

差速贴壁法原代培养椎间盘髓核细胞中的应用优势

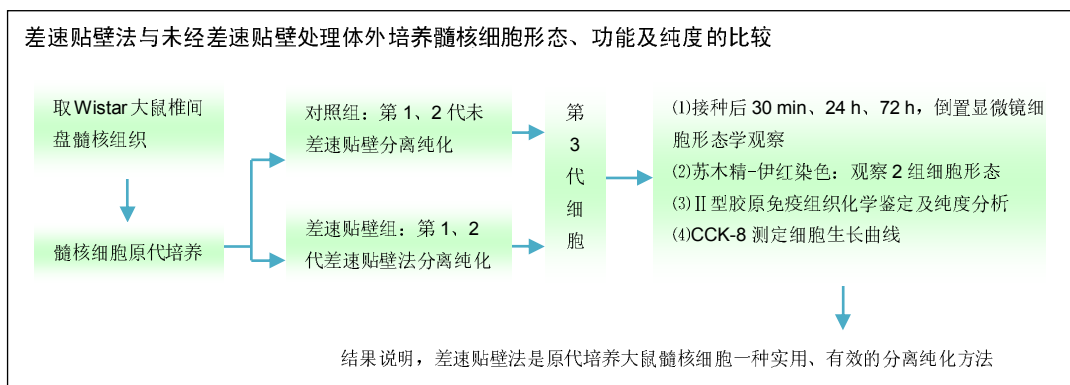
胡永凯, 孙浩林, 漆龙涛, 李淳德(北京大学第一医院骨科, 北京市 100034)

引用本文: 胡永凯, 孙浩林, 漆龙涛, 李淳德. 差速贴壁法原代培养椎间盘髓核细胞中的应用优势[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(42):6284-6289.

DOI: 10.3969/j.issn.2095-4344.2016.42.008

ORCID: 0000-0002-7368-1412(胡永凯)

文章快速阅读:



胡永凯, 男, 1988年生, 湖南省邵阳市人, 汉族, 2016年北京大学毕业, 硕士, 医师, 主要从事脊柱退行性疾病, 脊柱畸形的研究。

通讯作者: 李淳德, 主任医师, 北京大学第一医院骨科, 北京市 100034

中图分类号: R318

文献标识码: A

文章编号: 2095-4344

(2016)42-06284-06

稿件接受: 2016-08-02

文题释义:

差速贴壁法: 根据不同类型细胞黏附于某固相物质表面生长的能力的差异, 即某些细胞黏附能力强或作用快而另一些细胞黏附能力弱或作用慢, 接种后收集或去除未贴壁细胞, 从而将某特定类型细胞进行分离以达到逐步纯化的目的。

原代培养: 是指直接从机体取下组织、器官和细胞后立即进行培养。因此, 较为严格地说是指成功传代之前的培养, 此时的细胞保持原有细胞的基本性质。但通常把第1代至第10代以内的培养细胞统称为原代细胞培养。最常用的原代培养有组织块培养和分散细胞培养。

摘要

背景: 髓核细胞作为椎间盘的主要功能细胞是退变机制研究的重点对象, 维持体外培养的髓核细胞的生理功能及细胞表型的稳定至关重要。

目的: 通过对照研究差速贴壁法在大鼠椎间盘髓核细胞原代培养中的应用优势。

方法: 取4周龄雄性Wistar大鼠20只, 体外分离培养椎间盘髓核细胞, 待原代细胞汇合近90%时进行分组传代, 差速贴壁组在传代细胞贴壁30 min时, 将未贴壁细胞吸出重新调整浓度后传至新的培养皿中, 对照组不作处理。差速贴壁组第1、2代细胞均采用该法分离纯化。对两组第3代细胞进行细胞形态学比较及免疫组化鉴定纯度分析、CCK-8检测细胞功能活性并绘制细胞生长曲线。

结果与结论: ①倒置显微镜观察及苏木精-伊红染色, 差速贴壁组细胞均一性较对照组明显增高, 对照组髓核细胞中混有较多的成纤维样细胞; ②II型胶原免疫组化鉴定及纯度分析, 2组细胞胞浆均为被染成黄褐色, 证实为髓核类软骨细胞; ③纯度分析差速贴壁组阳性率显著高于对照组($P < 0.05$); ④CCK-8细胞生长曲线显示, 2组细胞均经过2 d的生长潜伏期, 3 d的指数生长期, 进入生长停滞期, 而对照组较差速贴壁组在潜伏期和指数增长期的早期生长更迅速。⑤结果说明, 差速贴壁法是原代培养大鼠髓核细胞一种实用、有效的分离纯化方法; 原代培养、经2次差速贴壁法分离纯化的第3代大鼠髓核细胞代谢旺盛、表型一致, 细胞纯度更高, 其对数增长期可以作为椎间盘细胞机制研究的最佳时期。

关键词:

组织构建; 软骨组织工程; 差速贴壁; 髓核细胞; 纯化; 细胞去分化; 细胞老化; 国家自然科学基金

主题词:

椎间盘; 细胞, 培养的; 细胞衰老; 组织工程

基金资助:

国家自然科学基金(81441058)

Hu Yong-kai, Master,
Physician, Department of
Orthopaedics, Peking
University First Hospital,
Beijing 100034, China

Corresponding author:
Li Chun-de, Chief
physician, Department of
Orthopaedics, Peking
University First Hospital,
Beijing 100034, China

Excellence of differential velocity adherent procedure in primary culture of nucleus pulposus cells of intervertebral disc

Hu Yong-kai, Sun Hao-lin, Qi Long-tao, Li Chun-de (Department of Orthopaedics, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China)

Abstract

BACKGROUND: As the main function cell of intervertebral disc, nucleus pulposus cells are the focus of studying the degenerative mechanism; thereby, it is crucial to maintaining the physiological function of nucleus pulposus cells *in vitro* and the stability of the cell phenotype.

OBJECTIVE: To study the excellence of differential velocity adherent procedure in primary culture of nucleus pulposus cells of rat intervertebral disc through comparison.

METHODS: Twenty male Wistar rats aged 4 weeks were enrolled, and then nucleus pulposus cells of intervertebral disc were isolated and cultured *in vitro*; cell passage culture was performed in different groups when the primary cells were merged to 90%. Differential velocity adherent group cells adhered for 30 minutes, and non-adherent cells were aspirated and transferred to new culture dish after readjusting the concentration; the controls received no intervention. Passages 1 and 2 cells in the differential velocity adherent group were isolated and purified by the same procedure. The morphology of three generations of cells in the two groups was compared, the purity of the identification was detected by immunohistochemistry, the cell viability was detected by cell counting kit-8 and the cell growth curve was drawn.

RESULTS AND CONCLUSION: Inverted phase contrast microscope and hematoxylin-eosin staining revealed that the cell homogeneity of the differential velocity adherent group was significantly higher than that of the control group, and there were more kinds of fibroblast-like cells in nucleus pulposus cells in the control group. Identification and purity analysis of collagen type II showed that the cytoplasm of two groups were both stained brown, indicating that they were the nucleus pulposus chondrocytes. The positive rate of differential velocity adherent group was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$). The cell growth curve of cell counting kit-8 showed cells in the two groups all passed by the latency phase within 2 days, then to the logarithmic phase of 3 days, and entered the lag phase, while the growth rate of the control group was more rapid during the latency and the early logarithmic phases.

These findings suggest that differential velocity adherence method is a practical and effective procedure for the isolation and purification of primary cultured rat nucleus pulposus cells. Through the primary culture, twice differential velocity adherence procedure, the passage 3 rat nucleus pulposus cells are metabolic exuberant, consistent with the phenotype, the cell purity is higher, and the logarithmic growth phase can be used as the optimal time for studying the mechanism of intervertebral disc cells.

Subject headings: Intervertebral Disk; Cells, Cultured; Cell Aging; Tissue Engineering

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81441058

Cite this article: Hu YK, Sun HL, Qi LT, Li CD. Excellence of differential velocity adherent procedure in primary culture of nucleus pulposus cells of intervertebral disc. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2016;20(42):6284-6289.

0 引言 Introduction

下腰痛是骨科顽疾,有超过80%的成年人受到过下腰痛的困扰,由此造成大量劳动力的丧失和经济损失。虽然造成下腰痛的机制仍不完全清楚,但椎间盘退变是重要原因之一,因此椎间盘退变的机制研究非常重要。但体外培养的椎间盘髓核细胞存在去分化现象和老化现象,目前解决的办法主要包括立体培养^[1-3]、病毒或质粒转染^[4-5]、细胞因子调控等方法^[6],这些方法在椎间盘组织工程研究中可行性较好,但作为椎间盘退变的机制研究会引入新的变量,干扰研究结果。作者课题组通过几个椎间盘退变课题的连续性研究,摸索出一种基于细胞差速贴壁原理的体外原代培养大鼠椎间盘髓核细胞

的方法^[7],该方法用于椎间盘退变机制研究简便实用,便于推广。研究旨在通过与未经差速贴壁处理细胞组对比,比较2组细胞形态、功能及纯度,为椎间盘髓核细胞的体外培养提供一定的理论依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 单一样本观察。

1.2 时间及地点 实验于2015年3月至10月在北京大学第一医院中心实验室完成。

1.3 材料

实验动物: 健康4周龄清洁级雄性Wistar大鼠20只,体质量225-250 g,由北京大学第一医院实验动物中心

提供(Ⅱ级, 许可证: SCXK11-000305)。

主要仪器和试剂: 光学显微镜BX41(Olympus公司, 日本); 倒置相差显微镜(Leica, 德国); 酶标仪(Bio-Rad公司, 美国); DMEM/F-12培养基(HyClone, 美国); 兔抗大鼠Ⅱ型胶原多克隆抗体(中山金桥公司, 中国); 二步法抗鼠/兔通用型免疫组织化学试剂盒(Dako公司, 加拿大); CCK-8试剂盒(凯基公司, 中国)。

1.4 实验方法

1.4.1 髓核细胞的分离及培养 取4周龄Wistar大鼠, 2%戊巴比妥钠(100 mg/kg)腹腔注射, 麻醉后脱颈处死, 体积分数70%乙醇浸泡5 min, 常规铺巾, 沿后正中中线剪开皮肤, 分离椎旁肌肉, 取出腰椎节段, 尽量分离干净椎体前缘所附着肌肉, 用磷酸盐缓冲液(含0.1%青-链霉素)冲洗2遍后浸泡5 min, 解剖显微镜下尖刀切开椎间盘纤维环, 用眼科镊夹取胶冻样髓核组织放入盛有磷酸盐缓冲液无菌培养皿中, 转移至超净台中, 磷酸盐缓冲液漂洗3遍, 用眼科剪将组织剪成0.5 mm×0.5 mm×0.5 mm大小, 再用磷酸盐缓冲液漂洗2遍, 1 000 r/min离心3 min, 收集沉淀。用5倍组织体积的2.5 g/L胰蛋白酶消化液重悬组织, 37 ℃消化10–15 min, 3倍胰酶体积的10%FBS培养基终止消化, 1 000 r/min离心3 min, 去上清; 沉淀中加入5倍组织体积的0.1%Ⅱ型胶原酶37 ℃震荡消化6 h, 200目无菌尼龙网过滤, 收集悬液, 1 000 r/min离心5 min。用20%FBS DMEM/F12制成细胞悬液, 血细胞计数板计数, 按 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 细胞浓度接种至直径35 mm培养皿中, 置于37 ℃、饱和湿度、体积分数5%CO₂培养箱中培养, 每3d换液1次, 倒置相差显微镜下观察细胞情况。细胞汇合至80%–90%时用0.25%胰蛋白酶0.01% EDTA消化并进行细胞传代。

1.4.2 髓核细胞传代

对照组: 当细胞接近90%汇合时进行传代。弃掉培养液, 用磷酸盐缓冲液洗涤细胞2次, 弃掉液体。加入1 mL含0.25%胰蛋白酶–0.01%EDTA混合消化液消化细胞, 镜下观察消化情况。镜下见细胞皱缩、间隙加大、个别细胞变圆漂浮时立即用含10%FBS的培养液3 mL终止消化; 用滴管轻轻吹打细胞数次制成细胞悬液。1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 以 $1 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 细胞浓度接种至新培养皿。置于37 ℃、饱和湿度、体积分数5%CO₂培养箱中培养, 待细胞接近90%汇合时再进行下一次传代。

差速贴壁组: 在对照组操作步骤的基础上, 当置于37 ℃、饱和湿度、体积分数5%CO₂培养箱中培养30 min后见拿出培养皿观察, 见部分细胞贴壁、大部分悬浮,

吸出尚未贴壁的悬浮细胞, 重新调整细胞密度后再次接种至新培养皿培养。第1代、第2代细胞均采用此种差速贴壁法行分离纯化。

1.4.3 髓核细胞苏木精-伊红染色 取2种方法培养的第3代髓核细胞爬片, 细胞汇合至80%后去除培养液, 磷酸盐缓冲液(PBS, 0.01 mol/L, pH 7.4)冲洗3遍, 40 g/L多聚甲醛室温固定20 min; 蒸馏水洗2 min×2; 苏木精染色2–5 min, 自来水冲洗; 1%盐酸乙醇分化10 s, 自来水冲洗; 1%氨水乙醇反蓝10 s, 自来水冲洗2 min; 伊红染色2 min, 自来水冲洗1 min; 体积分数70%、80%、90%、100%、100%乙醇梯度脱水; 二甲苯透明; 中性树脂封固。

1.4.4 髓核细胞Ⅱ型胶原免疫组织化学染色鉴定及纯度分析 取2种方法培养的第3代髓核细胞爬片, 成功后去除培养液, PBS冲洗3遍, 40 g/L多聚甲醛室温固定20 min, 进行免疫细胞化学染色。PBS洗涤, 5 min×3次; 0.3%TritonX-100/PBS溶液室温通透20 min, PBS洗涤, 5 min×3次; 体积分数3%的H₂O₂/甲醇溶液室温30 min封闭内源性过氧化物酶; PBS洗涤, 5 min×3次; 山羊封闭血清工作液封闭, 37 ℃孵育30 min; 分别滴加Ⅱ型胶原抗体(1:100), 阴性对照: 以抗体稀释液代替一抗, 湿盒中4 ℃过夜。PBS洗涤, 5 min×3次; 加入二抗工作液, 37 ℃孵育60 min; PBS洗涤, 5 min×3次; 二氨基联苯胺显色, 显微镜下控制显色程度, 约5 min, 自来水洗涤2次, 苏木精染色2–5 min, 自来水冲洗; 1%盐酸乙醇分化10 s, 自来水冲洗; 1%氨水乙醇反蓝10 s, 自来水冲洗; 体积分数70%、80%、90%、100%、100%乙醇梯度脱水; 二甲苯透明; 中性树脂封固。

显微镜下随机检测10个视野(×200), 每个视野检测约20个细胞, 分别计数Ⅱ型胶原免疫组化染色阳性细胞数, 并计算该细胞百分比, 即髓核细胞纯度。

1.4.5 第3代髓核细胞生长曲线 取2种方法培养的第2代髓核细胞待细胞汇合90%时按前述细胞传代方法制备细胞悬液, 血细胞计数板计数以 $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 接种至7块96孔培养板, 每块96孔培养板接种2组, 每组设置8个复孔, 每孔总液量为100 μL, 以接种时间记为0 d, 每24 h取1块96孔培养板加10 μLCCK-8溶液, 继续培养4 h后, 振荡摇匀10 min, 酶标仪上波长450 nm检测A值, 去掉一个最大值和最小值后取平均值。自接种时间起, 未测定培养板细胞每隔2日换1次液。以培养时间为横轴, A值为纵轴作曲线图。比较2种方法培养的细胞生长曲线的不同。

1.5 主要观察指标 ①大鼠髓核细胞形态及鉴定;②髓核细胞Ⅱ型胶原表达及髓核细胞纯度分析;③细胞生长曲线。

1.6 统计学分析 利用统计软件SPSS 20.0进行独立样本均值 t 检验,比较2组髓核细胞纯度是否有统计学差异。

2 结果 Results

2.1 大鼠髓核细胞体外单层培养及观察 髓核组织经胰酶消化后,仍有较多组织未被消化,而经Ⅱ型胶原酶消化后,组织块基本消化完全。原代培养时,高密度接种原代细胞,倒置显微镜下观察培养液中存在大量圆形细胞。培养1周后细胞开始贴壁,2周时细胞长成单层,有突起,呈圆形或多角型单层生长,3周时细胞汇合至90%。培养至第3代时,对照组可见大部分细胞呈多角形或类圆形,但有部分细胞呈梭形,为类成纤维细胞,差速贴壁组纯化后梭形细胞明显减少,见图1。

2.2 大鼠髓核细胞形态学鉴定 对照组可见第3代细胞中大部分为类圆形和多角形,但有部分呈长梭形;差速贴壁组分离纯化后第3代细胞均质性优于对照组,呈圆形或多角形,活力强,细胞核大而完整,呈卵圆形,染成均一蓝色,胞浆呈现淡粉色,见图2。

2.3 大鼠髓核细胞Ⅱ型胶原表达及髓核细胞纯度分析 对照组第3代髓核细胞Ⅱ型胶原表达阳性率为 $(91.4\pm 2.3)\%$,其中可见部分长梭形细胞Ⅱ型胶原表达阴性;差速贴壁组分离纯化后的第3代髓核细胞Ⅱ型胶原阳性率为 $(95.4\pm 0.6)\%$ 、胞浆染成棕黄色并且呈向心性分布,胞核淡染为蓝色,见图3,Ⅱ型胶原阳性率独立样本均值 t 检验,差速贴壁组细胞纯度较对照组差异有显著性意义($t=5.135, P<0.05$)。

2.4 细胞生长曲线 对照组和差速贴壁组第3代髓核细胞接种后,均经过2 d的生长潜伏期,3 d的指数生长期,进入生长停滞期(即平台期)。而对照组较差速贴壁组在潜伏期和指数增长期的早期生长更迅速,见图4。

3 讨论 Discussion

椎间盘细胞主要包括脊索细胞、类软骨细胞和类成纤维细胞。脊索细胞存在于胚胎期的髓核内,出生后逐渐减少,正常人10岁以后消失^[8]。类软骨细胞分布于髓核及纤维环的内层,而纤维环的外层主要为类成纤维细胞,表达Ⅰ型胶原以维持椎间盘纤维环的张力。类软骨细胞是髓核中的主要功能细胞,能够分泌Ⅱ型胶原和蛋白多糖,对细胞外基质的结构和功能的维持起着重要作

用。随着年龄的增长髓核细胞功能减弱,表面蛋白表达会逐渐降低,细胞外基质降解,脆性增加,出现椎间盘膨出、突出、破裂等。髓核细胞数量的减少、生理活性的降低是椎间盘退变的组织病理学基础^[9]。因此,如何通过体外培养获得高纯度、高活性的髓核类软骨细胞是研究其功能和相应的病理改变的重要前提。

正常椎间盘中未衰老髓核细胞呈大空泡状,细胞表面存在大量细胞团簇,可增强细胞间相互作用。在成熟衰老过程中,细胞表面的团簇逐渐消失,细胞表型丢失、形态改变和蛋白多糖合成能力逐渐下降,即去分化。髓核细胞在体外培养过程中也存在去分化现象,即出现表型丢失,如Ⅱ型胶原、蛋白聚糖等表达下降,同时Ⅰ型胶原合成增加,逐渐转化为类成纤维细胞^[10-12]。有研究表明体外单层培养髓核细胞易出现去分化,且可出现在原代培养初期。Horner等^[3]单层培养牛椎间盘细胞发现原代培养第1天髓核细胞合成蛋白聚糖减少,5 d内蛋白聚糖抗原决定簇C-4-S消失。去分化可能会改变细胞对细胞因子和机械刺激的反应性,因此维持细胞表型稳定在椎间盘细胞机制研究中至关重要。

据现有文献报道,细胞纯化方法主要有差速贴壁法、阿糖胞苷法、化学药物法及免疫亲和吸附法等,有研究者建议根据细胞种类可联合多种方法进行分离纯化,如采用密度梯度离心、差速贴壁分离纯化细胞取得了很好的效果^[13]。Kreider等^[14]较早报道了差速贴壁法,随后文献报道证实了其有效性^[15]。差速贴壁法是根据不同类型细胞黏附于某固相物质表面生长的能力存在差异,即某些细胞黏附能力强或作用快而另一些细胞黏附能力弱或作用慢,将某特定类型细胞进行分离以达到逐步纯化的目的。

研究通过从细胞形态、功能及纯度分析对比研究未经差速贴壁分离纯化培养的髓核细胞与差速贴壁法分离纯化的髓核细胞,差速贴壁法能培养出更高纯度的稳定表型的髓核细胞,可为进一步研究椎间盘退变的机制提供细胞学研究载体。相关文献报道,成纤维细胞一般在1 h以内贴壁^[16],软骨细胞24 h左右贴壁^[17]。椎间盘细胞主要是类软骨细胞和类成纤维细胞,因此该研究设置了传代接种15 min、30 min、1 h、2 h 4个差速贴壁处理时间点,结果发现1 h及2 h细胞贴壁近90%,15 min时细胞中混有较多的类成纤维细胞,故选用30 min作为研究时间点。由于所取椎间盘髓核组织经酶消化后原代细胞浓度较小,在原代培养时不进行差速贴壁处理,在第1代和第2代细胞传代时采用差速贴壁法进行分离纯化,去除部分去分化的类成纤维细胞,得到较高纯度的髓核类软骨细胞。对第

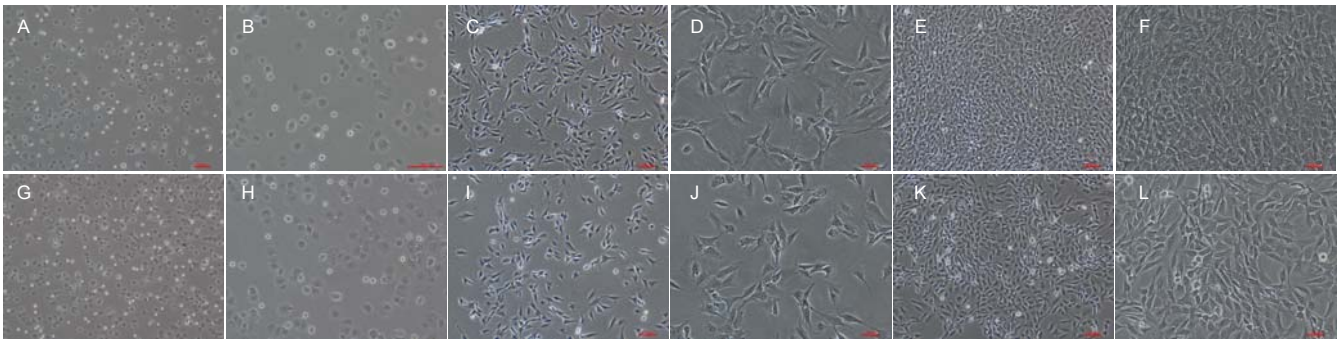


图1 倒置相差显微镜观察培养第3代大鼠髓核细胞

Figure 1 Morphological observation of passage 3 rat nucleus pulposus cells using inverted phase contrast microscope

图注: AB、CD、EF: 依次为对照组接种后 30 min、24 h、72 h, A, C, E($\times 100$)、B, D, F($\times 200$), 髓核软骨样细胞中混有成纤维样细胞; GH、IJ、KL: 依次为差速贴壁组接种后 30 min、24 h、72 h, G, I, K($\times 100$)、H, J, L($\times 200$), 类成纤维细胞明显减少。

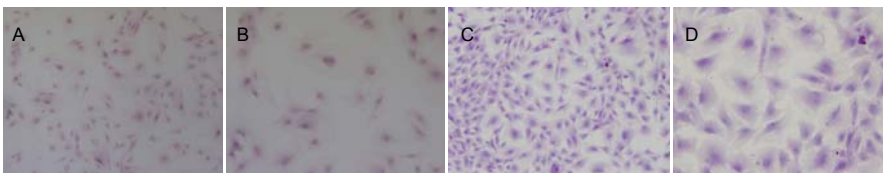


图2 第3代髓核细胞苏木精-伊红染色(A, C: $\times 100$ 、B, D: $\times 200$)

Figure 2 Hematoxylin-eosin staining of passage 3 nucleus pulposus cells (A/C, $\times 100$; B/D, $\times 200$)

图注: A、B 为对照组: 髓核软骨样细胞中混有成纤维样细胞; C、D 为差速贴壁组, 成纤维样细胞明显减少。

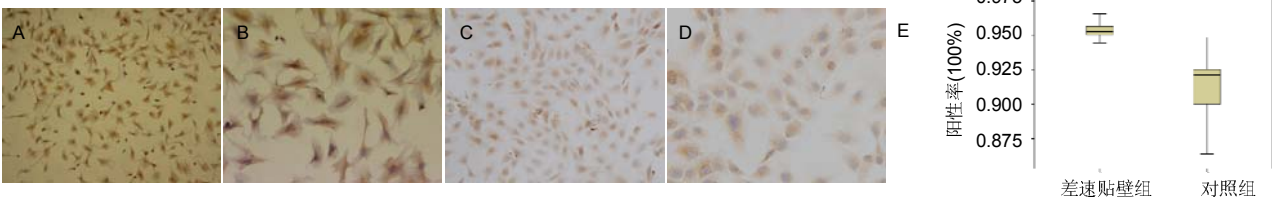


图3 第3代髓核细胞II型胶原免疫组织化学染色(A, C: $\times 100$ 、B, D: $\times 200$)

Figure 3 Collagen type II immunohistochemistry staining of passage 3 nucleus pulposus cells (A/C, $\times 100$; B/D, $\times 200$)

图注: A、B 为对照组: 可见较多的II型胶原表达阴性的长梭形细胞; C、D 为差速贴壁组: 细胞形态较均一, II型胶原表达阴性的长梭形细胞较对照组减少, 胞浆染成棕黄色且呈向心性分布; E: 两组II型胶原阳性细胞率均值盒子图。

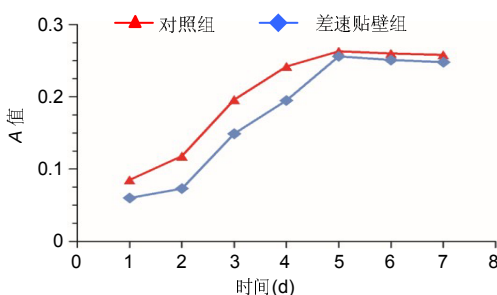


图4 两组髓核细胞生长曲线

Figure 4 Cell growth curves of nucleus pulposus cells in the two groups

图注: 对照组在潜伏期和指数生长期的早期较差速贴壁组细胞增长更快。

3代髓核软骨样细胞进行细胞形态学观察, 对照组可见大部分细胞呈多角形或类圆形, 但混有部分梭形的类成纤维样细胞, 差速贴壁组纯化后细胞形态更均一, 梭形细胞明显减少。II型胶原免疫组化分析差速贴壁组细胞纯度达95%以上, 较对照组的91%具有显著性差异。

细胞在传代过程中可出现体积增大、胞浆分布不均匀、折光性差等细胞老化现象。髓核细胞非永久再生细胞, 一般传5-10代即出现细胞老化, 主要表现为生长速度减缓、功能逐渐丧失。接种细胞密度过小也易出现老化。由于原代培养从椎间盘组织分离获取的髓核细胞相对较少, 细胞离体后适应新环境较慢, 需保证接种细胞密度, 因此在原代培养不进行差速贴壁处理。研究选择经2次差速贴壁纯化及对照组的第3代髓核细胞进行观察鉴定, 通过相差显微镜、苏木精-伊红染色均未发现2组细胞出现体积增大、胞浆分布不均匀、折光性差等细胞老化现象。II型胶原免疫组织化学证实类软骨细胞表型维持良好, 但对照组可见部分II型胶原表达阴性的长梭形细胞, 统计结果表明差速贴壁组细胞纯度更高。细胞生长曲线显示2组细胞均经过2d的潜伏期后达到对数增长期, 并可维持3d后进入平台期, 符合生长旺盛髓核细胞的生长曲线, 但对照组在潜伏期和指数

生长期的早期较差速贴壁组细胞增长更快, 这可能是对照组中混有较多的类成纤维细胞所致。

该研究通过设置对照组, 比较两组细胞形态、功能及纯度, 研究结果表明差速贴壁法在大鼠椎间盘髓核细胞原代培养中应用优势明显, 是一种实用、有效的分离纯化方法; 经原代培养、2次差速贴壁法分离纯化后的第3代大鼠髓核细胞代谢旺盛、表型一致, 细胞纯度更高, 其对数增长期可以作为椎间盘细胞机制研究的最佳时期。

作者贡献: 李淳德和孙浩林进行实验设计, 实验实施为胡永凯、漆龙涛, 实验评估为李淳德, 资料收集为胡永凯、漆龙涛, 胡永凯成文, 孙浩林、李淳德审校, 李淳德对文章负责。

利益冲突: 所有作者共同认可文章内容不涉及相关利益冲突。

伦理问题: 实验动物在戊巴妥钠麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

文章查重: 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

作者声明: 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

4 参考文献 References

- [1] He F, Pei M. Rejuvenation of nucleus pulposus cells using extracellular matrix deposited by synovium-derived stem cells. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2012;37(6):459-469.
- [2] Zhang WJ, Zhang L, Zhao C M, et al. Effects of rotating cell culture system on constructing of tissue engineering inter- vertebral nucleus pulposus. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2010;90(31):2215-2218.
- [3] Horner HA, Roberts S, Bielby RC, et al. Cells from different regions of the intervertebral disc: effect of culture system on matrix expression and cell phenotype. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2002;27(10):1018-1028.
- [4] Wang C, Ruan DK, Zhang C, et al. Effects of adeno-associated virus-2-mediated human BMP-7 gene transfection on the phenotype of nucleus pulposus cells. *J Orthop Res*. 2011;29(6):838-845.
- [5] Wang YY, Zhu QS, Wang Y W, et al. Thymosin Beta-4 Recombinant Adenoassociated Virus Enhances Human Nucleus Pulposus Cell Proliferation and Reduces Cell Apoptosis and Senescence. *Chin Med J (Engl)*. 2015;128(11):1529-1535.
- [6] de la Fuente I, Alcalde I, Gamboa O L, et al. A method for obtaining Schwann cell cultures from adult rabbit nerve based on "in vitro" pre-degeneration and neuregulin treatment. *Histol Histopathol*. 2012;27(1):95-102.
- [7] 孙浩林, 李淳德. 原代培养差速贴壁法分离纯化大鼠腰椎间盘髓核细胞[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(46):8569-8573.
- [8] Kim JH, Deasy BM, Seo HY, et al. Differentiation of intervertebral notochordal cells through live automated cell imaging system in vitro. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2009;34(23):2486-2493.
- [9] Hadjipavlou AG, Tzermiadianos MN, Bogduk N, et al. The pathophysiology of disc degeneration: a critical review. *J Bone Joint Surg Br*. 2008;90(10):1261-1270.
- [10] von der Mark K, Gauss V, von der Mark H, et al. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. *Nature*. 1977;267(5611):531-532.
- [11] Kluba T, Niemeyer T, Gaismaier C, et al. Human annulus fibrosis and nucleus pulposus cells of the intervertebral disc: effect of degeneration and culture system on cell phenotype. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2005; 30(24):2743-2748.
- [12] Hu MH, Hung LW, Yang SH, et al. Lovastatin promotes redifferentiation of human nucleus pulposus cells during expansion in monolayer culture. *Artif Organs*. 2011;35(4):411-416.
- [13] Wang Z, Chen S, Mo H, et al. A simple and economical method in purifying dairy goat luteal cells. *Tissue Cell*. 2013;45(4):269-274.
- [14] Kreider BQ, Messing A, Doan H, et al. Enrichment of Schwann cell cultures from neonatal rat sciatic nerve by differential adhesion. *Brain Res*. 1981;207(2):433-444.
- [15] Nash HH, Borke RC, Anders JJ. New method of purification for establishing primary cultures of ensheathing cells from the adult olfactory bulb. *Glia*. 2001;34(2):81-87.
- [16] Jankowski RJ, Haluszczak C, Trucco M, et al. Flow cytometric characterization of myogenic cell populations obtained via the preplate technique: potential for rapid isolation of muscle-derived stem cells. *Hum Gene Ther*. 2001;12(6):619-628.
- [17] Nevo Z, Silver J, Chorev Y, et al. Adhesion characteristics of chondrocytes cultured separately and in co-cultures with synovial fibroblasts. *Cell Biol Int*. 1993;17(3):255-273.