

## 正常及退变髓核细胞诱导骨髓间充质干细胞向髓核方向分化效果比较

胡浪<sup>1,2</sup>, 李大鹏<sup>2</sup>, 黄永辉<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> 江苏大学临床医学院, 江苏 镇江 212013; <sup>2</sup> 江苏大学附属医院骨科, 江苏 镇江 212001)

**[摘要]** 目的:分离培养SD大鼠退变髓核细胞(degenerative nucleus pulposus cells, dNPCs)、正常髓核细胞(nucleus pulposus cells, NPCs)及骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs),通过Transwell非直接接触体外共培养方法比较dNPCs和NPCs对BMSCs诱导作用。方法:针刺抽吸法制备SD大鼠退变椎间盘动物模型,取正常及已退变的生长良好的第2代NPCs及生长良好的第3代骨BMSCs,将dNPCs或NPCs等比例与BMSCs分别复合藻酸盐接种于Transwell共培养系统中进行体外非接触共培养(上室接种BMSCs,下室接种dNPCs或NPCs作为dNPCs共培养组和NPCs共培养组)7d后回收上室BMSCs。单独NPCs和单独BMSCs培养组分别作为阳性和阴性对照。对各组Ⅱ型胶原(collagenⅡ)和多功能蛋白聚糖(aggrecan)行RT-PCR和Western blot检测。结果:collagenⅡ和aggrecan的mRNA表达在两共培养组均有较高表达,但NPCs共培养组较dNPCs共培养组更加接近单纯NPCs组,而单纯BMSCs组未见明显表达;collagenⅡ和aggrecan的蛋白表达量在两共培养组中均较高,但NPCs共培养组较dNPCs共培养组更加接近单纯NPCs组,而单纯BMSCs组未见明显表达。结论:在Transwell非直接接触共培养条件下dNPCs和NPCs均能诱导BMSCs向髓核方向分化,并且NPCs对BMSCs向髓核方向分化的诱导作用更加明显。

**[关键词]** 椎间盘退变;髓核细胞;骨髓间充质干细胞;共培养;分化

**[中图分类号]** R681.53

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2014)05-621-06

**doi:**10.7655/NYDXBNS20140517

## Effects of normal and degenerative nucleus pulposus cells on differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into nucleus pulposus-like cells

Hu Lang<sup>1,2</sup>, Li Dapeng<sup>2</sup>, Huang Yonghui<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> School of Clinical Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013; <sup>2</sup> Department of Orthopaedics, Affiliated Hospital, Jiangsu University, Zhenjiang 212001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To isolate and culture the normal and degenerative nucleus pulposus cells (NPCs) and bone mesenchymal stem cells (BMSCs) of SD rats, and then to compare the effects of normal and degenerative NPCs on BMSCs differentiated into nucleus pulposus-like cells by a 3D noncontact coculture method. **Methods:** The animal models with degenerative nucleus pulposus were established by acupuncture and aspiration. The BMSCs, normal and degenerated NPCs of SD rats were isolated and cultured. The cells growth condition was observed by light microscope, and the second generation of NPCs and dNPCs and the third generation of BMSCs were selected to combine alginate gel stents and culture in transwell plate. The BMSCs+NPCs or BMSCs+dNPCs were co-cultured *in vitro* as experiment group; the NPCs and BMSCs were cultured alone as positive and negative control, respectively. 7 days later, the collagenⅡ and aggrecan of recycled BMSCs of each group were detected by western blot and RT-PCR. **Results:** The mRNA of collagenⅡ and aggrecan showed a high level both in two co-culture groups, but the BMSCs/NPCs co-culture group is more similar to NPCs sample than BMSCs/dNPCs co-culture group. The results of the content of collagenⅡ and aggrecan was the same with mRNA level. **Conclusion:** Under a 3D non-contact co-culture system, both the normal and degenerative NPCs can induce BMSCs differentiation into nucleus pulposus-like cells, but the induction effects of normal NPCs is more obviously than degenerative NPCs.

**[Key words]** Intervertebral disc degeneration; Nucleus pulposus cells; Bone mesenchymal stem cells; Co-culture; differentiation

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(05): 621-626]

**[基金项目]** 镇江市科技计划项目(SH2010031);镇江市医学重点人才项目

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: huangyh8855@163.com

椎间盘退变性疾病在临床骨科十分常见,常引起脊柱生物力学功能紊乱和腰背疼痛。而椎间盘是由中央的髓核、周围的纤维环和上下软骨终板组成,无血液和淋巴供应,营养主要来源于终板等部位组织液的渗透,一旦发生退变,很难自行修复,而且退变晚期的椎间盘细胞代谢能力下降且不断降解,导致其合成基质的功能基本丧失<sup>[1]</sup>。近年来,随着组织工程学的兴起和发展,细胞移植和组织重建技术治疗椎间盘退变疾病成为众多学者研究的热点。骨髓间充质干细胞(bone marrow derived mesenchymal stem cells, BMSCs)是一种能够向多种组织分化的多能干细胞,且来源广,无免疫原性,是目前研究较多的种子细胞之一<sup>[2-3]</sup>, Xu等<sup>[4]</sup>将 BMSCs 与髓核细胞(nucleus pulposus cells, NPCs)在体外共培养发现 BMSCs 能够向髓核样细胞方向分化; Richardson等<sup>[5]</sup>将 BMSCs 与 NPCs 直接接触共同培养,也检测出 BMSCs 向髓核样细胞分化。这说明在共培养条件下, NPCs 能够诱导 BMSCs 向髓核方向分化。所以用 BMSCs 作为种子细胞构建组织工程髓核治疗椎间盘退变是较好的选择。然而作为 BMSCs 向髓核方向分化的诱导剂, NPCs 本身来源是极其有限的,而且目前临床上通过手术治疗椎间盘退变性疾病所获得的髓核组织多数都已发生退变。本研究通过对比 NPCs 和 dNPCs 对 BMSCs 的诱导效果来分析两者之间的诱导差异,如果 dNPCs 在一定条件下能如 NPCs 一样对 BMSCs 起到同等效果的诱导作用,那么将会为细胞移植和组织工程方法治疗椎间盘退变性疾病的研究提供更为广阔的前景。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

DMEM/F12(DF12)培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(Gibco公司,美国), II型胶原和蛋白聚糖多克隆抗体(Santa Cruz公司,美国); CO<sub>2</sub> 恒温细胞培养箱(FORMA公司,美国), 倒置相差显微镜(NIKON公司,日本), 医用超净工作台(江苏苏净), PCR仪(Applied Biosystems公司,美国), Wester blot仪(Bio-Rad公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 SD大鼠椎间盘退变动物模型的建立

将 300~350 g 的雄性 SD 大鼠(江苏大学动物中心提供)用 10%水合氯醛以 4 ml/kg 腹腔麻醉,麻醉成功后背部剪毛,碘伏消毒铺巾后逐层切开皮肤、皮下筋膜、脊旁肌肉,显露 L2~L5 右侧关节突和横突,

用 21G 穿刺针沿关节突右侧偏下即椎间孔刺入椎间盘髓核,反复针刺抽吸椎间盘髓核 8~10 次后拔出针头。L2~L5 每个椎间盘重复以上操作后,碘伏、生理盐水冲洗,逐层缝合,纱布包扎。4 周后拍核磁共振,观察大鼠腰椎间盘退变情况。

#### 1.2.2 NPCs 及 dNPCs 的分离培养与鉴定

两种细胞分离培养方法相同,现以 NPCs 的分离培养方法为例:将 3 只腰椎间盘退变的 SD 大鼠用过量的 10%水合氯醛腹腔注射处死。无菌条件下取出大鼠退变腰椎节段,仔细剔除椎旁肌肉等组织后横切纤维环,暴露髓核并用眼科剪小心取出剪碎置于干净培养皿中,然后加入 0.25%的胰蛋白酶 37℃ 消化 20 min。再 500 g 离心 5 min 后弃上清液,加入 DF12 培养液(含 15%胎牛血清)吹匀细胞后将细胞悬液接种于 25 cm<sup>2</sup> 的细胞培养瓶中,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中静置培养,7 d 后半量换液,10 d 全量换液,以后每 3~4 d 全量换液 1 次,倒置显微镜观察细胞生长情况。15 d 左右细胞大部分汇集成片,此时用 0.25%胰蛋白酶消化,按 1:1 比例(以后按 1:2)传代培养,倒置显微镜下观察细胞生长情况,选取第 2 代 NPCs 备用。

#### 1.2.3 BMSCs 的分离培养与鉴定

取 100 g 左右 6~8 周龄的 SD 大鼠,雌雄不限(江苏大学动物中心提供),颈椎脱臼法处死大鼠,消毒后在无菌条件下完整取出双下肢股骨和胫腓骨,组织剪尽可能少地剪去骨两端的软骨,以刚好暴露出红色骨髓腔为宜,然后用 1 ml 无菌注射器抽吸含 10%胎牛血清的 DF12 培养液,刺入骨髓腔冲出骨髓液于无菌培养皿内,反复冲洗数次。用滴管轻轻敲打骨髓液,制成单细胞悬液后接种于 2 个 25 cm<sup>2</sup> 的细胞培养瓶中,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。24 h 后半量换液,48 h 全量换液,以后每 3~4 d 全量换液 1 次,倒置显微镜下观察细胞生长情况。10 d 左右 80%~90%细胞融合,此时用 0.25%胰蛋白酶消化,按 1:2 比例传代培养,倒置显微镜下观察细胞生长情况,选取第 3 代 BMSCs 备用。

#### 1.2.4 dNPCs、NPCs 及 BMSCs 与藻酸盐凝胶复合物的制备

准备 0.150 mol/L 的 NaCl 溶液和 0.102 mol/L 的 CaCl<sub>2</sub> 溶液各 100 ml,用广口瓶装取高压蒸汽灭菌后置于 4℃ 冰箱内备用。将 100 ml 0.150 mol/L 的 NaCl 溶液倒入干净烧杯中,再称取 1.0 g 藻酸盐(低黏度, Sigma 公司,美国)倒入,并放入磁力搅拌珠,置于加热搅拌器上,60℃ 搅拌约 2.5 h 直至藻酸盐完

全溶解,制成1%藻酸盐溶液后用广口瓶装取,高压蒸汽灭菌,4℃冰箱保存备用。

用1%藻酸盐溶液将备用的dNPCs、NPCs及BMSCs分别制成细胞悬液,细胞计数板计数,使细胞密度为 $1 \times 10^6$ 个/ml。用1 ml的微量移液器吸取细胞悬液垂直缓慢滴入装有0.102 mol/L的CaCl<sub>2</sub>溶液的培养皿中,5~10 min后混有藻酸盐的细胞悬液聚合成4 mm左右的凝胶微珠,吸出多余的CaCl<sub>2</sub>溶液,即制成3种藻酸盐复合物。

### 1.2.5 dNPCs、NPCs和BMSCs共培养体系的建立

将BMSCs藻酸盐复合物接种到Transwell 6孔板上层插槽中,下室接种dNPCs藻酸盐复合物作为dNPCs共培养组;取另一块Transwell 6孔板,将BMSCs藻酸盐复合物接种到上层插槽中,下室接种NPCs藻酸盐复合物作为NPCs共培养组。另取2块Transwell 6孔板,分别接种BMSCs藻酸盐复合物和NPCs藻酸盐复合物作为单独BMSCs培养组和单独NPCs培养组。然后加入含10%胎牛血清的DF12培养液,置于37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养,每3~4 d全量换液1次,共培养7 d后回收各组细胞。

### 1.2.6 共培养体系BMSCs的回收

柠檬酸钠粉剂1.618 g加入100 ml 0.15 mol/L的NaCl溶液中,制成55 mmol/L的柠檬酸钠溶液后广口瓶装取,高压蒸汽灭菌,4℃冰箱保存备用。在无菌条件下取出Transwell 6孔板上层插槽,将BMSCs藻酸盐微珠倒入干净培养皿中,然后滴加55 mmol/L的柠檬酸钠溶液淹没凝胶微珠,将培养皿置于37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中孵育10~15 min,待微珠完全溶解后全部转移至离心管,750 g离心5 min,弃上清液。单独培养的BMSCs和NPCs回收方法相同。

### 1.2.7 RT-PCR检测collagen II和aggrecan的mRNA表达

共培养7 d后,将1 ml TRIzol(Invitrogen公司,美国)加入到收集的细胞中,并用枪头吹打混匀,冰上静置5 min后加入氯仿200  $\mu$ l,充分混匀室温静置15 min,然后4℃ 12 000 g离心8 min,将上层水相(约500  $\mu$ l)吸取至1.5 ml EP管中并加入500  $\mu$ l异丙醇,混匀室温静置10 min后4℃ 12 000 g离心10 min,弃上清液,沉淀中加入75%的乙醇1 ml,漩涡振荡30 s,悬浮后再次离心(4℃,7 500 g,5 min),弃上清液,沉淀室温干燥10 min后溶于DEPC水中(无RNase水),-70℃储存备用。测定总RNA浓度,用RT试剂盒将RNA反转录为cDNA,然后进行

PCR扩增,引物均由生工生物工程(上海)有限公司合成。II型胶原RT-PCR反应条件:95℃ 3 min,95℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 30 s,72℃ 10 min;共进行36个循环。Aggrecan的RT-PCR反应条件均为:95℃ 3 min,95℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,72℃ 10 min;共进行36个循环。 $\beta$ -actin反应条件:95℃ 3 min,95℃ 30 s,62℃ 30 s,72℃ 30 s,72℃ 10 min;共进行30个循环。PCR产物经电泳、上海GIS2008凝胶成像系统拍照;显色条带图像分析系统检测其吸光度值,与内参 $\beta$ -actin条带比值为mRNA表达水平参数。

PCR检测目的基因的引物设计: $\beta$ -actin:5'-tgacgtggacatccgcaaag-3',5'-ctggaaggtggacagcgagg-3',目的片段235 bp;Aggrecan:5'-ctctggatctatcggtgtga-3',5'-ctcgggtcaaagtcagtggt-3',目的片段131 bp;Collagen II:5'-tcaggaatttggtgtggacata-3',5'-ccggactgtgaggttaggatag-3',目的片段178 bp。

### 1.2.8 Western blot检测collagen II和aggrecan的蛋白表达量

共培养7 d后,将收集的细胞充分裂解,BSA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,2  $\times$ 上样缓冲液调整蛋白浓度,100℃煮沸5 min,变性的蛋白样品用10%SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳,半干法电转移至PVDF膜上,BSA液室温封闭2 h,分别与collagen II、aggrecan及 $\beta$ -actin多克隆抗体4℃孵育过夜,TBST漂洗3  $\times$  10 min,二抗室温孵育2 h,漂洗10 min  $\times$  3次后与ECL化学发光显色剂显色,曝光拍照,凝胶图像分析系统分析光密度值。

### 1.3 统计学方法

数据统计用SPSS16统计软件包,以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,单因素方差分析和LSD-*t*检验进行组间比较, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

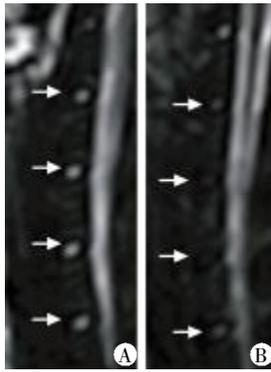
### 2.1 针刺抽吸法制备SD大鼠椎间盘退变动物模型的MRI观察结果

术后4周对SD大鼠予以MRI检查,可见建模后的大鼠L2~L5椎间盘髓核信号(T2加权像)明显减低,椎间隙高度也有所下降,而未做手术的正常大鼠椎间盘髓核信号强度无明显改变(图1)。

### 2.2 细胞形态观察结果

#### 2.2.1 SD大鼠BMSCs生长形态观察

全骨髓贴壁法所得的原代BMSCs呈球形悬浮于培养液中,其中可见大量红细胞等其他血系细胞,24 h后已有大量细胞贴壁,24 h和48 h换液后大部



A:正常组(箭头所指为正常椎间盘);B:针刺组(箭头所指为退变椎间盘)。

图1 各组大鼠腰椎间 T2MRI 矢状位

Figure 1 Sagittal T2MRI images of the SD rat's lumbar

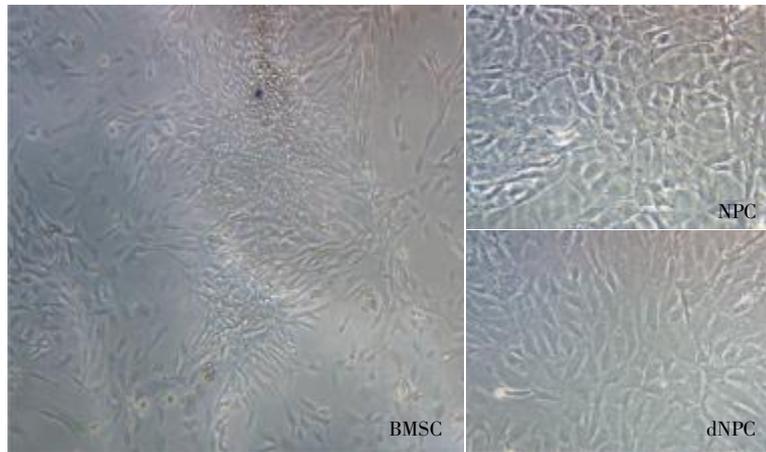
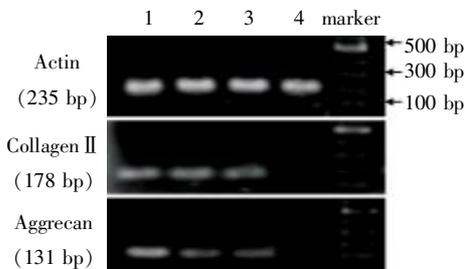


图2 细胞形态学观察(倒置显微镜,×100)

Figure 2 The cell morphology by inverted microscope(×100)

2.3 RT-PCR

collagen II 和 aggrecan 的 mRNA 在两共培养组中均有较高表达,但 NPCs 共培养组较 dNPCs 共培养组更加接近单纯 NPCs 组,而单纯 BMSCs 组未见明显表达(图 3,表 1)。



1:单纯正常髓核组(NPCs);2:正常髓核细胞共培养组(BMSCs/dNPCs);3:退变髓核细胞共培养组(BMSCs/dNPCs);4:单纯骨髓间充质干细胞组(BMSCs);M:Marker。

图3 II型胶原、SOX9 和 aggrecan 的 RT-PCR电泳结果

Figure 3 Reverse transcription polymerase chain reaction of collagen II ,SOX9 and aggrecan

分悬浮杂细胞已清除,贴壁的 BMSCs 向四周伸展,形态不规则,呈梭形或多角形。3 d 后细胞增殖明显增多,7~10 d 后贴壁细胞出现放射状或漩涡状增殖集落并相互融合,10~14 d 后可见细胞融合达 80%~90%,贴壁细胞铺满整个培养瓶底并相互重叠,此时已可传代(图 2)。

2.2.2 SD 大鼠 NPCs 形态观察

原代 NPCs 贴壁之前呈球形单个散开或多个聚集成团悬浮于培养液中。细胞贴壁能力较弱,3~4 d 才开始贴壁,7~10 d 后贴壁细胞明显增多,呈梭形或不规则多角形,细胞核呈卵圆形并可见核仁。12~14 d 细胞增殖明显增多,汇集成片,此时已可传代。NPCs 及 dNPCs 在形态上无明显区别(图 2)。

表 1 各组细胞目的基因表达水平

Table 1 Target gene expression of each group (X ± S, n = 3)

组别	目的基因	
	collagen II	aggrecan
NPC	0.818 5 ± 0.021 6	0.529 9 ± 0.014 9
NPC/BMSCs	0.582 2 ± 0.021 0	0.211 1 ± 0.002 3
dNPC/BMSCs	0.417 6 ± 0.030 7 <sup>#</sup>	0.186 2 ± 0.012 6 <sup>#</sup>

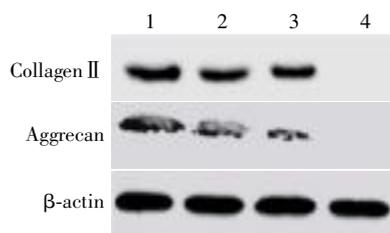
与 NPCs 共培养组比较,\*P < 0.05。

2.4 Western blot

collagen II 和 aggrecan 在两共培养组均有较高含量,但 NPCs 共培养组较 dNPCs 共培养组更加接近单纯 NPCs 组,而单纯 BMSCs 组未见明显表达(图 4,表 2)。

3 讨论

随着年龄增长,椎间盘在多个方面(如体积、形状、组成、结构及生物力学等)不断发生变化,主要表



1: 单纯正常髓核组(NPCs);2: 正常髓核细胞共培养组(BMSCs/dNPCs);3: 退变髓核细胞共培养组(BMSCs/dNPCs);4: 单纯干细胞组(BMSCs)。

图 4 II 型胶原和多功能蛋白聚糖 Western blot 电泳结果

Figure 4 Western blot of collagen II and aggrecan

表 2 各组目的蛋白的含量水平

Table 2 Target protein of each group

(n = 3,  $\bar{x} \pm s$ )

级别	蛋白	
	collagen II	aggrecan
NPC	0.550 5 ± 0.047 2	0.294 6 ± 0.012 6
NPC/BMSCs	0.300 4 ± 0.002 8*	0.156 6 ± 0.022 5*
dNPC/BMSCs	0.218 5 ± 0.335 4#	0.081 7 ± 0.005 7#

与 NPCs 共培养组比较,\*P < 0.05。

现为 NPCs 及细胞外基质的改变(如 NPCs 坏死、凋亡,aggrecan 和 collagen II 等细胞外基质合成减少甚至出现胶原类型转换如 collagen II 向 collagen I 转化,含水量继发减少)从而导致椎间盘功能减退,椎间高度下降,椎间盘力学结构改变,最终出现颈肩腰痛和四肢放射痛等一系列临床症状<sup>[6]</sup>。椎间盘中央的髓核是胶冻状组织,NPCs 是软骨样细胞,而细胞外基质主要由 aggrecan 和 collagen II 组成<sup>[7-8]</sup>。所以 aggrecan 和 collagen II 含量的变化以及基因表达情况能够在一定程度上反应出 NPCs 的特性,同时也成为 BMSCs 是否向髓核方向分化的检测指标。

目前,临床上对椎间盘退变性疾病如椎间盘突出症、椎间不稳症等疾病的治疗方法包括保守(如卧床休息、牵引等)和手术(如椎间盘摘除、椎间融合内固定等)治疗。但是无论哪种治疗方法都只能暂时缓解症状,而不能从根本上延缓或逆转椎间盘的进一步退变。已有研究表明,BMSCs 与 NPCs 共培养能够向 NPCs 方向分化<sup>[4-5]</sup>。因此,利用 BMSCs 来修复退变椎间盘成为一种新的可能的治疗方向,如细胞移植、组织工程等。然而,实现 BMSCs 向髓核方向分化需要通过与 NPCs 共培养来实现,这表明 NPCs 在这个共培养过程中起到了非常重要的作用。而作用的具体机制目前还不太清楚,所以设想通过对比 NPCs 及 dNPCs 对 BMSCs 的促分化效果,分析两者之间是否存在明显差异。如果有明显差异,说明

NPCs 与 dNPCs 之间存在某种不同点,而正是这种不同点对 BMSCs 的分化起到了至关重要的作用。另外,无论是 NPCs 还是 dNPCs 作为 BMSCs 分化的诱导细胞,这两种细胞的来源都是极其有限的。从目前临床而言,dNPCs 相对更多一些,因为髓核摘除手术所获得的髓核组织基本已经发生了退变。如果两种细胞对 BMSCs 的促分化作用无显著差异,那么就能用 dNPCs 替代 NPCs 与 BMSCs 共培养诱导分化,甚至通过 BMSCs 直接利用细胞移植技术或组织工程技术来治疗退变的椎间盘。如果以上两种细胞对 BMSCs 的促分化用有显著差异,那么就可以对这两种细胞作进一步研究,探讨能否通过对相对较容易获得的 dNPCs 予以一定的干预,从而消除这种差异。

Vadalà 等<sup>[9]</sup>发现 BMSCs 即使顺利移植到椎间盘内,由于没有合适细胞支架材料为移植细胞提供一个适宜的增殖、分化环境以及一定的机械稳定作用,所移植的 BMSCs 容易向椎间盘的前外侧渗漏而发生异位骨化。藻酸盐是一种从褐藻中提取的酸性多糖,遇到二价金属离子就会络合成一种亲水性较好且能让营养物质顺利渗透、扩散的网状水凝胶,而且这种可降解性的、具有良好组织相容性的水凝胶无论是其本身还是降解产物对人体都无毒害作用<sup>[10]</sup>,所以本研究将藻酸盐作为细胞支架,通过其特性提供一个能够稳定细胞、防止其流失的三维生长环境,而且可以实现细胞间的营养物质及所分泌的细胞因子自由交换。

虽然本研究表明 dNPCs 能够诱导 BMSCs 向髓核方向分化,但也有学者认为 dNPCs 所处的内环境功能紊乱,在这样的条件下 BMSCs 能否向髓核方向分化目前尚存争议。所以一方面,如果能在体外对 BMSCs 先予以一段时间的诱导分化,再将其移植到退变椎间盘,或许能解决其方向分化的问题。另一方面,如果能消除 NPCs 与 dNPCs 之间的差异,使 dNPCs 达到和 NPCs 一样的诱导效果,那么这种差异的消除也许就解决了退变椎间盘微环境紊乱的问题。

通过本研究发现,体外诱导 BMSCs 定向分化是可以实现的,然而 dNPCs 和 NPCs 对 BMSCs 诱导作用存在差异,即 NPCs 的诱导效果更好。但是 NPCs 来源有限,而 dNPCs 又有一定诱导作用,那么如果能通过对相对较容易获得的 dNPCs 予以一定的干预,从而达到和 NPCs 同等的诱导效果,将为今后 BMSCs 移植治疗椎间盘退变性疾病打下基础。

虽然目前对 dNPCs 的干预方法还有待研究,但

是本研究能提供一定的指导方向,因为本研究是用 Transwell 板构建的体外共培养体系,而 Transwell 板是美国 Corning 公司制造的一种共培养系统<sup>[11-12]</sup>,中间由具有通透性的聚碳酸酯膜(带有 0.4  $\mu\text{m}$  的孔径)隔成上下两室,分子量大于 70 000 的细胞成分如蛋白多糖(200 000)、II 型胶原(190 000)等不能通过此膜,而多种分子量不超过 70 000 的细胞因子可以通过,包括胰岛素样生长因子 1(IGF-1)、内皮生长因子(EGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )等<sup>[13]</sup>。Bi 等<sup>[14]</sup>研究表明,10  $\mu\text{g/L}$  的 TGF- $\beta$  可以很好地诱导 BMSCs 向软骨样细胞分化。众多研究表明,TGF- $\beta$ 1、IGF 等可以诱导 BMSCs 向软骨样细胞分化<sup>[15]</sup>。所以,本研究对 BMSCs 的分化起诱导作用可能是通过 Transwell 板隔膜的细胞因子等小分子物质,而且这些小分子物质是 NPCs 分泌的,或者与 NPCs 密切相关。两共培养组的 NPCs 及 dNPCs 数量不同,可能导致细胞因子分泌量有差异,或者是两共培养 NPCs 及 dNPCs 分泌细胞因子的能力有所差异,以致穿过 Transwell 板隔膜的细胞因子等小分子物质减少,最终导致 BMSCs 分化的差异。然而,具体是哪些小分子物质促进了 BMSCs 分化,以及这些小分子物质与 NPCs 存在什么样的关系,能否通过改变 dNPCs 浓度或者增减相应细胞因子浓度而增强其对 BMSCs 的分化诱导效果目前还不清楚,希望在后续实验中进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] Rajasekaran S, Balu JN, Arun R, et al. A serial magnetic resonance imaging study documenting the influence of the endplate on diffusion in normal and degenerate discs [J]. *Spine*, 2004, 29(23): 1652-1667
- [2] Mezey E. The therapeutic potential of bone marrow - derived stromal cells [J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(10): 2683-2687
- [3] Arthut A, Zannettino A, Gronthos S. The therapeutic applications of multipotential mesenchymal/stromal stem cells in skeletal tissue repair [J]. *J Cell Physiol*, 2009, 218(2): 237-245
- [4] Xu Y, Yu X, Xu L. Co-culture of bone marrow mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells in vitro [J]. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2011, 15(27): 4964-4968
- [5] Richardson SM, Walker RV, Parker S, et al. Intervertebral disc cell mediated mesenchymal stem cell differentiation [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(3): 707-716
- [6] Livshits G, Popham M, Malkin I, et al. Lumbar disc degeneration and genetic factors are the main risk factors for low back pain in women; the UK Twin Spine Study [J]. *Ann Rheum Dis*, 2011, 70(10): 1740-1745
- [7] Kepler CK, Anderson DG, Tannoury C, et al. Intervertebral disk degeneration and emerging biologic treatments [J]. *J Am Acad Orthop Surg*, 2011, 19(9): 543-553
- [8] Choi YS. Pathophysiology of degenerative disc disease [J]. *Asian Spine J*, 2009, 3(1): 39-44
- [9] Vadalà G, Sowa G, Hubert M, et al. Mesenchymal stem cells injection in degenerated intervertebral disc: cell leakage may induce osteophyte formation [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2012, 6(5): 348-355
- [10] Tay LX, Ahmad RE, Dashtdar H, et al. Treatment outcomes of alginate-embedded allongenic mesenchymal stem cells versus autologous chondrocytes for the repair of focal articular cartilage defects in a rabbit model [J]. *Am J of Sports Med*, 2012, 40(1): 83-90
- [11] Eslaminejad MB, Taghiyar L. Co-culture of mesenchymal stem cells with mature chondrocytes: producing cartilage construct for application in cartilage regeneration in vitro cell [J]. *Dev Biol Anim*, 2009, 36(6): 492-498
- [12] 王万宗, 陈宗雄, 刘晓强. 骨髓间充质干细胞与关节软骨细胞 Transwell 共培养诱导形成软骨 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(38): 7041-7044
- [13] Thompson JP, Oegema TJ, Bradford DS. Stimulation of mature canine Intervertebral disc by growth factors [J]. *Spine*, 1991, 16(3): 253-260
- [14] Bi X, Yang X, Bostrom MP, et al. Fourier transform infrared imaging spectroscopy investigations in the pathogenesis and repair of cartilage [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1758(7): 934-941
- [15] Gay I, Schwartz Z, Sylvia VL, et al. Lysophospholipid regulates release and activation of latent TGF-beta1 from chondrocyte extracellular matrix [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1684(1-3): 18-28

[收稿日期] 2013-11-27