

基础研究

正常与退变髓核的髓核间充质干细胞
代谢活性及干性基因表达的比较

阳普山, 刘子双一, 陶 晖, 姜刚强, 吴剑宏, 阮狄克, 王德利

(南方医科大学第三临床医学院附属海军总医院骨科 100048 北京市)

【摘要】目的:比较来源于正常与退变髓核的髓核间充质干细胞(NPMSCs)的细胞代谢活性及干性基因表达情况。**方法:**收集 6 例非退变患者髓核组织(正常组)与 6 例腰椎间盘突出症患者的退变髓核组织(退变组),采用酶消化法分离细胞,应用标准间充质干细胞培养基(standard MSC culture medium)进行细胞培养并观察细胞形态。两组内各取 1 例分离得到的细胞进行流式细胞仪检测间充质干细胞表面蛋白分子标记 CD90、CD105、CD73、CD45、CD34 及人类白细胞抗原(HLA)-DR 表达情况;并进行成骨、成脂及成软骨诱导分化,诱导 28d 后分别应用茜素红染色鉴定细胞成骨能力、油红 O 染色鉴定细胞成脂能力、甲苯胺蓝染色鉴定细胞成软骨分化能力,并按照国际干细胞治疗协会(ISCT)提出的间充质干细胞的判定标准,对分离得到的细胞进行综合评估鉴定。采用 CCK-8 检测两组 P2 代 NPMSCs 的代谢活力。提取两组每例 P2 代细胞总 RNA,行 RT-PCR 检测 P2 代细胞“干性维持”相关基因 Oct4 及 Nanog 表达情况。**结果:**两组 P0 代细胞均贴壁生长,形态学方面两组并无明显差异。免疫表型鉴定显示正常组和退变组间充质干细胞表面分子标记 CD90、CD105、CD73 表达比例分别高达 96%、98%、95%以上,两组均低表达造血细胞标志物 CD45、CD34、HLA-DR(均低于 4%)。茜素红染色、油红 O 染色及甲苯胺蓝染色分别证实正常组与退变组细胞均可向骨、脂肪及软骨细胞三系诱导分化。上述结果证实分离得到的细胞即 NPMSCs。细胞代谢活性测定示 P2 代细胞在培养后 5d、7d、9d、11d、13d 正常组细胞活性均强于退变组,两组细胞活性有统计学差异($P<0.05$)。正常组“干性维持”相关基因 Oct4 及 Nanog 表达量分别为退变组的 4.63 ± 1.17 、 7.36 ± 1.19 倍,正常组均明显高于退变组($P<0.05$)。**结论:**正常与退变髓核组织内均存在 NPMSCs,但正常椎间盘来源的 NPMSCs 具有较强的细胞代谢活性,较“强的干性维持”基因表达。

【关键词】椎间盘退变;髓核间充质干细胞;干性基因;细胞活性

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2014.05.14

中图分类号:R681.5,R813.1,Q786 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2014)-05-0454-08

Cell activity and stem cell-related genes expression of mesenchymal stromal cells from non-degenerative and degenerative nucleus pulposus: a comparative study/YANG Pushan, LIU Zishuangyi, TAO Hui, et al/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2014, 24(5): 454-461

【Abstract】 Objectives: To compare the cell activity and stem cell-related genes expression of mesenchymal stem cells(MSCs) in nucleus pulposus(NP) from non-degenerative and degenerative disc. **Methods:** The human nucleus pulposus mesenchymal stem cells (NPMSCs) were isolated by using standard MSC culture medium as suitable for MSCs culture by Cyagen from 6 non-degenerative patients of either scoliosis or burst fracture and 6 patients with degenerative intervertebral disc separately. One case of cells was selected from each group, respectively, and immunophenotype(CD90/CD105/CD73/CD45/CD34 and HLA-DR) and multilineage(Osteogenic, chondrogenic and adipogenic) differentiation potential were analyzed under the criteria to define MSCs, which was stated by the International Society for Cellular Therapy (ISCT). The cell activity of second passage from each group was analyzed by using cell counting kit-8(CCK-8). The total RNA of both non-degenerative and degenerative group were extracted, then the Real-Time PCR was used to detect the relative expressions of stem cell-related genes Oct4 and Nanog. **Results:** The original cells from both non-degenerative and degener-

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:81171740)

第一作者简介:男(1986-),硕士研究生在读,研究方向:脊柱外科

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

通讯作者:阮狄克 E-mail:ruandikengh@163.com;王德利 E-mail:wangdelinavy@163.com

ative group showed adherent growth, cell morphology of two groups showed no significant difference. The immune phenotype showed both normal and degenerative cells highly expressed the mesenchymal stem cell surface markers CD90, CD105, CD73 (expression ratio as high as 96%, 98%, 95%, respectively). And hematopoietic markers CD45, CD34, HLA-DR were lower expressions (all less than 4%). Multilineage differentiation results showed cells obtained from both non-degenerative and degenerative NP developed red stained calcium salts, and adipocyte-like cells which were stained red by Oil red O, and chondrocyte-like cells stained blue by toluidine blue, after Osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation for 28 days. Together with the immunophenotype, cells obtained from both non-degenerative and degenerative NP fulfilled the criteria to define MSCs stated by ISCT. Cell viability assay by CCK-8 showed that cell activity in normal group was stronger than that in the degeneration group at 5, 7, 9, 11, 13 days, there was significant difference between two groups ($P < 0.05$). The Real-Time PCR results showed that Stemness maintenance related gene Oct4 and Nanog expression in normal group was 4.63 ± 1.17 , 7.36 ± 1.19 times respectively than degeneration group. The Stemness maintenance related gene expression in normal group was significantly higher than that in the degeneration group ($P < 0.05$). **Conclusions:** Both the non-degenerative and degenerative NP contain NPMSCs. Moreover, the non-degenerative NPMSCs show stronger ability of cell metabolic activity and stem cell-related genes expression.

【Key words】 Intervertebral disc degeneration; Nucleus pulposus mesenchymal stem cells; Stem cell-related genes; Cell activity

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

椎间盘退变时,髓核组织退变最为明显,对于椎间盘退变具有重要影响^[1]。既往认为椎间盘处于一种低氧高压高渗状态,外层纤维环区域仅有极弱的再生修复能力^[2],而内层的髓核组织基本不具修复能力^[3],因此椎间盘内无干细胞存在。但随着椎间盘退变相关研究的深入,有学者发现在椎间盘内也存在前体细胞。Risbud 等^[4]于 2007 年首次报告人退变椎间盘组织中存在一类表达前体细胞表面抗原分子 (CD105+, CD166+, CD63+, CD49a+, CD90+, CD73+, p75+) 的细胞,这类细胞具有成骨、成软骨及成脂分化能力,提示该类细胞是椎间盘内的前体细胞。Blanco 等^[5]研究发现,这类细胞贴壁生长、特征性表达一系列间充质干细胞 (MSCs) 表面蛋白分子、可完成三系诱导分化,符合国际细胞治疗学会 (International Society for Cellular Therapy, ISCT) 有关 MSCs 的界定标准^[6],并将其命名为髓核间充质干细胞 (NPMSCs)。但正常来源的 NPMSCs 与退变来源的 NPMSCs 相比,两者生物学活性、细胞“干性”的自我维持是否存在差异,目前鲜见报道。本研究分别从正常与退变髓核组织分离培养 NPMSCs,并对其细胞代谢活性及干性基因表达进行对比,明确人椎间盘内 NPMSCs 的细胞活性及干性相关基因表达是否随椎间盘退变而发生改变。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

标准间充质干细胞培养基 (Cyagen Biosciences, 中国广州), 胰蛋白酶 (Solarbio, 美国), 磷酸盐缓冲液 (PBS) (Sigma, 美国), 胎牛血清 (Hyclone 公司, 美国); CCK-8 检测试剂盒 (同仁化学研究所, 日本东京); PE 标记 CD105、CD90、CD73、CD45、CD34、人类白细胞抗原 (HLA)-DR (eBioscience, 美国); 人 MSCs 成骨诱导培养液, 成脂诱导培养液, 成软骨诱导培养液 (Cyagen, 美国); FC 500 流式细胞仪 (Beckman Coulter, 美国); Real-Time PCR 试剂盒 (日本 Takara 公司), Trizol Reagent (美国, Invitrogen 公司); PCR 引物 (上海生工公司, 中国上海); Real-Time PCR 仪 (BIO-RAD MJ MiniOpticon detector for PTC1148, 美国); 倒置荧光显微镜 (Olympus/奥林巴斯 IX71, 日本)。

1.2 正常与退变髓核组织中 NPMSCs 的分离培养

1.2.1 取材 收集 6 例成人腰椎间盘内正常髓核组织, 其中先天性脊柱侧凸 4 例, 腰椎爆裂骨折患者 2 例, 年龄 22~53 岁, 根据 Pfirrmann 椎间盘退变分级患者椎间盘为 I 级或 II 级, 且患者既往无明显腰腿痛。6 例椎间盘退变髓核组织均来自于

腰椎间盘突出症患者, 年龄 36~57 岁, 按照 Pfirrmann 椎间盘退变分级患者椎间盘退变为Ⅳ级或以上。经医院伦理委员会同意, 以上所有患者均签署知情同意书。

1.2.2 NPMSCs 分离培养 取手术摘除的椎间盘标本, 无菌条件下超净台中仔细分离髓核组织, PBS 清洗 2 遍, 剪碎髓核组织至 $1.0 \times 1.0 \times 1.0 \text{ mm}$ 大小, 浸于 0.2 mg/ml 的Ⅱ型胶原酶溶液中, 置 37°C 恒温消化 4h, 无菌不锈钢丝网 ($200 \mu\text{m}$) 过滤组织碎片。1500r/min 离心 5min, 弃上清液, 收集细胞, 加入含 10%FBS 的标准 MSCs 培养基, 置于 37°C 、5% CO_2 条件培养。静置培养 1 周待细胞贴壁后每 2d 或 3d 换液 1 次, 待细胞融合达到 80%~90% 时, 进行常规传代培养。传代后用含 10%FBS 的标准 MSCs 培养基继续进行培养。

1.3 NPMSCs 的鉴定

1.3.1 细胞形态学观察 原代 (P0 代) 细胞贴壁后第 3 天观察细胞形态, 倒置显微镜下拍照记录 P0 代细胞形态学特征。传代后取生长良好的 P2 代细胞拍照, 记录细胞形态学特征。

1.3.2 细胞表面抗原蛋白分子的检测 取正常组与退变组 P1 代细胞各 1 例用胰蛋白酶消化后, 调整细胞浓度为 1×10^5 个细胞/ml, 每管取细胞 1ml, PBS 清洗两遍, 离心后弃上清用于标记。每种细胞均设同型对照, 对照管中加入 IgG-PE 抗体, 其余测定管中分别加入荧光单克隆抗体 CD90、CD105、CD73、CD45、CD34 及 HLA-DR (荧光染料均为 PE), 每管总共 $100 \mu\text{l}$ 细胞悬液, 混匀后室温避光孵育 30min, 再用 2ml PBS 清洗, 重悬于 $500 \mu\text{l}$ PBS 后在流式细胞仪上检测。根据同型对照的荧光强度设定阴性细胞群阈值, 观察两种细胞每一种单抗的阳性细胞表达率及荧光强度。

1.3.3 NPMSCs 三系诱导分化

(1) 成骨分化。选取正常组与退变组各 1 例的 P2 代细胞, 用胰酶消化细胞, 按照 5×10^3 个细胞/ml 密度接种于 6 孔板中, 常规培养液培养至细胞融合 60% 左右, 吸去常规培养液, 每孔加入 2ml 人 MSCs 成骨诱导培养液进行诱导培养。每 3d 更换 1 次培养液, 连续培养 28d 后茜素红染色观察。

(2) 成脂分化。选取正常组与退变组各 1 例的 P2 代细胞, 按照 2×10^4 个细胞/ml 密度接种于 6 孔板中, 常规培养直至细胞生长达到 95% 融合,

吸除常规培养液, 每孔加入 2ml 成脂诱导培养液 A。3d 后将 A 诱导液吸除换作成脂诱导培养液 B, 诱导 24h 后吸出诱导 B 液, 再次加入 2ml 成脂诱导 A 液进行诱导。按照以上方法换液 1 次为 1 个循环, 重复 3~4 个循环, 后用成脂诱导 A 液继续维持诱导, 总计共诱导 28d 后用油红 O 染色观察。

(3) 成软骨诱导分化。选取正常组与退变组各 1 例 P2 代细胞, 加入软骨诱导基础培养液 [不含转化生长因子- $\beta 3$ (TGF- $\beta 3$)] 重悬细胞, 1500r/min 离心 5min 弃上清, 按 $5.0 \times 10^5/\text{ml}$ 的量加入软骨诱导完全培养液 (含 TGF- $\beta 3$) 重悬细胞; 吸取 $500 \mu\text{l}$ 细胞悬液 (即 2.5×10^5 个细胞) 转入 15ml 离心管中, 1500r/min 离心 5min; 离心后不可摇动或吹打细胞团, 将离心管盖拧松, 放入 37°C 、5% CO_2 中孵育, 3d 后换新鲜的软骨分化诱导液, 第 1 次换液后轻弹细胞团使其能脱壁漂浮。每 2~3d 换液 1 次, 继续诱导 14d, 共计诱导 28d, 待细胞团直径增至约 2mm, 收集细胞微球甲醛固定后进行石蜡切片, 脱蜡后甲苯胺蓝染色观察。

完成细胞形态观察、细胞表面蛋白分子检测及三系诱导分化实验之后, 按照国际细胞治疗协会 (International Society For Cellular Therapy, ISCT) 关于间充质干细胞的判定标准进行综合判定。

1.4 NPMSCs 代谢活力的比较

取来源于正常与退变髓核的各例 P2 代细胞, 按照每孔 5×10^3 个细胞的密度接种于 96 孔细胞培养板中, 置于 37°C 、体积分数为 5% 的 CO_2 培养箱中培养。分别于接种后 4h 及 1、3、5、7、9、11、13d, 每例细胞各取 3 孔, 加入 $10 \mu\text{l}$ Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 试剂溶液作用 2h, 酶标仪测定 430nm 下各孔的吸光度值 (OD 值)。不加细胞的 CCK-8 孔作为阴性对照, 将细胞培养各孔所得 OD 值减去阴性对照 OD 值后计算正常与退变组 NPMSCs 的 OD 值平均值并进行比较。

1.5 NPMSCs “干性维持” 相关基因的测定

取生长良好 P2 代的 NPMSCs, 采用标准的 Trizol 溶液提取总 RNA。紫外分光光度仪检测提取的 RNA 纯度和浓度, OD260/OD280 值应 >1.8 , 将提取的细胞总 RNA 置入 -80°C 冰箱保存。待收集齐各标本总 RNA 后, 进行反转录并 PCR 反应。取 $3 \mu\text{l}$ 之前提取的 RNA 模板, 加入 $1 \mu\text{l}$ 随机引物,

1.0 μ l 反转录酶, 8 μ l dNTP, 加入 4 μ l 缓冲液, 3 μ l DEPC 处理水, 使反应体系总体积为 20 μ l, 于 42 $^{\circ}$ C, 反转录 1h, 获得 cDNA。逆转录后获得的 cDNA 通过 Real-Time PCR 对 Oct4 及 Nanog 基因进行扩增, 管家基因 GAPDH 作内参。所有引物序列由 Primer 5.0 软件生成: 人 GAPDH(上游: GAAGGTCTGGAGT-CAACGG; 下游: GGAAGATGCTGATGGGATT)(NM_000576.2); 人 Oct4 (上游: GTATTCAGC-CAAACGACCATCT; 下游: GCTTCCTCCACC-CACTTCT)(NM_001173531.1); 人 Nanog(上游: ACCCGTTTCACTGTGTAGC; 下游: GACGGCAGC-CAAGGTTATTA) (NC_000012.11)。Real-Time PCR 反应步骤为 95 $^{\circ}$ C(20s) 激活酶, 95 $^{\circ}$ C(5s), 60 $^{\circ}$ C(20s), 重复 40 个循环, 每次循环读取 CT 值。裂解反应为 95 $^{\circ}$ C~60 $^{\circ}$ C 每 0.2 $^{\circ}$ C 读取 CT 值, 得到裂解曲线。反应体系为 20 μ l 体系, 包括: 上游引物(20 μ M)、下游引物(20 μ M)共计 1.0 μ l, 模板 1.0 μ l, SYBR MIX 10 μ l, 水 8.0 μ l。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。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析, 对正常组与退变组 NPMSCs 不同培养天数的细胞

OD 值、基因相对表达量进行方差齐性检验后, 采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态

正常与退变来源的原代细胞培养 4~7d 后均贴壁, 贴壁细胞形态以短棒状形态生长, 其细胞长短大小不一(图 1); 培养 15~20d 可达到 90% 融合并出现漩涡样生长。两组细胞在进行传代后细胞生长较原代培养明显加快, 8~12d 后细胞即可融合。体外传代培养, P2 代细胞形态基本保持一致, 均为纺锤样长梭形(图 2)。

2.2 MSCs 表面抗原蛋白分子

来源于正常与退变髓核组织的 P2 代细胞均强阳性表达 MSCs 表面蛋白分子标志 CD90、CD105、CD73; 阴性表达造血细胞标志物 CD45、CD34、HLA-DR(图 3)。其中正常组和退变组来源细胞表面分子 CD105、CD90、CD73 表达率分别均高达 96%、98%、95% 以上; 两组均低表达造血干细胞标志物 CD45、CD34、HLA-DR (阳性率均低于 4%)。

2.3 NPMSCs 三系诱导分化

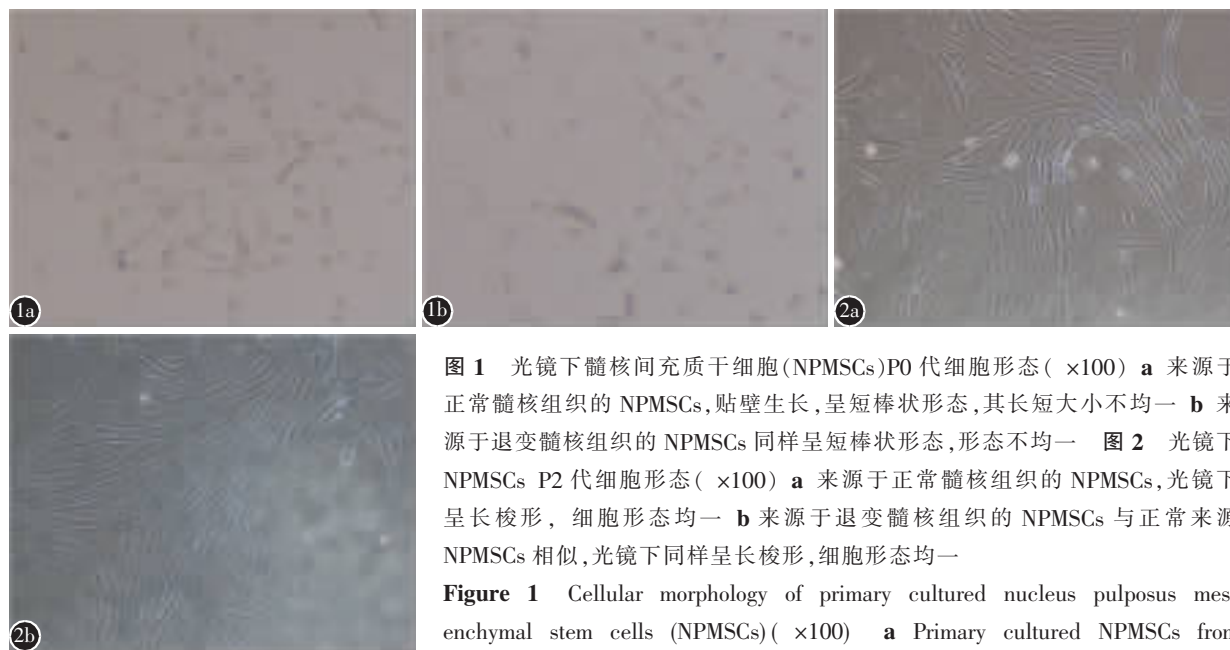


图 1 光镜下髓核间充质干细胞(NPMSCs)P0 代细胞形态($\times 100$) **a** 来源于正常髓核组织的 NPMSCs, 贴壁生长, 呈短棒状形态, 其长短大小不均一 **b** 来源于退变髓核组织的 NPMSCs 同样呈短棒状形态, 形态不均一 **图 2** 光镜下 NPMSCs P2 代细胞形态($\times 100$) **a** 来源于正常髓核组织的 NPMSCs, 光镜下呈长梭形, 细胞形态均一 **b** 来源于退变髓核组织的 NPMSCs 与正常来源 NPMSCs 相似, 光镜下同样呈长梭形, 细胞形态均一

Figure 1 Cellular morphology of primary cultured nucleus pulposus mesenchymal stem cells (NPMSCs) ($\times 100$) **a** Primary cultured NPMSCs from non-degenerative nucleus pulposus present a short rod like shape, and cell morphological are heterogeneity **b** Primary cultured NPMSCs from degenerative nucleus pulposus also present a short rod like shape, with cell morphological heterogeneity **Figure 2** Cellular morphology of second passage cultured NPMSCs ($\times 100$) **a** The second passage cultured NPMSCs from non-degenerative nucleus pulposus are generally elongated and spindle shaped, with uniform cell morphological **b** The second passage cultured NPMSCs from degenerative nucleus pulposus are also spindle shaped with uniform cell morphological

正常组与退变组 P2 代细胞均可向成骨细胞诱导分化, 诱导分化 28d 后茜素红染色可见正常与退变来源细胞表面均存在大量红染的矿化钙盐沉积, 两组在钙结节形成方面无明显差异(图 4)。成软骨诱导分化显示, 诱导 3 周后正常来源与退变来源 P2 代细胞均可以形成乳白色的软骨微球(图 5), 诱导 28d 后甲醛固定后切片甲苯胺蓝染色后两种来源细胞均可见明显蓝染的软骨细胞(图 6)。成脂诱导分化显示, 诱导 28d 后, 正常组与退变来源 P2 代细胞间均可形成片状脂滴团, 油红染色后呈鲜红色脂滴空泡(图 7)。

按照 ISCT 关于 MSCs 的判定标准, 结合细胞形态学、表面蛋白抗原分子及成脂、成骨、成软骨三系诱导分化结果, 判定分离得到的细胞为 NPMSCs。

2.4 正常与退变 NPMSCs 生物学活性的比较

CCK-8 测定细胞活性显示, 在培养 4h~3d, 正常组与退变组 NPMSCs 活性指标 OD 值比较差异无统计学意义($P>0.05$); 培养后 5、7、9、11、13d 正常组与退变组细胞活性指标 OD 值比较差异有统计学意义($P<0.05$), 正常组细胞活性明显高于退变组(表 1)。

2.5 正常与退变 NPMSCs“干性”基因表达的对比

以 GAPDH 基因作为内参基因, 退变组作为对照组, 比较 Oct4 及 Nanog 基因的表达。Real-Time PCR 检测结果显示, 相对于退变组, 正常组的 Oct4 及 Nanog 基因表达量显著升高 ($P<0.05$)。正常组的 Oct4 及 Nanog 的相对表达量分别是退变组的 4.63 ± 1.17 倍和 7.36 ± 1.19 倍(表 2)。

3 讨论

MSCs 是一种来源于中胚层的成体干细胞, 可以向多种组织(如骨、软骨、肌肉、韧带、肌腱、脂肪等)分化^[7]。人体的许多组织中存在干细胞^[8](如骨髓、脂肪组织、肌肉、滑膜等), 随着干细胞相关研究的深入, 既往认为不存在干细胞的组织亦发现干细胞的存在: 如人们发现神经组织^[9]、心肌组织^[10]均存在成体干细胞。那么髓核组织内是否也存在干细胞? Risbud 等^[4]首次从退变的椎间盘组织中分离出一类表达一系列骨髓间充质干细胞表面抗原分子并可以完成成骨、成脂诱导分化的细胞, 因此 Risbud 认为该类细胞为椎间盘内的骨骼前体细胞。Brisby 等^[11]则通过免疫组织化学染色

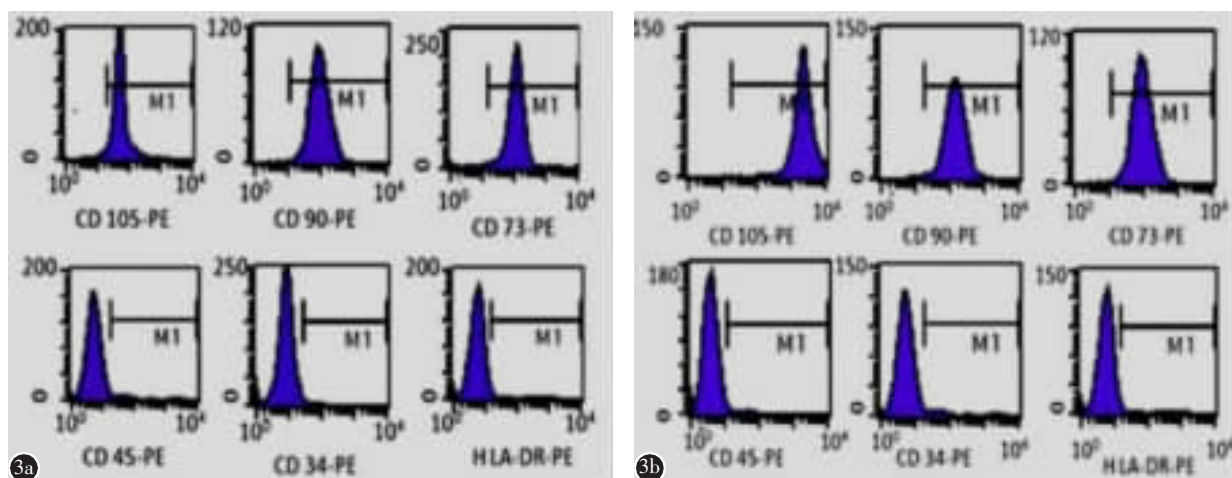


图 3 流式细胞仪检测 P2 代细胞间充质干细胞表面分子的表达结果 **a** 来源于正常髓核组织的 NPMSCs 高表达间充质干细胞标记 CD105、CD90、CD73(均高于 95%), 低表达造血干细胞标 CD45、CD34、HLA-DR(低于 4%) **b** 来源于退变髓核组织的 NPMSCs 同样高表达间充质干细胞表面分子标记 CD105、CD90、CD73(均高于 95%) 且低表达造血干细胞标 CD45、CD34、HLA-DR(低于 4%)

Figure 3 Surface molecule marker of second passage of NPMSCs detected with FACS **a** Surface molecule marker of MSC(CD105, CD90, CD73) high expressed and the hematopoietic stem cell markers(CD45, CD34, HLA-DR) low expressed(all less than 4%) on the second passage of non-degenerative NP-MSCs **b** The second passage cultured NPMSCs from degenerative nucleus pulposus also high expressed molecule marker of MSC (CD105, CD90, CD73) and low expressed the hematopoietic stem cell markers(all less than 4%)

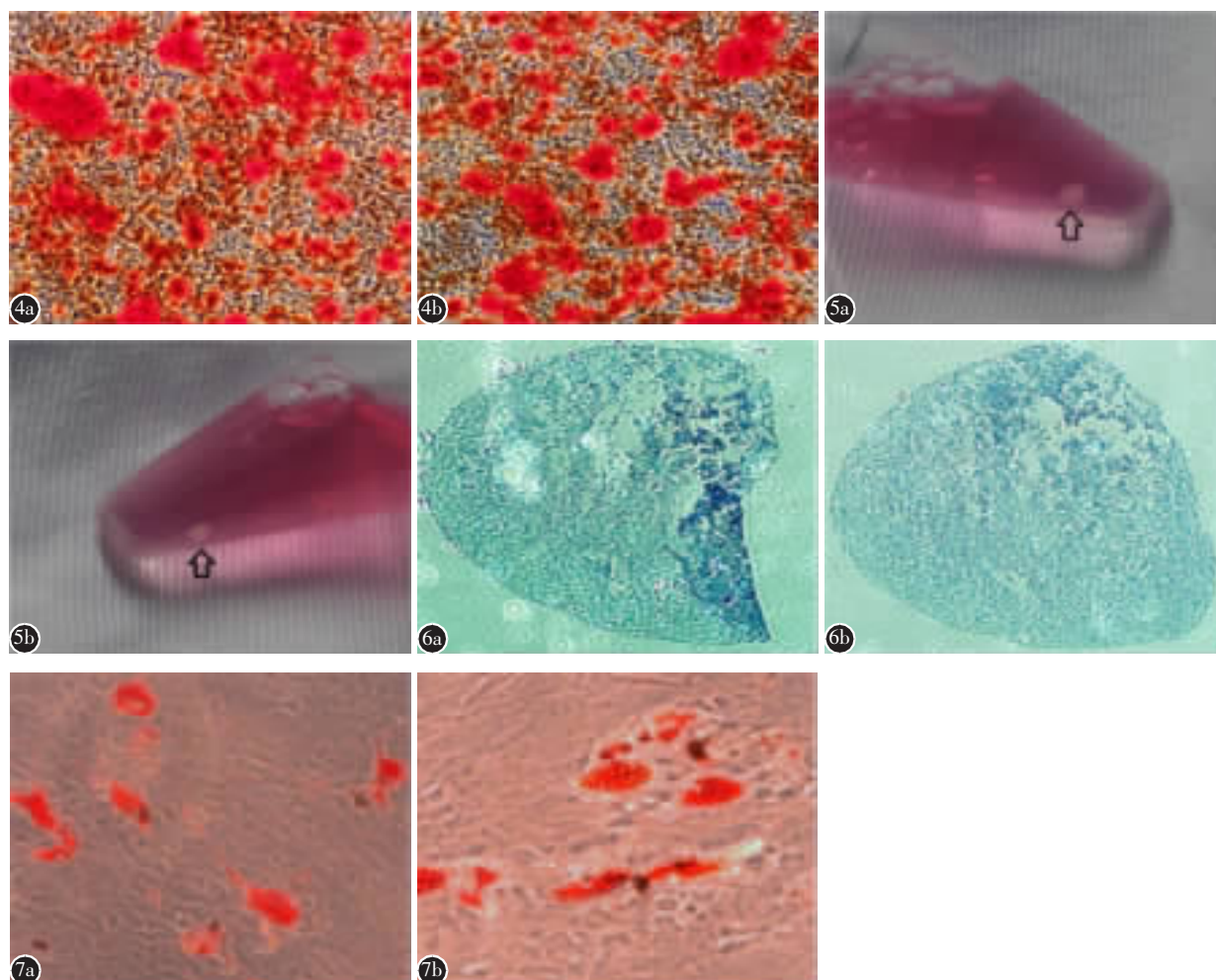


图 4 P2 代髓核间充质干细胞(NP MSCs)成骨诱导 28d 茜素红染色结果(×40) **a** 来源于正常髓核组织的 NP MSCs 成骨诱导 28d 后可见大量红染的钙结节 **b** 来源于退变髓核组织的 NP MSCs 成骨诱导 28d 细胞外同样存在大量红色的钙盐沉积 **图 5** P2 代 NP MSCs 成软骨诱导分化 28d 后软骨细胞微球大体形态(箭头示) **a** 来源于正常髓核组织的 NP MSCs 诱导分化后可见软骨微球形成 **b** 来源于退变髓核组织的 NP MSCs 诱导分化后同样可以形成软骨微球 **图 6** P2 代 NP MSCs 成软骨诱导分化后甲苯胺蓝染色结果(×40) **a** 来源于正常髓核的 NP MSCs 染色后可见明显蓝染的软骨样细胞 **b** 来源于退变髓核组织的 NP MSCs 染色后与正常来源 NP MSCs 相似, 同样可见明显蓝染的软骨样细胞 **图 7** P2 代 NP MSCs 成脂诱导分化 28d 后油红-O 染色结果(×100) **a** 正常的 NP MSCs 成脂诱导后可见细胞间形成红染的脂肪滴 **b** 来源于退变髓核组织的 NP MSCs 同样可以形成红染的脂肪滴细胞

Figure 4 NP MSCs osteogenic differentiated after 28 days evaluated by alizarin red stain (×40) **a** The second passage cultured non-degenerative NP MSCs formatted lots of red stained calcium salts **b** The second passage cultured NP MSCs from degenerative nucleus pulposus also with a lot of red stained calcium salts deposited **Figure 5** The macromorphology of NP MSCs chondrogenic differentiated after 28 days **a** The second passage NP MSCs from non-degenerative nucleus pulposus formatted a multicellular spheroids cartilage **b** The second passage of degenerative derived NP MSCs also formatted a multicellular spheroids cartilage **Figure 6** NP MSCs chondrogenic differentiation after 28 days stained by toluidine blue(×40) **a** The second passage non-degenerative NP MSCs are stained blue by toluidine blue, indicated it have been induced into chondrocyte-like cell **b** The second passage of NP MSCs from degenerative nucleus pulposus get the same result as the non-degenerative NP MSCs **Figure 7** NP MSCs adipogenic differentiation after 28 days stained by Oil-Red-O stain(×100) **a** The second passage of non-degenerative NP MSCs are stained red by Oil-Red-O, indicated it have been induced into adipocyte-like cell **b** The second passage of degenerative NP-MSCs are also formatted many red stained lipid droplets

表 1 正常组与退变组髓核间充质干细胞(NPMSCs)不同培养时间的 OD 值 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 The OD value in different culture point of non-degenerative and degenerative group

培养时间 Culture point	正常组 Non-degenerative group	退变组 Degenerative group
4h	0.17±0.005	0.175±0.005
1d	0.217±0.012	0.206±0.006
3d	0.313±0.003	0.286±0.031
5d	0.463±0.028	0.374±0.014 ^①
7d	0.714±0.041	0.580±0.028 ^①
9d	0.927±0.070	0.695±0.062 ^①
11d	1.09±0.008	0.849±0.0127 ^①
13d	1.112±0.036	0.893±0.021 ^①

注:①与正常组比较 $P<0.05$
Note: ①compared with non-degenerative group, $P<0.05$

表 2 正常组与退变组 NPMSCs Oct4 及 Nanog 基因相对表达量 ($n=6, \bar{x}\pm s$)

Table 2 Relative gene expression of Oct4 and Nanog between non-degenerative group and degenerative group NPMSCs

	正常组 Non-degenerative group	退变组 degenerative group
Oct4	4.63±1.17 ^①	1.03±0.28
Nanog	7.36±1.19 ^①	1.08±0.12

注:①与退变组比较 $P<0.05$
Note: ①compared with degenerative group, $P<0.05$

法观察到人退变髓核组织内存在干细胞标记染色阳性细胞,首次应用组织学方法证明退变髓核组织内存在干细胞。Blanco 等^[9]进行了类似 Risbud 的研究,应用标准 MSCs 培养基培养法成功分离出髓核前体细胞,并对分离出的细胞进行了免疫学表型和多向分化能力鉴定,结果证实其分离培养得到的细胞符合 ISCT 制定^[6]的 MSCs 的评判标准。因此 Blanco 将分离得到的髓核内源性干细胞命名为 NPMSCs。我们采用 Blanco 同样的方法分别从 6 例正常椎间盘及 6 例退变椎间盘髓核组织中分离培养出具有同样特性的细胞;两组细胞均呈贴壁生长,细胞流式仪检测证明两组细胞表面分子 CD105、CD90 及 CD73 的阳性表达率均高于 95%;阴性表达 CD45、CD34 及 HLA-DR;并且两组细胞均能成脂、成骨及成软骨三系诱导分化,同样完全符合 ISCT 提出的 MSCs 的评定标准,再次证明此种分离培养 NPMSCs 方法的可行性。

随着年龄的增长及各种有害刺激的积累,椎

间盘退变发生的同时即伴随着椎间盘细胞活性的降低,细胞数目减少,基质的产生量下降,而最终导致椎间盘退变的发生^[12,13]。但正常髓核与退变髓核内干细胞的细胞活性及增殖能力是否存在差异,目前并无文献报道。我们应用 CCK-8 试剂^[13,14]对 NPMSCs 活性进行测定,并来源于正常髓核与退变髓核组织内的 MSCs 细胞活性进行比较,发现来源于正常髓核的 MSCs 与来源退变髓核的 MSCs 两者尽管在细胞形态学上无明显差异,但两组细胞在进入对数生长期后,在接种后 5、7、9、11、13d 的细胞 OD 值正常组明显高于退变组,间接反映出正常来源 NPMSCs 的细胞活性明显强于退变来源的 NPMSCs。我们推测出现两组细胞活性的差异可能与椎间盘在长期应力累积损害、炎性细胞因子的侵袭致使椎间盘营养通道随着退变的进展而受阻有关。

MSCs 是体内一类特殊的细胞群体,其具有自我更新及多向分化能力^[15]。近年来干细胞相关研究发现,成体干细胞可能随着年龄和退变而出现干细胞自身增殖及分化功能减退^[16,17],可能与干细胞的干性维持相关基因表达下降有关^[18,19]。多向分化潜能性基因或干性维持基因(如 Oct4、Nanog)特定表达于具有多向分化潜力的细胞,对于干细胞的多向分化的调节具有核心作用,并随着干细胞的分化其表达量逐渐下降^[20-22]。Tsai 等^[23]发现 Oct4 及 Nanog 基因在成体 MSCs 同样高表达,而敲除 Oct4 及 Nanog 基因后, MSCs 的增殖及分化均明显下降,而自发性分化现象明显增加。我们应用 PCR 技术评估了 NPMSCs 内 Oct4 及 Nanog 基因的表达情况,结果显示正常组 Oct4 及 Nanog 表达量分别为对照组的 4.63 倍和 7.36 倍,正常组 NPMSCs“干性维持”基因表达明显高于退变组。说明正常组 NPMSCs 具有更好的自我更新及多项分化潜能。出现这种差异,我们同样考虑与退变椎间盘内细胞受长期应力累积损害、炎性细胞因子的侵袭及椎间盘营养通道随着退变的进展而受阻有关。

由上可见,正常与退变的髓核组织中均存在 NPMSCs,并且正常来源的 NPMSCs 具有较强的增殖活性及自我更新、多项分化潜能。我们推测,尽管在正常与退变椎间盘内均存在 NPMSCs,但由于有害因子刺激及长期积累性应力的作用,退变髓核内 MSCs 功能受损,细胞自身“干性基因”表

达量下降,自身的多向分化潜能及细胞增殖活性降低,出现“衰老”现象,从而无法分化出足够的椎间盘细胞群,因此导致不能逆转椎间盘退变,可能为椎间盘退变病因学之一。

4 参考文献

- Adams MA, Roughley PJ. What is intervertebral disc degeneration, and what causes it[J]. Spine, 2006, 31(18): 2151-2161.
- Melrose J, Smith SM, Fuller ES, et al. Biglycan and fibromodulin fragmentation correlates with temporal and spatial annular remodelling in experimentally injured ovine intervertebral discs[J]. Eur Spine J, 2007, 16(12): 2193-2205.
- Smith JW, Walmsley R. Experimental incision of the intervertebral disc[J]. J Bone Joint Surg Br, 1951, 33(4): 612-625.
- 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.
- Blanco JF, Graciani IF, Sanchez-Guijo FM, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from human degenerated nucleus pulposus: comparison with bone marrow mesenchymal stromal cells from the same subjects [J]. Spine, 2010, 35(26): 2259-2265.
- 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.
- 张凯, 王毅, 邢国胜. 间充质干细胞的生物学特性及多向分化潜能[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, (3): 539-542.
- Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, et al. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source [J]. Arthritis Rheum, 2005, 52(8): 2521-2529.
- English D, Sharma NK, Sharma K, et al. Neural stem cells—trends and advances[J]. J Cell Biochem, 2013, 114(4): 764-772.
- Wang WE, Chen X, Houser SR, et al. Potential of cardiac stem/progenitor cells and induced pluripotent stem cells for cardiac repair in ischaemic heart disease[J]. Clin Sci(Lond), 2013, 125(7): 319-327.
- Brisby H, Papadimitriou N, Brantsing C, et al. The presence of local mesenchymal progenitor cells in human degenerated intervertebral discs and possibilities to influence these in vitro: a descriptive study in humans [J]. Stem Cells Dev, 2013, 22(5): 804-814.
- Ariga K, Miyamoto S, Nakase T, et al. The relationship between apoptosis of endplate chondrocytes and aging and degeneration of the intervertebral disc[J]. Spine, 2001, 26(22): 2414-2420.
- Liebscher T, Haefeli M, Wuertz K, et al. Age-related variation in cell density of human lumbar intervertebral disc [J]. Spine, 2011, 36(2): 153-159.
- 熊建文, 肖化, 张镇西. MTT法和CCK-8法检测细胞活性之测试条件比较[J]. 激光生物学报, 2007, 16(5): 559-562.
- Sensebe L, Fleury-Cappellesso S. Biodistribution of mesenchymal stem/stromal cells in a preclinical setting[J]. Stem Cells Int, 2013, 2013: 678063.
- Sharpless NE, Depinho RA. How stem cells age and why this makes us grow old[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8(9): 703-713.
- Chang HX, Yang L, Li Z, et al. Age-related biological characterization of mesenchymal progenitor cells in human articular cartilage[J]. Orthopedics, 2011, 34(8): e382-e388.
- Alt EU, Senst C, Murthy SN, et al. Aging alters tissue resident mesenchymal stem cell properties [J]. Stem Cell Res, 2012, 8(2): 215-225.
- Collins-Hooper H, Woolley TE, Dyson L, et al. Age-related changes in speed and mechanism of adult skeletal muscle stem cell migration[J]. Stem Cells, 2012, 30(6): 1182-1195.
- Boyer LA, Lee TI, Cole MF, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells [J]. Cell, 2005, 122(6): 947-956.
- Darr H, Mayshar Y, Benvenisty N. Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features[J]. Development, 2006, 133(6): 1193-1201.
- Barrand S, Collas P. Chromatin states of core pluripotency-associated genes in pluripotent, multipotent and differentiated cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 391(1): 762-767.
- Tsai CC, Su PF, Huang YF, et al. Oct4 and Nanog directly regulate Dnmt1 to maintain self-renewal and undifferentiated state in mesenchymal stem cells[J]. Mol Cell, 2012, 47(2): 169-182.

(收稿日期:2013-12-30 末次修回日期:2014-03-22)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 李伟霞)