

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.49.018 [http://www.crter.org]

芮云峰, 王善正, 谢鑫荟, 孙明辉, 林禹丞, 李刚, 王宸. 大鼠椎间盘髓核来源间充质干细胞的体外分离及培养鉴定[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(49):8576-8582.

大鼠椎间盘髓核来源间充质干细胞的体外分离及培养鉴定***☆△

芮云峰¹, 王善正¹, 谢鑫荟¹, 孙明辉², 林禹丞¹, 李刚³△, 王宸¹ (¹东南大学附属中大医院骨科, 江苏省南京市 210009; ²南京大学附属鼓楼医院骨科, 江苏省南京市 210008; ³香港中文大学干细胞与再生医学实验室, 香港特别行政区)

文章亮点:

1 文章的创新之处在于首次报道了从 8 周龄 SD 大鼠椎间盘髓核内可以分离出成体干细胞, 将该类细胞称之为髓核来源间充质干细胞, 并通过体外诱导分化证实髓核来源间充质干细胞在一定的诱导条件下可以成骨、成脂、成软骨分化, 证实其实多向分化潜能。

2 作者认为, 髓核来源间充质干细胞的发现对于椎间盘生物学修复研究有着重大的影响, 对研究椎间盘退变修复机制有着重要的意义。

关键词:

干细胞; 干细胞培养与分化; 椎间盘; 髓核; 间充质干细胞; 成骨细胞; 脂肪细胞; 软骨细胞; II 型胶原; 国家自然科学基金; 干细胞图片文章

主题词:

间充质干细胞; 椎间盘; 成骨细胞; 脂细胞; 软骨细胞

基金资助:

国家自然科学基金青年基金(81201422)*; 江苏省自然科学基金青年基金项目(BK2012334)*; 东南大学“创新基金”项目(3290002401)*

摘要

背景: 目前椎间盘髓核组织的细胞组成和特性仍未阐明。

目的: 旨在建立大鼠椎间盘髓核来源间充质干细胞的体外培养体系, 并对其体外多项分化潜能进行鉴定。

方法: 体外培养 SD 大鼠椎间盘髓核来源间充质干细胞, 取第 3 代细胞进行三系诱导分化, 将成骨、成脂和成软骨分化作为实验组, 基础细胞培养作为对照组。

结果与结论: 低密度培养获得的髓核来源细胞早期可形成葵花样细胞集落, 克隆样生长。第 3 代后, 细胞形态趋向均一, 呈成纤维细胞样生长。成骨诱导 28 d, 实验组茜素红染色阳性, 且 RunX2、osteopontin 及 osteocalcin 表达较对照组显著增高($P < 0.05$); 成脂诱导 21 d, 实验组油红 O 染色阳性, C/EBP α 及 PPAR γ 2 表达较对照组显著增高($P < 0.05$); 成软骨分化诱导 21 d, 实验组番红 O 快绿染色和 II 型胶原免疫组织化学染色阳性, aggrecan 和 Col2a1 表达较对照组显著增高($P < 0.05$)。可见成年 SD 大鼠椎间盘髓核组织中可分离培养出体外呈克隆样生长的细胞群, 且有向脂肪细胞、成骨细胞和软骨细胞发生定向分化的潜能。

Isolation, culture and identification of nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cells from adult rats *in vitro*

Rui Yun-feng¹, Wang Shan-zheng¹, Xie Xin-hui¹, Sun Ming-hui², Lin Yu-cheng¹, Li Gang³, Wang Chen¹ (¹Department of Orthopaedics, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China; ²Department of Orthopedics, Nanjing Drum Tower Hospital of Nanjing University, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China; ³Laboratory of Stem Cells and Regeneration, the Chinese University of Hong Kong, Hong Kong Special Administrative Region, China)

Abstract

BACKGROUND: Currently, cellular composition and the features of the nucleus pulposus are still not to be clarified.

OBJECTIVE: To establish the *in vitro* culture system of rat nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cells and to identify their multi-lineage differentiation potential.

METHODS: Mesenchymal stem cells from the nucleus pulposus tissues of Sprague-Dawley rats were cultured *in vitro*. Then, cells at passage 3 were induced to differentiate into osteoblasts, adipocytes and chondrocytes as experimental group. Cells cultured with basic culture medium served as controls.

RESULTS AND CONCLUSION: Cells isolated from rat nucleus pulposus could form the sunflower-like colonies and exhibit clone-like growth when they cultured at a low density. Cells at passage 3 became homogeneous and exhibited fibroblast-like morphology. After 28 days of osteogenic induction, arizarin red positive signals were detected in the experimental group. The mRNA expressions of RunX2, osteopontin and osteocalcin were

芮云峰☆, 男, 1977 年生, 江苏省宜兴市人, 汉族, 2011 年香港中文大学毕业, 博士, 主治医师, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事肌腱、韧带和椎间盘的组织工程及再生医学修复研究。
ruiyunfeng@126.com

中图分类号:R394.2
文献标识码:B
文章编号:2095-4344
(2013)49-08576-07

收稿日期: 2013-09-28
(201308135/W · W)

Rui Yun-feng☆, M.D.,
Attending physician, Associate
researcher, Master's
supervisor, Department of
Orthopaedics, Zhongda
Hospital, Southeast University,
Nanjing 210009, Jiangsu
Province, China
ruiyunfeng@126.com

Accepted: 2013-09-28

significantly increased in the experimental group, compared to the control group ($P < 0.05$). After 21 days of adipogenic induction, oil red-O positive cells were detected in the experimental group. The mRNA expressions of C/EBP α and PPAR γ 2 were significantly increased in the experimental group, compared to the control group ($P < 0.05$). After 21 days of chondrogenic induction, safranin O/fast green staining was positive in the experimental group. The mRNA expressions of aggrecan and Col2a1 were significantly increased in the experimental group, compared to the control group ($P < 0.05$). Our findings in this study suggested that nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cells could be isolated from the Sprague-Dawley rat nucleus pulposus and exhibited clonal-like growth when they were cultured *in vitro*. These cells were confirmed to have the potential to differentiate into adipocytes, osteoblasts and chondrocytes *in vitro*.

Subject headings: mesenchymal stem cells; intervertebral disk; osteoblasts; adipocytes; chondrocytes

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81201422*; the Natural Science Foundation of Jiangsu Province for the Youth, No. BK2012334*; the Innovative Foundation of Southeast University, No. 3290002401*

Rui YF, Wang SZ, Xie XH, Sun MH, Lin YC, Li G, Wang C. Isolation, culture and identification of nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cells from adult rats *in vitro*. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013; 17(49): 8576-8582.

0 引言 Introduction

下腰痛对社会造成了巨大的负担, 无论从生理还是心理上对患者产生了消极的影响, 最终使得患者丧失劳动力, 造成了医疗的巨大开支^[1-2]。椎间盘退变是下腰痛产生的主要原因之一, 其主要病理特征为椎间盘内细胞丧失活力, 伴随着细胞外基质合成能力的丢失^[3-4]。

椎间盘受到年龄、生活习惯、工作等因素的影响, 椎间盘退变的病因尚未阐明^[1]。目前针对椎间盘退变的治疗方案主要包括椎间盘切除、椎间融合或椎间盘置换等, 但是这些治疗并非针对退变病因本身, 虽可缓解症状却难以扭转其退变^[5]。近年来, 生物学治疗, 特别是基于细胞学治疗的生物学疗法被认为是一个极具前景的替代方案^[6]。

然而, 椎间盘组织内正常的细胞增殖和再生过程目前尚未阐明, 其细胞生物学环境仍有待进一步探究^[7]。阐明椎间盘内细胞类型和功能对于未来椎间盘退变的生物学治疗具有重要意义。实验旨在建立大鼠椎间盘髓核来源干细胞的体外培养体系, 并对其体外多项分化潜能进行鉴定, 从而为下一步从细胞学水平研究椎间盘髓核退变的病理机制及其治疗提供新的实验依据。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 细胞学体外观察实验。

时间及地点: 于2013年1至5月在东南大学医学院外科学实验中心完成。

材料:

实验动物: 10只8周龄SD大鼠用于分离培养髓核来源间充质干细胞, 雌雄不限, 体质量为250-300 g。由江苏省农科院提供, 许可证号: SCXK(苏)2007-0004。实验中对动物的处理方法符合中华人民共和国科技

术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》的相关要求^[8]。

大鼠椎间盘髓核来源间充质干细胞的体外分离、培养及鉴定实验所用的试剂和仪器:

试剂及仪器	来源
LG-DMEM 培养基、胎牛血清、庆大霉素、链霉素、谷氨酰胺、II型胶原、胰酶	Gibco 公司
地塞米松、抗坏血酸、 β -甘油、胰岛素、吲哚美辛、异丁基甲基黄嘌呤、转化生长因子 β 、骨形态发生蛋白7、油红O染液、茜素红染液	Sigma 公司
II型胶原酶	Sigma-Aldrich 公司
光学显微镜(Q500MC)、倒置相差显微镜(DMI4000B)	Leica 公司
胎牛血清、细胞过滤器、亚油酸	Becton 公司
羊抗大鼠II型胶原一抗	Santa Cruz 公司
生物素标记的抗羊IgG抗体	Chemicon 公司
PCR仪、反应试剂盒	Applied Biosystem, 美国
RNA提取试剂盒	Qiagen 公司

实验方法:

髓核来源间充质干细胞体外培养: 无菌条件下取SD大鼠正常髓核组织, 用II型胶原酶(3 g/L)消化2 h。期间每隔20 min摇晃, 用吸管轻轻吹打, 将消化后的细胞及组织悬液用70 μ m的滤器(Becton Dickinson)过滤形成并收集单细胞悬液。细胞以50/cm²培养接种到标准培养基中(LG-DMEM、体积分数10%胎牛血清、1%双抗)培养7-10 d, 镜下观察克隆形成。

髓核来源间充质干细胞传代培养: 分离培养的SD大鼠髓核来源间充质干细胞每隔3 d换液1次, 第7-10天原代培养镜下观察细胞克隆形成。细胞克隆用PBS清洗2次, 0.25%胰蛋白酶消化, 细胞计数后以4 $\times$ 10³/cm²接种传代培养。倒置显微镜观察细胞生长情况。

髓核来源间充质干细胞多向分化实验:

成骨分化: 取第3代髓核来源间充质干细胞消化后, 以4 $\times$ 10³/cm²接种到六孔板, 常规培养基培养直至细胞融合。随后分两组, 一组继续以常规培养基培养,

另外一组以成骨诱导培养基培养(LG-DMEM、体积分数10%胎牛血清、1 nmol/L地塞米松、20 mmol/L beta-甘油磷酸钠、50 μmol/L维生素C), 28 d后, 应用茜素红染色检测钙小梁形成(细胞先用体积分数70%乙醇固定10 min, 随后用0.5%茜素红染色30 min); 行RT-PCR检测Runx2、osteopontin及osteocalcin的mRNA表达。

成脂分化: 取第3代髓核来源间充质干细胞消化后, 以 $4 \times 10^3/\text{cm}^2$ 接种到六孔板, 常规培养基培养直至细胞融合。随后分两组, 一组继续以常规培养基培养, 另外一组以成脂诱导培养基(LG-DMEM、体积分数10%胎牛血清、500 nmol/L地塞米松、0.5 mmol/L异丁基甲基黄嘌呤、50 μmol/L吡啶美辛、10 mg/L胰岛素)培养, 21 d后, 油红O染色检查脂滴形成(细胞先用体积分数70%乙醇固定10 min, 随后用0.3%油红O溶液染色2 h); 行RT-PCR检测C/EBPα和PPARγ的mRNA表达。

成软骨分化: 实验采用细胞三维微球培养检测髓核来源间充质干细胞成软骨分化。 8×10^5 个细胞于15 mL离心管离心(450×g, 10 min)后形成微团, 分别予以基础培养基和成软骨培养基(LG-DMEM、10 μg/L转化生长因子β3、500 μg/L骨形态发生蛋白2、 10^{-7} mol/L地塞米松、50 mg/L抗坏血酸-2-磷酸酯、40 mg/L脯氨酸、100 mg/L丙酮酸)培养。21 d后, 细胞微球分别行病理学固定, II型胶原免疫组织化学染色, RT-PCR检测COL2a1和aggrecan的mRNA表达。

II型胶原免疫组织化学染色: 细胞微球予以40 g/L多聚甲醛中固定, 脱水, 石蜡包埋切片脱蜡后, 予以梯度乙醇脱水, 予以体积分数3%过氧化氢室温下浸泡20 min灭活内源性过氧化酶。然后, 用2 g/L蛋白酶进行抗原修复以探测II型胶原, 30 min后, 予以PBS冲洗剩余活性酶。室温用山羊血清封闭20 min后, 切片予以小鼠抗大鼠II型胶原抗体4℃孵育过夜。切片孵育过夜后用山羊抗小鼠IgG二抗室温孵育1 h, 随后切片PBS冲洗, 苏木精复染, 梯度乙醇和二甲苯脱水, 镜下观察。阴性组抗体用阻断剂替代, 阳性组用来源于股骨髁的关节软骨作为对照。

实时荧光定量PCR分析: 细胞消化后进行均一化处理, RNeasy mini试剂盒提取RNA。根据First Strand cDNA试剂盒说明将RNA转录为cDNA, 通过测量260 nm/280 nm吸光度值得到cDNA浓度。特异性引物PCR反应条件在不同的退火条件, 通过PCR仪进行优化。循环条件如下: 在95℃下变性10 min, 在95℃10 s, 45个循环, 最佳退火温度(见表1)15 s, 72℃20 s, 最后在60-95℃(加热速率0.18℃/s)。实验结果通过Relative Quantification Software进行分析, 靶基因以β-actin作为内参, 相关基因表达通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 公式计算。实验通过来自3只大鼠的细胞进行重复以验证结果。

表 1 用于实时荧光定量分析的引物序列

Table 1 Primer sequences in the quantitative real-time PCR analysis

基因	引物序列	产物大小 (bp)	退火温度 (℃)
Runx2	5'-CCG ATG GGA CCG TGG TT-3'(forward)	74	60
	5'-CAG CAG AGG CAT TTC GTA GCT-3'(reverse)		
osteopontin	5'-TCC AAG GAG TAT AAG CAG CGG GCC A-3'(forward)	200	55
	5'-CTC TTA GGG TCT AGG ACT AGC TTC T-3'(reverse)		
osteocalcin	5'-GGT GCA AAG CCC AGC GAC TCT-3'(forward)	199	60
	5'-GGA AGC CAA TGT GGT CCG CTA-3'(reverse)		
C/EBPα	5'-AAG GCC AAG AAG TCG GTG GA-3'(forward)	189	55
	5'-CAG TTC GCG GCT CAG CTG TT-3'(reverse)		
PPARγ	5'-CGG CGA TCT TGA CAG GAA AG-3'(forward)	174	59
	5'-GCT TCC ACG GAT CGA AAC TG-3'(reverse)		
COL2a1	5'-ATGACAATCTGGCTCCCAA CACTGC-3'(forward)	364	55
	5'-GACCGGCCCTATGTCCACA CCGAAT-3'(reverse)		
aggrecan	5'-CTT GGG CAG AAG AAA GAT CG-3'(forward)	158	58
	5'-GTG CTT GTA GGT GTT GGG GT-3'(reverse)		
β-Actin	5'-ATC GTG GGC CGC CCT AGG CA-3'(forward)	243	52
	5'-TGG CCT TAG GGT TCA GAG GGG-3'(reverse)		

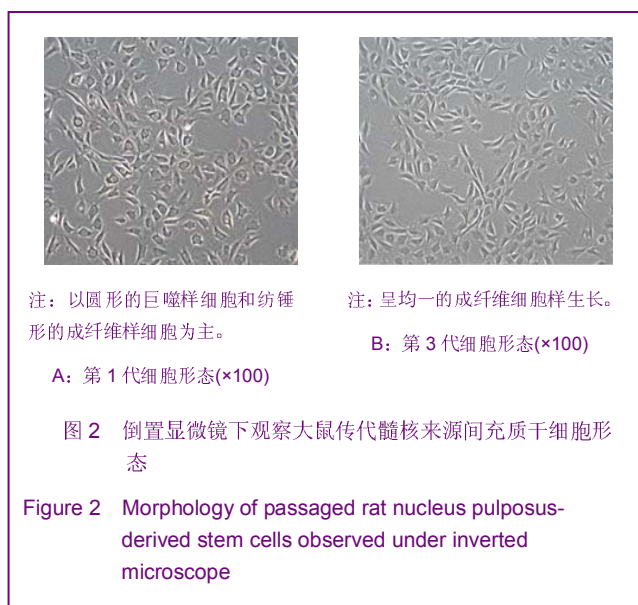
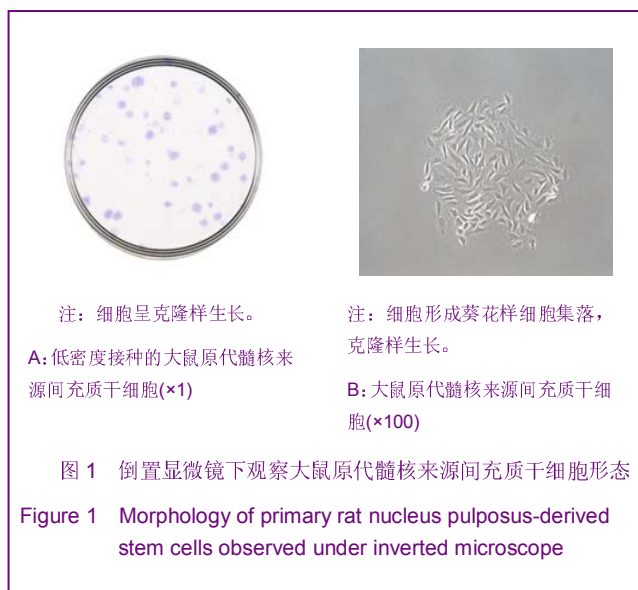
主要观察指标: ①原代及传代细胞形态学观察。②对髓核来源间充质干细胞体外成骨、成脂、成软骨分化潜能进行鉴定。

统计学分析: 通过计算靶基因在诱导组和实验组的比值对比两组之间 mRNA 表达水平。比值为 1 表明两组间差异无显著性意义, 数据采用 Mann-Whitney U 检验分析。所有数据分析均采用 SPSS 17.0 统计软件。

2 结果 Results

2.1 髓核来源间充质干细胞形态学观察 体外酶消化分离, 低密度接种的髓核来源间充质干细胞呈克隆样生长, 见图1A; 低密度培养7-10 d, 贴壁的髓核来源间充质干细胞早期可形成葵花样细胞集落, 克隆样生长, 见图1B。克隆生长呈异质性, 原代细胞传代后(第1代)可见多种细胞形态, 以圆形的巨噬样细胞和纺锤形的成纤

纤维细胞为主, 见图2A。第3代后, 细胞形态趋向均一, 呈成纤维细胞样生长, 见图2B。

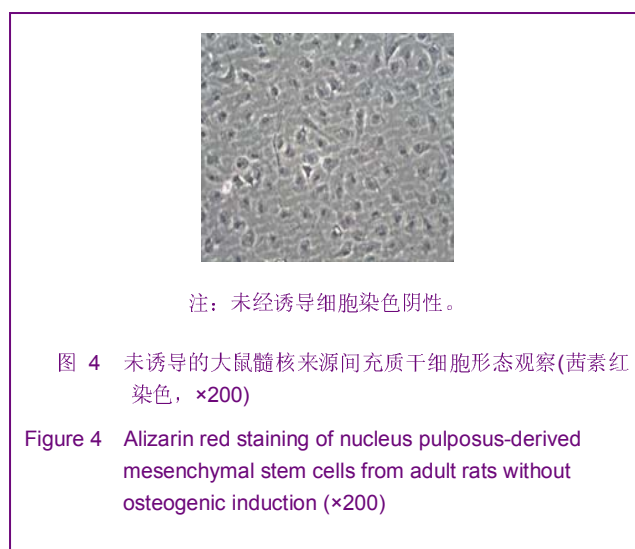
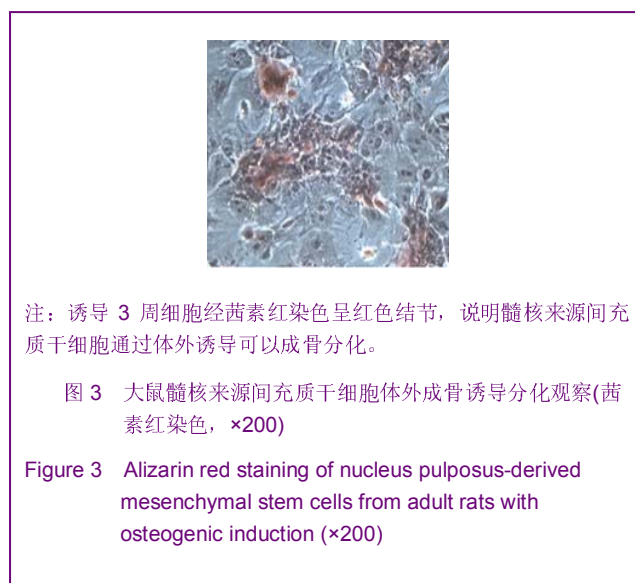


2.2 髓核来源间充质干细胞体外成骨诱导分化结果
髓核来源间充质干细胞更换成骨诱导培养液后细胞增殖稍慢, 诱导后5 d后, 可见细胞形态逐渐改变, 由长梭形变为类圆形、多边形或不规则形; 1周后细胞开始呈簇状生长, 2周时细胞团逐渐增大, 诱导3周经茜素红染色呈红色结节, 见图3; 平行培养未经诱导细胞染色阴性, 见图4。

髓核来源间充质干细胞成骨诱导28 d, 成骨诱导组中Runx2、osteopontin及osteocalcin表达较对照组均显著增高($P < 0.05$), 差异有显著性意义, 见图5, 说明髓核来源间充质干细胞通过体外诱导可以成骨分化。

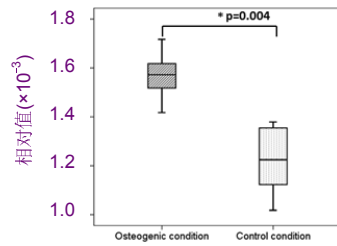
2.3 髓核来源间充质干细胞体外成脂诱导分化结果
髓核来源间充质干细胞更换成脂诱导培养液后细胞增

殖缓慢, 诱导后5 d胞浆内出现少量脂滴并逐渐聚集, 细胞形态亦逐渐由长梭形变为多边形、椭圆形。3周时油红O染色阳性, 细胞内出现大量红染颗粒, 见图6; 平行培养未经诱导细胞染色阴性, 见图7; 髓核来源间充质干细胞成脂诱导21 d, 成脂诱导组中C/EBP α 和PPAR γ 表达较对照组显著增高($P < 0.05$), 差异有显著性意义, 见图8, 说明髓核来源间充质干细胞通过体外诱导可以成脂分化。

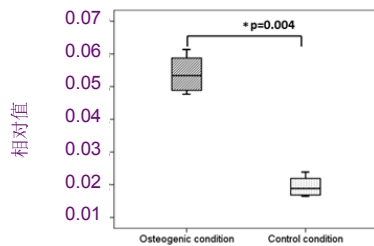


2.4 髓核来源间充质干细胞体外成软骨诱导分化结果
髓核来源间充质干细胞成软骨诱导分化21 d后, II型胶原免疫组织化学染色和番红O快绿染色均为阳性, 见图9。

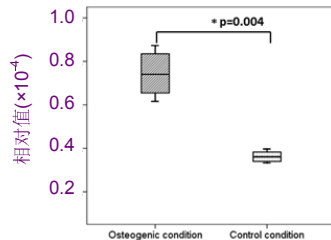
成软骨分化诱导21 d, 成软骨诱导组中Col2a1和aggrecan的表达较对照组显著增高($P < 0.05$), 差异有显著性意义, 说明髓核来源间充质干细胞通过体外诱导可以成软骨分化。见图10。



A: 成骨诱导组和对照组(未诱导)Runx2 基因表达的比较



B: 成骨诱导组和对照组(未诱导)osteopontin 基因表达的比较

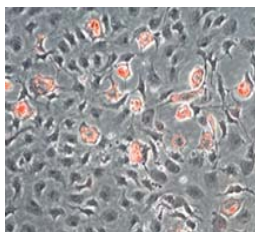


C: 成骨诱导组和对照组(未诱导)osteocalcin 基因表达的比较

注: 成骨诱导组中 Runx2、osteopontin 及 osteocalcin 表达较对照组均显著增高($P < 0.05$), 说明髓核来源间充质干细胞通过体外诱导可以成骨分化。

图 5 成骨诱导及未诱导大鼠髓核来源间充质干细胞 Runx2、osteopontin 及 osteocalcin 基因表达

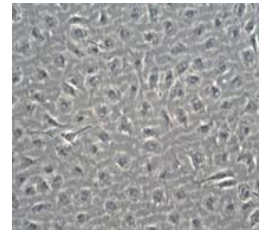
Figure 5 Comparison of Runx2, osteopontin and osteocalcin mRNA expression between the osteogenic group and the control group



注: 成脂诱导 3 周时油红 O 染色阳性, 说明髓核来源间充质干细胞通过体外诱导可以成脂分化。

图 6 大鼠髓核来源间充质干细胞体外成脂诱导分化观察(油红 O 染色, ×200)

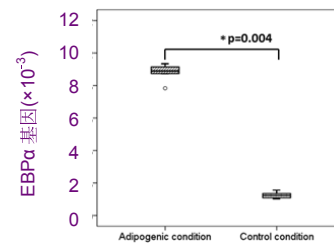
Figure 6 Oil red O staining of nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cells from adult rats with adipogenic induction (×200)



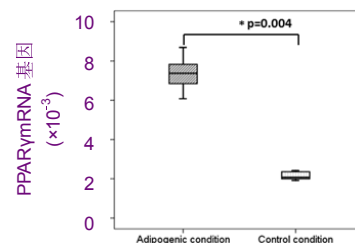
注: 未经诱导细胞染色阴性。

图 7 未诱导的大鼠髓核来源间充质干细胞形态观察(油红 O 染色, ×200)

Figure 7 Oil red-O staining of nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cells from adult rats without adipogenic induction (×200)



A: 成脂诱导组和对照组(未诱导)C/EBPα 基因表达的比较



B: 成脂诱导组和对照组(未诱导)PPARγ 基因表达的比较

注: 成脂诱导 21 d 成脂诱导组中 C/EBPα 和 PPARγ 表达较对照组显著增高($P < 0.05$), 说明髓核来源间充质干细胞通过体外诱导可以成脂分化。

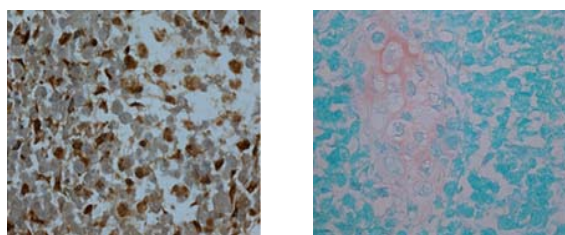
图 8 成脂诱导及未诱导大鼠髓核来源间充质干细胞 C/EBPα 和 PPARγ 基因表达结果

Figure 8 Comparison of C/EBPα and PPARγ mRNA expression between the osteogenic group and the control group

3 讨论 Discussion

椎间盘退变的病理机制目前仍未阐明。椎间盘退变的组织学研究发现, 髓核组织中可见细胞增殖, 细胞成群分布, 同时可见细胞死亡(包括坏死和凋亡)增加。一

般认为,椎间盘细胞的合成和分解代谢失衡导致椎间盘退变的发生;反之,椎间盘退变加重也影响椎间盘细胞维持的合成分解代谢的自然平衡。



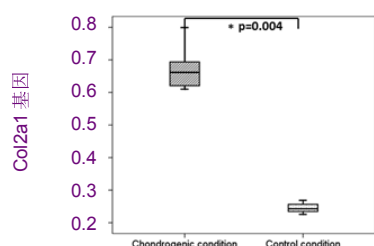
A: II型胶原免疫组化染色

B: 番红 O 快绿染色

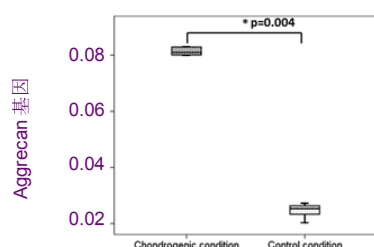
注:成软骨诱导分化 21 d 后 II 型胶原免疫组化化学染色和番红 O 快绿染色均为阳性,说明髓核来源间充质干细胞通过体外诱导可以成软骨分化。

图 9 大鼠髓核来源间充质干细胞 Pellet 成软骨诱导培养后 II 型胶原免疫组化化学染色、番红 O 快绿染色 ($\times 400$)

Figure 9 Type II collagen immunohistochemical staining and safranin O fast green staining after chondrogenic induction of at bone marrow mesenchymal stem cells ($\times 400$)



A: 成软骨诱导组和对照组(未诱导) Col2a1 基因表达的比较



B: 成软骨诱导组和对照组(未诱导)aggrecan 基因表达的比较

注:成软骨诱导分化 21 d 成软骨诱导组中 Col2a1 和 aggrecan 的表达较对照组显著增高($P < 0.05$),说明髓核来源间充质干细胞通过体外诱导可以成软骨分化。

图 10 成软骨诱导及未诱导大鼠髓核来源间充质干细胞 Col2a1 和 aggrecan 基因表达结果比较

Figure 10 Comparison of Col2a1 and aggrecan mRNA expression between the chondrogenic group and the control group

椎间盘内的细胞种类仍存在一定争议。椎间盘内细胞在维持椎间盘基质合成中起到重要作用,在成人髓核中发现了一种体积较小的细胞,形态类似于软骨细胞。然而,髓核组织中也存在一类空泡样细胞,这类细胞体积较大,来源于脊索^[9]。髓核中这类脊索细胞大量丢失同时会伴随着椎间盘退变,提示这类细胞在椎间盘的稳态及自我更新中起到重要作用^[10-11]。人类的脊索细胞随着年龄和椎间盘退变而逐渐减少^[12]。基于以上的认识,推测椎间盘中应存在一类具备增殖分化潜能的祖细胞。

实验成功从SD大鼠椎间盘髓核组织中分离出一类祖细胞,这类细胞在传代后形态呈成纤维细胞样,类似于骨髓间充质干细胞,具备较强的增殖活性和分化潜能。因此,推测髓核中的软骨样细胞和脊索细胞均源于这些祖细胞,而这些祖细胞最终会分化成这两种细胞从而修复退变椎间盘。

成体干细胞在组织内以沉默态和激活态两种方式存在,且两种方式同时并存,在生理状态细胞发生更替或者组织遭受创伤时,对自身特异性组织中的已经分化的终末细胞具有维持,再生和替代的能力^[13-14]。因此,对正常组织的生理性稳态的维持和损伤组织的再生修复都具有重要作用。目前人们已成功从肌腱^[15-17]、骨髓^[18-19]、脂肪等组织中成功分离出成体干细胞^[20-21]。

实验从8周龄SD大鼠椎间盘髓核组织中,成功的分离出了一群独特的成体干细胞,进一步丰富了成体干细胞家族,为成体干细胞未来的研究提供了进一步的线索。实验获取的这些髓核来源细胞具备一般间充质干细胞的特性,包括克隆形成、低密度接种时高增殖活力、成骨、成脂和成软骨等多向分化潜能,将这些髓核组织来源细胞称之为髓核来源间充质干细胞。

实验结果表明,从8周龄SD大鼠中分离的髓核来源间充质干细胞在低密度接种时,表现出较高的增殖活性,这些克隆集落在大小和密度上具有高度的一致性。这点同作者此前低密度接种肌腱干细胞结论相同,较低的接种密度即可促进细胞的增殖和富集^[22]。在髓核来源间充质干细胞处于P0和P1阶段,作者观察到不同的细胞形态,而细胞传代到P3时,观察到细胞形态逐渐统一,呈成纤维细胞样的细胞样形态。结果表明,髓核来源间充质干细胞于P3时可以用于干细胞分化和组织工程学研究。

在成体干细胞研究中,有报道称富血小板血浆可以激活肌腱干细胞向肌腱细胞分化^[23]。作者前期一项研究中,通过向兔退变椎间盘内注射PRP可以缓解甚至逆转椎间盘退变^[24],前期推测其原因为PRP中的多种生长因子促进了椎间盘退变组织的修复,而根据此实验结论,其原因很可能为PRP激活了髓核来源间充质干细胞向髓核终末细胞分化,进而修复退变椎间盘。下一步研究

当前,椎间盘退变的细胞生物学机制仍不明确,而

将通过实验验证作者的假设。

髓核来源间充质干细胞的发现对于未来研究椎间盘退变的生物学修复具有着重大的意义。作为组织工程学种子细胞的选择,髓核来源间充质干细胞对于其他组织来源成体干细胞具有较大的优势。而利用激活剂,激活退变椎间盘中的髓核来源间充质干细胞,促进其增殖分化,产生细胞外基质填充组织缺损也无疑是一种理想的椎间盘退变早期干预方案。

综上所述,实验成功的从8周龄SD大鼠髓核组织中分离出髓核来源间充质干细胞,它表现出一类干细胞具有的特性,包括克隆形成,增殖潜能,多系分化潜能。而此类成体干细胞是否能够在老龄化SD大鼠中继续维持一定数量,促进椎间盘组织修复仍有待进一步研究。

作者贡献: 文章全部作者均参与了实验的设计,实施和评估,均受过正规培训。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验对动物的处理方法符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

学术术语: 髓核来源间充质干细胞-从SD大鼠椎间盘髓核内分离出成的体干细胞。

作者声明: 文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Manek NJ, MacGregor AJ. Epidemiology of back disorders: prevalence, risk factors, and prognosis. *Curr Opin Rheumatol*. 2005;17:134-140.
- [2] Juniper M, Le TK, Mladi D. The epidemiology, economic burden, and pharmacological treatment of chronic low back pain in France, Germany, Italy, Spain and the UK: a literature-based review. *Expert Opin Pharmacother*. 2009;10:2581-92.
- [3] Adams MA, Roughley PJ. What is intervertebral disc degeneration, and what causes it? *Spine*. 2006;31:2151-2161.
- [4] Singh K, Masuda K, An HS. Animal models for human disc degeneration. *Spine J*. 2005;15:267S-279S.
- [5] Hadjipavlou AG, Tzermiadianos MN, Bogduk N, et al. The pathophysiology of disc degeneration: a critical review. 2008; 90(10):1261-1270.
- [6] 王善正,王宸,芮云峰.椎间盘退变的生物学治疗:从基础研究到临床应用[J].中华临床医师杂志:电子版,2012,6(17):58-61.
- [7] Freemont AJ. The cellular pathobiology of the degenerate intervertebral disc and discogenic back pain. *Rheumatology (Oxford)*. 2009;48(1):5-10.
- [8] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.
- [9] Choi KS, Cohn MJ, Harfe BD. Identification of Nucleus Pulposus Precursor Cells and Notochordal Remnants in the Mouse: Implications for Disk Degeneration and Chordoma Formation. *Dev Dyn*. 2008;237(12):3953-3958.
- [10] Hunter CJ, Matyas JR, Duncan NA. The notochordal cell in the nucleus pulposus: a review in the context of tissue engineering. *Tissue Eng*. 2003;9(4):667-677.
- [11] Maldonado BA, Oegema TR Jr. Initial characterization of the metabolism of intervertebral disc cells encapsulated in microspheres. *J Orthop Res*. 1992;10(5):677-690.
- [12] Weiler C, Nerlich AG, Schaaf R, et al. Immunohistochemical identification of notochordal markers in cells in the aging human lumbar intervertebral disc. *Eur Spine J*. 2010;19(10):1761-1770.
- [13] Li L, Clevers H. Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science*. 2010;327(5965):542-545.
- [14] Lim JY, Loisel AE, Lee JS, et al. Optimizing the osteogenic potential of adult stem cells for skeletal regeneration. *J Orthop Res*. 2011;29(11):1627-1633.
- [15] Ni M, Rui YF, Tan Q, et al. Engineered scaffold-free tendon tissue produced by tendon-derived stem cells. *Biomaterials*. 2013;34(8):2024-2037.
- [16] Lee WY, Lui PP, Rui YF. Hypoxia-mediated efficient expansion of human tendon-derived stem cells in vitro. *Tissue Eng Part A*. 2012;18(5-6):484-498.
- [17] Rui YF, Lui PP, Wong YM, et al. Altered fate of tendon-derived stem cells isolated from a failed tendon-healing animal model of tendinopathy. *Stem Cells Dev*. 2013;22(7):1076-1085.
- [18] 王善正,王宸,芮云峰.自体激活富血小板血浆干预兔髓核间充质干细胞体外成软骨分化的研究[J].中国组织工程研究,2013, 17(1):1-8.
- [19] Yang D, Sun S, Wang Z, et al. Stromal cell-derived factor-1 receptor CXCR4-overexpressing bone marrow mesenchymal stem cells accelerate wound healing by migrating into skin injury areas. *Cell Reprogram*. 2013; 15(3):206-215.
- [20] Song K, Wang Z, Li W, et al. In Vitro Culture, Determination, and Directed Differentiation of Adult Adipose-Derived Stem Cells Towards Cardiomyocyte-Like Cells Induced by Angiotensin II. *Appl Biochem Biotechnol*. 2013;170(2):459-470.
- [21] Pazdro R, Harrison DE. Murine adipose tissue-derived stromal cell apoptosis and susceptibility to oxidative stress in vitro are regulated by genetic background. *PLoS One*. 2013;8(4):e61235.
- [22] Rui YF, Lui PP, Li G, et al. Isolation and characterization of multipotent rat tendon-derived stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(5):1549-1558.
- [23] Zhang J, Wang JH. Platelet-rich plasma releasate promotes differentiation of tendon stem cells into active tenocytes. *Am J Sports Med*. 2010;38(12):2477-2486.
- [24] 胡新锋,王宸,芮云峰.自体富血小板血浆干预兔早期椎间盘退变的初步研究[J].中国修复重建外科杂志,2012,26(8):977-983.