓退变髓核细胞衰老, 最终达到恢复椎间盘细胞的数量、减缓椎间盘退变的生物学作用。

关于共培养后所产生的这种干细胞与成体干细胞间的相互作用的机制, 目前有旁分泌, 细胞与细胞接触反应及缝隙连接三种主要学说, 但对于 CESC 被调控为 NPC 的机制目前仍尚未阐明, 需要进一步的研究来进一步明晰, 对于 LDH 的细胞移植治疗, 目前的大多数研究还只是局限于体外, 临床应用的实验开展的极为有限, 对于种子细胞移植的时机、细胞移植的安全性和长期有效性, 尚待进一步深入探究。相信随着分子生物学技术的发展及理论研究的深入, 对于细胞移植进行腰椎退行性疾病的治理的研究将会有新的进展, 从而为腰椎退变性疾病的患者带来一丝曙光。

4 参考文献

1. Campbell P, Wynne-Jones G, Muller S, et al. The influence of employment social support for risk and prognosis in nonspecific back pain: a systematic review and critical synthesis [J]. Int Arch Occup Environ Health, 2013, 86(2): 119-137.
2. Hoy DG, Smith E, Cross M, et al. The global burden of musculoskeletal conditions for 2010: an overview of methods [J]. Ann Rheum Dis, 2014, 73(6): 982-989.
3. Tang X, Jing L, Chen J. Changes in the molecular phenotype of nucleus pulposus cells with intervertebral disc aging [J]. PLoS One, 2012, 7(12): e52020.
4. Saleem S, Aslam HM, Rehmani MA, et al. Lumbar disc degenerative disease: disc degeneration symptoms and magnetic

- resonance image findings[J]. Asian Spine J, 2013, 7(4): 322-334.
5. Buckwalter JA. Aging and degeneration of the human intervertebral disc[J]. Spine, 1995, 20(11): 1307-1314.
6. Freemont AJ, Watkins A, Le Maitre C, et al. Current understanding of cellular and molecular events in intervertebral disc degeneration: implications for therapy[J]. J Pathol, 2002, 196(4): 374-379.
7. Liu LT, Huang B, Li CQ, et al. Characteristics of stem cells derived from the degenerated human intervertebral disc cartilage endplate[J]. PLoS One, 2011, 6(10): e26285.
8. Huang B, Liu LT, Li CQ, et al. Study to determine the presence of progenitor cells in the degenerated human cartilage endplates[J]. Eur Spine J, 2012, 21(4): 613-622.
9. Thornemo M, Tallheden T, Sjogren Jansson E, et al. Clonal populations of chondrocytes with progenitor properties identified within human articular cartilage [J]. Cells Tissues Organs, 2005, 180(3): 141-150.
10. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. Cytotherapy, 2006, 8(4): 315-317.
11. Raj PP. Intervertebral disc: anatomy-physiology-pathophysiology-treatment[J]. Pain Pract, 2008, 8(1): 18-44.
12. Roberts S, Evans H, Trivedi J, et al. Histology and pathology of the human intervertebral disc [J]. J Bone Joint Surg Am, 2006, 88(Suppl 2): 10-14.
13. Chang X, Chen B, Li HY, et al. The safety and efficacy of minimally invasive discectomy: a meta-analysis of prospective randomised controlled trials [J]. Int Orthop, 2014, 38 (6): 1225-1234.
14. 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.
15. Richardson SM, Walker RV, Parker S, et al. Intervertebral disc cell-mediated mesenchymal stem cell differentiation [J]. Stem Cells, 2006, 24(3): 707-716.
16. Yoshikawa T, Ueda Y, Miyazaki K, et al. Disc regeneration therapy using marrow mesenchymal cell transplantation: a report of two case studies[J]. Spine, 2010, 35(11): E475-480.
17. 张传志, 周跃, 李长青. 兔髓核细胞体外最佳培养条件的探索[J]. 中国矫形外科杂志, 2005, 13(14): 1093-1096.
18. 常献, 陈斌, 李长青. 髓核细胞老化机制研究进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2014, 22(1): 40-42.
- (收稿日期: 2014-09-10 修回日期: 2014-11-14)
(英文编审 蒋欣/贾丹彤)
(本文编辑 彭向峰)

消息

第二届中国脊柱内镜学术会议通知

由中国医疗保健国际交流促进会骨科疾病防治专业委员会脊柱内镜学组及《中国骨与关节杂志》主办,上海市第十人民医院(同济大学附属第十人民医院)承办的第二届中国脊柱内镜学术会议将于2015年7月31日至8月2日在上海召开。本次会议将邀请国内外脊柱内镜领域的著名专家做专题报告,同时对脊柱内镜领域共同关注的热点及难点问题进行广泛深入的讨论,展示本领域的新设备、新进展、新成果。欢迎广大从事及热爱脊柱内镜专业的人员参会交流。

会议时间: 2015年7月31日报到,8月1日全天及8月2日上午会议,8月2日下午撤离。

会议地点: 上海市闸北区共和新路1928号(上海大宁福朋喜来登酒店)。

会议注册: 现场注册,注册费800元,食宿统一安排,费用自理,由于酒店房间紧张,请提前与会务组联系;委员免注册费,提供食宿,交通费自理。

学分: 会议授予国家级Ⅰ类教育学分6分。

通讯地址: 上海市闸北区延长中路301号2号楼16楼东(同济大学附属第十人民医院骨科三区脊柱外科) 顾广飞(收), 邮编: 200072。E-mail: hss7418@aliyun.com; guguangfei01@163.com。

联系人: 顾昕 13764131302; 顾广飞 13611757174; 胡硕 13636513610; 虞舜志 13917032701; 颜旺宇 15010179781。