

基础研究

透明质酸水凝胶包封对携带 BMP-2 基因的腺病毒转染骨髓间充质干细胞增殖活性及其表达的影响

麻凤玉^{1,2}, 吴彬³, 章旭², 李衍朋², 管大凡^{1,2}, 齐豹², 孟纯阳²

(1 新乡医学院 453003 河南新乡市; 2 济宁医学院附属医院脊柱外科; 3 创伤骨科 272000 山东济宁市)

【摘要】目的:探讨携带骨形态发生蛋白 2(bone morphogenetic protein 2, BMP-2)基因的腺病毒转染骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)后应用透明质酸水凝胶(hyaluronic acid hydrogel, HAH)包封对 BMSCs 增殖能力及其表达目标蛋白 BMP-2 的影响。**方法:**体外分离、提取、鉴定 BMSCs, 并将提前构建好的 Ad-BMP-2 转染 BMSCs 并使用 HAH 进行包封, 激光共聚焦显微镜下观察 Ad-BMP-2 转染的 BMSCs 在 HAH 包封下的三维形态。实验分为 4 组(各组培养条件无差异): A 组(未转染 BMP-2 的 BMSCs); B 组(HAH+未转染 BMP-2 的 BMSCs); C 组(转染 BMP-2 的 BMSCs); D 组(HAH+转染 BMP-2 的 BMSCs)。分别一周内不同时相点(1d、2d、3d……7d)使用 CCK-8 法检测各组 OD 值来评价细胞增殖活性; ELISA 法检测各组 BMP-2 的量(pg/ml)来评价目标蛋白的表达状况。**结果:**激光共聚焦显微镜三维重建可观察到 BMSCs 可在 HAH 中任意平面铺展, 有充足的生长空间。BMSCs 的增殖活性检测显示, 随着培养时间延长, 细胞增殖活性逐渐增强, A 组、C 组 4d 后的 OD 值较 1d 时明显增大($P<0.05$); B 组和 D 组 5d 后的 OD 值较 1d 时明显增大($P<0.05$); 至 7d 时, A 组 OD 值为 1.283 ± 0.061 , B 组为 1.844 ± 0.075 ; C 组为 1.570 ± 0.099 ; D 组为 1.976 ± 0.142 , 包封 HAH 的 B、D 组 OD 值均优于没有包封 HAH 的 A、C 组($P<0.05$)。BMP-2 的表达在 A、B 组较弱, 不同时间点间无显著性差异($P>0.05$); C、D 组的 BMP-2 表达各时间点均明显高于 A、B 组($P<0.05$); 从 4d 时起, C、D 两组的 BMP-2 表达显著增加(与 1d 时比较 $P<0.05$), 且 D 组明显优于 C 组, 差异有显著性($P<0.05$)。**结论:**三维环境下(即包封 HAH 后), Ad-BMP-2 转染的 BMSCs 不仅有较强的增殖活性; 而且对 BMP-2 的表达具有一定的促进作用。

【关键词】透明质酸水凝胶; 骨形态发生蛋白 2; 骨髓间充质干细胞; 髓核组织工程

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2016.10.10

中图分类号: Q786, Q813.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2016)-10-0926-07

Bone marrow-derived mesenchymal stem cells transfected with adenovirus vector containing bone morphogenetic protein 2 encapsulated by hyaluronic acid hydrogel and its effect on proliferation and expression of target protein/MA Fengyu, WU Bin, ZHANG Xu, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2016, 26(10): 926-932

【Abstract】 Objectives: To observe the proliferative ability of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) transfected with the adenovirus vector containing bone morphogenetic protein 2(BMP-2) in the three-dimensional condition of hyaluronic acid hydrogel(HAH) and its effect on the expression of BMP-2 originated from BMSCs. **Methods:** BMSCs were isolated, extracted, identified in vitro and transfected with the constructed adenovirus vector containing BMP-2(Ad-BMP-2) in advance, then BMSCs were encapsulated by HAH; the three-dimensional shape of Ad-BMP-2 BMSCs in HAH was observed by laser scanning confocal microscope. Four groups in the experiments (all groups no difference in culture conditions) were classified as followings: group A, untransfected BMSCs; group B, HAH+untransfected BMSCs; group C, transfected BMSCs; group D, HAH+transfected BMSCs. CCK-8 method was used to detect each OD value for evaluating cell proliferation of transfected cells encapsulated by HAH at different time point(1d, 2d, 3d……7d). ELISA method was used

基金项目: 山东省高等学校科技计划项目(编号: J14LL04); 山东省自然科学基金青年基金(编号: ZR2014CQ042)

第一作者简介: 男(1986-), 医师, 硕士在读, 研究方向: 脊柱、脊髓损伤与骨组织工程

电话: (0537)2903236 E-mail: mafengyu3@126.com

通讯作者: 孟纯阳 E-mail: chunyangmeng16@163.com

to detect the quantity of each BMP-2 expression (pg/ml). **Results:** In HAH by used confocal laser 3d reconstruction of BMSCs morphology could be observed that BMSCs rendered arbitrary planar spreading with plenty of growth space. BMSCs proliferation activities detection showed the extension of incubation time as, cell proliferation activities increased, OD value of group A and group C after 4d was obviously higher than that in 1d($P<0.05$); OD value of group B and group D after 5d was obviously higher than that in 1d($P<0.05$). At 7d, the OD value of group A was 1.283 ± 0.061 , group B was 1.844 ± 0.075 , group C was 1.570 ± 0.099 , group D was 1.976 ± 0.142 and encapsulated HAH OD value of group B and group D were better than that in group A and group C without encapsulated HAH($P<0.05$). Weak expression of BMP-2 were in group A and group B, there were no significant difference between different time points ($P>0.05$). At various time points, the expression of BMP-2 in both group C and group D were obviously higher than that in group A and group B ($P<0.05$). Since 4d, group C and group D of BMP-2 expression significantly increased(compared to 1d, $P<0.05$); the expression of BMP-2 in group D was significantly better than that in group C, and the difference between the two group was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusions:** Ad-BMP-2 BMSCs not only have strong proliferationpotency, but also can promote the expression of BMP-2 in three-dimensional environment (encapsulated by HAH).

【Key words】 Hyaluronic acid hydrogels; BMP-2; BMSCs; Tissue engineering nucleus pulp

【Author's address】 Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan, 453003; Spine Surgery, Affiliated Hospital of Jining Medical University, Jining, Shandong, 272000, China

颈椎及腰椎椎间盘退变是脊柱退行性疾病发生的第一步,被认为是颈背痛及腰痛的常见原因之一,严重影响着患者的生活质量^[1];如何有效地减缓甚至逆转椎间盘的退变是当前骨科医生的梦想和挑战。生长因子在椎间盘修复领域被广泛研究。骨形态发生蛋白 2(bone morphogenetic protein 2, BMP-2)是转化生长因子超家族成员之一,具有非常强的成骨作用,在自体骨移植领域具有非常大的应用前景^[2]。Kim 等^[3]将 BMP-2 应用于椎间盘修复,发现不仅没有成骨作用,反而还会促进纤维环细胞的有丝分裂;同时 BMP-2 可以促进髓核细胞二型胶原及蛋白聚糖的表达^[4]。另外, Hou 等^[5]将腺病毒介导 BMP-2(Ad-BMP-2)转染至骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSCs)发现可以诱导并维持其向类软骨细胞表型分化。BMSCs 具有取材方便、多向分化潜能、低免疫原性等特性,是修复椎间盘退变组织工程目前最受青睐的种子细胞。透明质酸水凝胶(hyaluronic acid hydrogel, HAH)是一种非常有前景的新型可注射生物材料,通常在组织工程和再生医学领域可以作为细胞三维培养支架来模拟细胞在体内生长的生理环境。在髓核组织中,透明质酸支撑着与硫酸盐糖胺连接的蛋白聚糖分子^[6]。不仅可以促进椎间盘组织的修复,还可以调节细胞功能,有利于髓核细胞表型的维持^[7,8]。对于 BMSCs, HAH 在为其提供三维环境的

同时还有利于 BMSCs 粘附、聚集。本研究拟将携带 BMP-2 基因的腺病毒转染至 BMSCs 并使用 HAH 包封,体外观察 BMSCs 在 HAH 中的形态、增殖状态以及目的蛋白表达情况,为下一步髓核组织工程的构建及动物相关实验研究提供理论基础和技术支持。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

胎牛血清、DMEM/F12 培养基、青-链霉素、10×磷酸盐缓冲液(PBS)、0.25%胰蛋白酶(Gibco)、戊巴比妥钠、Percoll 分离液(solarbio)、小鼠抗兔 CD14-APC(Miltenyi Biotec)、小鼠抗兔 CD31-PE(Novus Biologicals)、小鼠抗兔 CD90-PE(antibodies-online)、小鼠抗兔 CD105-PerCP(Gene-Tex)、小鼠 IgG1 K(PE, ebioscience)、小鼠 IgG1(PE, Abbiotec)、小鼠 IgG1(APC, Abbexa Ltd)、小鼠 IgG1(PerCP, enzolifesciences)同型对照抗体、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI, Sigma)、透明质酸水凝胶试剂盒(BioTime Inc)、CCK-8 试剂盒(Dojindo)、Ad-BMP-2(汉恒生物)、人 BMP-2 酶联免疫试剂盒(武汉博士德)、细胞培养超净台(thermo fisher Scientific)、CO₂ 恒温细胞培养箱(thermo fisher Scientific)、倒置荧光相差显微镜(OLYMPUS)、激光共聚焦显微镜(ZEISS)、FACS Calibur 流式细

胞仪(BD),酶标仪(Awareness)。

1.2 实验动物

新西兰大白兔 2 只,3~4 周龄,雌雄不拘,体重约 0.5kg,用于分离 BMSCs,由山东省鲁抗医药股份有限公司实验动物中心提供(动物许可证号:SCXK 鲁 20130001)。

1.3 BMSCs 的提取、鉴定

1%戊巴比妥钠(3.5ml/kg)经耳缘静脉缓慢注射入新西兰大白兔,注射时注意观察大白兔的呼吸以及角膜反射。待麻醉深度可以后取侧卧位,双侧髂前上棘备皮、消毒、铺巾;16 号骨髓穿刺针接 20ml 注射器经左侧髂前上棘抽取兔骨髓液约 3~5ml,依序抽取另一侧。将骨髓液与 PBS 等比例混合,然后将稀释的骨髓液轻轻滴加在等量的 Percoll 分离液上方,2500r/min 水平离心 30min,溶液分四层,吸取乳白色单核细胞层,用 DMEM/F12 培养基(含 1%青-链霉素、10%胎牛血清)在 25cm² 培养瓶中进行培养,每 2~3d 换液,倒置荧光相差显微镜观察生长状态。取第三代细胞进行成骨、成脂诱导分化,同时另取第三代细胞按照说明书分别加入抗兔 CD14、CD31、CD90、CD105 抗体进行流式细胞仪检测。

1.4 Ad-BMP-2 转染 BMSCs

BMSCs 鉴定完成后,取生长状态良好的第三代 BMSCs 为实验对象,计数,接种于 6 孔板内(2×10⁶ 个/孔)。每孔加入 1/2 体积的培养基(无双抗、10%胎牛血清、DMEM-F12 培养基),然后按照感染复数(multiply of infection,MOI)值分别为 50、80、100、120、200 的 Ad-BMP-2 加入到 6 孔板中,每种 MOI 值设 3 个复孔,4~6h 后换液,24h 后上流式细胞仪检测感染效率以及细胞生存率,确定最佳 MOI 值转染后 12、24h 后观察 GFP 表达并拍照。

1.5 HAH 包封 Ad-BMP-2 BMSCs

将透明质酸、交联剂和脱气去离子水平衡至室温。用无菌注射器向透明质酸管形瓶和交联剂管形瓶中添加脱气的去离子水。将管形瓶放在振荡器上,大约 30min 后固体材料将慢慢溶解,溶液澄清略微粘稠。抽取部分透明质酸溶液与交联剂混合,待水凝胶溶液反应后(大约 10min 后),分别加入预先离心好的 Ad-BMP-2 BMSCs 或 BMSCs 沉淀,重悬细胞,使细胞在水凝胶中均匀分布。

实验分为 4 组(各组培养条件无差异):A 组

(未转染 BMP-2 的 BMSCs);B 组(HAH+未转染 BMP-2 的 BMSCs);C 组(转染 BMP-2 的 BMSCs);D 组(HAH+转染 BMP-2 的 BMSCs)。

1.6 Ad-BMP-2 BMSCs 增殖活性检测

在 HAH 凝成胶体之前,将水凝胶混合液迅速移至 8 块 96 孔板内,每个实验组设 3 个复孔,每孔 100μl、细胞数为 10⁴ 个/孔,然后置于体积分数 37°、5% CO₂ 细胞培养箱内。待 HAH 凝固成胶体后,每孔再添加 100μl DMEM/F12 细胞培养基(含 10%胎牛血清),继续培养。然后按照 CCK-8 说明书,在 1d、2d、3d、4d、5d、6d、7d 七个时间点进行 CCK-8 检测,细胞增殖活性使用光密度(optical density,OD)值表示。

1.7 ELISA 法测定 BMP-2 的表达

借助上一步,在进行 CCK-8 检测前,将每个检测时间点的细胞上清液收集并装入 EP 管中,使用 BMP-2 酶联免疫试剂盒对 BMP-2 的分泌表达进行检测,具体操作步骤按照说明书进行。将酶标仪测得的数据根据标准曲线换算成 BMP-2 分泌量。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件处理,数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组样本均数比较采用单向方差分析;多组样本间的多重比较:若方差齐,使用 SNK-q 检验,若方差不齐,使用 Dunnett's T3 检验,以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 BMSCs 的形态观察及鉴定

倒置相差显微镜下观察,BMSCs 在 24h 后已有部分细胞开始贴壁生长,呈多边形或小梭形,细胞状态良好,48h 后首次换液,随培养时间延长,细胞呈梭形,集落开始出现且逐渐增大,细胞群呈旋风样排列,细胞 1 周左右即可达到 80%融合(图 1a)。传代细胞的生长较原代要快,约 3d 传代一次(图 1b)。三代细胞成骨、成脂诱导分化成功(图 1c、d);流式细胞仪细胞表面抗原检测包封 BMSCs 的细胞表型:CD90 93.67%;CD105 92.03%;CD14 0.11%;CD31 1.08%(图 2)。Ad-BMP-2 转染 BMSCs,12h 后转染效率可达 70%,且与未携带 BMP-2 基因的腺病毒转染 BMSCs(Ad BMSCs)无明显差异(图 3a、b)。然后根据细胞转染效率和生存率确定 Ad-BMP-2 最佳 MOI

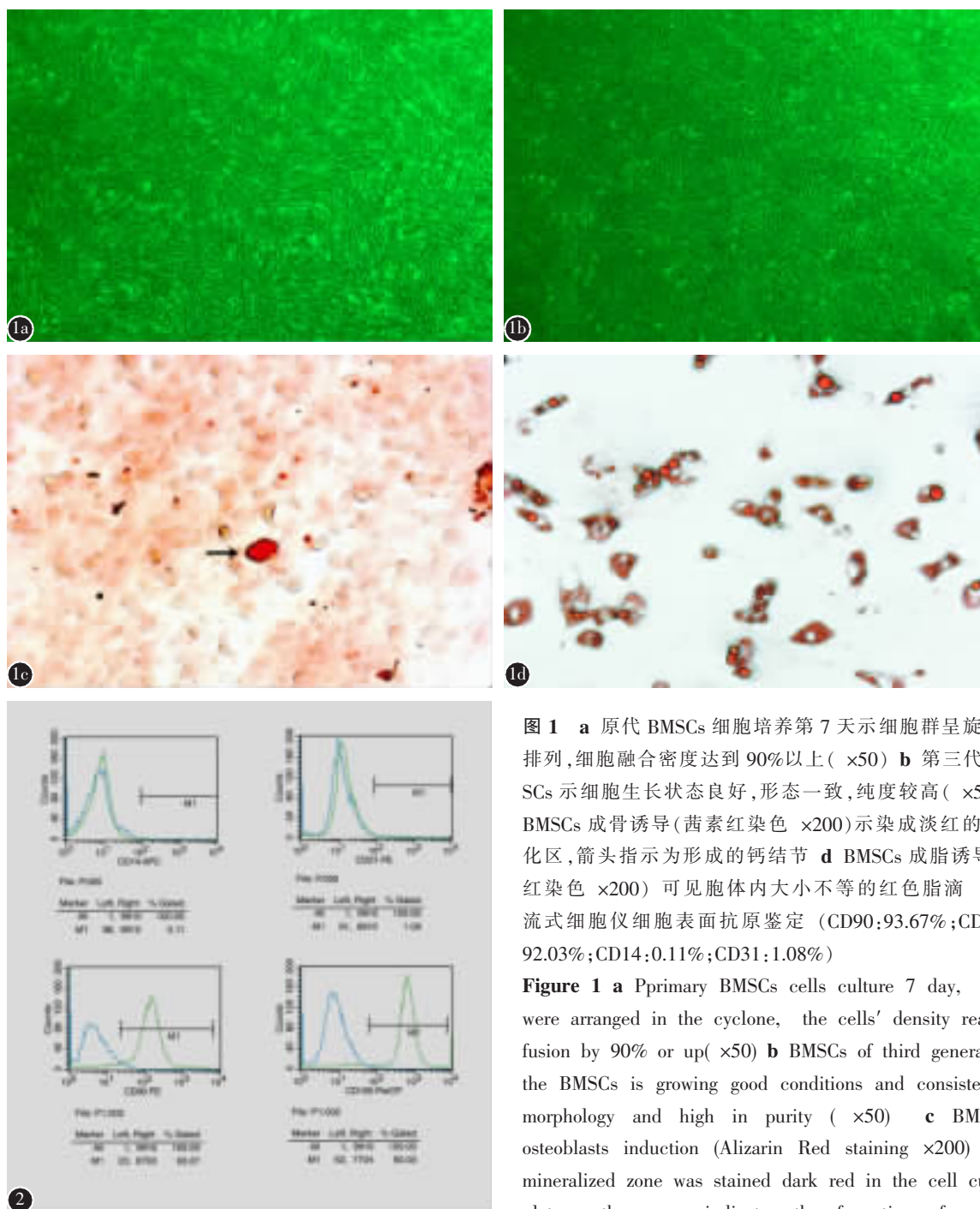


图 1 a 原代 BMSCs 细胞培养第 7 天示细胞群呈旋风样排列,细胞融合密度达到 90%以上(×50) b 第三代 BMSCs 示细胞生长状态良好,形态一致,纯度较高(×50) c BMSCs 成骨诱导(茜素红染色 ×200)示染成淡红的为矿化区,箭头指示为形成的钙结节 d BMSCs 成脂诱导(油红染色 ×200)可见胞体内大小不等的红色脂滴

Figure 1 a Pprimary BMSCs cells culture 7 day, Cells were arranged in the cyclone, the cells' density reached fusion by 90% or up(×50) b BMSCs of third generation, the BMSCs is growing good conditions and consistent in morphology and high in purity (×50) c BMSCs' osteoblasts induction (Alizarin Red staining ×200) the mineralized zone was stained dark red in the cell culture plate, the arrow indicates the formation of calcium

nodules d BMSCs' adipogenic induce, red lipid droplets of various sizes can be seen in the intracellular(oil red staining, ×200) Figure 2 Identification of cell surface antigens via Flow Cyto Meter(CD90: 93.67%; CD105: 92.03%; CD14: 0.11%; CD31: 1.08%)

值为 100(图 3c)。

2.2 Ad-BMP-2 BMSCs 在 HAH 中的形态及分布

Ad-BMP-2 转染 BMSCs 24h 后,即可观察到明显的绿色荧光,使用 HAH 包封后,DAPI 染核,激光共聚焦显微镜三维重建可观察到 BMSCs 可

在 HAH 中任意平面铺展,有充足的生长空间(图 3d)。

2.3 细胞增殖活性检测结果

随着培养时间延长,各组细胞增殖活性逐渐增强,A 组、C 组 4d 后的 OD 值较 1d 时明显增大($P<0.05$);B 组和 D 组 5d 后的 OD 值较 1d 时明

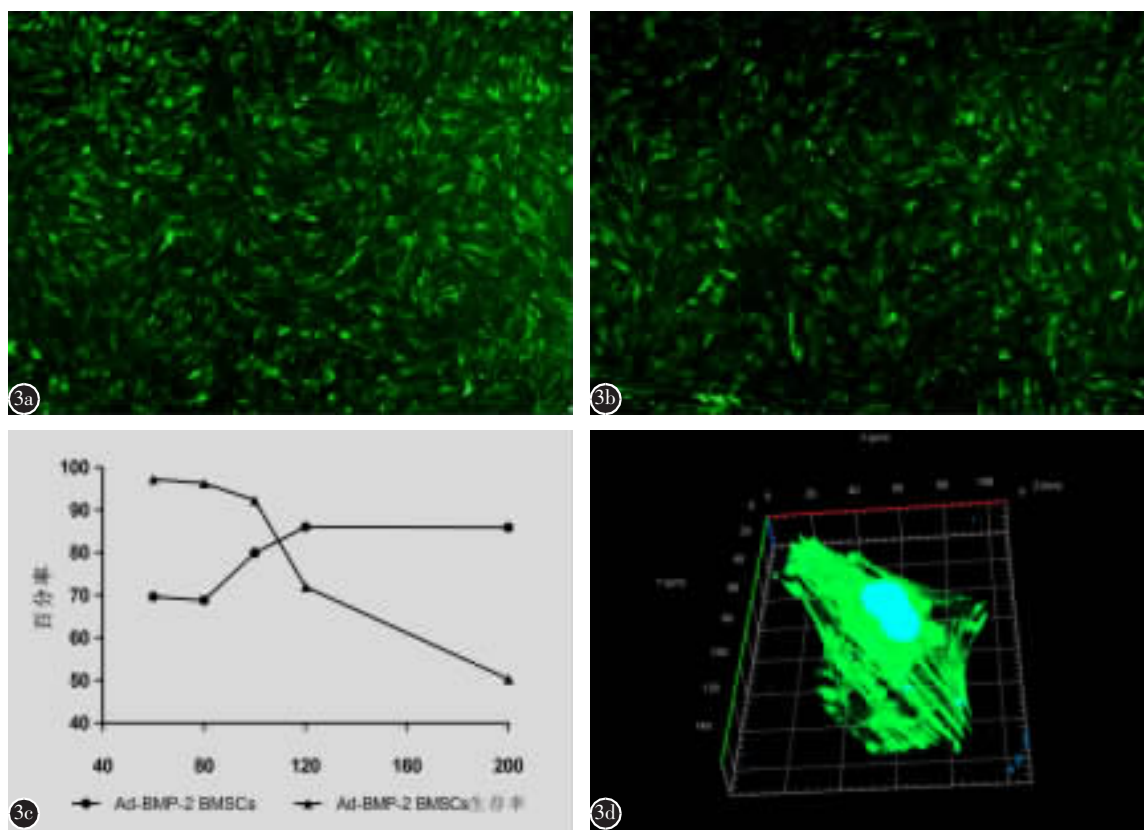


图3 a 荧光显微镜下观察 Ad-BMP-2 BMSCs GFP 表达情况(12h,×50) b 荧光显微镜下观察 Ad BMSCs GFP 表达情况(12h,×50) c 不同感染复数(MOI)下病毒转染效率以及细胞存活率 d 激光共聚焦显微镜下 Ad-BMP-2 BMSCs 在 HAH 中的三维形态(×200)

Figure 3 a Ad-BMP-2 BMSCs green fluorescent protein's(GFP's) expression under the fluorescence microscope(12h, × 50) b Ad BMSCs GFP's expression under the fluorescence microscope(12h, ×50) c Virus transfection efficiency under different multiplicity of infection(MOI) and the cells' survival rate d Under the laser scanning confocal microscope, three-dimensional shape of Ad-BMP-2 MSCs in the HAH(×200)

显增大($P<0.05$);至 7d 时,包封 HAH 的 B、D 组 OD 值均优于没有包封 HAH 的 A、C 组 ($P<0.05$, 表 1)。

2.4 BMP-2 表达检测结果

ELISA 法结果显示,Ad-BMP-2 转染 BMSCs 后,BMP-2 均可表达,组间多重比较显示差异具有统计学意义($P<0.05$)。BMP-2 的表达在 A、B 组较弱,不同时间点间无显著性差异($P>0.05$);C、D 组的 BMP-2 表达各时间点均明显高于 A、B 组 ($P<0.05$);从 4d 时起,C、D 两组的 BMP-2 表达显著增加(与 1d 时比较 $P<0.05$),且 D 组明显优于 C 组,差异有显著性($P<0.05$,表 2)。

3 讨论

椎间盘退变是颈背痛、腰痛的常见原因之一,

严重影响着患者的生活质量,椎间盘退变的治疗干预一直都是临床医生及科研工作者面临的挑战。随着组织工程、分子生物学的发展,细胞移植和基因治疗在椎间盘退变的治疗中被认为是极具前景的治疗策略^[9]。研究表明,椎间盘的退变通常伴随着髓核细胞的丢失以及细胞外基质分泌的减少,说明髓核细胞在椎间盘退变的起始和发展过程中扮演着重要的角色^[10]。近年来,不同来源的种子细胞如自体的髓核细胞已经被证实可以促进椎间盘的再生^[11];但是除了少量的脊索细胞,人髓核组织含有很少健康的髓核细胞^[12],这就限制了自体髓核细胞的应用。

随着组织工程学研究和发展越来越深入,组织工程种子细胞越来越受到重视。BMSCs 是多能干细胞,具有多向分化潜能,可以分化为骨细胞、

表 1 不同时相点 BMSCs 的 OD 值

(n=4, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 OD values of BMSCs at different time points

	A组(Group A)	B组(Group B)	C组(Group C)	D组(Group D)
1d	0.490±0.049	0.807±0.105	0.819±0.057	0.888±0.036
2d	0.506±0.008	0.788±0.012	0.839±0.041	0.896±0.014
3d	0.556±0.027	0.866±0.008	0.932±0.023	1.002±0.038
4d	1.045±0.074 ^①	1.032±0.078	1.161±0.045 ^①	1.233±0.118
5d	1.257±0.005 ^①	1.310±0.022 ^①	1.494±0.013 ^①	1.761±0.072 ^①
6d	1.421±0.023 ^①	1.538±0.070 ^①	1.549±0.054 ^①	1.974±0.047 ^①
7d	1.283±0.061 ^①	1.844±0.075 ^{①②}	1.570±0.099 ^①	1.976±0.142 ^{①②}

注:①与同组 1d 时比较 $P<0.05$;②与 A、C 组比较 $P<0.05$ Note: ①Compared with 1d of same group, $P<0.05$; ②Compared with group A or C, $P<0.05$

表 2 不同时相点 BMP-2 的表达量

(pg/ml)

Table 2 The expression of BMP-2 at different time points

	A组(Group A)	B组(Group B)	C组(Group C)	D组(Group D)
1d	31.42±1.69	30.19±4.08	72.89±12.70 ^①	75.69±8.26 ^①
2d	27.48±7.80	29.73±4.47	93.52±11.70 ^①	75.10±21.80 ^①
3d	32.54±0.97	28.04±1.69	66.74±11.61 ^①	74.56±7.55 ^①
4d	33.10±1.68	30.85±5.43	119.56±31.17 ^{①②}	186.77±19.79 ^{①②③}
5d	34.79±1.68	26.34±7.37	182.83±47.31 ^{①②}	252.58±26.86 ^{①②③}
6d	31.98±0.97	30.85±5.43	140.61±20.98 ^{①②}	294.60±21.73 ^{①②③}
7d	33.10±1.68	33.67±3.51	167.60±14.40 ^{①②}	267.15±28.73 ^{①②③}

注:①与 A、B 组比较 $P<0.05$;②与同组 1d 时比较 $P<0.05$;③与 C 组比较 $P<0.05$ Note: ①Compared with group A or B, $P<0.05$; ②Compared with 1d of same group, $P<0.05$; ③Compared with group C, $P<0.05$

脂肪细胞、软骨细胞、肌细胞、肝细胞等;同时在适当刺激下 BMSCs 还可以分化为髓核细胞^[13,14]。在获得方式上,BMSCs 来源于骨髓间质,具有来源充足、取材容易、分离、培养简单等特点。在应用上,BMSCs 已经可以直接注射或者与支架包封在一起注射到退变的椎间盘中,分化为椎间盘细胞并促进细胞外基质的分泌^[15]。所以,针对椎间盘退变 BMSCs 移植是一个非常具有潜能的治疗策略。

生长因子作为蛋白质分子对细胞的增殖、组织的生长、生物有机体的发育等都具有调节作用。在椎间盘退变的研究领域,生长因子一直扮演着重要的地位。骨形态发生蛋白 2(BMP-2)由 Urist 教授于 1965 年发现,是转化生长因子超家族成员之一,能够诱导动物或人体间充质细胞分化为骨、软骨、韧带、肌腱和神经组织。Li 等^[16]在体外证实 BMP-2 可以促进椎间盘细胞基质的分泌以及 BMP-7、TGF- β 1 的表达。在本研究中,CCK-8 检测显示各组细胞增殖活性逐渐增强,A 组、C 组 4d 后的 OD 值较 1d 时明显增大($P<0.05$);B 组和

D 组 5d 后的 OD 值较 1d 时明显增大 ($P<0.05$),考虑跟使用 HAH 包封有关。至 7d 时,包封 HAH 的 B、D 组 OD 值均优于没有包封 HAH 的 A、C 组 ($P<0.05$)。

透明质酸是一种蛋白多糖,通常分布在多种组织细胞外的基质,是细胞外基质的主要成分之一。透明质酸与相应交联剂交联,形成具有一定的生物相容性、可降解及无免疫原性的水凝胶。在包封细胞时,可以为细胞提供三维立体生长环境,克服了二维环境里的“接触抑制”,同时还具有一定的机械强度,常被用于组织工程的水凝胶支架^[17]。在椎间盘退变的治疗上,水凝胶交联时在液态,可以被注射并完全充盈到缺损的髓核组织;聚合后又可以为椎间盘提供足够的机械强度,可满足椎间盘复杂的生理结构。在本研究中,使用 HAH 包封的 D 组在培养后期 BMSCs 表达 BMP-2 的量明显优于未使用 HAH 包封的 C 组,提示 HAH 可为 BMSCs 的生长、增殖提供良好的三维环境的同时,还可促进 BMSCs 表达 BMP-2。另外

Maturavongsadit 等^[18]在诱导 BMSCs 为软骨细胞时也证实 HAH 对 BMSCs 表达 BMP-2 具有一定的促进作用。

综上所述,包封 HAH 后,Ad-BMP-2 BMSCs 不仅可存活,而且还可促进 BMSCs 增殖活性及表达 BMP-2 的能力;同时也印证 BMP-2 对 BMSCs 的增殖活性具有一定的促进作用。本实验将 HAH 包封 Ad-BMP-2 BMSCs 后对 BMSCs 进行形态学观察,以及对其在 HAH 中的增殖活性及目的蛋白的分泌进行了评价,为今后 HAH 包封 Ad-BMP-2 BMSCs 移植治疗提供一定的理论和实验基础。本组实验中未对 HAH 包封 Ad-BMP-2 BMSCs 的增殖活性及目标蛋白的表达进行较长时间研究(如 2 周、3 周),未观察 HAH 对 BMSCs 其他基质分泌的影响,也没有用透明质酸在二维环境下对 Ad-BMP-2 BMSCs 进行对比评价(此部分本课题组已进行过评价^[9]),其用于髓核组织工程的椎间盘修复还有待于进一步实验研究。

4 参考文献

1. Okada E, Matsumoto M, Ichihara D, et al. Aging of the cervical spine in healthy volunteers: a 10-year longitudinal magnetic resonance imaging study[J]. Spine, 2009, 34(7): 706-712.
2. Noshchenko A, Hoffecker L, Lindley EM, et al. Perioperative and long-term clinical outcomes for bone morphogenetic protein versus iliac crest bone graft for lumbar fusion in degenerative disk disease: systematic review with meta-analysis[J]. J Spinal Disord Tech, 2014, 27(3): 117-135.
3. Kim H, Lee JU, Moon SH, et al. Zonal responsiveness of the human intervertebral disc to bone morphogenetic protein-2[J]. Spine, 2009, 34(17): 1834-1838.
4. Froelich K, Setiawan LE, Technau A, et al. Influence of different growth factors on chondrogenic differentiation of adipose-derived stem cells in polyurethane-fibrin composites [J]. The International journal of artificial organs, 2012, 35 (12): 1047-1060.
5. Hou Y, Shi G, Shi J, et al. Study design: in vitro and in vivo assessment of bone morphogenetic protein 2 combined with platelet-rich plasma on treatment of disc degeneration[J]. International Orthopaedics, 2016, 40(6): 1143-1155.
6. Shankar H, Scarlett JA, Abram SE. Anatomy and pathophysiology of intervertebral disc disease[J]. Techniques in Regional Anesthesia and Pain Management, 2009, 13(2): 67-75.
7. Collin EC, Grad S, Zeugolis DI et al. An injectable vehicle for nucleus pulposus cell-based therapy[J]. Biomaterials, 2011, 32(11): 2862-2870.
8. Halloran DO, Grad S, Stoddart M et al. An injectable cross-linked scaffold for nucleus pulposus regeneration[J]. Biomaterials, 2008, 29(4): 438-447.
9. Leung VY, Chan D, Cheung KM. Regeneration of intervertebral disc by mesenchymal stem cells: potentials, limitations, and future direction [J]. Eur Spine J, 2006, 15 (Suppl 3): S406-413.
10. Shoukry M, Li J, Pei M. Reconstruction of an in vitro niche for the transition from intervertebral disc development to nucleus pulposus regeneration[J]. Stem Cells Dev, 2013, 22(8): 1162-1176.
11. Nishimura K, Mochida J. Percutaneous reinsertion of the nucleus pulposus: an experimental study[J]. Spine, 1998, 23 (14): 1531-1538.
12. Sakai D, Nakamura Y, Nakai T, et al. Exhaustion of nucleus pulposus progenitor cells with ageing and degeneration of the intervertebral disc[J]. Nat Commun, 2012, 3: 1264.
13. 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.
14. 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 Research & Therapy, 2011, 13(3): 1-13.
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. Li J, Yoon ST, Hutton WC. Effect of bone morphogenetic protein-2(BMP-2) on matrix production, other BMPs, and BMP receptors in rat intervertebral disc cells [J]. J Spinal Disord Tech, 2004, 17(5): 423-428.
17. Lei Y, Gojgini S, Lam J et al. The spreading, migration and proliferation of mouse mesenchymal stem cells cultured inside hyaluronic acid hydrogels[J]. Biomaterials, 2011, 32(1): 39-47.
18. Maturavongsadit P, Luckanagul JA, Metavarayuth K, et al. Promotion of in vitro chondrogenesis of mesenchymal stem cells using in situ hyaluronic hydrogel functionalized with rod-like viral nanoparticles[J]. Biomacromolecules, 2016, 17 (6): 1930-1938.
19. 张聪, 刘洪美, 李庆伟, 等. 临床剂量浓度透明质酸对骨髓间充质干细胞旁分泌及过表达 VEGF165 作用影响的实验研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2014, 22(9): 839-842.

(收稿日期:2016-04-27 修回日期:2016-08-11)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 彭向峰)