

基础研究

脐带华通胶间充质干细胞移植对
退变椎间盘影响的实验研究张 燕¹, 陶 晖¹, 顾 韬¹, 李欢迎², 李海峰¹, 吴剑宏¹, 何 劼¹, 阮狄克¹

(1 第二军医大学海军总医院骨科; 2 海军总医院医学影像科 100048 北京市)

【摘要】目的:探讨人华通胶间充质干细胞(Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells, WJMSCs)移植对犬退变椎间盘的影响。方法:从新生儿脐带中提取 WJMSCs,取增殖良好的第 3 代细胞,用含有绿色荧光蛋白的腺相关病毒(rAAV2-EGFP)感染标记细胞。选择 20 只健康成年比格犬作为实验动物,使用穿刺抽吸髓核组织法建立椎间盘退变模型(L4/5、L5/6、L6/7)。4 周后将犬各节段椎间盘进行分组:L3/4 为对照组(A 组);L4/5 为退变组(B 组);L5/6 为注射组(C 组),注射生理盐水;L6/7 为移植组(D 组),移植绿色荧光蛋白标记的 WJMSCs 细胞悬液。造模术前、术后 4、8、12、24 周行腰椎 X 线及 MRI 检查。24 周后处死动物取材进行冰冻切片荧光、HE 染色及番红 O 染色等组织学检测,提取髓核组织总 RNA,反转录后行 Real Time PCR 检测,观察蛋白多糖、II 型胶原、SOX-9 及 I 型胶原基因表达变化。结果:分离培养的 WJMSCs 贴壁生长,呈梭形形态,rAAV2-EGFP 病毒感染后第 3 天表达绿色荧光。影像学检查结果显示各组椎间盘高度指数及相对灰度指数在造模术前、术后第 4 周无统计学差异,术后 8、12、24 周,D 组椎间盘相对高度指数及相对灰度指数较 B、C 组高($P<0.05$),比 A 组低($P<0.05$)。术后 24 周,D 组髓核组织冰冻切片内能够检测到 GFP 阳性的 WJMSC 细胞,HE 染色显示 D 组髓核组织退变比 B 组和 C 组轻,番红 O 染色结果显示 D 组染色较 B 组和 C 组深,基因表达检测结果显示 D 组 II 型胶原、蛋白多糖及 SOX-9 基因表达比 B、C 组高($P<0.05$),但比 A 组低($P<0.05$)。结论:人 WJMSCs 移植入犬退变椎间盘内能够存活,促进椎间盘细胞外基质 II 型胶原及蛋白多糖合成,维持椎间盘高度及髓核含水量,能够有效延缓椎间盘退变进展。

【关键词】华通胶间充质干细胞;细胞移植;椎间盘退变;动物实验

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2015.08.15

中图分类号:Q813.1,R681.5 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2015)-08-0750-07

The effect of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in a xenograft canine model for intervertebral disc degeneration/ZHANG Yan, TAO Hui, GU Tao, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2015, 25(8): 750-756

【Abstract】 Objectives: To assess the effect of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells(WJMSCs) in a xenograft canine model for intervertebral disc degeneration. Methods: WJMSCs were isolated from human umbilical cords and labeled with rAAV2-EGFP. Twenty healthy adult Beagle dogs were used for animal experiment. Degenerative models were established in L4/5, L5/6, L6/7 intervertebral discs by aspiration of the nucleus pulposus. For each canine, L4/5 was used as degenerative segments(group B), L5/6 was injected with 0.9% saline 4 weeks after first operation (group C), L6/7 was injected with EGFP-labeled WJMSCs 4 weeks after first operation (group D), and the intact disc L3/4 served as an un-injured control (group A). The animals were followed up for 24 weeks after the initial operation. Spinal image was evaluated at 0, 4, 8, 12 and 24 weeks after operation respectively. Histologic analyses were performed at 24 weeks. Gene expression analysis for aggrecan, type II collagen, SOX-9 and type I collagen was performed. Results: The WJMSCs in vitro were adherent growth and exhibited fibroblast-like morphology. GFP expression was confirmed using fluorescence microscope 3 days after rAAV2-EGFP infection. Disc height and T2-weighted signal intensity were higher in group D than group B and C at 8, 12 and 24 weeks($P<0.05$), and

第一作者简介:男(1979-),在读博士,研究方向:脊柱外科

电话:(010)66958224 E-mail:zhangyan0718@163.com

通讯作者:阮狄克 E-mail:ruandikengh@163.com

didn't show significant changes in all groups at 0 and 4 weeks. GFP-positive WJMSCs were detected in the nucleus pulposus of the canine in group D 24 weeks after first operation. Histological assay showed better preserved in group D as compared to the operated degenerated control discs (group B and C). Safranin O staining showed higher aggrecan content in group D. Disc regeneration was also confirmed at the gene expression level by using real-time polymerase chain reaction. The relative gene expressions of matrix-related genes (aggrecan and type II collagens) were significantly increased in group D when compared to those of group B and group C ($P < 0.05$). **Conclusions:** The transplanted WJMSCs can survive in the disc of canine. The increased amount of aggrecan and type II collagen in the nucleus pulposus suggests that WJMSCs may serve as a new valuable resource in cell transplantation therapy for degenerative disc disease.

[Key words] Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells; Cell transplantation; Intervertebral disc degeneration; Animal experiment

[Author's address] Department of Orthopaedics, Navy General Hospital, Second Military Medical University, Beijing, 100048, China

椎间盘退变性疾病 (degenerative disc disease, DDD) 是由椎间盘退变引起的一组疾病, 是成人腰背痛的主要原因, 临床上治疗 DDD 的方法主要包括保守治疗和手术治疗, 均无法使椎间盘恢复正常的功能状态, 不能阻止椎间盘退变的进展, 因此探索新的治疗方法具有一定的临床意义。目前, 通过细胞移植技术修复退变椎间盘是国内外基础研究的热点, 大量动物实验证实成人间充质干细胞移植能够有效修复椎间盘退变, 临床应用细胞移植治疗 DDD 也取得良好效果^[1,2]。华通胶间充质干细胞 (Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells, WJMSCs) 是新近发现的来源于脐带血管间华通胶组织的间充质干细胞, 相比成人间充质干细胞, 具有来源丰富, 获取无创伤性, 免疫源性更低等优点。前期研究证实 WJMSCs 通过体外共培养能被诱导分化为类髓核细胞^[3,4], 因此本课题的研究目的是在前期研究的基础上, 通过动物实验研究 WJMSCs 体内修复退变椎间盘的潜能, 为细胞移植技术治疗 DDD 探索新的干细胞来源。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

离心机 (Hereaus 公司, 德国), 二氧化碳孵箱 (Hereaus, 德国), DMEM/F12 培养基 (Hyclone, 美国), 胰蛋白酶 (Solaibo, 中国), PBS (Sigma, 美国), 特级胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (Gibco 公司, 美国); rAAV2-EGFP 腺相关病毒 (规格 5.0×10¹¹vp) 购于本元正阳基因技术有限公司; Real-Time PCR 试剂盒购于日本 Takara 公司, Trizol

Reagent 试剂购于美国 Invitrogen 公司; 引物由北京博迈德公司合成。Real-Time PCR 仪 (BIO-RAD MJ Minioption detector for PTC1148, 美国); 氯胺酮注射液 (福建古田药业有限公司), 速眠新 II 注射液 (吉林圣达动物药品有限公司)。

1.2 标本来源

1.2.1 实验动物 健康成年比格犬 20 只, 雌雄各 10 只, 平均体重 10kg, 年龄 12~15 个月, 海军总医院动物实验中心提供, 购于北京科宇动物养殖中心 (许可证号: 京 2012-0004), 实验获海军总医院伦理委员会批准。

1.2.2 新生儿脐带 由海军总医院妇产科提供, 健康足月顺产婴儿脐带, 标本获取及研究应用经产妇及家属知情同意, 并经医院伦理委员会批准。

1.3 人脐带 WJMSCs 的提取与培养

无菌条件下取健康足月顺产婴儿脐带约 10cm, 去除脐带静脉和动脉, 得到华通胶组织, 剪切成约 1mm³ 大小碎块, 0.2mg/ml 的 II 型胶原酶溶液, 37℃ 恒温消化 18h, 2500rpm 离心 10min, 弃掉上清, 剩余液体加 0.25% 胰蛋白酶, 37℃ 恒温消化 30min, 加入胎牛血清终止消化, 2500rpm 离心 10min, 弃上清, 收集细胞, 加 DMEM/F12 培养基和胎牛血清, 使胎牛血清浓度达 20%, 将细胞悬液分装于 25cm² 培养瓶, 置于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱培养。5d 左右待细胞贴壁融合达到 80%~90% 时, 进行细胞传代, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基进行培养, 每 2~3d 细胞换液。

1.4 rAAV2-EGFP 病毒感染标记 WJMSCs

取分装于 25cm² 培养瓶生长状态良好的第 3 代 WJMSCs, 待融合达到 40%~50% 时, 进行细胞

计数。去除细胞培养基,用无血清培养基轻柔冲洗细胞 2 遍,根据细胞计数结果,按照感染复数为 1×10^5 (vp/cell) 计算所需加入的 rAAV2-EGFP 病毒体积数,加入每瓶细胞中,将培养瓶置于 37°C 、5% CO_2 培养箱培养,1h 后,吸去每瓶液体,加入 5ml 含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基继续培养 3d,荧光显微镜下观察绿色荧光表达情况,进行细胞移植实验。

1.5 动物造模实验

初次手术前对 20 只比格犬行腰椎 X 线片及 MRI 检查,排除脊柱疾病及椎间盘退变性疾病。椎间盘退变模型采用经典的穿刺抽吸髓核组织法造模^[5,6],肌肉注射速眠新和氯胺酮 1:1 混合液麻醉动物后,置于手术台,经左侧腹膜外入路,切开皮肤、皮下组织,暴露 L5、L6 和 L7 的横突,显露 L4/5、L5/6、L6/7 椎间盘,用穿刺针进行穿刺,深度约 8mm,10ml 注射器负压抽吸,抽吸出少量胶冻状髓核组织。术后 4 周行 X 线片及 MRI 检查。

1.6 WJMSCs 细胞移植动物实验

取造模成功的 20 只比格犬进行细胞移植手术,根据腰椎节段进行分组:L3/4 为对照组(A 组),不进行任何操作;L4/5 为退变组(B 组),不进行暴露及干预;L5/6 作为注射组(C 组),注射生理盐水 100 μl ;L6/7 作为移植组(D 组),注射含有 1×10^6 个 WJMSCs 的生理盐水细胞悬液 100 μl 。造模术后 4、8、12、24 周进行 X 线片及 MRI 检查,术后 24 周处死动物行组织学及分子生物学检测。

1.7 腰椎正侧位 X 线片及 MRI 检查

于造模术前、术后 4、8、12、24 周对犬的椎间盘进行 X 线及 MRI 影像学检查。使用 CDmanager 软件,在动物侧位 X 线平片上,测量并计算椎间盘相对高度指数(DHI%)^[7]。利用腰椎 MRI 评估椎间盘信号变化,采用 1.5T 磁共振扫描仪(Magneton 63P/4000;Siemens,Iselin,NJ),用自旋回波序列对腰椎行矢状位扫描和 L3~L7 椎间盘横轴位扫描,T2 像矢状位和轴位扫描。使用 CDmanager 软件测定相应椎间盘髓核及脑脊液的灰度值,髓核组织的灰度值与脑脊液的灰度值比作为相对灰度指数(relative grey index,RGI)。

1.8 组织学检测

初次手术后 24 周时,随机取 2 条犬的 L3/4、L4/5、L5/6、L6/7 椎间盘标本髓核组织,进行冰冻切片,荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白表达。剩余

18 条犬的脊柱标本,分离各椎间盘,沿纤维环中央横行切开椎间盘组织,取一半椎间盘的髓核组织,福尔马林固定 72h 后,进行组织切片,行 HE 和番红 O 染色,另一半椎间盘髓核组织提取总 RNA 进行基因表达检测。

1.9 髓核组织基因表达检测

取髓核组织,置于组织研磨器,加入 1ml Trizol 液体,研磨彻底后,按照标准的 Trizol 溶液提取技术提取总 RNA。紫外分光光度仪检测提取的 RNA 的纯度和浓度,OD260/OD280 值应大于 1.8。将提取的总 RNA 反转录获得 cDNA。获得的 cDNA 通过 Real-Time PCR 对蛋白多糖、I 型胶原、II 型胶原、SOX-9 进行扩增。管家基因 GAPDH 作为内参,引物序列由 Primer 6.0 软件(PREMIER Biosoft,USA)生成:犬 GAPDH(上游:TCTGCTCCTTCTGCTGAT;下游:GCCTGCTTCAC-TACCTTC)(NM_001003142.1),犬 I 型胶原(上游:TTCTGGTCCTCGTGGTCTCC;下游:CTTCAC-CGTCATCTCCGTTCTT)(NM_001003090.1),犬 II 型胶原(上游:GAAGACGGAGACTACTG-GATTG;下游:AGGCGGAGGAAGGTCATCTG)(NM_001006951.1),犬 SOX-9(上游:CCAGC-GAACGCACATCAAGA;下游:TGTAGGTGAAG-GTGGAGTAGAGG)(NM_001002978.1),犬蛋白多糖(上游:GCAGGACCAGACTGTCAGATAC;下游:TCCAGGCGTGTGATGAAGAAC)(NM_0011134-55.1)。Real-Time PCR 采用 BIO-RAD MJ Minioption detector 系统以及 SYBR Green PCR 试剂盒。Real-Time PCR 反应步骤为 95°C 20s 激活酶, 95°C 5s, 60°C 20s,重复 40 循环,每次循环读取 CT 值。裂解反应为从 95°C 到 60°C 每 0.2 $^\circ\text{C}$ 读取 CT 值,得到裂解曲线。反应体系为 20 μl 体系,包括上游引物 (20 μM),下游引物 (20 μM),模板 1.0 μl ,SYBR MIX 10 μl ,水 8.0 μl 。采用三复孔检测,取 CT 平均值。用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 计算目的基因的相对表达量。

1.10 统计学分析

数据以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 软件(15.0)对结果进行统计分析,采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 作为检验标准。

2 结果

2.1 WJMSCs 培养及标记结果

华通胶组织中分离提取的 WJMSCs 贴壁生长,梭形,均匀分布增长;rAAV2-EGFP 病毒感染 WJMSCs 后第 3 天荧光显微镜下能够观察到绿色荧光表达,感染病毒后的 WJMSCs 生长状态良好,形态正常(图 1)。

2.2 影像学检查结果

腰椎 X 线片及 MRI 检测结果显示,造模术后各时间点,A 组椎间盘相对高度指数及髓核组织相对灰度指数各时间点相比无统计学差异 ($P>0.05$),B、C、D 组椎间盘相对高度指数及髓核组织相对灰度指数随着时间的推移逐渐降低;术后第 8、12、24 周,D 组椎间盘相对高度指数及髓核组织相对灰度指数较 B、C 组高,比 A 组低,均具有统计学意义($P<0.05$,图 2,表 1~2)。

2.3 华通胶间充质干细胞的存活观察

随机抽取的两条比格犬中,D 组椎间盘髓核组织内均能观察到绿色荧光表达,表明 D 组椎间盘髓核组织内有存活的华通胶间充质干细胞,A、B、C 组椎间盘冰冻切片未见绿色荧光表达(图 3)。

2.4 组织学结果

髓核组织 HE 染色及番红 O 染色结果显示,A 组髓核内有较多细胞,髓核无纤维化,无退变征象。B、C 和 D 组与 A 组椎间盘相比髓核细胞数量减少,组织结构混乱,有纤维化改变,发生退变改变,但没有观察到血管化、炎症细胞浸润;相对于 B 组和 C 组,D 组退变较轻,髓核细胞数量较多,组织结构形态保持相对完整。番红 O 染色结果显

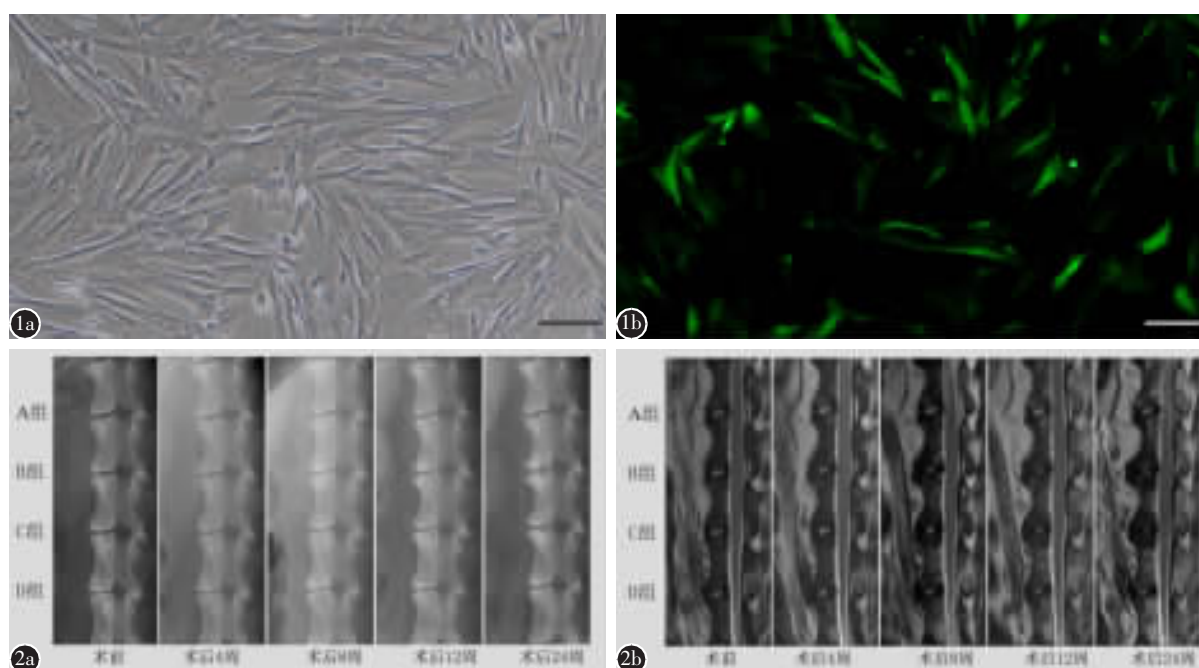


图 1 WJMSCs 形态及 rAAV2-EGFP 病毒感染标记后观察结果 **a** WJMSCs 贴壁生长,呈梭形,均匀分布增长 **b** rAAV2-EGFP 病毒感染 WJMSCs 后第 3 天荧光显微镜下能观察到绿色荧光蛋白表达(Bar=100 μ m) **图 2** **a** 术前、术后第 4、8、12、24 周腰椎侧位 X 线片示 A 组(L3/4)椎间盘各时间点高度未见降低,B(L4/5)、C(L5/6)、D(L6/7)组椎间盘高度随着时间的推移逐渐降低,但 D 组椎间盘高度在术后第 8、12、24 周时较 B、C 组高 **b** 术前、术后第 4、8、12、24 周腰椎 MRI 检查矢状位 T2 像示 A 组(L3/4)椎间盘各时间点灰度未见降低,B(L4/5)、C(L5/6)、D(L6/7)组椎间盘灰度随着时间的推移逐渐降低,但 D 组椎间盘灰度在术后第 8、12、24 周时较 B、C 组高

Figure 1 The morphology of WJMSCs and fluorescent imaging of WJMSCs infected rAAV2-EGFP **a** WJMSCs appeared to be mostly spindle-shaped and adhered to the culture dish **b** GFP expression was confirmed using fluorescence microscope 3 days after rAAV2-EGFP infection(Bar=100 μ m) **Figure 2** Radiographic and magnetic resonance imaging (MRI) **a** the representative radiographic images. The disc height in group A didn't decrease during the entire experimental period. The disc height in group B, C and D decreased as time went on. The disc height in group D was higher than those of the discs in groups B and C at 8, 12, and 24 weeks **b** The representative MRI of the discs. The disc grey in group A didn't decrease during the entire experimental period. The disc grey in group B, C and D decreased as time went on. Disc grey in the group D was higher than those of the discs in the group B and C at 8, 12, and 24 weeks

示 B、C、D 组染色较 A 组浅, 但 D 组染色较 B 组和 C 组深(图 4)。

2.4 基因表达结果分析

结果显示, A 组及 D 组椎间盘髓核组织的蛋白多糖、Ⅱ型胶原和 SOX-9 相对基因表达比 B 组和 C 组增高, Ⅰ型胶原的相对基因表达显著降低, 有统计学意义($P<0.05$); D 组椎间盘髓核组织的蛋白多糖、Ⅱ型胶原和 SOX-9 相对基因表达比 A 组降低, 有统计学意义($P<0.05$)(表 3)。D 组蛋白多糖、Ⅱ型胶原和 SOX-9 的 mRNA 基因表达增高幅度为: 蛋白多糖上调 9.58 倍, Ⅱ型胶原上调 11.85 倍, SOX-9 上调 15.23 倍; B 组髓核组织蛋白多糖、Ⅱ型胶原、Ⅰ型胶原和 SOX-9 相对基因表达与 C 组相比无显著变化, 无统计学意义($P>0.05$)(表 3)。

3 讨论

3.1 应用 WJMSCs 移植治疗椎间盘退变的优点

表 1 各组椎间盘相对高度指数 ($n=20, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Radiographic assessment in all groups

术后时间(周) Weeks post introduction of degeneration (W)	A组 Group A	B组 Group B	C组 Group C	D组 Group D
0	98.7±4.1	99.3±3.0	98.0±4.9	98.3±5.4
4	99.3±5.5	96.1±6.9	95.2±5.8	96.4±4.8
8	98.2±3.9	91.2±7.7 ^①	90.7±6.1 ^①	96.6±8.0 ^{①②}
12	99.0±4.2	88.0±6.4 ^①	87.8±5.5 ^①	94.7±5.2 ^{①②}
24	98.5±4.8	82.5±8.1 ^①	81.2±6.1 ^①	93.9±7.6 ^{①②}

注: ①与 A 组比较, $P<0.05$; ②与 B 组和 C 组比较, $P<0.05$

Note: ①Compared with group A, $P<0.05$; ② Compared with group B and C, $P<0.05$

表 2 各组椎间盘相对灰度指数 ($n=20, \bar{x} \pm s$)

Table 2 MIR assessment in all groups

术后时间(周) Weeks post introduction of degeneration (W)	A组 A group	B组 B group	C组 C group	D组 D group
0	0.69±0.07	0.67±0.06	0.68±0.05	0.69±0.04
4	0.68±0.05	0.57±0.03	0.54±0.06	0.57±0.06
8	0.65±0.06	0.49±0.06 ^①	0.47±0.04 ^①	0.53±0.02 ^{①②}
12	0.66±0.04	0.36±0.02 ^①	0.32±0.05 ^①	0.48±0.05 ^{①②}
24	0.63±0.05	0.20±0.01 ^①	0.24±0.03 ^①	0.43±0.03 ^{①②}

注: ①与 A 组比较, $P<0.05$; ②与 B 组和 C 组比较, $P<0.05$

Note: ①Compared with group A, $P<0.05$; ② Compared with group B and C, $P<0.05$

2004 年, Wang 等首先在人脐带组织中分离出 WJMSCs, 并且证实其具有三系分化潜能^[8]。本研究通过动物实验验证了 WJMSCs 延缓椎间盘退变的效果, 为临床细胞移植治疗椎间盘退变提供了新的种子细胞来源。相比成人间充质干细胞, 在临床上应用 WJMSCs 具有以下优势: (1) 脐带为胎儿分娩后的废弃物, 其获取无创伤性, 来源丰富, 取材方便, 其应用不存在伦理道德问题; 这种来源的干细胞可以大量扩增, 可以建立细胞库, 临床使用方便快捷; (2) 由于其来源于新生儿脐带, 相对纯净, 病毒及病原微生物感染远低于骨髓移植; (3) WJMSCs 相对比较原始, 增殖分化能力介于胚胎干细胞和成体干细胞之间, 比成人间充质干细胞增殖分化能力更强^[9]; (4) WJMSCs 不表达 MHC-Ⅱ, 低表达移植相关的细胞表面标记 CD80、CD86 及 HLA-ABC, 具有低免疫源性和诱导免疫耐受的能力, 免疫源性比骨髓间充质干细胞低^[10], 可进行同种异体或异种移植, 不会发生免疫排斥反应^[11], 不产生移植物抗宿主病^[11, 12]。因此, 有望替代成人间充质干细胞, 成为细胞移植技术或组织工程技术进行组织修复的理想种子细胞。

3.2 WJMSCs 移植对退变椎间盘的影响

髓核为无血管组织, 属于免疫赦免器官^[13]。动物实验研究证实椎间盘能耐受同种异体或异种来源的细胞^[14, 15], 移植的外源性细胞能够长期存活并具有生物学功能^[16-18]。本研究利用 rAAV2-EGFP 标记 WJMSCs, 移植术后 20 周, 细胞移植组椎间盘髓核组织冰冻切片荧光显微镜下均能观察到绿色荧光表达, 证实移植的 WJMSCs 能够在犬椎间盘内存活 20 周。此外, 组织学检测未观察到髓核内出现血管化、炎症细胞浸润和其他炎症反应的表现, 表明移植的异种 WJMSCs 没有受到宿主免疫系统的排斥, 进一步证实了椎间盘髓核是无血管组织, 具有免疫赦免特性^[19]。

在临床上, 判断无症状的椎间盘退变主要靠影像学检查, 早期影像学主要表现为 MRI 片 T2 相髓核组织灰度值减低, 退变加重则变为“黑间盘”, 后期 X 线平片出现椎间盘高度丢失。本研究中, WJMSCs 移植术后能观察到移植组椎间盘高度和灰度均得到有效保持, 表明髓核含水量得到有效维持, 延缓了椎间盘退变进展。组织学检测可以从微观方面评估椎间盘的细胞及细胞外基质的变化, 髓核组织切片 HE 染色和番红 O 染色结果

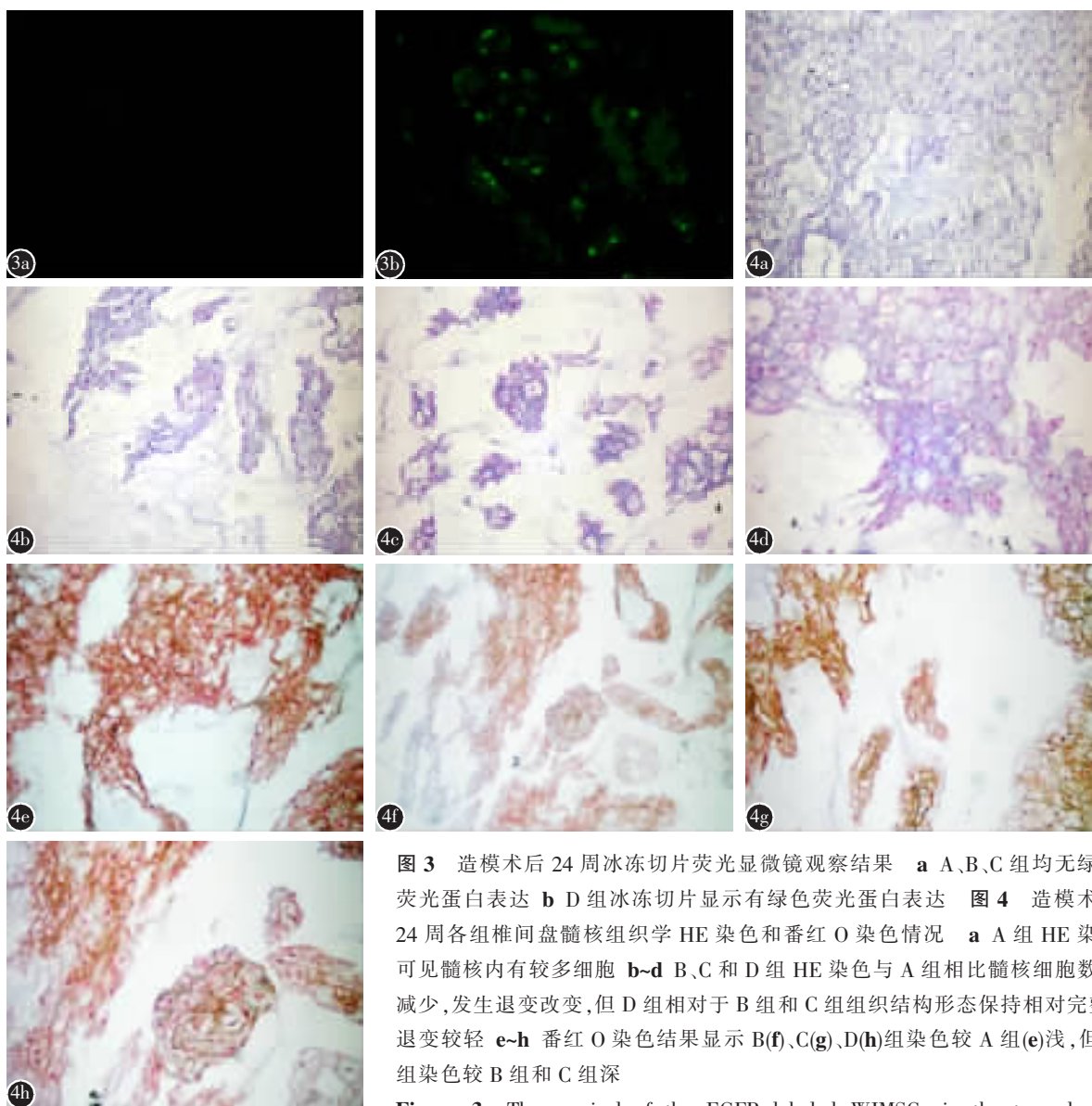


图 3 造模术后 24 周冰冻切片荧光显微镜观察结果 **a** A、B、C 组均无绿色荧光蛋白表达 **b** D 组冰冻切片显示有绿色荧光蛋白表达 **图 4** 造模术后 24 周各组椎间盘髓核组织学 HE 染色和番红 O 染色情况 **a** A 组 HE 染色可见髓核内有较多细胞 **b~d** B、C 和 D 组 HE 染色与 A 组相比髓核细胞数量减少,发生退变改变,但 D 组相对于 B 组和 C 组组织结构形态保持相对完整,退变较轻 **e~h** 番红 O 染色结果显示 B(**f**)、C(**g**)、D(**h**)组染色较 A 组(**e**)浅,但 D 组染色较 B 组和 C 组深

Figure 3 The survival of the EGFP-labeled WJMSCs in the transplanted and control discs at 24 weeks. The fluorescence microscopy demonstrated the survival of the EGFP-labeled WJMSCs in the D group disc. The fluorescence microscopy didn't detect the fluorescence in the A/B/C group **Figure 4** Typical histological images stained by hematoxylin and eosin(HE) and Safranin-O at 24 weeks. The HE staining showed the degenerative changes of NP in group B, C, and D. And the degenerative changes in group D were less deep than that in group B and C. The Safranin-O staining was more light in group B, C and D compared with group A. The discs in group D showed more deep staining than group B and C

表 3 造模术后 24 周各组椎间盘髓核组织基因相对表达变化

($n=18, \bar{x} \pm s$)

Table 3 Relative gene expression in NPs in all groups at 24 weeks

	A组(Group A)	B组(Group B)	C组(Group C)	D组(Group D)
蛋白多糖(Aggrecan)	67.03±15.87	1.03±0.35 ^①	1.11±0.07 ^①	9.58±2.52 ^{①②}
Ⅱ型胶原(Type Ⅱ collagen)	56.82±12.78	1.01±0.12 ^①	0.98±0.08 ^①	11.85±3.67 ^{①②}
SOX-9	113.63±24.67	1.04±0.06 ^①	1.05±0.11 ^①	15.23±3.90 ^{①②}
Ⅰ型胶原(Type Ⅰ collagen)	0.52±0.16	1.00±0.19 ^①	0.99±0.09 ^①	0.62±0.11 ^①

注:①与 A 组比较, $P<0.05$; ②与 B 组和 C 组比较, $P<0.05$

Note: ①Compared with group A, $P<0.05$; ② Compared with group B and C, $P<0.05$

表明细胞移植延缓了髓核细胞丢失的速度,较好地保持了髓核组织形态结构及细胞外基质。椎间盘细胞外基质主要包括蛋白多糖和Ⅱ型胶原,椎间盘退变时蛋白多糖、Ⅱ型胶原及 SOX-9 含量降低,Ⅰ型胶原含量增高,本研究基因学检测结果显示细胞移植可使蛋白多糖、Ⅱ型胶原及 SOX-9 表达得到有效维持,显著降低Ⅰ型胶原含量,表明细胞移植延缓了椎间盘退变的进展。

本研究仅观察到细胞移植术后 20 周,虽然细胞移植组椎间盘影像学、组织学及分子生物学结果均提示延缓了椎间盘退变,但是更长期观察是否仍能得到同样的结果尚属未知。因此,通过生物学技术真正扭转椎间盘退变,有待于更深入的研究。本课题虽然通过组织学证实了移植干细胞的髓核内细胞数量增多,细胞外基质增加,但由于检测方法有限,未能区分增加的细胞外基质是自体细胞分泌的还是移植的干细胞分泌,并且移植入的干细胞是否分化为髓核细胞,都有待于进一步研究证实。

4 参考文献

1. 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.
2. 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.
3. 张燕,阮狄克,张超,等. 接触式细胞共培养诱导人脐带华通胶间充质干细胞向类髓核细胞分化 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2012, 22(10): 936-942.
4. 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.
5. Okuma M, Mochida J, Nishimura K, et al. Reinsertion of stimulated nucleus pulposus cells retards IVD degeneration: an in vitro and in vivo experimental study[J]. J Orthop Res, 2000, 18(6): 988-997.
6. Hiyama A, Mochida J, Iwashina T, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells in a canine disc degeneration model [J]. J Orthop Res, 2008, 26(5): 589-600.
7. Lu, DS, Shono, Y, Oda, I, et al. Effects of chondroitinase ABC and chymopapain on spinal motion segment biomechanics. An in vivo biomechanical, radiologic, and histologic canine study[J]. Spine, 1997, 22(16): 1828-1834.
8. Wang HS, Hung SC, Peng ST, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord[J]. Stem Cells, 2004, 22(7): 1330-1337.
9. Amable PR, Teixeira MV, Carias RB, et al. Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly[J]. Stem Cell Res Ther, 2014, 5(2): 53.
10. Donders R, Vanheusden M, Bogie JF, et al. Human Wharton's jelly-derived stem cells display immunomodulatory properties and transiently improve rat experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. Cell Transplant, 2014 Oct 10. [Epub ahead of print].
11. Rachakatla RS, Marini F, Weiss ML, et al. Development of human umbilical cord matrix stem cell-based gene therapy for experimental lung tumors[J]. Cancer Gene Ther, 2007, 14 (10): 828-835.
12. Weiss ML, Anderson C, Medicetty S, et al. Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells [J]. Stem Cells, 2008, 26(11): 2865-2874.
13. Yang X, Li X. Nucleus pulposus tissue engineering: a brief review[J]. Eur Spine J, 2009, 18(11): 1564-1572.
14. 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.
15. Jeong JH, Jin ES, Min JK, et al. Human mesenchymal stem cells implantation into the degenerated coccygeal disc of the rat[J]. Cytotechnology, 2009, 59(1): 55-64.
16. 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.
17. Wei A, Tao H, Chung SA, et al. The fate of transplanted xenogeneic bone marrow-derived stem cells in rat intervertebral discs[J]. J Orthop Res, 2009, 27(3): 374-379.
18. Chun HJ, Kim YS, Kim BK, et al. Transplantation of human adipose-derived stem cells in a rabbit model of traumatic degeneration of lumbar discs[J]. World Neurosurg, 2012, 78 (3-4): 364-371.
19. Takada T, Nishida K, Doita M, et al. Fas ligand exists on intervertebral disc cells: a potential molecular mechanism for immune privilege of the disc[J]. Spine, 2002, 27(14): 1526-1530.

(收稿日期:2015-05-04 修回日期:2015-07-21)

(英文编审 唐翔宇/贾丹彤)

(本文编辑 彭向峰)