

丝素蛋白 / 纳米羟基磷灰石 / 淫羊藿苷可促进移植骨髓间充质干细胞增殖分化为髓核样细胞

https://doi.org/10.12307/2022.281

郭晓鹏, 刘莹松, 尚晖

投稿日期: 2020-09-25

采用日期: 2020-11-19

修回日期: 2021-04-30

在线日期: 2021-05-18

中图分类号:

R459.9; R318.8; R-332

文章编号:

2095-4344(2022)22-03528-07

文献标识码: B

文章快速阅读:

实验动物:

新西兰大白兔

模型:

采用髓核抽吸法建立兔椎间盘退变动物模型。

实验分组:

- (1) 模型组采用微量注射器向椎间盘内注射 PBS;
- (2) 对照组注射丝素蛋白 / 羟基磷灰石水凝胶与骨髓间充质干细胞悬液;
- (3) 实验组注射含淫羊藿苷的丝素蛋白 / 羟基磷灰石水凝胶与骨髓间充质干细胞悬液;
- (4) 正常组不建模也不进行任何处理。

文章特点一

△对比丝素蛋白 / 纳米羟基磷灰石 / 淫羊藿苷材料与丝素蛋白 / 纳米羟基磷灰石材料复合骨髓间充质干细胞在椎间盘退变修复中的效果差异。

观察指标:

- (1) X 射线片、MRI 检查;
- (2) 组织形态学观察;
- (3) II 型胶原、蛋白聚糖、Sox9 mRNA 表达;
- (4) II 型胶原、蛋白聚糖、Sox9 蛋白表达。

文题释义:

丝素蛋白纤维: 是一种无生理活性的天然大分子, 由18种氨基酸组成, 结构稳定, 力学性能优良, 并且具有良好的生物相容性和可降解性, 适合作为纤维环支架, 但是单纯的丝素蛋白材料不能完全满足椎间盘的全部要求, 目前通常将其与其他材料复合使用。

淫羊藿苷: 是黄酮类化合物, 具有免疫调节、抗肿瘤、延缓衰老、影响心血管系统等生物活性, 具有很高的保健作用和药用价值, 近年来对淫羊藿苷的研究得到广泛关注。研究发现, 淫羊藿苷可作为一种良好的骨诱导活性因子有效促进骨髓间充质干细胞向软骨细胞定向分化。

摘要

背景: 近年来利用组织工程技术修复椎间盘退变成成为脊柱外科领域的研究热点。

目的: 对比丝素蛋白/纳米羟基磷灰石/淫羊藿苷与丝素蛋白/纳米羟基磷灰石复合材料在椎间盘退变修复中的效果。

方法: 采用物理共混法与致孔剂制备丝素蛋白/纳米羟基磷灰石水凝胶, 将水凝胶直接与淫羊藿苷物理混合制备含淫羊藿苷(10 mmol/L)的水凝胶。采用髓核抽吸法建立新西兰大白兔椎间盘退变动物模型, 将造模成功的36只兔随机分3组, 每组12只: 模型组采用微量注射器向椎间盘内注射PBS, 对照组注射丝素蛋白/羟基磷灰石水凝胶与骨髓间充质干细胞悬液, 实验组注射丝素蛋白/羟基磷灰石水凝胶与淫羊藿苷凝胶与骨髓间充质干细胞悬液。正常组(n=12)不建模也不进行任何处理。术后4, 8, 12周进行X射线片、MRI检查, 术后12周进行组织学(苏木精-伊红染色与甲苯胺蓝染色)、RT-PCR检测(II型胶原、蛋白聚糖、Sox9 mRNA的表达)与Western blotting检测(II型胶原、蛋白聚糖、Sox9蛋白的表达)。

结果与结论: ①X射线片显示, 术后4, 8, 12周时, 模型组椎间盘高度逐渐下降, 对照组、实验组椎间盘高度逐渐增加, 其中实验组椎间盘高度的恢复好于对照组; ②MRI检查显示, 术后4, 8, 12周时, 模型组椎间盘T2加权像信号值呈逐渐降低趋势, 对照组与实验组逐渐升高, 其中以实验组升高更明显; ③苏木精-伊红染色显示, 模型组髓核组织破坏较明显, 髓核细胞显著减少; 对照组髓核组织欠完整, 中央髓核区可见少量髓核样细胞增生; 实验组髓核组织较完整, 中央髓核区可见大量髓核样细胞增生; ④甲苯胺蓝染色显示, 模型组髓核无着色, 对照组中度染色, 实验组髓核深染; ⑤RT-PCR与Western blotting检测显示, 模型组II型胶原、蛋白聚糖、Sox9的mRNA及蛋白表达水平低于正常组(P < 0.05), 对照组与实验组的II型胶原、蛋白聚糖、Sox9的mRNA及蛋白表达水平高于模型组(P < 0.05), 实验组的II型胶原、蛋白聚糖、Sox9的mRNA及蛋白表达水平高于对照组(P < 0.05); ⑥结果表明, 丝素蛋白/羟基磷灰石水凝胶联合淫羊藿苷可促进移植骨髓间充质干细胞增殖并分化为髓核样细胞, 增加细胞基质的合成, 促进退变椎间盘的修复。

关键词: 材料; 丝素蛋白; 纳米羟基磷灰石; 水凝胶; 椎间盘退变; 淫羊藿苷; 实验动物

Silk fibroin/nano hydroxyapatite composite combined with icariin can promote the proliferation and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into nucleus pulposus like cells

Guo Xiaopeng, Liu Yingsong, Shang Hui

Shiyan Taihe Hospital, Shiyan 442000, Hubei Province, China

Guo Xiaopeng, Master, Associate chief physician, Shiyan Taihe Hospital, Shiyan 442000, Hubei Province, China

Corresponding author: Liu Yingsong, Master, Associate chief physician, Shiyan Taihe Hospital, Shiyan 442000, Hubei Province, China

十堰市太和医院, 湖北省十堰市 442000

第一作者: 郭晓鹏, 男, 1979年生, 湖北省十堰市人, 硕士, 副主任医师, 主要从事研究脊柱相关疾病研究。

通讯作者: 刘莹松, 硕士, 副主任医师, 十堰市太和医院, 湖北省十堰市 442000

https://orcid.org/0000-0002-1054-2511 (郭晓鹏)

引用本文: 郭晓鹏, 刘莹松, 尚晖. 丝素蛋白 / 纳米羟基磷灰石 / 淫羊藿苷可促进移植骨髓间充质干细胞增殖分化为髓核样细胞 [J].

中国组织工程研究, 2022, 26(22):3528-3534.



Abstract

BACKGROUND: In recent years, using tissue engineering technology to repair intervertebral disc degeneration has become a research hotspot in the field of spinal surgery.

OBJECTIVE: To compare the effect of silk fibroin/nano hydroxyapatite composite material combined with icariin and silk fibroin/nano hydroxyapatite composite in the repair of intervertebral disc degeneration.

METHODS: Silk fibroin/nano hydroxyapatite hydrogel was prepared by physical blending and porogen. The hydrogel was directly physically mixed with icariin to prepare a hydrogel containing icariin (10 mmol/L). Animal models of intervertebral disc degeneration in New Zealand white rabbits were established by nucleus pulposus aspiration method. Thirty-six rabbits were randomly divided into 3 groups, with 12 in each group. The model group was injected with PBS using microinjector into intervertebral disc. The control group was injected with silk fibroin/hydroxyapatite hydrogel and bone marrow mesenchymal stem cell suspension. The experimental group was injected with fibroin/hydroxyapatite hydrogel containing icariin and bone marrow mesenchymal stem cell suspension. The normal group ($n=12$) was not modeled and did not receive any treatment. X-ray and MRI examinations were performed 4, 8, and 12 weeks after surgery. Histology (hematoxylin-eosin staining and toluidine blue staining), RT-PCR detection (type II collagen, proteoglycan, Sox9 mRNA), and western blot assay (type II collagen, proteoglycan, Sox9 protein expression) were performed 12 weeks after surgery.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) X-ray films showed that the height of the intervertebral disc in the model group gradually decreased at 4, 8, and 12 weeks after the operation, while the height of the intervertebral disc in the control group and the experimental group increased gradually. Among them, the rabbit disc height in the experimental group recovered better than the control group. (2) MRI demonstrated that at 4, 8, and 12 weeks after surgery, the T2 weighted image signal value of the rabbit intervertebral disc in the model group gradually decreased, and gradually increased in the control group and the experimental group, of which the experimental group increased more significantly. (3) Hematoxylin-eosin staining showed that the nucleus pulposus tissue of the model group was obviously damaged, and the number of nucleus pulposus cells was remarkably reduced; the control group was less complete with a small amount of nucleus pulposus-like cell proliferation in the central nucleus pulposus. In the experimental group, nucleus pulposus tissue was intact, and a large number of nucleus pulposus-like cell proliferation could be seen in the central nucleus pulposus. (4) Toluidine blue staining showed that the nucleus pulposus of the model group was not stained, moderately stained in the control group, and deeply stained in the experimental group. (5) RT-PCR and western blot assay showed that the expression levels of type II collagen, proteoglycan and Sox9 in the model group were lower than those in the normal group ($P < 0.05$). The expression levels of type II collagen, proteoglycan and Sox9 in the control and experimental groups were higher than those of the model group ($P < 0.05$). The expression levels of type II collagen, proteoglycan and Sox9 in the experimental group were higher than those in the control group ($P < 0.05$). (6) The results have shown that the silk fibroin/hydroxyapatite hydrogel combined with icariin can promote the proliferation and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into nucleus pulposus like cells, increase the synthesis of cell matrix and promote the repair of degenerative intervertebral disc.

Key words: material; silk fibroin; nano-hydroxyapatite; hydrogel; intervertebral disc degeneration; icariin; experimental animal

How to cite this article: GUO XP, LIU YS, SHANG H. Silk fibroin/nano hydroxyapatite composite combined with icariin can promote the proliferation and differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into nucleus pulposus like cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(22):3528-3534.

0 引言 Introduction

椎间盘退变是临床下腰痛症状的主要原因之一，多种因素在椎间盘退变的发生与发展中发挥着重要作用^[1-2]。目前大多数的研究认为椎间盘退变开始于髓核，髓核细胞坏死凋亡后引发细胞外基质的合成与分泌减少，致使髓核微环境发生变化，进一步减少髓核细胞数量，如此反复形成了恶性循环^[3-6]。目前主要采用椎间盘摘除术与椎间融合术治疗椎间盘退变类疾病^[7-11]，虽然这些方法在一定程度上可缓解临床症状，但不能从根本上阻止椎间盘的退变。随着体外椎间盘髓核和纤维环组织细胞培养技术的建立，特别是软骨组织工程学的不断深入，使退行性变椎间盘的形态结构与生理功能的再生修复成为了可能，有望为阻止或逆转椎间盘退行性变、促进椎间盘组织再生提供一条新的有效方法。

近年来，利用组织工程技术修复椎间盘退变成为脊柱外科领域的研究热点，组织工程技术主要涉及种子细胞、支架材料与生物活性因子3个因素。其中间充质干细胞是具有自我更新能力与多向分化潜能的原始细胞，是组织工程研究中重要的种子细胞之一。支架材料在组织工程中起着中心作用，不但为特定的细胞提供结构支撑，同时还具有模板引导作用，引导组织再生与调控组织结构。丝素蛋白纤维是一种无生理活性的天然大分子，由18种氨基酸组成，结构稳定，力学性能优良，并且具有良好的生物相容性和可降解性^[12-14]，适合作为纤维环支架，但是单纯的丝素蛋白材料不能完全满足椎间盘的全部要求，目前通常将其与其他材料复合使用。纳米羟基磷灰石是脊椎动物骨骼与牙齿的主要无机成分，具有优良的生物相容性与力学性能，被广泛用于骨科^[15-17]、牙齿

填充剂^[18]、修补剂与组织工程支架材料^[19-20]。因此，实验将丝素蛋白与纳米羟基磷灰石复合作为纤维环支架材料，以发挥二者各自的优势。

生长因子是一种多肽类物质，通过细胞膜特殊的受体发挥生理功能，可调节基质的产生与细胞的修复。许多生长因子在椎间盘的生长发育与再生修复中发挥着重要作用，例如：转化生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、骨形态发生蛋白及表皮生长因子等。淫羊藿苷是黄酮类化合物，具有免疫调节、抗肿瘤、延缓衰老、影响心血管系统等生物活性^[21-23]，具有很高的保健作用和药用价值，近年来对淫羊藿苷的研究得到广泛关注。研究发现，淫羊藿苷可作为一种良好的骨诱导活性因子有效促进骨髓间充质干细胞向软骨细胞的定向分化^[24]。实验主要对比丝素蛋白/纳米羟基磷灰石/淫羊藿苷材料复合骨髓间充质干细胞与丝素蛋白/纳米羟基磷灰石材料复合骨髓间充质干细胞在修复椎间盘退变修复中的效果。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 动物观察性实验。

1.2 时间及地点 实验于2019年12月至2020年5月在湖北医药学院完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 3周龄新西兰大白兔4只，体质量0.45 kg，雌雄不拘，用于分离培养骨髓间充质干细胞。3月龄新西兰大白兔，体质量2.5-3.0 kg，雌雄不拘，用于退变椎间盘模型的制备。实验动物均由湖北医药学院实验中心提供。实验方案由湖北医药学院动物实验伦理委员会批准。

1.3.2 主要试剂与仪器 蚕茧 (湖北医药学院提供); 纳米羟基磷灰石 (含量 99.9%, 北京德科岛金科技有限公司); 淫羊藿苷 (CAS: 489-32-7, 成都德思特生物技术有限公司); 戊巴比妥钠 (上海信裕生物科技有限公司); DMEM/F12 培养基 (江苏科晶生物科技有限公司); 胎牛血清 (赛默飞世尔科技有限公司); 鼠抗兔 II 型胶原、蛋白聚糖、Sox9 (美国 Abcam); 3.0 T 医用超导核磁共振仪 (荷兰飞利浦公司); RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit 试剂盒 (麦瑞康生物); 成脂诱导培养液、成软骨诱导培养液与成骨诱导培养液 (北京雅安达生物技术有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 制备水凝胶 将蚕茧剪成碎片, 进行脱胶处理。脱胶后置于 30 °C 真空烘干箱中干燥 3 d, 得到丝素蛋白; 将 44.83 g 的 LiBr·H₂O 溶于 45 mL 蒸馏水中, 然后将 12 g 丝素蛋白加入其中, 55 °C 下使其溶解, 搅拌均匀后冷却至室温; 将溶液进行过滤、透析, 高速离心并过滤获得丝素蛋白再生溶液 (浓度为 5.5%), 低温保存。将纳米羟基磷灰石浆料与丝素蛋白再生溶液置于 250 mL 三口瓶中, 二者的质量比为 2 : 1, 随后加入过筛的颗粒大小 100 目的 NaCl 粉末, 加入 20 mL DMSO 于三口瓶中, 利用恒温磁力搅拌器在 95 °C 水浴中持续搅拌 3 h, 将反应物倒在模板上, 冷却后盖好保护壳。将水凝胶置于 -20 °C 冰箱中保存。水凝胶注射前 γ 射线辐照灭菌, 随后直接与淫羊藿苷物理混合制备丝素蛋白 / 羟基磷灰石 / 淫羊藿苷水凝胶, 其中淫羊藿苷的浓度为 1 mmol/L。

1.4.2 分离培养骨髓间充质干细胞^[25] 耳缘静脉注射 1.3% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg)³ 周龄麻醉实验兔, 无菌条件下以一侧髂前上棘为穿刺点, 使用含肝素钠的无菌注射器抽取大约 10 mL 骨髓液, 与 PBS 以体积比 1 : 1 混合, 随后缓慢加入含 Percoll 分离液的离心管中, 3 000 r/min 离心 30 min, 可见管内溶液分为 4 层, 吸取第 2 层云雾状的单核细胞层, 以 3 倍体积的 PBS 悬浮细胞, 1 000 r/min 离心 3 min, 弃上清液, 重复 2 次。将离心后的细胞以含体积分数 10% 胎牛血清、1% 青 - 链霉素的 DMEM/F12 培养基重悬, 接种于培养瓶内, 置于培养箱中培养。48 h 后首次换液, 此后每 2 d 换液一次。观察细胞生长至 85% 汇合时进行传代。选择第 3 代骨髓间充质干细胞进行移植实验。

1.4.3 鉴定骨髓间充质干细胞 取骨髓间充质干细胞悬液 100 μL, 细胞浓度为 1×10⁹ L⁻¹, 分别加入流式检测管内, 阴性对照管中加入相应荧光标记的同型抗体小鼠 IgG1-PerCP、小鼠 IgG1-APC、小鼠 IgG1-PE、小鼠 IgG1 K-PE; 实验管内加入荧光素标记的小鼠抗兔 CD29-FITC、CD90-FITC、CD45-FITC 抗体, 各 20 μL, 混匀后 4 °C 避光孵育 30 min, 上机检测。将骨髓间充质干细胞悬液接种于 6 孔板内, 每孔 3×10⁴ 个细胞, 加入完全培养液培养 24 h, 弃掉原来的培养液, 分别更换为成脂诱导培养液、成软骨诱导培养液与成骨诱导培养液, 诱导 21 d 后分别进行油红 O 染色、甲苯胺蓝染色与茜素红

染色。

1.4.4 制备椎间盘退变模型 3 月龄新西兰白兔术前 24 h 禁食、禁饮。手术当天以 1.3% 戊巴比妥钠耳缘静脉注射, 麻醉生效后右侧卧位并固定兔四肢, 在脊椎左侧髂嵴至肋弓下脊柱区与左侧腹部常规备皮、消毒、铺巾, 在左侧肋弓下缘与左侧髂嵴之间作一连线, 在左侧横突上方作一长约 10 cm 的切口, 切开深筋膜后钝性分离胸腰筋膜与腹外斜肌, 暴露横突, 沿横突腹内缘钝性分离至腰椎中心, 依次显露 L_{3/4}、L_{4/5}、L_{5/6} 椎间盘; 使用 18G 穿刺针沿平行于终板方向依次刺破 L_{3/4}、L_{4/5}、L_{5/6} 椎间盘, 刺入深度约 5 mm 并抽吸 20 s, 可吸出呈胶冻样的髓核组织, 髓核量约为 10 mg, 随后逐层缝合切口。术后连续 3 d 肌注青霉素预防感染。4 周后以病理学检查验证造模成功。

1.4.5 实验分组及干预 造模 4 周后再次麻醉实验兔, 按照上述方法显露 L_{3/4}、L_{4/5}、L_{5/6} 椎间盘, 将造模成功的 36 只新西兰大白兔随机分为 3 组, 每组 12 只, 模型组采用微量注射器向椎间盘内注射 30 μL PBS; 对照组注射 15 μL 的丝素蛋白 / 羟基磷灰石水凝胶与 15 μL 的骨髓间充质干细胞悬液, 细胞浓度为 1×10¹⁰ L⁻¹; 实验组注射 15 μL 的丝素蛋白 / 羟基磷灰石 / 淫羊藿苷水凝胶与 15 μL 的骨髓间充质干细胞悬液, 细胞浓度为 1×10¹⁰ L⁻¹; 正常组 (n=12) 不建模也不进行任何处理。

1.4.6 影像学检查

X 射线片检查: 治疗后 4, 8, 12 周时麻醉实验兔, 进行数字化 X 射线照相机拍摄, 测量椎体高度与椎间盘高度, 计算椎间盘高度指数。

椎间盘高度指数 = 椎间盘高度 ÷ (椎间盘高度 + 上一椎体高度)

相对椎间盘高度指数 = 术后椎间盘高度指数 ÷ 造模前椎间盘高度指数 × 100%

MRI 检查: 治疗后 4, 8, 12 周, 麻醉实验兔后进行腰椎 MRI 检查, 利用 Vue PACs 软件分析 T2 加权像信号值变化。

1.4.7 组织学观察 治疗后 12 周时空气栓塞法处死实验兔, 俯卧位下切开皮肤, 分离椎体旁肌肉, 显露 L_{3/4}、L_{4/5}、L_{5/6} 椎间盘, 截取退变节段椎间盘, 获取髓核组织, 其中一部分置于液氮中冷冻保存; 另一部分置于体积分数 4% 甲醛溶液中 4 °C 固定 3 h, 脱钙后水平位切开标本, 石蜡包埋后切成厚约 5 μm 的切片, 分别进行苏木精 - 伊红染色与甲苯胺蓝染色。

1.4.8 Western blotting 检测 Western blotting 检测髓核组织中 II 型胶原、蛋白聚糖、Sox9 蛋白的表达。将 100 mg 髓核组织放入研磨皿中, 加入液氮后研成粉末, 加入 0.5 mL 组织裂解液后持续研磨, 按比例加入 0.2 mL 的蛋白酶抑制剂, 匀浆至组织充分裂解, 将匀浆组织液 12 000×g 离心 3 min, 取上清, 95 °C 煮沸 10 min 变性, -20 °C 保存。采用 BCA 法检测蛋白浓度。取 20 μL 蛋白样品, 加入 5 μL 的 6× 蛋白上样缓冲液混匀, 加热 5 min 后冷却; 按预定的顺序上样, 旁边孔内加入 5 μL 蛋白 Marker; 80 V 加压至 120 V 恒压电泳,

将目的蛋白转移至 PVDF 膜上, 脱脂牛奶封闭 1 h, 加入稀释的一抗 (鼠抗兔 II 型胶原、蛋白聚糖、Sox9, 稀释度分别为 1 : 1 000、1 : 10 000、1 : 5 000) 4 °C 孵育过夜; 加入二抗羊抗鼠 IgG (稀释度分别为 1 : 2 000) 室温孵育 1 h, 以 GAPDH 为内参; ECL 显影、曝光。

1.4.9 RT-PCR 检测 采用 RT-PCR 法检测髓核组织中 II 型胶原、蛋白聚糖、Sox9 mRNA 的表达。将 100 mg 冷冻的髓核组织置于液氮中研磨成粉末, 制成匀浆液; 加入氯仿后混匀, 4 °C 12 000×g 离心 10 min; 按照 RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit 试剂盒说明书操作提取总 RNA。取各组样品总 RNA 1 μL, 利用核酸蛋白分析仪检测总 RNA 浓度。PrimeScript®RT reagent Kit With gDNA Eraser 说明书操作进行反转录反应。将合成的 cDNA 进行 RT-PCR 反应, 引物序列见表 1。

表 1 | RT-PCR 反应引物序列

Table 1 | Primer sequences of RT-PCR

基因名称	上游引物	下游引物
II 型胶原	5'-GCA CCT TGG ACG CCA TGA AG-3'	5'-GCT GCT GCT TCT GGC TCT TG-3'
蛋白聚糖	5'-GCT ACG GAG ACA AGG ATG AGT TC-3'	5'-CGT AAA AGA CCT CAC CCT CCA T-3'
Sox9	5'-TGC AGA ATG CTT GCG CTC TC-3'	5'-GGC ACA CAC TGG CTG CTA AA-3'
GAPDH	5'-ATC CTG CAC CAC CAA CTG CT-3'	5'-ACG CCA CAG CTT CCC AGA G-3'

PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 变性 30 s、60 °C 退火 34 s、72 °C 延伸 60 s, 共 40 个循环; 95 °C 15 s、60 °C 1 min、95 °C 15 s。

1.5 主要观察指标 4 组兔椎间盘的影像学、组织形态学、RT-PCR 检测与 Western blotting 检测结果。

1.6 统计学分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表达, 采用统计学软件 SPSS 22.0 进行方差分析。

2 结果 Results

2.1 骨髓间充质干细胞的分离培养和鉴定 倒置显微镜下可见, 骨髓间充质干细胞在接种 24 h 后开始贴壁生长, 形态呈多边形或是小梭形, 状态良好; 首次换液后, 随着培养时间的延长, 细胞呈梭形; 第 3 次换液后细胞之间相互融合, 呈旋涡状生长, 见图 1A。成脂诱导 21 d 后, 油红 O 染色可见脂滴, 见图 1B; 成软骨诱导 21 d 后, 甲苯胺蓝染色可见蛋白聚糖基质的软骨组织, 见图 1C; 成骨诱导 21 d 后, 茜素红染色可见钙结节, 见图 1D, 该结果说明分离培养的细胞可分化为脂肪细胞、软骨细胞与成骨细胞, 具有多向分化潜能。

流式细胞术检测骨髓间充质干细胞表面抗原显示, 细胞低表达 CD45(0.76%), 高表达 CD29(92.21%)、CD90(90.16%), 见图 2, 表明为纯度较高的骨髓间充质干细胞。

2.2 各组兔椎间盘 X 射线片检查结果 治疗后 4, 8, 12 周时, 正常组兔椎间盘高度无明显变化, 模型组逐渐下降, 对照组、实验组逐渐增加, 其中实验组椎间盘高度恢复好于对照组, 见图 3。

统计分析结果显示, 模型组术后各时间点的相对椎间盘

高度指数低于正常组 ($P < 0.05$), 对照组、实验组术后各时间点的相对椎间盘高度指数低于模型组 ($P < 0.05$), 实验组治疗后各时间点的相对椎间盘高度指数高于对照组 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 | 治疗后各组兔相对椎间盘高度指数与 T2 加权像信号值比较 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 | Comparison of relative intervertebral disc height index and T2 weighted image signal value of each group after operation

组别	相对椎间盘高度指数 (%)		
	治疗后 4 周	治疗后 8 周	治疗后 12 周
正常组	100	100	100
模型组	61.37±5.21 ^a	53.99±2.18 ^a	48.35±1.19 ^a
对照组	70.11±2.23 ^b	76.32±2.03 ^b	84.37±1.27 ^b
实验组	83.15±1.78 ^{bc}	89.37±2.34 ^{bc}	93.06±1.19 ^{bc}

组别	T2 加权像信号值		
	治疗后 4 周	治疗后 8 周	术后 12 周
正常组	1 098.36±12.09	1 103.08±9.36	1 079.34±16.21
模型组	382.61±16.23 ^a	292.36±19.11 ^a	112.08±14.66 ^a
对照组	458.74±20.17 ^b	579.17±15.33 ^b	603.57±12.85 ^b
实验组	537.88±19.58 ^{bc}	679.76±21.22 ^{bc}	789.39±32.77 ^{bc}

表注: 与正常组对比, ^a $P < 0.05$; 与模型组对比, ^b $P < 0.05$; 与对照组对比, ^c $P < 0.05$

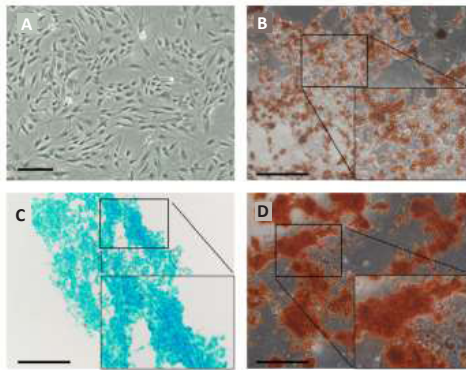
2.3 各组兔椎间盘 MRI 检查结果 治疗后 4, 8, 12 周时, 正常组椎间盘 T2 加权像信号无明显变化, 模型组呈逐渐降低趋势, 对照组与实验组逐渐升高, 其中以实验组升高更明显, 见图 3。

T2 加权像信号值统计学分析显示, 模型组治疗后各时间点的 T2 加权像信号值低于正常组 ($P < 0.05$), 对照组、实验组治疗后各时间点的 T2 加权像信号值高于模型组 ($P < 0.05$), 实验组治疗后各时间点的 T2 加权像信号值高于对照组 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.4 各组兔椎间盘组织学观察结果 正常组苏木精-伊红染色显示髓核组织完整, 髓核区可见大量髓核细胞, 分布均匀; 甲苯胺蓝染色显示髓核组织深染。模型组苏木精-伊红染色显示髓核组织破坏较明显, 髓核细胞显著减少, 可见纤维样增生; 甲苯胺蓝染色显示髓核无着色, 局部淡染。对照组苏木精-伊红染色显示髓核组织欠完整, 中央髓核区可见少量髓核样细胞增生, 甲苯胺蓝染色显示髓核组织中度染色。实验组苏木精-伊红染色显示髓核组织较完整, 中央髓核区可见大量髓核样细胞增生, 甲苯胺蓝染色显示髓核组织深染。各组髓核组织组织学分析结果见图 4。

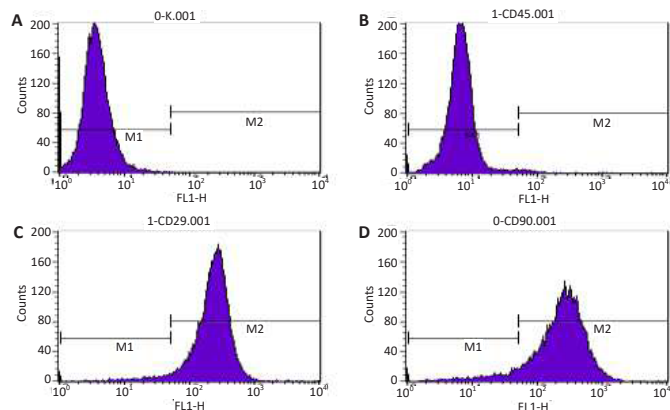
2.5 各组兔髓核组织 Western blotting 检测结果 模型组的 II 型胶原、蛋白聚糖、Sox9 蛋白表达水平低于正常组 ($P < 0.05$), 对照组与实验组的 II 型胶原、蛋白聚糖、Sox9 蛋白表达水平高于模型组 ($P < 0.05$), 实验组的 II 型胶原、蛋白聚糖、Sox9 蛋白表达水平高于对照组 ($P < 0.05$), 见图 5。

2.6 各组兔髓核组织 RT-PCR 检测结果 模型组的 II 型胶原、蛋白聚糖、Sox9 mRNA 表达水平低于正常组 ($P < 0.05$), 对照组与实验组的 II 型胶原、蛋白聚糖、Sox9 mRNA 表达水平高于模型组 ($P < 0.05$), 实验组的 II 型胶原、蛋白聚糖、Sox9 mRNA 表达水平高于对照组 ($P < 0.05$), 见图 6。



图注: A 为第 3 代骨髓间充质干细胞; B 为骨髓间充质干细胞的成脂诱导, 油红 O 染色呈阳性; C 为骨髓间充质干细胞的成软骨诱导, 甲苯胺蓝染色呈阳性; D 为骨髓间充质干细胞的成骨诱导, 茜素红染色呈阳性

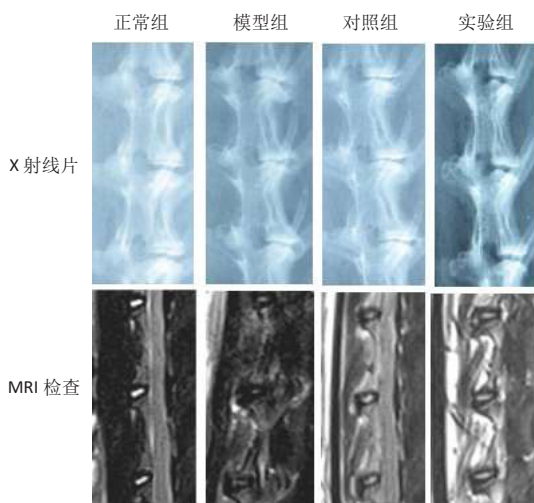
图 1 | 骨髓间充质干细胞的形态与多向分化潜能 (标尺 = 100 μm)
Figure 1 | Morphology and multi-directional differentiation potential of bone marrow mesenchymal stem cells (scale bars=100 μm)



图注: A 为阴性对照; B 为骨髓间充质干细胞 CD45 表达 (0.76%); C 为骨髓间充质干细胞 CD29 表达 (92.21%); D 为骨髓间充质干细胞 CD90 表达 (90.16%)

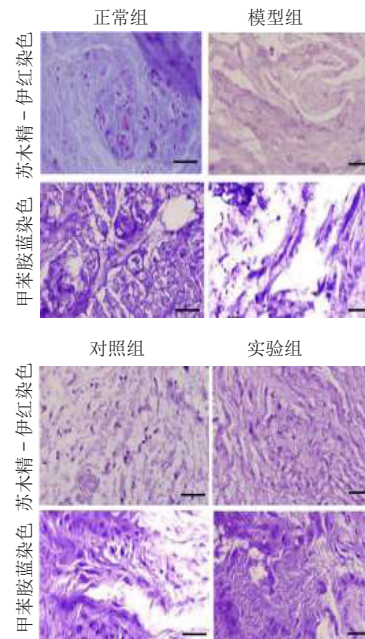
图 2 | 骨髓间充质干细胞表面抗原检测

Figure 2 | Detection of surface antigen of bone marrow mesenchymal stem cells



图注: 治疗后 12 周的 X 射线片显示, 模型组椎间盘高度下降, 对照组、实验组增加, 其中实验组椎间盘高度恢复好于对照组。治疗后 12 周 MRI 检查显示, 模型组椎间盘 T2 加权像信号降低, 对照组与实验组升高, 其中以实验组升高更明显

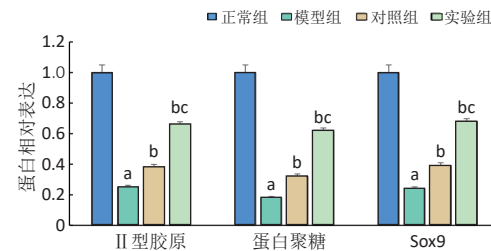
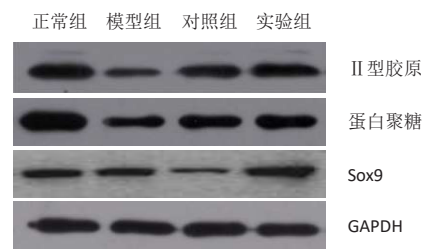
图 3 | 治疗后 12 周各组兔椎间盘影像学检查结果
Figure 3 | Imaging examination of intervertebral discs in each group 12 weeks after operation



图注: 模型组苏木精-伊红染色显示髓核组织破坏较明显, 甲苯胺蓝染色显示髓核无着色, 局部淡染。对照组苏木精-伊红染色显示髓核组织欠完整, 甲苯胺蓝染色显示髓核组织中度染色。实验组苏木精-伊红染色显示髓核组织较完整, 甲苯胺蓝染色显示髓核组织深染

图 4 | 治疗后 12 周各组兔髓核组织学观察结果 (标尺 = 50 μm)

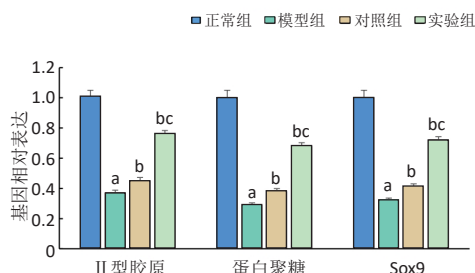
Figure 4 | Histological observation of rabbit nucleus pulposus in each group 12 weeks after operation (scale bars=50 μm)



图注: 与正常组对比, ^aP < 0.05; 与模型组对比, ^bP < 0.05; 与对照组对比, ^cP < 0.05

图 5 | 各组兔髓核组织 II 型胶原、蛋白聚糖及 Sox9 的蛋白表达

Figure 5 | Expression of collagen II type, proteoglycan and Sox9 protein in rabbit nucleus pulposus of each group



图注: 与正常组对比, ^aP < 0.05; 与模型组对比, ^bP < 0.05; 与对照组对比, ^cP < 0.05

图 6 | 各组兔髓核组织 II 型胶原、蛋白聚糖及 Sox9 的 mRNA 表达

Figure 6 | Expression of collagen II type, proteoglycan and Sox9 mRNA in rabbit nucleus pulposus of each group

3 讨论 Discussion

水凝胶作为一种生物材料,其固有的亲水性使其具有吸水膨胀及水化的特点,易于修饰,可体现出与不同生物组织相类似的机械和润滑性质,可注射及可交联的性质使其易于设计和操作,可具有微创修复软骨损伤的能力;此外还可均匀包裹细胞、传递生物分子及药物等优点,因此被广泛应用于椎间盘髓核组织的再生修复^[26-27]。注射水凝胶制剂被认为是治疗退行性椎间盘退变疾病的一种非常有前途的策略^[28-29],其不但可恢复椎生物力学,还可以减轻腰痛。用于椎间盘髓核再生及修复的水凝胶可分为天然、合成及复合水凝胶三大类,天然材料具有良好的生物相容性及较低的细胞毒性,但力学性能较差;合成材料具有较好的可控性与良好的力学性能,但是生物相容性较差,因此复合水凝胶是研究椎间盘再生修复与置换的重要方向。目前用于椎间盘的支架材料选择较多,包括丝素蛋白^[30-31]、脱细胞基质等天然材料与聚己内酯、聚氨酯、聚乳酸等人工合成高分子材料。其中丝素蛋白具有良好的生物相容性、可降解性与力学性能,目前已被应用于组织工程椎间盘,但其单独应用仍有不足,柔韧性较差、易脆,需对其进行化学修饰以进一步增强其力学性能。羟基磷灰石作为人体骨骼与牙齿的主要无机成分内部有相互连通的孔隙结构,对细胞的压迫小,在体液中性质稳定,并且与丝素蛋白具有较强的亲和力,能附着在丝素蛋白上^[32],因此实验将二者复合作为纤维环支架材料。预实验中显示该复合材料呈束状纳米纤维,具有良好的生物相容性与力学性能。

骨髓间充质干细胞具有多项分化潜能,体外实验证明其在适当的刺激条件下可分化为髓核样细胞,可作为退变椎间盘移植的种子细胞。蓝蔚仁等^[33]发现,大鼠髓核细胞外泌体可在体外诱导骨髓间充质干细胞向髓核样细胞分化。张宁峰等^[34]采用骨髓间充质干细胞条件培养基培养髓核细胞,发现骨髓间充质干细胞条件培养可促进髓核细胞的增殖,并促进细胞外基质蛋白的表达。白亦光等^[35]分别将髓核细胞与骨髓间充质干细胞移植入兔退变椎间盘内,通过MRI检查、病理、免疫组化等对比修复效果,发现骨髓间充质干细胞与髓核细胞一样可有效抑制椎间盘髓核组织的退变,有望成为髓核细胞的良好替代。

淫羊藿苷促进与骨组织相关细胞的增殖,包括成骨细胞、软骨细胞、骨膜细胞、间充质细胞等,表明淫羊藿苷在骨组织修复与重建中发挥着积极作用,具有潜在的临床应用价值。肖军等^[24]采用0.01, 0.1, 1, 10 $\mu\text{mol/L}$ 的淫羊藿苷体外诱导骨髓间充质干细胞分化为软骨细胞,发现淫羊藿苷呈浓度依赖性诱导骨髓间充质干细胞的成软骨分化,其中10 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下的软骨分化更明显,II型胶原和蛋白多糖表达更强烈。

此次实验MRI、苏木精-伊红染色与甲苯胺蓝染色病理切片、RT-PCR与Western blotting检测均显示,丝素蛋白/羟基磷灰石水凝胶联合淫羊藿苷与骨髓间充质干细胞移植治疗兔退变的椎间盘具有明显的效果,分析可能的原因为:①

在淫羊藿苷和髓核微环境的作用下骨髓间充质干细胞分化为髓核样细胞,使椎间盘中央髓核细胞数量明显增加;②移植的骨髓间充质干细胞通过分泌胰岛素样生长因子、血小板衍生生长因子等多种细胞因子促进退变髓核细胞的生长,增加髓核细胞数量,增加细胞外基质的合成,改善退变髓核细胞的功能;③随着髓核细胞数量的增加以及细胞外基质的增加,可部分分担椎体压力负荷,增加椎间隙高度,降低外轴纤维环与上下软骨板的退变程度。

当然,丝素蛋白/羟基磷灰石水凝胶与骨髓间充质干细胞移植治疗兔退变的椎间盘也具有一定的效果,但是弱于丝素蛋白/羟基磷灰石水凝胶联合淫羊藿苷与骨髓间充质干细胞移植的效果,推测淫羊藿苷促进移植骨髓间充质干细胞的增殖并分化为髓核样细胞,增加细胞外基质的合成,进一步逆转退变髓核细胞的功能。

综上所述,实验结果表明,骨髓间充质干细胞移植可增加中央髓核细胞数量,同时分泌更多的细胞外基质逆转残存的髓核细胞,并与髓核细胞一起分泌多种细胞外基质,改善退变的椎间盘;而加入淫羊藿苷可促进移植骨髓间充质干细胞的移植并定向分化为髓核样细胞,进一步增加中央髓核细胞数量及分泌更多的细胞外基质,进一步改善退变的椎间盘,结果有待进一步的验证。但是关于淫羊藿苷的最佳作用浓度还有进一步的实验探究。

作者贡献: 郭晓鹏进行实验设计,实验实施为郭晓鹏、尚晖,实验评估为刘莹松,资料收集与成文为郭晓鹏,刘莹松审核。

经费支持: 该文章未接受任何经费支持。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案由湖北医药学院动物实验伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在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。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 该文统计学方法已经湖北医药学院生物统计学专家审核。

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。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] SAMPARA P, BANALA RR, VEMURI SK, et al. Understanding the molecular biology of intervertebral disc degeneration and potential gene therapy strategies for regeneration: a review. *Gene Ther.* 2018; 25(2):67-82.

- [2] ANITUA E, PADILLA S. Biologic therapies to enhance intervertebral disc repair. *Regen Med.* 2018;13(1):55-72.
- [3] LI Z, CHEN X, XU D, et al. Circular RNAs in nucleus pulposus cell function and intervertebral disc degeneration. *Cell Prolif.* 2019;52(6):e12704.
- [4] LI Z, LI X, CHEN C, et al. Long non-coding RNAs in nucleus pulposus cell function and intervertebral disc degeneration. *Cell Prolif.* 2018;51(5):e12483.
- [5] XIA K, GONG Z, ZHU J, et al. Differentiation of Pluripotent Stem Cells into Nucleus Pulposus Progenitor Cells for Intervertebral Disc Regeneration. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2019;14(1):57-64.
- [6] HOLGUIN N, SILVA MJ. In-Vivo Nucleus Pulposus-Specific Regulation of Adult Murine Intervertebral Disc Degeneration via Wnt/Beta-Catenin Signaling. *Sci Rep.* 2018;8(1):11191.
- [7] KOS N, GRADISNIK L, VELNAR T. A Brief Review of the Degenerative Intervertebral Disc Disease. *Med Arch.* 2019;73(6):421-424.
- [8] SURI P, PEARSON AM, ZHAO W, et al. Pain Recurrence After Discectomy for Symptomatic Lumbar Disc Herniation. *Spine (Phila Pa 1976).* 2017;42(10):755-763.
- [9] KANNO H, AIZAWA T, HAHIMOTO K, et al. Minimally invasive discectomy for lumbar disc herniation: current concepts, surgical techniques, and outcomes. *Int Orthop.* 2019;43(4):917-922.
- [10] LOUIE PK, VARTHI AG, NARAIN AS, et al. Stand-alone lateral lumbar interbody fusion for the treatment of symptomatic adjacent segment degeneration following previous lumbar fusion. *Spine J.* 2018;18(11):2025-2032.
- [11] TABA HA, WILLIAMS SK. Lateral Lumbar Interbody Fusion. *Neurosurg Clin N Am.* 2020;31(1):33-42.
- [12] MELKE J, MIDHA S, GHOSH S, et al. Hofmann S. Silk fibroin as biomaterial for bone tissue engineering. *Acta Biomater.* 2016;31:1-16.
- [13] LI DW, HE J, HE FL, et al. Silk fibroin/chitosan thin film promotes osteogenic and adipogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Biomater Appl.* 2018;32(9):1164-1173.
- [14] PATIL S, SINGH N. Silk fibroin-alginate based beads for human mesenchymal stem cell differentiation in 3D. *Biomater Sci.* 2019;7(11):4687-4697.
- [15] GAIHRE B, USWATTA S, JAYASURIYA AC. Nano-scale characterization of nano-hydroxyapatite incorporated chitosan particles for bone repair. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2018;165:158-164.
- [16] 张亚楠, 严霞, 孟增东. Zn、Mg 增强羟基磷灰石骨修复材料临床应用与机制: 生物活性及成骨诱导的研究进展 [J]. *中国组织工程研究*, 2020,24(4):606-611.
- [17] 岳聚安, 郭晓忠, 王冉东, 等. 纳米羟基磷灰石 / 聚酰胺 66 支撑棒结合同种异体骨治疗 ARCO III 期股骨头坏死 [J]. *中国组织工程研究*, 2020,24(28):4485-4491.
- [18] 王志平, 赵蒙蒙, 董志恒, 等. 纳米羟基磷灰石复合树脂与牙釉质之间粘接界面电镜观察 [J]. *口腔医学研究*, 2019,35(5):457-460
- [19] 黄术, 吴江怡, 杨君君, 等. 天冬氨酸修饰纳米羟基磷灰石 / 聚乳酸复合物制备软骨组织工程支架及其生物性能研究 [J]. *中国医学物理学杂志*, 2018,35(5):616-620.
- [20] 臧晓龙, 孙健, 李亚莉, 等. 3D 生物打印构建聚乳酸羟基乙酸 / 纳米羟基磷灰石支架骨形态发生蛋白 2 缓释复合体的实验研究 [J]. *中国组织工程研究*, 2016,20(16):2405-2411.
- [21] 徐瑞, 黄鹏, 张祎冰, 等. miR-205-5p/PRKCA/p38 信号通路在淫羊藿苷抑制动脉粥样硬化中的介导作用 [J]. *中国老年学杂志*, 2020,40(10):2169-2176.
- [22] 杨全中, 张煜, 王亚娟, 等. 淫羊藿苷激活 CaMK II -JNK 通路抑制人非小细胞肺癌 A549 细胞存活和转移特性 [J]. *中国公共卫生*, 2020,36(7):1014-1019.
- [23] 鞠静, 谭人千, 钟勇, 等. 淫羊藿苷对气管切开模型大鼠早期 β -防御素 -2 和 T 细胞亚群的影响 [J]. *中南大学学报 (医学版)*, 2020,45(1):1-7.
- [24] 肖军, 马德彰, 杨钟华, 等. 淫羊藿苷促进入骨髓间充质干细胞成软骨分化的研究 [J]. *中华实验外科杂志*, 2013,30(7):1357-1359
- [25] 闫建国, 周亚莉, 邢雪琨, 等. 辛硫磷对大鼠骨髓间充质干细胞 DNA 损伤、细胞凋亡及 P53 蛋白表达的影响 [J]. *卫生研究*, 2013,42(4):664-669,681.
- [26] WATANABE A, MAINIL-VARLET P, DECAMBRON A, et al. Efficacy of HYADD[®]4-G single intra-discal injections in a rabbit model of intervertebral disc degeneration. *Biomed Mater Eng.* 2019; 30(4):403-417.
- [27] WANG F, NAN LP, ZHOU SF, et al. Injectable Hydrogel Combined with Nucleus Pulposus-Derived Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Degenerative Intervertebral Disc in Rats. *Stem Cells Int.* 2019;2019:8496025.
- [28] LIGORIO C, ZHOU M, WYCHOWANIEC JK, et al. Graphene oxide containing self-assembling peptide hybrid hydrogels as a potential 3D injectable cell delivery platform for intervertebral disc repair applications. *Acta Biomater.* 2019;92:92-103.
- [29] ALINEJAD Y, ADOUNGOTCHODO A, GRANT MP, et al. Injectable Chitosan Hydrogels with Enhanced Mechanical Properties for Nucleus Pulposus Regeneration. *Tissue Eng Part A.* 2019;25(5-6):303-313.
- [30] GHORBANI M, AI J, NOURANI MR, et al. Injectable natural polymer compound for tissue engineering of intervertebral disc: In vitro study. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;80:502-508.
- [31] NEO PY, SHI P, GOH JC, et al. Characterization and mechanical performance study of silk/PVA cryogels: towards nucleus pulposus tissue engineering. *Biomed Mater.* 2014;9(6):065002.
- [32] 唐俊杰, 李文杰, 李根, 等. 骨组织工程诱导性支架材料修复骨缺损 [J]. *中国组织工程研究*, 2015,19(3):340-346.
- [33] 蓝蔚仁, 潘赛, 孙超, 等. 大鼠髓核细胞来源外泌体对骨髓间充质干细胞向髓核样细胞分化的作用研究 [J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2019,29(1):74-81.
- [34] 张宁峰, 袁俊虎, 苏帆, 等. 骨髓间充质干细胞条件培养基对退变髓核细胞生物学活性及细胞外基质表达的调节作用 [J]. *中华实验外科杂志*, 2019,36(11):1945-1948.
- [35] 白亦光, 陈巧玲, 刘康, 等. 髓核细胞和骨髓间充质干细胞对早期椎间盘退行性变干预作用对比 [J]. *广西医科大学学报*, 2019,36(12):1902-1908.

(责任编辑: GW, ZN, ZH)