**分类号： R683.2**  **学校代码：**  **10114**

**密** 级：  **学** 号 ： **DR2011034**

**SD 大鼠 NPMSC 和 BMSC 在体外诱导条件下向软骨细胞**

**分化能力的研究**

**The ability to form cartilage of NPMSC and BMSC in SD rats**

**研 究 生： 张 辉**

**指导教师：** 马 迅 **教授 专业名称：** **外科学**

**研究方向：** **脊柱脊髓损伤 学位类型：** **学术 学位**

**所在学院：** **第二临床医学院**

**中国 ft西**

**二 O 一五年五月八日**

**目 录**

[**中文摘要** I](#_bookmark0)

[**英文摘要**VII](#_bookmark1)

[**常用缩写词中英文对照表** XV](#_bookmark2)

[**前 言** 1](#_bookmark3)

[**第一部分 NPMSC 的分离培养鉴定** 3](#_bookmark4)

[1 **材料与方法** 4](#_bookmark5)

[1.1 实验动物 4](#_bookmark6)

[1.2 主要试剂和仪器 4](#_bookmark7)

[1.3 试验方法 6](#_bookmark8)

[**2结 *果*** 15](#_bookmark9)

[2.1 NPMSC 细胞形态观察 15](#_bookmark10)

[2.2 PCR 检测 NPMSC 干细胞基因表达 15](#_bookmark11)

[2.3 PCR 检测 NPMSC 干细胞表面标记物 16](#_bookmark12)

[2.4 NPMSC 成骨、成脂、成软骨诱导分化 17](#_bookmark13)

[**3讨 *论*** 19](#_bookmark14)

[**第二部分 NPMSC 和 BMSC 增殖能力和多向分化能力的比较** 21](#_bookmark15)

[1 **材料与方法**22](#_bookmark16)

[1.1 实验动物 22](#_bookmark17)

[1.2 主要试剂和仪器 22](#_bookmark18)

[1.3 试验方法 24](#_bookmark19)

[**2结 *果*** 36](#_bookmark20)

[2.1 NPMSC、BMSC 细胞形态观察 36](#_bookmark21)

[2.2 NPMSC、BMSC 细胞增殖能力的比较 37](#_bookmark22)

[2.3 PCR 检测 NPMSC、BMSC 干细胞基因表达 37](#_bookmark23)

[2.4 PCR 检测 NPMSC、BMSC 干细胞表面标记物 38](#_bookmark24)

[2.5 NPMSC、BMSC 成骨、成脂、成软骨诱导分化 39](#_bookmark25)

[2.6 PCR 检测 NPMSC、BMSC 诱导后成骨、成脂、成软骨基因的表达 40](#_bookmark26)

[**3** **讨** 论 42](#_bookmark27)

[**第三部分NPMSC和BMSC成软骨能力的比较** 44](#_bookmark28)

### [1 材料和方法 45](#_bookmark29)

[1.1 研究对象 45](#_bookmark30)

[1.2 主要试剂和仪器 45](#_bookmark31)

[1.3 实验方法 47](#_bookmark32)

### [**2** 结 果 55](#_bookmark33)

[2.1 NPMSC 和 BMSC 在体外诱导条件下均可以向软骨分化 55](#_bookmark34)

[2.2 NPMSC 和 BMSC 成软骨诱导后 PCR 检测 II 型胶原、蛋白聚糖、SOX9 基因表达均增高，两者之间表达无差异 55](#_bookmark35)

[2.3 NPMSC 和 BMSC 成软骨诱导后 RT-PCR 定量检测 II 型胶原、蛋白聚糖、SOX9 基因表达均增高，两者之间表达无差异 57](#_bookmark36)

[2.4 NPMSC和BMSC成软骨诱导后Western-blot定量检测II型胶原、蛋白聚糖、](#_bookmark37)

[SOX9蛋白表达均增高，两者之间表达无差异 58](#_bookmark37)

### [**3** 讨 论 61](#_bookmark38)

### [**4** 结 论 64](#_bookmark39)

[**参考文献** 65](#_bookmark40)

[**综** 述 72](#_bookmark41)

[**致** 谢 90](#_bookmark42)

[**在学期间承担/参与的科研课题与研究成果** 91](#_bookmark43)

[**个人简历** 92](#_bookmark44)

**SD大鼠NPMSC和BMSC在体外诱导条件下向软骨细胞分化能力的研究**

# 中文摘要

随着下腰痛的发病率越来越高，治疗这种疾病已经成为当今社会界面临的一个医疗和社会难题。研究发现下腰痛是由许多原因造成的，包括外伤，椎间盘退变，椎间盘突出，椎管狭窄等。而椎间盘退变被认为是下腰痛的主要原因。椎间盘退变表现为：髓核细胞和细胞外基质的减少，椎间盘结构的破坏。许多因素包括：基因、不良生活习惯、重体力劳动和其他的身体机能紊乱等都可能导致椎间盘退变。

目前的治疗椎间盘退变方法有：药物治疗、类固醇注射、理疗、椎间盘切除、脊柱融合术等。这些方法只能减轻临床症状，还不能治愈和阻止椎间盘退变的过程。因此，提出来许多新的治疗和逆转椎间盘退变的方法。这些方法集中在修复再生髓核细胞，并取得了一定的研究进展。第一种新疗法是分子治疗，利用基因产物调控合成代谢和降解途径从而抑制或逆转椎间盘退变。第二种新疗法是细胞治疗，结合组织工程技术，通过恢复或更换退变椎间盘中减少和衰老的髓核细胞来达到治疗的目的。目前用到的种子细胞有从骨髓、脂肪、脐带等组织提取出来的干细胞，还有同源性软骨细胞和髓核细胞等。

最近Blanco报道从退变椎间盘组织中分离培养出一些细胞，以骨髓间充质干细胞为对照，发现这类细胞表达干细胞表面标志物CD44、CD29、CD90、CD73、

CD105、CD166、CD106，不表达造血干细胞标志物CD34、CD45、CD14、CD19，并与骨髓间充质干细胞标志物表达无明显不同，并且具有成骨、成软骨的分化能力，而无成脂分化能力。符合国际细胞治疗学会（the Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy, ISCT）中有关多能间充质干细胞的界定标准。从髓核分离的干细胞，来源于髓核组织，相对于其他组织来源的干细胞更能适应椎间盘的内环境。但髓核干细胞和骨髓干细胞在细胞形态、增值能力、成骨成脂成软骨分化能力上有什么区别，还没有相关文献报道。

本实验从SD大鼠的髓核组织中提取了髓核干细胞，并进行培养鉴定。比较

髓核干细胞和骨髓干细胞形态，增值能力和分化能力。比较髓核干细胞和骨髓干细胞在体外诱导条件下成软骨能力有何区别。

本实验共分为三部分：

# **第一部分** **NPMSC**的分离培养鉴定

**目的：**

本部分实验从SD大鼠髓核组织中分离和培养髓核干细胞，并通过细胞形态、干细胞基因、干细胞表面标记物，以及成骨、成脂、成软骨分化能力进行鉴定。

**材料和方法：**

**1. 实验动物**

选用由ft西医科大学实验动物中心提供体重250±10g的健康雄性SD大鼠。

**2. 实验方法**

**2.1 NPMSC分离培养**

在无菌条件下应用显微镜从每个SD大鼠尾巴的椎间盘内分离髓核组织。经过0.2%II型胶原酶和0.25%胰蛋白酶处理后，用含有20%胎牛血清和青链霉素的DMEM/F12培养基培养。

**2.2 NPMSC细胞形态观察**

NPMSC培养到第三代进行细胞形态学观察。

**2.3 PCR检测NPMSC干细胞基因检测**

收集第三代NPMSC应用Trizol提取总RNA. PCR检测Nanog、Sox2、Oct-4

干细胞基因的表达。

**2.4 PCR检测NPMSC干细胞表面标记物检测**

PCR检测CD44、CD105、CD73、CD90、CD45、CD34、CD14、HLA-DR

干细胞表面标记物的表达。

**2.5 NPMSC成骨、成脂、成软骨诱导分化**

NPMSC在体外诱导条件下向骨、脂肪、软骨分化。观察NPMSC的多向分化能力。

**结果：**

**1. SD大鼠髓核组织中可以分离培养NPMSC。**

**2. 第三代NPMSC形态基本保持一致为纺锤样长梭形。**

**3. NPMSC表达干细胞基因Nanog、Sox2、Oct-4.**

**4. NPMSC表达干细胞表面标记物CD44、CD105、CD73、CD90，不表达造血干细胞表面标记物CD45、CD34、CD14、HLA-DR。**

**5. NPMSC具有成骨、成脂、成软骨多向分化能力。**

结论一：

从SD大鼠的髓核组织中可以分离培养出纺锤样长梭形细胞，表达干细胞基因Nanog、Sox2、Oct-4，表达干细胞表面标记物CD44、CD105、CD73、CD90，不表达造血干细胞表面标记物CD45、CD34、CD14、HLA-DR，具有成骨、成脂、成软骨多向分化能力的NPMSC。

# **第二部分** **NPMSC**和**BMSC**增殖能力和多向分化能力的

**比较**

**目的：**

分离培养SD大鼠NPMSC和BMSC，比较两种干细胞形态、细胞增殖能力、干细胞基因表达、干细胞表面标记物表达、成骨成脂成软骨分化能力，以及诱导后成骨、成脂、成软骨基因的表达。

**材料和方法：**

**1.实验动物**

选用由ft西医科大学实验动物中心提供体重250±10g的健康雄性SD大鼠。

**2.实验方法**

**2.1 NPMSC和BMSC分离培养**

分别从SD大鼠的椎间盘髓核组织和长骨骨髓中分离培养NPMSC和BMSC。

**2.2 NPMSC和BMSC细胞形态观察**

NPMSC、BMSC培养到第三代进行细胞形态学观察。

**2.3 NPMSC和BMSC细胞增殖能力检测**

应用CCK-8法分别检测第三代NPMSC和BMSC在第0、1、3、5、7、9

天的细胞增殖能力。

**2.4 PCR检测NPMSC和BMSC干细胞基因检测**

收集第三代NPMSC、BMSC应用Trizol提取总RNA. PCR检测Nanog、Sox2、Oct-4干细胞基因的表达。

**2.5 PCR检测NPMSC和BMSC干细胞表面标记物检测**

PCR检测第三代NPMSC和BMSC中CD44、CD105、CD73、CD90、CD45、

CD34、CD14、HLA-DR干细胞表面标记物的表达。

**2.6 NPMSC和BMSC成骨、成脂、成软骨诱导分化**

NPMSC、BMSC在体外诱导条件下向骨、脂肪、软骨分化。观察NPMSC、

BMSC的多向分化能力。

**2.7 PCR检测NPMSC和BMSC成骨、成脂、成软骨基因的表达**

PCR检测NPMSC和BMSC诱导后成骨、成脂、成软骨基因的表达。

**结果：**

**1. SD大鼠髓核组织和骨髓中分离培养NPMSC和BMSC。**

**2. 第三代NPMSC和BMSC形态基本一致均为纺锤样长梭形。**

**3. 第三代NPMSC和BMSC在增殖能力上相近。**

**4. NPMSC和BMSC均表达干细胞基因Nanog、Sox2、Oct-4.**

**5. NPMSC和BMSC表达干细胞表面标记物CD44、CD105、CD73、CD90，不表达造血干细胞表面标记物CD45、CD34、CD14、HLA-DR。**

**6. NPMSC和BMSC具有成骨、成脂、成软骨多向分化能力。**

**7. NPMSC和BMSC诱导后均表达成骨、成脂、成软骨基因。**

结论二：

SD大鼠髓核组织中分离培养的NPMSC和长骨骨髓中分离培养的BMSC在细胞学形态、增殖能力上一致，均表达干细胞基因，表达干细胞表面标记物，不表达造血干细胞表面标记物，具有成骨、成脂、成软骨能力，诱导后表达成骨、成脂、成软骨基因。

# **第三部分** **NPMSC**和**BMSC**成软骨能力的比较

**目的：**

应用PCR、RT-PCR、Western-blotting等方法检测NPMSC和BMSC成软骨诱导后II型胶原、蛋白聚糖、SOX9基因和蛋白表达。比较两种干细胞在成软骨能力上的差异。

**材料和方法：**

**1.实验动物**

选用由ft西医科大学实验动物中心提供体重250±10g的健康雄性SD大鼠。

**2.实验方法**

**2.1 NPMSC和BMSC在体外诱导条件下向软骨细胞分化**

三代干细胞2.5×10 5个离心后，加入1ml新鲜的完全成软骨诱导液（1ml不完全成软骨诱导液+10μTGF-ß3），在成软骨诱导第21 d 的时候，收集细胞。

**2.2 PCR检测II型胶原、蛋白聚糖、SOX9基因的表达**

分别提取NPMSC和BMSC诱导前后细胞的总RNA，应用PCR检测II型胶原、蛋白聚糖、SOX9基因的表达。

**2.3 RT-PCR检测II型胶原、蛋白聚糖、SOX9基因的表达**

分别提取NPMSC和BMSC诱导前后细胞的总RNA，逆转录后应用RT-PCR

定量检测II型胶原、蛋白聚糖、SOX9基因的表达。

**2.4 Western-blotting检测II型胶原、蛋白聚糖、SOX9蛋白的表达**

分别提取NPMSC和BMSC诱导前后细胞的总蛋白，应用Western-blotting

定量检测II型胶原、蛋白聚糖、SOX9蛋白的表达

**结果：**

**1. NPMSC和BMSC在体外诱导条件下均可以向软骨分化。**

**2. NPMSC和BMSC成软骨诱导后PCR检测II型胶原、蛋白聚糖、SOX9基因表达均增高，两者之间表达无差异。**

**3. NPMSC和BMSC成软骨诱导后RT-PCR定量检测II型胶原、蛋白聚糖、**

**SOX9基因表达均增高，两者之间表达无差异。**

**4. NPMSC和BMSC成软骨诱导后Western-blotting定量检测II型胶原、蛋白聚糖、SOX9蛋白表达均增高，两者之间表达无差异。**

结论三：

NPMSC和BMSC成软骨诱导后，经PCR、RT-PCR、Western-blotting检测

II型胶原、蛋白聚糖、SOX9基因和蛋白表达均较诱导前明显增高。NPMSC 和

BMSC诱导后II型胶原、蛋白聚糖、SOX9基因和蛋白表达无明显差异。NPMSC和BMSC在体外诱导条件下向软骨细胞分化能力无明显区别。

结论：

通过本次试验证实了SD大鼠椎间盘髓核组织内可以分离培养出具有干细胞特性的髓核干细胞，其次髓核干细胞和骨髓干细胞相比在体外诱导条件下成软骨能力上相似，为组织工程提供了新的种子细胞。

**关键词：**NPMSC(nucleus pulposus mesenchymal stem cells); BMSC（bone marrow mesenchymal stem cells）; 增殖能力; 多向分化能力

**The ability to form cartilage of NPMSC and BMSC in SD rats**

**Abstract**

With the incidence of low back pain is increasing, the treatment of this disease has become a medical and social problems. Study found that low back pain is caused by many reasons, including injuries, disc degeneration, disc herniation, spinal stenosis. The disc degeneration is considered to be the main reason for lower back pain. Disc degeneration as follows: reduction of nucleus pulposus cells and extracellular matrix, destruction disc structure. Many factors, including: genes, bad habits, heavy manual labor and other physical disorders and so may lead to disc degeneration.

Current treatment of disc degeneration methods: medication, steroid injections, physical therapy, discectomy, spinal fusion and so on. These methods can reduce symptoms, it can not cure and prevent disc degeneration process. Therefore, many new treatments and ways proposed to reverse disc degeneration. These methods focus on repair and regeneration of nucleus pulposus cells. The firs new therapy is molecular therapy, the use of anabolic gene product regulation and degradation pathways to inhibit or reverse disc degeneration. The second new therapy is cell therapy and tissue engineering, through restoration or replacement of degenerated intervertebral disc nucleus pulposus cells to achieve the purpose of treatment. Currently used in the seed cells extracted from the bone marrow, fat, and other tissues out of the umbilical cord stem cells, as well as homology nucleus pulposus cells and chondrocytes.

Recently Blanco isolated and cultured some cells from degenerative disc tissue, found that such cells express stem cell surface markers CD44, CD29, CD90, CD73, CD105, CD166, CD106, did not express hematopoietic stem cell markers CD34, CD45, CD14, CD19, and has osteogenic cartilage differentiation without adipogenic differentiation. Compliance with international Society for Cell therapy (the

Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy, ISCT) standards defined in pluripotent mesenchymal stem cells. NPMSC derived from the nucleus pulposus, compared to other tissue-derived stem cells can adapt to the environment within the intervertebral disc. Whether the nucleus pulposus stem cells and bone marrow stem cells have difference in cell morphology, value-added, ability of osteogenic and adipogenic differentiation, cartilage differentiation capacity, there is no relevant literature.

In this study, we extracted the nucleus pulposus stem cells from the SD rat nucleus, and cultured identification. Compare the nucleus of stem cells and bone marrow stem cell morphology, added value and differentiation. Compare the nucleus of stem cells and bone marrow stem cells, what is the difference in the ability of cartilage in vitro conditions.

The experiment is divided into three parts:

**Section 1 The separation culture and identification of NPMSC**

**Objective:**

This part of the experiment was isolated and cultured nucleus pulposus stem cell from SD rats, and by cell morphology, stem cell genes, stem cell surface markers, and osteogenic, adipogenic, chondrogenic differentiation were identified.

**Materials and methods:**

**1. Experimental Animals**

Healthy male SD rats（weight 250±10g by the Experimental Animal Center of Shanxi Medical University）.

**2. Experimental Methods**

**2.1 NPMSC Isolation**

Application microscope isolated nucleus pulposus from each rat tail SD disc under sterile conditions. After 0.2% type II collagenase and 0.25% trypsin treatment, containing 20% fetal calf serum and penicillin-streptomycin in DMEM / F12 culture medium.

**2.2 NPMSC cell morphology**

NPMSC culture to the third generation cell morphology.

**2.3 PCR detection of genetic testing NPMSC stem cells**

Collected the third generation NPMSC applications Trizol extraction of total RNA. PCR detection of Nanog, Sox2, Oct-4 gene expression in stem cells.

**2.4 PCR detection NPMSC stem cell surface marker**

PCR to detect the expression of stem cell surface markers. CD44, CD105, CD73, CD90, CD45, CD34, CD14, HLA-DR

**2.5 NPMSC osteogenic, adipogenic, chondrogenic differentiation**

NPMSC in vitro conditions to differentiate into bone, fat, cartilage. Observe the ability of differentiation.

**Results:**

**1. NPMSCs can be isolated and cultured from the nucleus pulposu of SD rats.**

**2. The third generation NPMSC shape remained the same as the spindle-like fusiform.**

**3. NPMSC stem cell gene expression of Nanog, Sox2, Oct-4.**

**4. NPMSC expressed stem cell surface markers CD44, CD105, CD73, CD90, did not express hematopoietic stem cell surface markers CD45, CD34, CD14, HLA-DR.**

**5. NPMSC** have the ability of osteogenic, adipogenic, **chondrogenic differentiation**

**Summary:**

NPMSC can be isolated cultured from the nucleus pulposus of SD rats, long spindle-like spindle cells express stem cell gene Nanog, Sox2, Oct-4, the expression of stem cell surface markers CD44, CD105, CD73, CD90, did not express hematopoietic stem cell surface markers matter CD45, CD34, CD14, HLA-DR, has osteogenic, adipogenic, chondrogenic differentiation capacity.

**Section 2 Compare the differentiation capacity of NPMSC and BMSC**

**Objective:**

Isolation and culture NPMSC and BMSC from SD rats, comparison the two stem cell of morphology, cell proliferation ability, gene expression of stem cells, stem cell surface marker expression, osteogenic、adipogenic,、chondrogenic differentiation

Capacity, as well as induced osteogenic, adipogenic, chondrogenic gene expression.

**Materials and methods:**

**1. Experimental Animals**

Healthy male SD rats（weight 250±10g by the Experimental Animal Center of Shanxi Medical University）.

**2. Experimental Methods**

**2.1 NPMSC and BMSC isolation and culture**

NPMSC and BMSC were isolated and cultured from SD rat nucleus pulposus and bone marrow.

**2.2 NPMSC and BMSC cell morphology**

NPMSC, BMSC cultured to the third generation of cell and detected morphology.

**2.3 NPMSC BMSC ability of cell proliferation**

Application of CCK-8 were detected by the third generation NPMSC and BMSC cell proliferation ability in 0, 1, 3, 5, 7, 9.

**2.4 PCR detection NPMSC and BMSC stem cell genetic**

Collect the third generation NPMSC, BMSC application Trizol extraction of total RNA. PCR detection of Nanog, Sox2, Oct-4 gene expression.

**2.5 PCR detection NPMSC and BMSC stem cell surface marker detection**

PCR to detect the expression of the third generation NPMSC and BMSC in stem cell surface markers（CD44, CD105, CD73, CD90, CD45, CD34, CD14, HLA-DR）.

**2.6 NPMSC and BMSC osteogenic, adipogenic, chondrogenic differentiation**

NPMSC, BMSC in vitro conditions to osteogenic, adipogenic, chondrogenic differentiation. Observe NPMSC, multi-directional differentiation compare with BMSC.

**2.7 Osteogenic, adipogenic, chondrogenic gene expression**

PCR detection Osteogenic, adipogenic, chondrogenic gene expression of NPMSC and BMSC.

**Results:**

**1. NPMSC and BMSC s were isolated and cultured from SD rats.**

**2. The third generation morphology of NPMSC and BMSC are spindle-like long spindle consistently.**

**3. The third generation NPMSC and BMSC are similar in value-added capabilities.**

**4. NPMSC and BMSC were expressed stem cell gene Nanog, Sox2, Oct-4.**

**5. NPMSC and BMSC expressing stem cell surface markers CD44, CD105, CD73, CD90, did not express hematopoietic stem cell surface markers CD45, CD34, CD14, HLA-DR.**

**6. NPMSC and BMSC have the ability of osteogenic, adipogenic, chondrogenic differentiation.**

**7. NPMSC and BMSC expressed osteogenic, adipogenic, chondrogenic genes**

**After differentiation. Summary:**

NPMSC isolated from cultured from SD nucleus pulposus tissue and BMSC from long bone marrow, compare the morphology, ability to add value consistent, both expressing stem cell gene, expression of stem cell surface markers, did not express hematopoietic stem cell surface markers, with the ability of osteogenic, adipogenic, chondrogenic differentiation, after induced expressing osteogenic, adipogenic, chondrogenic genes.

**Section 3 chondrogenic differentiation capacity of NPMSC and BMSC**

**Objective:**

PCR, RT-PCR and Western-blotting were used to detect collagen II, proteoglycans, SOX9 gene and protein expression after differentiation. Comparison of two stem cell differences in the ability of chondrogenic differentiation.

**Materials and methods:**

**1. Experimental Animals**

Healthy male SD rats（weight 250±10g by the Experimental Animal Center of Shanxi Medical University）.

**2. Experimental Methods**

**2.1 NPMSC and BMSC differentiation into chondrocytes in vitro conditions**

Three generations of stem cells 2.5×10 5 centrifuge, add 1ml fresh complete chondrogenic solution (1ml incomplete chondrogenic liquid + 10μTGF-ß3), cells were collected after 21 d of cartilage induced.

**2.2 PCR detected the expression of type II collagen, proteoglycans, SOX9 gene**

Total RNA was extracted after NPMSC and BMSC induced, using PCR to detect gene expression of type II collagen, proteoglycans, SOX9.

**2.3 RT-PCR to detect the expression of type II collagen, proteoglycans, SOX9 gene**

Total RNA was extracted after NPMSC and BMSC induced, application of RT-PCR detected the gene expression of type II collagen, proteoglycan, SOX9.

**2.4 Western-blotting to detect the expression of type II collagen, proteoglycans, SOX9 protein**

Total cellular protein were extracted induction of NPMSC/BMSC and before induction, the application of Western-blotting quantitative detection protein of type II collagen, proteoglycans, SOX9.

**Results:**

**1. NPMSC and BMSC can be differentiated cartilage in vitro conditions.**

**2. NPMSC and BMSC into PCR detection after the induction of cartilage type II collagen and proteoglycans, SOX9 gene expression were increased, no difference in expression between the two.**

**3. After chondrogenic differentiation of NPMSC and BMSC, using RT-PCR detection gene expression of type II collagen, proteoglycans, SOX9, which were increased, there was no difference in expression between the two.**

**4. NPMSC and BMSC after chondrogenic differentiation, Western-blotting quantitative detection protein expression of type II collagen, proteoglycans, SOX9 were increased, while there was no difference between the two.**

**Summary:**

After NPMSC and BMSC induced into cartilage, using PCR, RT-PCR, Western-blotting detected gene and protein expression of type II collagen, proteoglycans, SOX9, that was significantly higher than before induction. There was

No significant difference between NPMSC and BMSC.

**Conclusion：**

In a word, in this study we confirmed that NPMSC with characteristics of stem cells can be isolated and cultured form nucleus pulposus tissues of intervertebral disc of SD rats, the chondrogenic ability of NPMSC and BMSC was similar under induction in vitro. This could provide a new seed cells for tissue engineering.

**Key words:** NPMSC (nucleus pulposus mesenchymal stem cells); BMSC (bone marrow mesenchymal stem cells); Value-added; Multi-directional differentiation

**常用缩写词中英文对照表**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **英文缩写** | **英文名称** | **中文名称** |
| IVD | Intervertebral Disc | 椎间盘 |
| IVDD | Intervertebral Disc Degeneration | 椎间盘退变 |
| LBP | Low Back Pain | 腰背痛 |
| NP | Nucleus Pulposus | 髓核 |
| AF | Anulus Fibrosus, | 纤维环 |
| CEP | Cartilage End-plate | 软骨终板 |
| FCS | Fetal Calf Serum | 胎牛血清 |
| PBS | Phosphate Buffered Solution | 磷酸盐缓冲溶液 |
| EDTA | zkq 20151125  Ethylenediamine Tetraacetic Acid | 乙二胺四乙酸钠 |
| MSC | Mesenchymal Stem Cell | 间充质干细胞 |
| BM | Bone Marrow | 骨髓 |
| BMSC | Bone Marrow Stem Cell | 骨髓干细胞 |
| NP-MSC | Nucleus Pulposus-Derived Mesenchymal Stem Cell | 髓核间质干细胞 |
| ColⅡ | Collagen Type Ⅱ | Ⅱ型胶原 |
| OD | Optical Density | 吸光度 |
| PCR | Polymerase Chain Reaction | 聚合酶链反应 |
| RT-PCR | Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction | 逆转录 RT-PCR |

**SD大鼠NPMSC和BMSC在体外诱导条件下向**

**软骨细胞分化能力的研究**

**前**言

随着衰老的过程，椎间盘（IVD）不可避免的经历生化和形态的退行性改变。腰椎间盘退变有多种临床表现，如特发性下腰痛、颈痛、椎间盘突出症、颈椎病、椎管狭窄、脊髓病变等[1, 2]。特别是下腰痛（LBP）困扰高达85%的成人，致使影响人的日常活动和工作能力。因此下腰痛每年要消耗大量的医疗支出，对经济、社会、和公众健康上的影响越来越大[3-5]。

椎间盘退变表现为细胞核脱水，蛋白多糖消耗，细胞结构减少，纤维环椎间盘结构破坏[6, 7]。典型的椎间盘退变是一个结构逐渐破坏的过程，包括径向裂缝、椎间盘

下垂、终板破坏、内外纤维环的破裂、椎间隙变窄等[6]。诸多因素包括基因、生活习

zkq 20151125

惯（如肥胖、吸烟、酗酒）、重体力劳动和其他身体机能紊乱（糖尿病）等都可以导

致椎间盘退变[8]。常见的观察椎间盘退变过程的途径是细胞和结构破坏，退行性变化是由于椎间盘细胞数量和功能降低[9]。迄今为止，椎间盘退变的分子机制还不是很清楚。

目前还没有治愈下腰痛的方法。现有的治疗方法包括：药物、类固醇注射、理疗、椎间盘切除和脊柱融合术，只能减轻症状，还不能阻止椎间盘退变的过程。因此，各种新的和潜在有效的治疗和逆转椎间盘退变的方法被提出来。新治疗方法集中在生物修复或再生髓核和纤维环，在椎间盘退变早期使用效果最好[2, 10]。第一种新疗法是分子治疗，如：基因产物可以影响合成代谢和降解途径从而抑制或逆转椎间盘退变[11-14]。第二种疗法是细胞治疗，特别是结合组织工程技术，以恢复或更换在退变椎间盘中减少或衰老的髓核细胞[15, 16]。目前有几种来源的干细胞有细胞治疗的可行性，包括同源性软骨细胞，髓核细胞，骨髓和脂肪间充质干细胞[16]。为了达到最佳治疗效果，对于这些细胞来源在椎间盘分子、细胞和生物学方面的研究，特别是种子细胞选择和椎间盘内微环境因素的研究是非常重要的。

Blanco报道[17]由退变椎间盘组织中分离培养出一些细胞，并以骨髓间充质干细胞

作为对照，发现这类细胞表达干细胞表面标志物：CD44、CD29、CD90、CD73、CD105、

CD166、CD106，不表达造血干细胞表面标志物：CD34、CD45、CD14、CD19，并与骨髓间充质干细胞标志物表达无明显不同，并且具有成骨、成软骨分化能力，无成脂分化能力。完全符合国际细胞治疗学会（the Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy, ISCT）有关多能间充质干细胞的界定标准[18]。髓核来源的干细胞，来源于髓核组织，相对于其他组织来源的干细胞更能适应椎间盘的内环境。那么相对于骨髓干细胞，髓核来源干细胞与之在体外诱导条件下成软骨能力有何区别，之前还没有相关的研究。

本实验从SD大鼠的髓核组织中提取了髓核干细胞，并进行培养鉴定。比较髓核干细胞和骨髓干细胞形态，增殖能力和分化能力。比较髓核干细胞和骨髓干细胞在体外诱导条件下成软骨能力有何区别。

zkq 20151125

# **第一部分** **NPMSC**的分离培养鉴定

Blanco报道[17]由退变椎间盘组织中分离培养出一些细胞，发现这类细胞表达干细胞表面标志物，不表达造血干细胞表面标志物，并与骨髓间充质干细胞标志物表达无明显不同，并且具有成骨、成软骨分化能力，无成脂分化能力。完全符合国际细胞治疗学会（the Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy, ISCT）有关多能间充质干细胞的界定标准[18]。本实验从SD大鼠的椎间盘髓核组织中提取NPMSC，并且从细胞学形态、干细胞基因、干细胞表面标记物，以及成骨、成脂、成软骨的多向分化能力进行鉴定。

zkq 20151125

### **1** 材料与方法

**1.1****实验动物**

选用由ft西医科大学实验动物中心提供体重250±10g的健康雄性SD大鼠。

**1.2****主要试剂和仪器**

**1.2.1主要试剂仪**

DMEM-F12(Hyclone) DMEM/Low Glucose（Hyclone）胰蛋白酶（Trypsin）(Solarbio)

Ⅱ型胶原酶（Solarbio）胎牛血清（杭州四季青）

双抗（青、链霉素（Solarbioz）kq 20151125

培养板（6孔、96孔等）（Corning）培养瓶（25mL）（Corning）

SD大鼠干细胞成骨诱导培养液（广州Cyagen）

SD大鼠干细胞成脂诱导培养液（广州Cyagen）

SD大鼠干细胞成软骨诱导培养液（广州Cyagen）

Trizol提取试剂盒（上海生工）

第一链cDNA合成试剂盒（上海生工）溴化乙锭（上海生工）

琼脂糖（加拿大BBI）无乙水醇（上海生工）异丙醇（上海生工）丙三醇（上海生工）

TaqDNA聚合酶（上海生工）

10×PCR Buffer（上海生工）

MgCl2（25mM）（上海生工）dNTP（10mM）（上海生工）DNA Marker（上海生工）6×DNA Loading Dye（上海生工）

10×TAE（400mM Tris-acetate and 10mM EDTA, pH8.0）（上海生工）引物（上海生工）

**1.2.2主要仪器**

HERA cell 150 CO2培养箱（Heraeus）CA950-2超净工作台（上海净化仪器厂）HS-11-2型循环水浴箱（北京东方仪器厂）

IX50荧光倒置显微镜（Olympus）

MDF-U32V 超低温冰箱（-75℃）(SANYO)

PCR反应扩增仪（美国ABI公司）

SW-CJ-1D洁净工作台（江苏zk苏q洁净20化15设1备12厂5 ）

HC-2518R冷冻离心机（加拿大BBI）

TGL-14G台式高速离心机（上海医疗器械有限公司）

XW-80A微型旋涡混合仪（上海沪西分析仪器厂有限公司）

H6-1微型电泳槽（上海精益有机玻璃制品仪器厂）

DYY-8型稳压稳流电泳仪（上海琪特分析仪器有限公司）

YXJ-2离心机（湘仪离心机仪器有限公司）凝胶成像系统（上海复日科技有限公司）

TU-1901紫外分光光度计（北京普析通用仪器有限公司）

移液器（范围100-1000μl, 20-200μl, 0.5-10μl）（加拿大BBI公司）切片机（德国LEICA RM2245）

**1.2.3培养基配制方法：**

DMEM/Low Glucose Medium + 10% FBS (四季青) + 1%双抗

DMEM/F12+ 20% FBS (四季青) + 1%双抗

### **1.3** 试验方法

**1.3.1NPMSC分离培养**

过量注射戊巴比妥处死老鼠，收集老鼠尾巴。在无菌条件下应用显微镜从每个大鼠尾巴的8个椎间盘内分离纤维环和髓核组织。在超净台内将髓核组织与纤维环分离。髓核组织用PBS冲洗，并剪碎成1×1×1mm 3大小组织碎块。用0.2% II型胶原酶在37℃水浴箱中消化2小时。加入PBS在1000转离心5分钟洗涤2次。再次加入

0.25%胰蛋白酶在37℃水浴箱中消化10分钟。加入PBS在1000转离心5分钟洗涤 2

次。分离的细胞用含有20%胎牛血清和青链霉素的DMEM/F12培养基，在37度，5%

CO2培养箱中培养。悬浮细胞和碎片通过细胞换液被去除，在1天后细胞贴壁每3天换液。大约4周后当细胞达到90%融后用0.25%胰蛋白酶-EDTA消化后细胞传代。在第三代时被收获，细胞生长状态良好用于以下实验。

**1.3.2 NPMSC细胞形态观察**

NPMSC培养到第三代进行细胞形态学观察。

**1.3.3 PCR检测NPMSC干细胞基因表达**

**1.3.3.1应用Trizol提取总RNA**

1. 提取出的第三代NPMSC加入Trizol裂解细胞，每10cm2面积加1mlTrizol。用移液器吹打混匀。

2. 将裂解后样品室温放置5-10min，使得核蛋白与核酸完全分离。

3. 加入0.2ml氯仿，剧烈振荡15 sec，室温放置3min.12,000 rpm 4°C 离心10min

4. 吸取上层水相转移至干净的离心管中，加入等体积异丙醇，混匀，室温放置

20min。

5. 12,000rpm4°C离心10min，弃上清。

6. 加入1ml75%乙醇洗涤沉淀。12,000 rpm4°C 离心3 min，弃上清。室温干燥5-10

min。

7. 加入30-50µlRNase -freeddH2O，充分溶解RNA. 将所得到的RNA溶液置于

-70°C 保存或用于后续试验。

**1.3.3.2反转录**

cDNA第一链合成

## （1） 在0.2mlPCR管中加入以下试剂：

5µl total RNA

1µl Random Primer p(dN) 6(0.2µg/µl )

5µl Rnase -free ddH2O

（2）70°C 温浴5min。

（3）冰浴10sec，离心加入下列试剂：4.0µl 5\*Reaction Buffer

2.0µl dNTP Mix(10mmol/L) 1.0µl Rnase inhibitor(20U/µl )

2.0µl AMV Reverse Transcriptase (10U/µl) 20.0µl Total volume

（4）37°C 温浴5min。

（5）42°C温浴60min。

（6）70°C温浴10min。终止反应。

（7）将上述溶液-20°C 保存。

**1.3.3.3引物序列如下**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Primers | Sequences (5’-3’) | Length of products |
| R-β-actin-F | CGTAAAGACCTCTATGCCAACA |  |
|  |  | 163bp |
| R-β-actin-R | AGCCACCAATCCACACAGAG |  |
| R-NANOG-F | AGGACGAGACAGAAGGATCACC |  |
|  |  | 218bp |
| R-NANOG-R | ATAGAAGCCTCTTGGCGGAA |  |
| R-OCT-4-F | GGTGGAGGAAGCTGACAACAA | 396bp |
| R-OCT-4-R | GGAAAAGGGACCGAGTAGAGTG |  |
| R-SOX2-F | TGTTCAATCCCACCCTTTTCA |  |
| R-SOX2-R | GGCAGCCTGGTTCCAATAA | 177bp |

**1.3.3.4反应体系如下**

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 用量 |
| 模板 cDNA | 0.5μl |
| 引物 F(10μM) | 0.5μl |
| 引物 R(10μM) | 0.5μl |
| DNTP(10 mM) | 0.5μl |
| TaqBuffer(10×) | 2.5μl |
| MgCl2(25mM) | 2μl |
| Taq 酶(5U/μl) | 0.2μl |
| H2O | 18.3μl |

**1.3.3.5反应条件如下**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 程序 |  | |
| 温度 | 时间 |
| 预变性 | 95℃ | 3min |
| 变性 | 94℃ | 30s |
| 退火 | 56℃ | 30s |
| 延伸 | 72℃ | 90s |
| 修复延伸 | 72℃ | 8min |
| 循环数 | 35C | |

**1.3.3.6结果判定**

PCR结束后，扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳，紫外灯下观察结果。

**1.3.4 PCR检测NPMSC干细胞表面标记物表达**

**1.3.4.1应用Trizol提取总RNA**

方法同前

**1.3.4.2反转录**

方法同前

**1.3.4.3引物序列如下**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Primers | Sequences (5’-3’) | Length of products |
| R-β-actin-F | CGTAAAGACCTCTATGCCAACA |  |
|  |  | 163bp |
| R-β-actin-R | AGCCACCAATCCACACAGAG |  |
| R-CD44-F | CAACGAAGATGCCTGGTACG | 145bp |
| R-CD44-R | GCAATGGTGCTGGAGATAAAAT |  |
| R-CD105-F | GTCGGTTGTGATCTACAGCGTG |  |
|  |  | 197bp |
| R-CD105-R | CGAGTCTCAGTGCCATTTTGC |  |
| R-CD73-F | CTCATCATCCTCAAGGCTCCA |  |
|  |  | 314bp |
| R-CD73-R | TCCTCCCTCCCAAGTTCTGT |  |
| R-CD90-F | CCAAGCCACGGACTTCATT |  |
|  |  | 297bp |
| R-CD90-R | ATCGGGTCTCCAGGACAAAC |  |
| R-CD45-Fn | ACCTGCTCCTGAAACTTCGAC |  |
|  |  | 264bp |
| R-CD45-Rn | CCCCAAATTGATTGTACTCCAC |  |
| R-CD34-Fn | AACCACAGACTTACCCAACCG |  |
|  |  | 313bp |
| R-CD34-Rn | AGCTCTTCTCCCCTTTCCTTC |  |
| R-CD14-F | TTGTCAGGAACTTTGGCTTTG |  |
|  |  | 355bp |
| R-CD14-R | TTGTGGGGTTGGGGATTTA |  |
| R-HLA-DR-Fn | CCTTGACCTCAGTGAAAGCAGT |  |
| R-HLA-DR-Rn | TGGGGCATTCCATAGCAGA | 226bp |

1.3.4.4**反应体系**方法同前

**1.3.4.5反应条件**

方法同前

**1.3.4.6结果判定**

PCR结束后，扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳，紫外灯下观察结果。

**1.3.5 NPMSC成骨、成脂、成软骨诱导分化**

**1.3.5.1成骨诱导：**

**1. 成骨诱导液如下**

|  |  |
| --- | --- |
| 成分 | 剂量 |
| SD 大鼠干细胞成骨诱导培养基 | 175ml |
| 干细胞胎牛血清 | 20ml |
| 青链霉素 | 2ml |
| 谷氨酰胺 | 2ml |
| 抗坏血酸 | 400μl |
| β-Glycerophosphate | 2ml |
| 地塞米松 | 20μl |
| Total Volume | 201ml |

SD大鼠干细胞成骨诱导液成分

**2. 明胶包被板子：**

a)向6孔板中加入1ml0.1%的Gelatin Solution，轻轻晃动，使培养皿底部完全被Gelatins Solution覆盖；

b）室温放置至少30 min；

c) 30min后，在超净工作台中，吸弃Gelatin Solution，打开培养皿盖子，使剩余的Gelatin Solution在30min内风干；

d）一旦风干了，立刻盖上培养皿盖子；

**3. NPMSC成骨诱导：**

a)当第三代NPMSC细胞汇合度达到80-90%时，用Trypsin-EDTA（含有

EDTA的胰酶）消化细胞，接种于提前用明胶包被好的6孔板中，细胞密度为3×10 3cells/cm2, 37℃，5%CO2培养箱中培养细胞；

b）24小时后，轻轻的吸除培养基，加入2ml成骨诱导液；

c）每3天（每隔2天）换一次成骨诱导液；

d）诱导21天后，细胞可以用来固定和用Alizarin red染色；

**4. Alizarin red染色实验步骤**

a）在诱导后，吸弃成骨诱导液，用1×PBS洗涤；

b)用2 ml4%甲醛固定30 min；

c)用1×PBS洗涤2次；

d)用1 ml Alizarin red工作液染色，室温染色3-5 min；

e)用1×PBS洗涤2次；

f）倒置显微镜进行拍照。

**1.3.5.2成脂诱导：**

**1. 成脂诱导液如下**

|  |  |
| --- | --- |
| 成分 | 剂量 |
| SD 大鼠干细胞成脂诱导培养基 A | 175ml |
| 干细胞胎牛血清 | 20ml |
| 青链霉素 | 2ml |
| 谷氨酰胺 | 2ml |
| 胰岛素 | 200μl |
| IBMX | 200μl |
| 吲哚美辛 | 200μl |
| 地塞米松 | 200μl |
| Total Volume | 200ml |

SD大鼠干细胞成脂诱导培养液A成分

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |
|  | 成分 | 剂量 |  |
|  | SD 大鼠干细胞成脂诱导培养基 B | 175ml |  |
|  | 干细胞胎牛血清 | 20ml |  |
|  | 青链霉素 | 2ml |  |
|  | 谷氨酰胺 | 2ml |  |
|  | 胰岛素 | 200μl |  |
|  | Total Volume | 199ml |  |

SD大鼠干细胞成脂诱导培养液B成分

**2. NPMSC成脂诱导：**

a)待第三代NPMSC 细胞达到80-90%融合时，用Trypsin-EDTA（含有

EDTA的胰酶）消化细胞；

b）将干细胞接种于六孔板中，每孔约2x104/cm2，加入干细胞完全培养液

（2ml/孔），放入37°C，5% CO2孵箱中培养；

c）每三天进行换液（干细胞完全培养液），直至细胞达到100%融合；

d）待细胞达到100%融合时（可能需要3-5天），移去旧的培养液，加入成脂诱导液A（2ml/孔）开始诱导；

e）三天后更换为成脂诱导液B（2ml/孔）进行维持，24h后再更换为成脂诱导液A诱导（2ml/孔），如此进行3个循环。当脂滴出现较多，但比较小时，可以用成脂诱导液B进行维持7天（每3天换一次液），脂滴增大；

f）油红O染色。

**3.油红O染色步骤：**

a）诱导完成后，吸除成脂诱导液，用1×PBS 洗涤；

b) 2ml 4%多聚甲醛固定30 min；

c) 1×PBS洗涤2次；

d）加入1ml oil red O工作液（和ddH2O按照3: 2稀释，并且用滤纸过滤），

37℃染色30 min；

e)用1×PBS洗涤2-3次；

f）倒置显微镜下拍照。

**1.3.5.3成软骨诱导：**

**1. 成软骨诱导液如下**

|  |  |
| --- | --- |
| 成分 | 剂量 |
| SD 大鼠干细胞成软骨诱导培养基 | 194ml |
| 地塞米松 | 20μl |
| 抗坏血酸 | 600μl |
| ITS + Supplement | 2ml |
| 丙酮酸钠 | 200μl |
| 脯氨酸 | 200μl |
| TGF-β3 | 2ml |
| Total Volume | 200ml |

SD大鼠干细胞成软骨诱导培养液成分

不完全培养基：培养基+地塞米松+抗坏血酸+ITS+丙酮酸钠+脯氨酸完全培养基：10μl TGF-β3+1ml不完全培养基

**2. NPMSC细胞成软骨诱导：**

a)待干细胞达到80-90%融合时，用Trypsin-EDTA（含有EDTA的胰酶）消

化细胞；

b）800rpm，3min，离心，弃上清；

c）用3ml不完全成软骨诱导液重悬细胞（2.5×10 5个细胞）；

d）800rpm，3min，离心，弃上清；

e）用4ml完全成软骨诱导液（不完全成软骨诱导液+TGF-ß3）重悬细胞

（2×10 6个细胞）；

f）将细胞悬液平均分配到8个15ml离心管中，每个15ml离心管500ul

细胞悬液（2.5×10 5个细胞）；

g) 800rpm,3min,离心；

h）放入37°C，5% CO2孵箱中培养，24h内不移动；

i）每2-3天进行一下换液；每管加入500ul新鲜的完全成软骨诱导液（不完全成软骨诱导液+TGF-ß3）；

j）第21天的时候，收集细胞。

**3. Alcian Blue染色**

a）石蜡包埋后切片；

b) Alcian Blue染色30分钟;

c)用PBS洗涤3次；

d）倒置显微镜下拍照。

**2****结果**

**2.1** **NPMSC细胞形态观察**

NPMSC原代细胞24小时后即可贴壁生长，形态以梭形较多，其中含有少量三角形及多边形，4周左右达到80%-90%融合，传代培养后细胞生长较原代培养明显加快，5-7d后细胞即可融合，第3代细胞形态基本保持一致为纺锤样长梭形。见图2-1、2-2、2-3、2-4。





图 2-1 椎间盘内取出的髓核组织 图2-2 ×10镜下观察NPMSC

 

图 2-3 ×40镜下观察NPMSC 图2-4 ×40镜下观察第三代NPMSC

**2.2** **PCR检测NPMSC干细胞基因表达**

NANOG、OCT-4、SOX2是最原始的干细胞转录因子。PCR检测显示NPMSC

表达NANOG、OCT-4、SOX2干细胞基因。见图2-5.



图 2-5 NANOG、OCT-4、SOX2基因PCR

**2.3** **PCR检测NPMSC干细胞表面标记物检测**

NPMSC表达干细胞表面标志物：CD44、CD105、CD73、CD90，不表达造血干细胞标志物：CD45、CD34、CD14、HLA-DR。说明NPMSC来源于间充质成分，而非胚胎来源干细胞和造血干细胞。见图2-6、2-7。



图 2-6 CD44、CD105、CD73、CD90表达阳性



图 2-7 CD45、CD34、HLA-DR、CD14表达阴性

**2.4** **NPMSC成骨、成脂、成软骨诱导分化**

2.4.1**成骨分化：**NPMSC在成骨诱导21天Alizarin red染色后显微镜下可以观察到有大量钙结节形成。见图2-8、2-9、2-10。





图 2-8 ×4镜下观察NPMSC成骨诱导图2-9 ×10镜下观察NPMSC成骨诱导



图 2-10 ×40镜下观察NPMSC成骨诱导

2.4.2**成脂分化：**NPMSC在成脂诱导21天oil red O染色后观察，可见红染脂肪滴空泡形成。见图2-11。



图 2-11 ×40镜下观察NPMSC成脂诱导

2.4.3**成软骨分化：**NPMSC在成软骨诱导21天Alcian Blue染色后观察，可见蓝染的蛋白聚糖。见图2-12。



图 2-12 ×10镜下观察NPMSC成软骨诱导

**3****讨论**

椎间盘由中央的髓核，周边的纤维环和椎间的终板构成[19]。椎间盘缺乏血液供应

[20, 21]. 从发生和发育来看，髓核起源于脊索组织[22, 23]。人类的髓核细胞和软骨组织

很相似。在椎间盘退变的开始，椎间盘细胞，尤其是髓核细胞，数量减少，活力降低。椎间盘内细胞数量是维持体内椎间盘组织修复功能的重要因素。体外的基础研究已经表明：椎间盘细胞的增生能力很低，成年人的椎间盘中大部分细胞呈现衰老状态[24]。这些事实已经让研究者们聚焦于用干细胞治疗椎间盘细胞的退变的方案。干细胞有自我更新和多向分化能力的特点。干细胞应用和干细胞移植已经从很多方向展开。使用新的干细胞资源，例如诱导多能干细胞或者胚胎干细胞，为椎间盘细胞的修复再生提供一个新的思路。

Blanco等[17]研究表明：通过来自16个人体的骨髓间充质干细胞和髓核间充质干细胞的分化能力的比较发现了髓核间充质干细胞类似于骨髓间充质干细胞，唯一不同的是髓核间充质干细胞的无成脂分化能力。Feng等[25]研究报道；纤维环细胞表达与骨髓间充质干细胞相同的一些干细胞表面抗原。这些研究表明了刺激内源性干细胞是有效的，可以应用于治疗椎间盘细胞的退变，或者提供种子细胞用于异体移植。

本实验从SD大鼠的椎间盘髓核组织中分离培养了NPMSC. NPMSC原代细胞

24小时后即可贴壁生长，形态以梭形较多，其中含有少量三角形及多边形，4周左右达到80%-90%融合，传代培养后细胞生长较原代培养明显加快，5-7d后细胞即可融合，第3代细胞形态基本保持一致为纺锤样长梭形。NPMSC表达NANOG、OCT-4、

SOX2干细胞基因。NPMSC表达干细胞表面标志物：CD44、CD105、CD73、CD90，不表达造血干细胞标志物：CD45、CD34、CD14、HLA-DR. NPMSC在成骨诱导21天Alizarin red染色后显微镜下可以观察到有大量钙结节形成。NPMSC在成脂诱导

21天oil red O染色后观察，可见红染脂肪滴空泡形成。NPMSC在成软骨诱导21天Alcian Blue染色后观察，可见蓝染的蛋白聚糖。完全符合国际细胞治疗学会（the Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy, ISCT）中有关多能间充质干细胞的界定标准。

Blanco[17]等研究表明人退变椎间盘来源的髓核干细胞有成骨、成软骨，没有成脂能力。而本次试验髓核干细胞有成脂能力，可能与以下原因有关：之前的研究采用从

人退变的髓核组织中提取的髓核干细胞，本实验采用从SD大鼠正常的髓核组织中提取的髓核干细胞。由于组织来源不同，而且退变的髓核组织可能本身分化能力就较弱，因此造成退变组织中的髓核干细胞无成脂能力。

在椎间盘微环境中存在着许多分子结构包括：细胞因子、生长因子、炎症介质、蛋白水解酶和抑制剂、可溶性和不可溶性黏附分子。他们个别的和相互的作用还有待于进一步研究。随着更进一步研究，会发现与椎间盘退变有关的内环境稳定和病理机制的重要分子和途径。特别是由于椎间盘结构和解剖学特征，椎间盘细胞需要克服几个不利因素来生存和正常运作，包括有限的养分供应和严重缺氧。此外，椎间盘细胞处于一个有高机械负荷的环境中，椎间盘提供脊柱灵活性（弯曲和旋转），传输体重负荷和肌肉活动[26]。由于上述原因和与老化相关的变化如脱水，使得这一区域变为高渗和酸性的组织环境。在这种恶劣的条件下，椎间盘细胞必须依靠某些内在机制来适应周围的环境。

干细胞的多向分化潜能和各种性能提供了许多潜在治疗各种疾病的可能。临床上，BMSC移植已应用于治疗全层关节软骨缺损、成骨不全和心肌梗塞，而正在开发应用到其他疾病。BMSC移植的优势与其他细胞移植疗法，是因为骨髓间充质干细胞容易收获、分离和培养，在体外培养技术成熟。此外，间充质干细胞不仅可以自体移植，而且也可以异体移植，因为BMSC缺乏HLA-DR抗原的表达。因此，骨髓间充质干细胞作为一个实用的细胞来源广泛适用在临床上。本实验从SD椎间盘髓核组织中分离培养NPMSC，来源于髓核组织，可能比更适应椎间盘的内环境。因此，为组织工程中的种子细胞提供了新的研究方向。

# **第二部分** **NPMSC**和**BMSC**增殖能力和多向分化能力的比较

从SD大鼠的椎间盘髓核组织中提取NPMSC，从细胞学形态、干细胞基因、干细胞表面标记物，以及成骨、成脂、成软骨的多向分化能力进行鉴别。符合国际细胞治疗学会有关多能间充质干细胞的界定标准[27]，可以证明髓核组织中确实存在间充质干细胞。BMSC是研究最早的干细胞，目前已经有学者把BMSC移植到人体器官内治疗相关疾病并取得了一定的研究成果。NPMSC和BMSC相比在细胞增殖能力和多向分化能力上有何区别，目前还没有相关的文献报道。本实验从SD大鼠的椎间盘和骨髓组织内提取并培养NPMSC和BMSC。在体外培养条件下比较两种干细胞的细胞形态、增殖能力、干细胞基因、干细胞表面标记物和成骨、成脂、成软骨的多向分化能力。

### **1** 材料与方法

**1.1****实验动物**

选用由ft西医科大学实验动物中心提供体重250±10g的健康雄性SD大鼠

**1.2****主要试剂和仪器**

**1.2.1主要试剂**

DMEM-F12(Hyclone) DMEM/Low Glucose（Hyclone）胰蛋白酶（Trypsin）(Solarbio)

Ⅱ型胶原酶（Solarbio）胎牛血清（杭州四季青）

双抗（青、链霉素（Solarbio）

培养板（6孔、96孔等）（Corning）培养瓶（25mL）（Corning）

SD大鼠干细胞成骨诱导培养液（广州Cyagen）

SD大鼠干细胞成脂诱导培养液（广州Cyagen）

SD大鼠干细胞成软骨诱导培养液（广州Cyagen）

Trizol提取试剂盒（上海生工）

第一链cDNA合成试剂盒（上海生工）溴化乙锭（上海生工）

琼脂糖（加拿大BBI）无乙水醇（上海生工）异丙醇（上海生工）丙三醇（上海生工）

TaqDNA聚合酶（上海生工）

10×PCR Buffer（上海生工）

MgCl2（25mM）（上海生工）dNTP（10mM）（上海生工）DNA Marker（上海生工）6×DNA Loading Dye（上海生工）

10×TAE（400mM Tris-acetate and 10mM EDTA, pH8.0）（上海生工）引物（上海生工）

CCK-8试剂盒（日本DOJINDO）

**1.2.2主要仪器**

HERA cell 150 CO2培养箱（Heraeus）CA950-2超净工作台（上海净化仪器厂）HS-11-2型循环水浴箱（北京东方仪器厂）

IX50荧光倒置显微镜（Olympus）

MDF-U32V 超低温冰箱（-75℃）(SANYO)

PCR反应扩增仪（美国ABI公司）

SW-CJ-1D洁净工作台（江苏苏洁净化设备厂）

HC-2518R冷冻离心机（加拿大BBI）

TGL-14G台式高速离心机（上海医疗器械有限公司）

XW-80A微型旋涡混合仪（上海沪西分析仪器厂有限公司）

H6-1微型电泳槽（上海精益有机玻璃制品仪器厂）

DYY-8型稳压稳流电泳仪（上海琪特分析仪器有限公司）

YXJ-2离心机（湘仪离心机仪器有限公司）凝胶成像系统（上海复日科技有限公司）

TU-1901紫外分光光度计（北京普析通用仪器有限公司）

移液器（范围100-1000μl, 20-200μl, 0.5-10μl）（加拿大BBI公司）切片机（德国LEICA RM2245）

SpectraMax M2酶标仪（美国Molecular Devices公司）

**1.2.3培养基配制方法：**

DMEM/Low Glucose Medium + 10% FBS (四季青) + 1%双抗

DMEM/F12+ 20% FBS ( 四季青) + 1%双抗

**1.3****试验方法**

**1.3.1 NPMSC、BMSC分离培养**

**1.3.1.1NPMSC分离培养**

过量注射戊巴比妥处死老鼠，收集老鼠尾巴。在无菌条件下应用显微镜从每个大鼠尾巴的8个椎间盘内分离纤维环和髓核组织。在超净台内将髓核组织与纤维环分离。髓核组织用PBS冲洗，并剪碎成1×1×1mm 3大小组织碎块。用0.2%II型胶原酶在37℃水浴箱中消化2小时。加入PBS在1000转离心5分钟洗涤2次。再次加入

0.25%胰蛋白酶在37℃水浴箱中消化10分钟。加入PBS在1000转离心5分钟洗涤 2

次。分离的细胞用含有20%胎牛血清和青链霉素的DMEM/F12培养基，在37度，

5%CO2培养箱中培养。悬浮细胞和碎片通过细胞换液被去除，在1天后细胞贴壁每

3天换液。大约4周后当细胞达到90%融后用0.25%胰蛋白酶-EDTA消化后细胞传代。在第三代时被收获，细胞生长状态良好用于以下实验。

**1.3.1.2 BMSC分离培养**

无菌条件下从SD大鼠后肢取下长骨，剪开长骨两端。用含有10%胎牛血清和青链霉素的DMEM/LOW GLUCOSE培养基冲洗出长骨内骨髓。吹打后用200目滤网过滤。过滤后的培养液置入25cm2的培养瓶中培养，24小时后半量换夜，以后每3天换夜，当细胞达到90%融合后传代。在第三代细胞收获后用于实验。

**1.3.2 NPMSC、BMSC细胞形态观察**

NPMSC、BMSC培养到第三代在倒置显微镜下进行细胞形态学观察。

**1.3.3 NPMSC、BMSC细胞增殖能力检测**

用CCK-8法比较第三代的NPMSC和BMSC在1、3、5、7、9天的增殖能力。收集NPMSC和BMSC细胞，调整细胞密度至2×10 4个细胞/ml，接种于96孔细胞培养板，100 ul/孔，定期进行细胞换液。每个检测孔加入10 ul CCK-8试剂，在37℃，5% CO2环境中孵育1 h。分别在接种后0d，1 d，3 d，5d，7 d，9 d用酶标仪进行

检测，波长为450 nm。

**1.3.4 PCR检测NPMSC、BMSC干细胞基因表达**

**1.3.4.1应用Trizol提取总RNA**

1. 提取出的第三代NPMSC、BMSC加入Trizol裂解细胞，每10 cm2面积加1 ml

Trizol。用移液器吹打混匀。

2. 将裂解后样品室温放置5-10 min，使得核蛋白与核酸完全分离。

3. 加入0.2 ml氯仿，剧烈振荡15 sec，室温放置3 min.12,000 rpm 4°C 离心10 min

4. 吸取上层水相转移至干净的离心管中，加入等体积异丙醇，混匀，室温放置

20 min。

5. 12,000 rpm 4°C 离心10 min，弃上清。

6. 加入1 ml 75%乙醇洗涤沉淀。12,000 rpm 4°C离心3 min，弃上清。室温干燥5-10 min。

7. 加入30-50µl RNase -free ddH2O，充分溶解RNA. 将所得到的RNA溶液置于

-70°C 保存或用于后续试验。

**1.3.4.2反转录**

cDNA第一链合成

## （1） 在0.2-ml PCR管中加入以下试剂：

5µl total RNA

1µl Random Primer p(dN) 6(0.2µg/µl )

5µl Rnase -free ddH2O

（2）70°C 温浴5min。

（3）冰浴10sec，离心加入下列试剂：4.0µl 5\* Reaction Buffer

2.0µl dNTP Mix (10mmol/L) 1.0µl Rnase inhibitor (20U/µl )

2.0µl AMV Reverse Transcriptase (10U/µl) 20.0µl Total volume

（4）37°C 温浴5min。

（5）42°C温浴60min。

（6）70°C温浴10min。终止反应。

（7）将上述溶液-20°C 保存。

**1.3.4.3引物序列如下：**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Primers | Sequences (5’-3’) | Length of products |
| R-β-actin-F | CGTAAAGACCTCTATGCCAACA |  |
|  |  | 163bp |
| R-β-actin-R | AGCCACCAATCCACACAGAG |  |
| R-NANOG-F | AGGACGAGACAGAAGGATCACC |  |
|  |  | 218bp |
| R-NANOG-R | ATAGAAGCCTCTTGGCGGAA |  |
| R-OCT-4-F | GGTGGAGGAAGCTGACAACAA | 396bp |
| R-OCT-4-R | GGAAAAGGGACCGAGTAGAGTG |  |
| R-SOX2-F | TGTTCAATCCCACCCTTTTCA |  |
| R-SOX2-R | GGCAGCCTGGTTCCAATAA | 177bp |

**1.3.4.4反应体系如下：**

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 用量 |
| 模板 cDNA | 0.5μl |
| 引物 F(10μM) | 0.5μl |
| 引物 R(10μM) | 0.5μl |
| DNTP(10 mM) | 0.5μl |
| TaqBuffer(10×) | 2.5μl |
| MgCl2(25mM) | 2μl |
| Taq 酶(5U/μl) | 0.2μl |
| H2O | 18.3μl |

**1.3.4.5反应条件如下：**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 程序 |  | |
| 温度 | 时间 |
| 预变性 | 95℃ | 3min |
| 变性 | 94℃ | 30s |
| 退火 | 56℃ | 30s |
| 延伸 | 72℃ | 90s |
| 修复延伸 | 72℃ | 8min |
| 循环数 | 35C | |

**1.3.4.6结果判定**

PCR结束后，扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳，紫外灯下观察结果。

**1.3.5 PCR检测NPMSC、BMSC干细胞表面标记物表达**

**1.3.5.1应用Trizol提取总RNA**

方法同前

**1.3.5.2反转录**

方法同前

**1.3.5.3引物序列如下：**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Primers | Sequences (5’-3’) | Length of products |
| R-β-actin-F | CGTAAAGACCTCTATGCCAACA |  |
|  |  | 163bp |
| R-β-actin-R | AGCCACCAATCCACACAGAG |  |
| R-CD44-F | CAACGAAGATGCCTGGTACG | 145bp |
| R-CD44-R | GCAATGGTGCTGGAGATAAAAT |  |
| R-CD105-F | GTCGGTTGTGATCTACAGCGTG |  |
|  |  | 197bp |
| R-CD105-R | CGAGTCTCAGTGCCATTTTGC |  |
| R-CD73-F | CTCATCATCCTCAAGGCTCCA |  |
|  |  | 314bp |
| R-CD73-R | TCCTCCCTCCCAAGTTCTGT |  |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| R-CD90-F | CCAAGCCACGGACTTCATT |  |
|  |  | 297bp |
| R-CD90-R | ATCGGGTCTCCAGGACAAAC |  |
| R-CD45-Fn | ACCTGCTCCTGAAACTTCGAC |  |
|  |  | 264bp |
| R-CD45-Rn | CCCCAAATTGATTGTACTCCAC |  |
| R-CD34-Fn | AACCACAGACTTACCCAACCG |  |
|  |  | 313bp |
| R-CD34-Rn | AGCTCTTCTCCCCTTTCCTTC |  |
| R-CD14-F | TTGTCAGGAACTTTGGCTTTG |  |
|  |  | 355bp |
| R-CD14-R | TTGTGGGGTTGGGGATTTA |  |
| R-HLA-DR-Fn | CCTTGACCTCAGTGAAAGCAGT |  |
| R-HLA-DR-Rn | TGGGGCATTCCATAGCAGA | 226bp |

**1.3.5.4反应体系**

方法同前

1.3.5.5**反应条件**方法同前

**1.3.5.6结果判定**

PCR结束后，扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳，紫外灯下观察结果。

**1.3.6 NPMSC、BMSC成骨、成脂、成软骨诱导分化**

**1.3.6.1成骨诱导：**

**1. 成骨诱导液如下：**

|  |  |
| --- | --- |
| 成分 | 剂量 |
| SD 大鼠干细胞成骨诱导培养基 | 175ml |
| 干细胞胎牛血清 | 20ml |
| 青链霉素 | 2ml |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |
|  | 谷氨酰胺 | 2ml |  |
|  | 抗坏血酸 | 400μl |  |
|  | β-Glycerophosphate | 2ml |  |
|  | 地塞米松 | 20μl |  |
|  | Total Volume | 201ml |  |

SD大鼠干细胞成骨诱导液成分

**2. 明胶包被板子：**

a)向6孔板中加入1 ml 0.1%的Gelatin Solution，轻轻晃动，使培养皿底部完全被Gelatins Solution覆盖；

b）室温放置至少30 min；

c) 30 min后，在超净工作台中，吸弃Gelatin Solution，打开培养皿盖子，使剩余的Gelatin Solution 在30 min内风干；

d）一旦风干了，立刻盖上培养皿盖子；

**3. NPMSC、BMSC成骨诱导：**

a）当第三代NPMSC、BMSC细胞汇合度达到80-90%时，用Trypsin-EDTA（含有EDTA的胰酶）消化细胞，接种于提前用明胶包被好的6孔板中，细胞密度为3×10 3cells/cm2, 37℃，5% CO2培养箱中培养细胞；

b）24小时后，轻轻的吸除培养基，加入2 ml 成骨诱导液；

c）每3天（每隔2天）换一次成骨诱导液；

d）诱导21天后，细胞可以用来固定和用Alizarin red染色；

**4. Alizarin red 染色实验步骤：**

a）在诱导后，吸弃成骨诱导液，用1×PBS 洗涤；

b) 用 2ml 4%甲醛固定 30 min；

c) 用 1×PBS 洗涤 2 次；

d)用1 ml Alizarin red工作液染色，室温染色3-5 min；

e) 用 1×PBS 洗涤 2 次；

f）倒置显微镜进行拍照。

**1.3.6.2成脂诱导：**

**1. 成脂诱导液如下：**

|  |  |
| --- | --- |
| 成分 | 剂量 |
| SD 大鼠干细胞成脂诱导培养基 A | 175ml |
| 干细胞胎牛血清 | 20ml |
| 青链霉素 | 2ml |
| 谷氨酰胺 | 2ml |
| 胰岛素 | 200μl |
| IBMX | 200μl |
| 吲哚美辛 | 200μl |
| 地塞米松 | 200μl |
| Total Volume | 200ml |

SD大鼠干细胞成脂诱导培养液A成分

|  |  |
| --- | --- |
| 成分 | 剂量 |
| SD 大鼠干细胞成脂诱导培养基 B | 175ml |
| 干细胞胎牛血清 | 20ml |
| 青链霉素 | 2ml |
| 谷氨酰胺 | 2ml |
| 胰岛素 | 200μl |
| Total Volume | 199ml |

SD大鼠干细胞成脂诱导培养液B成分

**2. NPMSC、BMSC成脂诱导：**

a)待第三代NPMSC、BMSC细胞达到80-90%融合时， 用

Trypsin-EDTA（含有EDTA的胰酶）消化细胞；

b）将干细胞接种于六孔板中，每孔约2x104/cm2，加入干细胞完全培养液

（2ml/孔），放入37°C，5% CO 2孵箱中培养；

c）每三天进行换液（干细胞完全培养液），直至细胞达到100%融合；

d）待细胞达到100%融合时（可能需要3-5天），移去旧的培养液，加入成脂诱导液A（2ml/孔）开始诱导；

e）三天后更换为成脂诱导液B（2ml/孔）进行维持，24h后再更换为成脂诱导液A诱导（2ml/孔），如此进行3个循环。当脂滴出现较多，但比较小时，可以用成脂诱导液B进行维持7天（每3天换一次液），脂滴增大；

f） 油红 O 染色。

**3. 油红 O 染色步骤：**

a）诱导完成后，吸除成脂诱导液，用1×PBS 洗涤；

b) 2 ml 4%多聚甲醛固定 30 min；

c) 1×PBS 洗涤 2 次；

d)加入1 ml oil red O工作液（和ddH2O按照3: 2 稀释，并且用滤纸过滤），

37℃染色30 min；

e)用1×PBS 洗涤2-3次；

f）倒置显微镜下拍照。

**1.3.6.3成软骨诱导：**

**1. 成软骨诱导液如下：**

|  |  |
| --- | --- |
| 成分 | 剂量 |
| SD 大鼠干细胞成软骨诱导培养基 | 194ml |
| 地塞米松 | 20μl |
| 抗坏血酸 | 600μl |
| ITS + Supplement | 2ml |
| 丙酮酸钠 | 200μl |
| 脯氨酸 | 200μl |
| TGF-β3 | 2ml |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |
|  | Total Volume | 200ml |  |

SD大鼠干细胞成软骨诱导培养液成分

不完全培养基：培养基+地塞米松+抗坏血酸+ITS+丙酮酸钠+脯氨酸完全培养基：10μl TGF-β3+1ml不完全培养基

**2. NPMSC、BMSC细胞成软骨诱导：**

a)待干细胞达到80-90%融合时，用Trypsin-EDTA（含有EDTA的胰酶）消化

细胞；

b) 800 rpm, 3 min，离心，弃上清；

c）用3 ml 不完全成软骨诱导液重悬细胞（2.5×10 5个细胞）；

d) 800 rpm, 3 min，离心，弃上清；

e）用4 ml 完全成软骨诱导液（不完全成软骨诱导液+TGF-ß3）重悬细胞

（2×10 6个细胞）；

f）将细胞悬液平均分配到8个15 ml离心管中，每个15 ml离心管500 ul 细

胞悬液（2.5×10 5个细胞）；

g) 0rpm, 3 min，离心；

h）放入37°C，5% CO 2孵箱中培养，24h内不移动；

i）每2-3天进行一下换液；每管加入500ul新鲜的完全成软骨诱导液（不完全成软骨诱导液+TGF-ß3）；

j）第21d的时候，收集细胞。

**3. Alcian Blue染色**

a)石蜡包埋后切片; b) Alcian Blue染色30分钟;

c)用PBS洗涤3次；

d）倒置显微镜下拍照。

**1.3.7 PCR检测NPMSC和BMSC成骨、成脂、成软骨基因的表达**

**1.3.7.1应用Trizol提取总RNA**

1. 分别收集NPMSC和BMSC成骨、成脂、成软骨诱导完成后的细胞加入Trizol

裂解细胞，每10 cm2面积加1 ml Trizol。用移液器吹打混匀。

2. 将裂解后样品室温放置5-10 min，使得核蛋白与核酸完全分离。

3. 加入0.2 ml 氯仿，剧烈振荡15 sec，室温放置3 min.12,000 rpm 4°C 离心10 min

4. 吸取上层水相转移至干净的离心管中，加入等体积异丙醇，混匀，室温放置

20 min。

5. 12,000 rpm 4°C 离心10 min，弃上清。

6. 加入1 ml 75%乙醇洗涤沉淀。12,000 rpm 4°C离心3 min，弃上清。室温干燥5-10 min。

7. 加入30-50µl RNase -free ddH2O，充分溶解RNA. 将所得到的RNA溶液置于

-70°C 保存或用于后续试验。

**1.3.7.2反转录**

cDNA第一链合成

## （1） 在0.2-ml PCR管中加入以下试剂：

5µl total RNA

1µl Random Prim er p(dN) 6(0.2µg/µl )

5µl Rnase -free ddH2O

（2）70°C 温浴5min。

（3）冰浴10sec，离心加入下列试剂：4.0µl 5\*Reaction Buffer

2.0µl dNTP Mix (10mmol/L) 1.0µl Rnase inhibitor (20U/µl )

2.0µl AMV Reverse Transcriptase (10U/µl) 20.0µl Total volume

（4）37°C 温浴5min。

（5）42°C温浴60min。

（6）70°C温浴10min。终止反应。

（7）将上述溶液-20°C 保存。

**1.3.7.3引物序列如下：**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Primers | Sequences (5’-3’) | Length of products |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  |  |
| R-β-actin-F | CGTAAAGACCTCTATGCCAACA |  |
|  |  | 163bp |
| R-β-actin-R | AGCCACCAATCCACACAGAG |  |
| R-ALP-F | GCCTGGACCTCATCAGCATT | 420bp |
| R-ALP-R | TGTAGCCACCAAACGTGAAAAC |  |
| R-PPAR-2-F | TTTCTGGGTGGATTGAAGTGG | 362bp |
| R-PPAR-2-R | TTTGCATGGTTCTGAGTGCTAAG |  |
| R-LPP-F | CGAGCCCTGCTACATCAATACG |  |
|  |  | 288bp |
| R-LPP-R | TCACGGTCCAGAGCCACAAT |  |
| R-APP-F | ACCCATCAGGGACCAAAACC |  |
|  |  | 221bp |
| R-APP-R | GAGAAGGGCATCGCTTACAAA |  |
| R-COL2A1-F | GGAATTTGGTGTGGACATAGGG |  |
|  |  | 173bp |
| R-COL2A1-R | GGACTGTGAGGTTAGGATAGTTGAA |  |
| R-PG-Fn | CTTCTGACTCCAAAAGCCCACT |  |
|  |  | 140bp |
| R-PG-Rn | ACCTTCTTCCTCCTCTTCCTCC |  |
| R-SOX9-F | AAACTTCAGTGGGAGCGACAA |  |
|  |  | 110bp |
| R-SOX9-R | AGGAGGGAGGGAAAACAGAGA |  |

**1.3.7.4反应体系如下：**

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 用量 |
| 模板 cDNA | 0.5μl |
| 引物 F(10μM) | 0.5μl |
| 引物 R(10μM) | 0.5μl |
| DNTP(10 mM) | 0.5μl |
| TaqBuffer(10×) | 2.5μl |
| MgCl2(25mM) | 2μl |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |
|  | Taq 酶(5U/μl) | 0.2μl |  |
|  | H2O | 18.3μl |  |

**1.3.7.5反应条件如下：**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 程序 |  | |
| 温度 | 时间 |
| 预变性 | 95℃ | 3min |
| 变性 | 94℃ | 30s |
| 退火 | 56℃ | 30s |
| 延伸 | 72℃ | 90s |
| 修复延伸 | 72℃ | 8min |
| 循环数 | 35C | |

**1.3.7.6结果判定**

PCR结束后，扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳，紫外灯下观察结果。

**2结果**

### **2.1** **NPMSC**、**BMSC**细胞形态观察

NPMSC原代细胞24小时后即可贴壁生长，形态以梭形较多，其中含有少量三角形及多边形，4周左右达到80%-90%融合，传代培养后细胞生长较原代培养明显加快，5-7d后细胞即可融合，第3代细胞形态基本保持一致为纺锤样长梭形。BMSC原代细胞贴壁后生长较快4-5天即可达到80%-90%融合，形态上和NPMSC相似。第三代以后NPMSC和BMSC生长速度基本一致。NPMSC和BMSC在形态学上贴壁后都为长梭形，表现为成纤维细胞的形态。见图2-1、2-1、2-3、2-4。





图 2-1 ×10镜下观察NPMSC 图2-2 ×10镜下观察NPMSC



图 2-3 ×10镜下观察BMSC 图2-4 ×10镜下观察BMSC

### **2.2** **NPMSC**、**BMSC**细胞增殖能力的比较

经CCK-8检测NPMSC和BMSC在第三代的1、3、5、7、9天的增殖能力相近，无明显差别。在第3-5天细胞增殖能力最强，7天以后增殖能力明显下降。见图2-5。



图 2-5 NPMSC、BMSC CCK-8

### **2.3** **PCR**检测**NPMSC**、**BMSC**干细胞基因表达

NPMSC、BMSC均表达NANOG、OCT-4、SOX2干细胞基因。见图2-6.



图 2-6 NPMSC、BMSC表达NANOG、OCT-4、SOX2干细胞基因

### **2.4** **PCR**检测**NPMSC**、**BMSC**干细胞表面标记物

NPMSC、BMSC均表达干细胞表面标志物：CD44、CD105、CD73、CD90，不表达造血干细胞标志物：CD45、CD34、CD14、HLA-DR。见图2-7、2-8。



图 2-7 NPMSC、BMSC表达CD44、CD105、CD73、CD90



图 2-8 NPMSC、BMSC表达CD45、CD34、HLA-DR、CD14

### **2.5** **NPMSC**、**BMSC**成骨、成脂、成软骨诱导分化

2.5.1**成骨分化：**NPMSC、BMSC在成骨诱导21天Alizarin red染色后显微镜下可以观察到有大量钙结节形成。见图2-9、2-10。





图 2-9 ×10镜下观察NPMSC茜素红染色图2-10 ×10镜下观察BMSC茜素红染色

2.5.2**成脂分化：**NPMSC、BMSC在成脂诱导21天oil red O染色后观察，可见红染脂肪滴空泡形成。见图2-11、2-12。



图 2-11 ×40镜下观察NPMSC油红O染色图2-12 ×40镜下观察BMSC油红O染色

2.5.3**成软骨分化：**NPMSC、BMSC在成软骨诱导21天Alcian Blue染色后观察，可见蓝染的蛋白聚糖。见图2-13、2-14。





图 2-13 ×10镜下观察NPMSC甲苯胺蓝染色图2-14 ×10镜下观察BMSC甲苯胺蓝染色

### **2.6** **PCR**检测**NPMSC**、**BMSC**诱导后成骨、成脂、成软骨基因的表达

两种干细胞在体外分别成骨、成脂、成软骨诱导后经PCR 检测表达成骨基因

（ALP），成脂基因（PPAR-2、LPP、APP），成软骨基因（II型胶原、蛋白聚糖、SOX9）。见图2-15、2-16、2-17。





图 2-15 NPMSC、BMSC成骨基因表达

图 2-16 NPMSC、BMSC成脂基因表达



图 2-17 NPMSC、BMSC成软骨基因表达

**3****讨论**

干细胞具有自我更新、快速增殖和多向分化的能力[28]。成人间充质干细胞（MSCs）是一种更好的自体来源的祖细胞，它能很容易的从骨髓、脂肪组织中分离出BM-MSCs和AD-MSCs。越来越多的研究表明这些间充质干细胞能够向类髓核细胞分化[29-38]。

BMSC是最早用作细胞治疗的成体干细胞，这方面的研究起步最早，研究的也最深入

[39]. 骨髓组织中除了用于治疗多种血液疾病的造血干细胞，还有其他很多类型的成体

干细胞被分离出来，例如：内皮祖细胞和BMSC等。BMSC是骨髓基质细胞的祖胞胞，在控制血细胞再生方面发挥着重要作用[40]，并且在体内和体外条件下都可以向成骨细胞、软骨细胞和脂肪细胞方向分化，此外，还有免疫豁免、甚至抗炎活性。正是由于以上诸多优点，BMSC是细胞疗法应用中特别在外科学领域中的理想种子细胞。目前用到的种子细胞有从骨髓、脂肪、脐带等组织提取出来的干细胞，还有同源性软骨细胞和髓核细胞等[41-44]。

本实验部分中，从SD大鼠的椎间盘髓核组织和骨髓组织中分离培养了NPMSC、

BMSC. NPMSC原代细胞24小时后即可贴壁生长，形态以梭形较多，其中含有少量三角形及多边形，第3代细胞形态基本保持一致为纺锤样长梭形。BMSC原代细胞贴壁后生长较快4-5天即可达到80%-90%融合，形态上和NPMSC相似。第三代以后

NPMSC和BMSC生长速度基本一致。NPMSC和BMSC在形态学上贴壁后都为长梭形，表现为成纤维细胞的形态。经CCK-8检测NPMSC和BMSC在第三代的1、3、

5、7、9天的增殖能力相近，无明显差别。在第3-5天细胞增殖能力最强，7天以后增殖能力逐渐下降。NPMSC、BMSC均表达NANOG、OCT-4、SOX2干细胞基因。

NPMSC、BMSC均表达干细胞表面标志物：CD44、CD105、CD73、CD90，不表达造血干细胞标志物：CD45、CD34、CD14、HLA-DR. NPMSC、BMSC在成骨诱导

21天Alizarin red染色后显微镜下可以观察到有大量钙结节形成具有成骨分化能力。

NPMSC、BMSC在成脂诱导21天oil red O染色后观察，可见红染脂肪滴空泡形成，两种干细胞均具有成脂分化能力。镜下观察NPMSC形成的脂滴较BMSC少，说明NPMSC的成脂能力较BMSC弱。NPMSC、BMSC成软骨诱导24小时后即可聚集成细胞团，以后细胞团逐渐增大。在成软骨诱导21天Alcian Blue染色后观察，可见蓝

染的蛋白聚糖。NPMSC、BMSC体外成骨诱导后经PCR检测表达成骨基因(ALP)。

ALP 活性认为和成骨细胞早期分化有关，在矿化过程中表现为先增加后逐渐减少[45,

46]. ALP 是一种早期骨化的标记物[47]。因此检测ALP 来证明干细胞的成骨能力。

NPMSC、BMSC体外成脂诱导后经PCR检测表达成脂基因（PPAR-2、LPP、APP）。

NPMSC、BMSC体外成软骨诱导后经PCR检测表达成软骨基因（II型胶原、蛋白聚糖、SOX9），II型胶原、蛋白聚糖是细胞外基质的主要成分[48]，SOX9在软骨形成和刺激细胞外基质产生中有重要作用。

通过本实验结果可以得出结论，NPMSC和BMSC在形态、增殖能力、干细胞基因表达、干细胞表面标记物及成骨、成软骨能力无明显差别，NPMSC成脂能力稍差。

本实验结果有力的证明了NPMSC在体外培养和诱导条件下具有和BMSC相当的特性。在体内的条件下两种细胞是否具有相同的分化能力和增殖能力，还没有进行相关实验。另外，本实验选用了SD大鼠的NPMSC和BMSC，对于人体正常髓核组织来源的NPMSC和BMSC是否有区别还需要进一步实验验证。

# **第三部分** **NPMSC**和**BMSC**成软骨能力的比较

以上实验部分得出结论，NPMSC和BMSC在细胞形态、增殖能力、干细胞基因表达、干细胞表面标志物以及体外诱导条件下具有成骨、成脂、成软骨能力。那么，NPMSC和BMSC在体外诱导后成软骨能力有什么区别，和BMSC相比是否有更好的成软骨能力？

本实验部分比较NPMSC和BMSC成软骨诱导后，通过PCR、RT-PCR、Western blot检测II型胶原、蛋白聚糖、SOX9的基因和蛋白表达，来分析NPMSC和BMSC在成软骨能力上有何区别。能否作为一种新的种子细胞来治疗椎间盘退变。

### **1** 材料和方法

**1.1****研究对象：**

由SD大鼠提取的第三代NPMSC和BMSC。

**1.2****主要试剂和仪器**

**1.2.1主要试剂**

DMEM-F12(Hyclone) DMEM/Low Glucose（Hyclone）胰蛋白酶（Trypsin）（Solarbio）Ⅱ型胶原酶（Solarbio）

胎牛血清（杭州四季青）

双抗（青、链霉素（Solarbio）

培养板（6孔、96孔等）（Corning）培养瓶（25mL）（Corning）

SD大鼠干细胞成软骨诱导培养液（广州Cyagen）

Trizol提取试剂盒（上海生工）

第一链cDNA合成试剂盒（上海生工）溴化乙锭（上海生工）

琼脂糖（加拿大BBI）无乙水醇（上海生工）异丙醇（上海生工）丙三醇（上海生工）

TaqDNA聚合酶（上海生工）10×PCR Buffer（上海生工）MgCl2（25mM）（上海生工）dNTP（10mM）（上海生工）

DNA Marker（上海生工）6×DNA Loading Dye（上海生工）

10×TAE（400mM Tris-acetate and 10mM EDTA, pH8.0）（上海生工）引物（上海生工）

SybrGreen PCR Master Mix 2X(ABI) Anti-Collagen II antibody(Abcam) Aggrecan antibody(Santa cruz)

Sox-9 antibody(Santa cruz)

**1.2.2主要仪器**

HERA cell 150 CO2培养箱（Heraeus）CA950-2超净工作台（上海净化仪器厂）HS-11-2型循环水浴箱（北京东方仪器厂）

IX50荧光倒置显微镜（Olympus）

MDF-U32V 超低温冰箱（-75℃）(SANYO)

PCR反应扩增仪（美国ABI公司）

SW-CJ-1D洁净工作台（江苏苏洁净化设备厂）

HC-2518R冷冻离心机（加拿大BBI）

TGL-14G台式高速离心机（上海医疗器械有限公司）

XW-80A微型旋涡混合仪（上海沪西分析仪器厂有限公司）

H6-1微型电泳槽（上海精益有机玻璃制品仪器厂）

DYY-8型稳压稳流电泳仪（上海琪特分析仪器有限公司）

YXJ-2离心机（湘仪离心机仪器有限公司）凝胶成像系统（上海复日科技有限公司）

TU-1901紫外分光光度计（北京普析通用仪器有限公司）

移液器（范围100-1000μl, 20-200μl, 0.5-10μl）（加拿大BBI公司）

StepOne型荧光定量PCR仪（ABI）

**1.3****实验方法**

**1.3.1 NPMSC和BMSC在体外诱导条件下向软骨细胞分化**

**1. 成软骨诱导液如下：**

|  |  |
| --- | --- |
| 成分 | 剂量 |
| SD 大鼠干细胞成软骨诱导培养基 | 194ml |
| 地塞米松 | 20μl |
| 抗坏血酸 | 600μl |
| ITS + Supplement | 2ml |
| 丙酮酸钠 | 200μl |
| 脯氨酸 | 200μl |
| TGF-β3 | 2ml |
| Total Volume | 200ml |

SD大鼠干细胞成软骨诱导培养液成分

不完全培养基：培养基+地塞米松+抗坏血酸+ITS+丙酮酸钠+脯氨酸完全培养基：10μl TGF-β3+1ml不完全培养基

**2. NPMSC、BMSC细胞成软骨诱导：**

a)待干细胞达到80-90%融合时，用Trypsin-EDTA（含有EDTA的胰酶）消化

细胞；

b）800 rpm，3min，离心，弃上清；

c）用3ml不完全成软骨诱导液重悬细胞（2.5×10 5个细胞）；

d）800rpm，3min，离心，弃上清；

e）用4ml 完全成软骨诱导液（不完全成软骨诱导液+TGF-ß3）重悬细胞

（2×10 6个细胞）；

f）将细胞悬液平均分配到8个15 ml离心管中，每个15ml离心管500ul细胞悬液（2.5×10 5个细胞）；

g) 800rpm，3 min，离心；

h）放入37°C，5% CO2孵箱中培养，24h内不移动；

i）每2-3天进行一下换液；每管加入500ul新鲜的完全成软骨诱导液（不完全成软骨诱导液+TGF-ß3）；

j）第21天的时候，收集细胞。

**1.3.2 PCR检测II型胶原、蛋白聚糖、SOX9基因的表达**

**1.3.2.1应用Trizol提取总RNA**

1. 分别收集NPMSC和BMSC成软骨诱导完成后的细胞加入Trizol裂解细胞，每

10 cm2面积加1mlTrizol。用移液器吹打混匀。

2. 将裂解后样品室温放置5-10 min，使得核蛋白与核酸完全分离。

3. 加入0.2 ml氯仿，剧烈振荡15sec，室温放置3min.12,000 rpm4°C 离心10min

4. 吸取上层水相转移至干净的离心管中，加入等体积异丙醇，混匀，室温放置

20min。

5. 12,000rpm4°C 离心10 min，弃上清。

6. 加入1ml75%乙醇洗涤沉淀。12,000rpm4°C 离心3min，弃上清。室温干燥5-10

min。

7. 加入30-50µl RNase -free ddH2O，充分溶解RNA. 将所得到的RNA溶液置于

-70°C 保存或用于后续试验。

**1.3.2.2反转录**

cDNA第一链合成

## （1） 在0.2ml PCR管中加入以下试剂：

5µl total RNA

1µl Random Primer p(dN) 6(0.2µg/µl )

5µl Rnase -free ddH2O

（2）70°C 温浴5min。

（3）冰浴10sec，离心加入下列试剂：4.0µl 5\*Reaction Buffer

2.0µl dNTP Mix (10mmol/L) 1.0µl Rnase inhibitor (20U/µl )

2.0µl AMV Reverse Transcriptase (10U/µl) 20.0µl Total volume

（4）37°C 温浴5min。

（5）42°C温浴60min。

（6）70°C温浴10min。终止反应。

（7）将上述溶液-20°C 保存。

**1.3.2.3引物序列如下：**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Primers | Sequences (5'-3') | Length of products |
| R-β-actin-F | CGTAAAGACCTCTATGCCAACA |  |
|  |  | 163bp |
| R-β-actin-R | AGCCACCAATCCACACAGAG |  |
| R-COL2A1-F | GGAATTTGGTGTGGACATAGGG |  |
|  |  | 173bp |
| R-COL2A1-R | GGACTGTGAGGTTAGGATAGTTGAA |  |
| R-PG-Fn | CTTCTGACTCCAAAAGCCCACT |  |
|  |  | 140bp |
| R-PG-Rn | ACCTTCTTCCTCCTCTTCCTCC |  |
| R-SOX9-F | AAACTTCAGTGGGAGCGACAA |  |
|  |  | 110bp |
| R-SOX9-R | AGGAGGGAGGGAAAACAGAGA |  |

**1.3.2.4反应体系如下：**

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 用量 |
| 模板 cDNA | 0.5μl |
| 引物 F(10μM) | 0.5μl |
| 引物 R(10μM) | 0.5μl |
| DNTP(10 mM) | 0.5μl |
| TaqBuffer(10×) | 2.5μl |
| MgCl2(25mM) | 2μl |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |
|  | Taq 酶(5U/μl) | 0.2μl |  |
|  | H2O | 18.3μl |  |

**1.3.2.5反应条件如下：**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 程序 |  | |
| 温度 | 时间 |
| 预变性 | 95℃ | 3min |
| 变性 | 94℃ | 30s |
| 退火 | 56℃ | 30s |
| 延伸 | 72℃ | 90s |
| 修复延伸 | 72℃ | 8min |
| 循环数 | 35C | |

**1.3.2.6结果判定**

PCR结束后，扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳，紫外灯下观察结果。

**1.3.3 RT-PCR检测II型胶原、蛋白聚糖、SOX9基因的表达**

用Real-Time PCR定量检测II型胶原、蛋白聚糖、SOX9基因的表达。

**1.3.3.1应用Trizol提取总RNA**

1. 分别收集NPMSC和BMSC成软骨诱导完成后的细胞加入Trizol裂解细胞，每

10 cm2面积加1mlTrizol。用移液器吹打混匀。

2. 将裂解后样品室温放置5-10 min，使得核蛋白与核酸完全分离。

3. 加入0.2 ml氯仿，剧烈振荡15sec，室温放置3min.12,000rpm4°C离心10 min

4. 吸取上层水相转移至干净的离心管中，加入等体积异丙醇，混匀，室温放置

20min。

5. 12,000rpm4°C离心10min，弃上清。

6. 加入1ml 75%乙醇洗涤沉淀。12,000rpm4°C 离心3min，弃上清。室温干燥5-10

min。

7. 加入30-50µlRNase -freeddH2O，充分溶解RNA. 将所得到的RNA溶液置于

-70°C 保存或用于后续试验。

**1.3.3.2反转录**

cDNA第一链合成

## （1） 在0.2ml PCR管中加入以下试剂：

5µl total RNA

1µl Random Primer p(dN) 6(0.2µg/µl )

5µl Rnase -free ddH2O

## （2） 70°C 温浴5min。

## （3） 冰浴10sec，离心加入下列试剂：4.0µl 5\*Reaction Buffer

2.0µl dNTP Mix (10mmol/L) 1.0µl Rnase inhibitor (20U/µl )

2.0µl AMV Reverse Transcriptase (10U/µl) 20.0µl Total volume

## （4） 37°C 温浴5min。

## （5） 42°C温浴60min。

（6）70°C温浴10min。终止反应。

（7）将上述溶液-20°C 保存。

**1.3.3.3引物序列如下：**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Primers | Sequences (5'-3') | Length of products |
| R-β-actin-F | CGTAAAGACCTCTATGCCAACA |  |
|  |  | 163bp |
| R-β-actin-R | AGCCACCAATCCACACAGAG |  |
| R-COL2A1-F | GGAATTTGGTGTGGACATAGGG |  |
|  |  | 173bp |
| R-COL2A1-R | GGACTGTGAGGTTAGGATAGTTGAA |  |
| R-PG-Fn | CTTCTGACTCCAAAAGCCCACT |  |
|  |  | 140bp |
| R-PG-Rn | ACCTTCTTCCTCCTCTTCCTCC |  |
| R-SOX9-F | AAACTTCAGTGGGAGCGACAA | 110bp |

|  |  |
| --- | --- |
| R-SOX9-R | AGGAGGGAGGGAAAACAGAGA |

**1.3.3.4配置PCR反应液如下：**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Reaction Component | Concentration | Volume(μl) |
| SybrGreen qPCR Master Mix | 2X | 10 |
| 引物 F (10μM) | 10μM | 1 |
| 引物 R (10μM) | 10μM | 1 |
| ddH20 |  | 6 |
| Template (cDNA) |  | 2 |
| Total |  | 20 |

**1.3.3.5反应条件**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Thermal Cycler | Times and Temperatures | | | 熔解曲线步骤 |
| Initial Steps | Each of 40 cycles | |
| Melt | Anneal/  Extend |
| ABI Stepone plus 型荧  光定量 PCR 仪 | HOLD | CYCLE | |
| 3 min 95℃ | 15sec 95℃ | 40s 60℃ |

**1.3.3.6结果判定**

完成上述步骤后，把加好样品的96孔板放在ABI Stepone plus型荧光定量PCR

仪中进行反应。

**1.3.3.7数据分析**

1.溶解曲线：Tm值＞85℃，单峰值认为扩增为特异性。

2.相对定量结果计算（2 -(ΔΔCt)法）

ΔCt目的基因=ΔCt诱导后-ΔCt诱导前

-ΔΔCt=-（ΔΔCt诱导后-ΔΔCt诱导前）

**1.3.4 Western-blotting检测II型胶原、蛋白聚糖、SOX9蛋白的表达**

分别提取NPMSC和BMSC诱导前后细胞的总蛋白，应用Western-blotting定量检测II型胶原、蛋白聚糖、SOX9蛋白的表达。

**1.3.4.1 实验步骤：**

1. 细胞处理；

2. 蛋白提取：

a. 按每20 ul紧实细胞体积重，加入200ulLysisbuffer。剧烈震荡使细胞充分裂解，冰上放置10min，重复操作一次。

b. 离心：13000r/min，4℃，20 min，取上清即为全蛋白提取物。

c. 蛋白定量：使用改良型BCA蛋白浓度测定试剂盒（sangon, SK3051）进行蛋白定量。

3. 制胶：根据目标蛋白大小制备不同浓度（8%、10%、12%）的胶备用蛋白大小和胶浓度：

0~10kd 上层：12% 下层：15%

10~20kd上层：10%下层：12%分离胶浓度：20kd-80kd 10%

80kd-130kd 8%

>130kd上层：6%下层：8%

4. 制样：普通蛋白上样量：40 ug

磷酸化蛋白上样量：80-100 ug

上样体积：20-40 ul（20% Loading buffer）

5. 电泳：浓缩胶80 V约30 min分离胶120 V约90min。

6. 转膜：

a) PVDF膜甲醇活化时间：3min

b)滤纸、PVDF膜、SDS胶转膜buffer平衡时间：15min

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 蛋白大小 | 0-20kd | 20-100kd | >100kd |
| 转膜方式 | 湿转 | 湿转 | 湿转 |
| 转膜条件 | 1-2 张膜  恒流：200mA 时间：70 min | 1-2 张膜  恒 流 ：  200-300mA  时间：2.5h | 1-2 张膜  恒流：100mA 过夜  或 恒压： 30V过夜 |

7. 封闭：5%脱脂奶粉+1%BSA 37℃120min or 4℃过夜

抗体稀释液：

5%脱脂奶粉 or 1% BSA

8. 一抗：(collagen-II(1:5000; Abcam), SOX-9 (1:1000; Santa

Cruz), aggrecan (1:1000; Santa Cruz),β-actin(1:2000; Santa Cruz))，4℃过夜第二天复温30-60min洗3次，每次10min

9. 二抗：37℃60min,1:5000-1: 10000稀释缓慢振荡。

10. 用ECL发光液检测蛋白表达量。

11. 用目的蛋白的灰度值除以内参β-actin的灰度值以校正误差，所得结果即为蛋白的相对含量。

**1.4统计学方法：**

结果以均数±标准差（Mean±S. D. ）表示，组间比较采用单因素方差分析（one-way

ANOVA），数据分析采用SPSS 13.0统计软件，P<0.05认为具有统计学意义。

**2结果**

**2.1** **NPMSC和BMSC在体外诱导条件下均可以向软骨分化。**

NPMSC、BMSC在成软骨诱导21天Alcian Blue染色后观察，可见蓝染的蛋白聚糖。见图2-1、2-2





图 2-1 ×10镜下观察NPMSC成软骨图2-2 ×10 镜下观察BMSC成软骨

**2.2** **NPMSC和BMSC成软骨诱导后PCR检测II型胶原、蛋白聚糖、SOX9基因表达均增高，两者之间表达无差异。**

两种干细胞在体外诱导后经PCR检测表达成软骨基因（II型胶原、蛋白聚糖、

SOX9）。见图2-3、2-4、2-5.





图 2-3 诱导前后II型胶原的表达

图 2-4 诱导前后PG的表达



图 2-5 诱导前后SOX9表达

**2.3** **NPMSC和BMSC成软骨诱导后RT-PCR定量检测II型胶原、蛋白聚糖、SOX9基因表达均增高，两者之间表达无差异。**

NPMSC和BMSC在诱导前经RT-PCR检测II型胶原、蛋白聚糖、SOX9，低表达。诱导后II型胶原、蛋白聚糖、SOX9高表达（P＜0.05）。NPMSC和BMSC诱导后对II型胶原、蛋白聚糖、SOX9进行比较，基因表达无明显差别。结果用2 -(ΔΔCt)进行统计列表。见图2-6。



图 2-6 NPMSC、BMSC诱导前后II型胶原、蛋白聚糖、SOX9 RT-PCR结果

\*P<0.05 vs. 诱导前#P<0.05 vs. 诱导前

1：诱导前2：诱导后

**2.4** **NPMSC和BMSC成软骨诱导后Western-blot定量检测II型胶原、蛋白聚糖、SOX9蛋白表达均增高，两者之间表达无差异。**

NPMSC和BMSC在成软骨诱导三周后II型胶原、蛋白聚糖、SOX9的表达蛋白均较诱导前增高(P＜0.05)。Western blot结果与RT-PCR一致。NPMSC和BMSC在成软骨诱导后相比，II型胶原、蛋白聚糖、SOX9蛋白表达无明显差异。见图2-7、2-8、2-9、2-10。



图 2-7 NPMSC、BMSC诱导前后II型胶原、蛋白聚糖、SOX9 Westernblot结果

**C O L 2 A 1**



\*

**#**

**0. 8**

**R e l a t i v e p r o t e i n e x p r e s s i o n**

**0. 6**

N P M S C B M S C

**0. 4**

**0. 2**

**0. 0**

II型胶原诱导前后蛋白表达

\*P<0.05 vs. 诱导前#P<0.05 vs. 诱导前

1：诱导前2：诱导后

**S O X 9**

**0. 6**

**R e l a t i v e p r o t e i n e x p r e s s i o n**

N P M S C  B M S C



**\***

**#**

**0. 4**

**0. 2**

**0. 0**

SOX9诱导前后蛋白表达（1诱导前2诱导后）

\*P<0.05 vs. 诱导前#P<0.05 vs. 诱导前

1：诱导前2：诱导后

**P G**

**0. 6**

**R e l a t i v e p r o t e i n e x p r e s s i o n**

N P M S C  B M S C



**#**

**\***

**0. 4**

**0. 2**

**0. 0**

PG诱导前后蛋白表达

\*P<0.05 vs. 诱导前#P<0.05 vs. 诱导前

1：诱导前2：诱导后

**3****讨论**

干细胞是各个器官保持动态平衡跟自我更新能力的关键。干细胞数量的减少跟其功能的改变引起的了所构成器官的功能障碍。内源性干细胞的活化是保持椎间盘细胞动态平衡的一种途径。有证据表明干细胞存在很多组织中，包括骨髓、皮肤（毛囊）、肌肉、胃肠道、肺、心脏、神经嵴（胚）、乳房、前列腺、韧带、肌腱中[49-51]。

椎间盘组织最突出的特点就是含有大量的细胞外基质(ECM)，主要维持椎间盘内细胞生存，其中椎间盘细胞外基质实质上是由大分子精细结构来吸引和储存水分。主要的大分子结构是由II型胶原和蛋白多糖组成的[52]。椎间盘中细胞外基质越多，内容物越丰富。椎间盘的完整依靠细胞外基质的合成和降解平衡来保持。椎间盘退变的特点是椎间盘形态改变和细胞外基质成分的变化，包括椎间盘细胞和含水量的减少。椎间盘退变时细胞外基质减少，造成椎间盘内水分减少，从而形成椎间盘结构的退变

[53]. 细胞疗法提供了一个治疗椎间盘退变的潜在性治疗方法。以前的研究人员报告运

各种类型的细胞：包括髓核细胞，软骨细胞和间充质干细胞等用于细胞疗法[54-56]。随着研究的进展，干细胞治疗已经应用于临床并取得了一定的研究成果。目前以BMSC做为种子细胞的研究最多。BMSC和其他种子细胞相比，骨髓间充质干细胞容易收获、分离和培养，在体外培养技术成熟。此外，间充质干细胞被认为是合适的，不仅为自体，而且也可以异体移植，因为他们缺乏HLA-II类抗原的表达。因此，骨髓间充质干细胞作为一个实用的细胞来源广泛应用在临床上。2010年Yoshikawa T等用自体骨髓干细胞注射到2名有腰痛伴有腰椎椎管狭窄的患者椎间盘内，术后2年观察患者X线、CT、核磁共振显示患者腰椎间盘突出不稳定改善，椎间盘内含水量增加，患者腰痛症状明显减轻[57]。2011年Orozco等用自体培养的骨髓干细胞采用注射治疗到10例慢性诊断为腰椎间盘退变有完整的纤维环背部疼痛患者的入髓核区域。并且进行为期1年的临床观察，并对背部疼痛，生活质量、椎间盘高度、核磁共振成像进行评价评价。71%的患者疼痛症状好转，生活质量提高，虽然椎间盘高度未恢复，但核磁共振显示椎间盘内含水量在12个月内显著升高[58]。因此，细胞疗法确实在一定程度上有逆转椎间盘退变的作用。2010年Blanco等[17]报道由退变椎间盘组织中分离培养出一些细胞，具有干细胞特性。本部分实验对髓核来源的干细胞进行了分离培养鉴定，并和BMSC进行比较来分析NPMSC做为新的种子细胞的可行性。

通过实验我们证明：NPMSC和BMSC在成软骨诱导前II型胶原、蛋白聚糖、

SOX9表达均比较低。诱导后通过检测II型胶原、蛋白聚糖、SOX9的基因和蛋白表达发现：这两种细胞在体外诱导条件下，通过PCR和RT-PCR检测II型胶原、蛋白聚糖、SOX9基因的表达均增高；Westernblot检测三种成软骨基因蛋白表达也均增高。与诱导前比较II型胶原、蛋白聚糖、SOX9这三种成软骨基因和蛋白表达明显增高有统计学意义。因此，NPMSC和BMSC在体外成软骨能力方面接近。

椎间盘内是一个高渗、低氧、低营养的微环境[59]。NPMSC来源于椎间盘内的髓核组织，可能比BMSC更适应椎间盘内高渗、低氧、低营养的环境，因此NPMSC可能比BMSC更好的修复椎间盘退变，这些还需要动物实验进一步证实。

本次试验存在的几个问题：

1.之前的研究表明人退变椎间盘来源的髓核干细胞有成骨、成软骨，没有成脂能力[17]。而本次试验髓核干细胞有成脂能力，可能与以下原因有关：之前的研究采用从人退变的髓核组织中提取的髓核干细胞，本实验采用从大鼠正常的髓核组织中提取的髓核干细胞。由于组织来源不同，而且退变的髓核组织可能本身分化能力就较弱，因此造成退变组织中的髓核干细胞无成脂能力。

2.髓核细胞目前还没有确切的细胞表面标记物，因此我们只能测定典型的细胞外基质蛋白聚糖和II型胶原以及软骨分化的表面标记物SOX-9作为检测指标。

3.本实验选用SD大鼠的髓核来源干细胞，而没有选用人的正常髓核组织分离的髓核来源干细胞是由于：为以后动物实验提供依据，如采用人的正常髓核组织提取会涉及取材和伦理道德方面的限制。

由于独特的微环境和细胞的耐受性，椎间盘是很难再生的组织。因为干细胞容易获得、有向椎间盘分化能力（与髓核细胞表面标志物表达相似），成人干细胞似乎是椎间盘再生的有发展前途的细类型。然而退变椎间盘内环境对移植细胞的影响还需要进一步研究。虽然动物椎间盘退变模型是非常有用的，但需要更精确的反映人类椎间盘自然退变的过程，符合椎间盘微环境的改变。基于上述要求，对于椎间盘生物学研究的需要，进一步改进椎间盘体内实验模型。具体的讲，就是移植细胞和椎间盘微环境之间的相互作用[60, 61]。这些体内的模拟系统包括含氧量、营养、PH、渗透压、细胞因子水平、机械负荷。理论上讲，所有这些影响因素能够独立地控制，能够维持细胞的活力和组织的完整性，为研究干细胞移植后的疗效提供一个合适的模型。

虽然细胞疗法在治疗椎间盘退变方面有一定的效果，但也存在一些风险。2012年Vadala等研究发现将骨髓间充质干细胞注射兔的退变椎间盘，有可能出现细胞泄漏从而导致骨赘形成的风险[62]。因此如何能更好的控制干细胞的诱导途径，以及避免意想不到的分化和导致肿瘤的风险还需要进一步研究[63]。

干细胞疗法在动物试验中已经显示出椎间盘组织再生巨大的潜力，它能够提升椎间盘高度、增加含水量、产生细胞外基质[64, 65]。人类临床试验的疗效是减轻疼痛，而动物实验无法体现出这一点。下腰痛的原因显然是多种原因造成的，大约有40%患者与椎间盘退变有关[66]。小规模的有关使用自体椎间盘细胞和MSC细胞移植能够减轻疼痛，减少残疾，提高椎间盘内的含水量，椎间盘高度没有增加[67, 68]。这些研究都提示干细胞疗法至少在目前临床治疗中是有效的，还需要更多的临床试验来观察长期疗效。如果这种治疗方法被证明是有长期疗效和高安全性，那么对于治疗椎间盘退变和慢性下腰痛将是革命性的进展。

细胞疗法为治疗这种增加患者痛苦和花费巨大的疾病提供很有潜力的治疗方法。随着人口老龄化和慢性肌肉骨骼疾病的增加，社会和家庭的负担更加增大。通过不同科学领域的合作（生物、化学、材料学等），结合临床医师和政府支持，这个领域的研究将会取得更大成果。

**4****结论**

通过本次试验证实了SD大鼠椎间盘髓核组织内可以分离培养出具有干细胞特性的髓核干细胞，其次髓核干细胞和骨髓干细胞相比在体外诱导条件下成软骨能力上相似，为组织工程提供了新的种子细胞。

参考文献

[1] Roh JS, Teng AL, Yoo JU. Degenerative disorders of the lumbar and cervical spine [J]. Orthop Clin North Am, 2005, 36: 255-262.

[2] Larson JW, Levicoff EA, Gilbertson LG. Biologic modification of animal models of intervertebral disc degeneration [J]. J Bone Joint Surg Am, 2006, 88: 83-87.

[3] Louw QA, Morris LD, Grimmer-Somer K. The prevalence of low back pain in Africa: a systematic review [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2007, 8: 105.

[4] Dagenais S, Caro J, Haldeman S. A systematic review of low back pain cost of illness studies in the United States and internationally [J]. Spine J, 2008, 8: 8-20.

[5] Childs J, Fritz J, Flynn T. A clinical predication rule to identify patients with low back pain most likely to benefit from spinal manipulation: A validation study [J]. Annals of Internal Medicine, 2004, 141: 920-928.

[6] Zhou GQ, Yang F, Leung VL, Cheung KMC. Molecular and cellular biology of the intervertebral disc and the use of animal models [J]. Curr Orthop, 2008, 22: 267-273.

[7] Schollmeier G, Lahr-Eigen R, Lewandrowski KU. Observations on fiber-forming collagens in the anulus fibrosus [J]. Spine, 2000, 25: 2736-2741.

[8] Buckwalter JA. Aging and degeneration of the human intervertebral disc [J]. Spine, 1995, 20: 1307-1314.

[9] Hunter CJ, Matyas JR, Duncan NA. Cytomorphology of notochordal and chondrocytic cells from the nucleus pulposus: a species comparison [J]. J Anat, 2004, 205: 357-362.

[10] Paesold G, Nerlich AG, Boos N. Biological treatment strategies for disc degeneration: potentials and shortcomings [J]. Eur Spine J, 2007, 16: 447-468.

[11] Freemont AJ, Watkins A, Le Maitre C, Jeziorska M, Hoyland JA. Current understanding of cellular and molecular events in intervertebral disc degeneration: implications for therapy [J]. J Pathol, 2002, 196: 374-379.

[12] Walsh AJ, Bradford DS, Lotz JC. In vivo growth factor treatment of degenerated intervertebral discs [J]. Spine, 2004, 29: 156-163.

[13] Masuda K, Oegema TR Jr, An HS. Growth factors and treatment of intervertebral disc

Degeneration [J]. Spine, 2004, 29: 2757-2769.

[14] Masuda K, Imai Y, Okuma M. Osteogenic protein-1 injection into a degenerated disc induces the restoration of disc height and structural changes in the rabbit anular puncture model [J]. Spine, 2006, 31: 34-54.

[15] Anderson DG, Tannoury C. Molecular pathogenic factors in symptomatic disc degeneration [J]. Spine J, 2005, 5: 260-266.

[16] Leung VY, Chan D, Cheung KM. Regeneration of intervertebral disc by mesenchymal stem cells: potentials, limitations, and future direction [J]. Eur Spine J, 2006, 15: 406-413.

[17] Blanco JF, Graciani IF, Sanchez-Guijo FM, Muntion S, Hernandez-Campo P, Santamaria C, Carrancio S, Barbado MV, Cruz G, Gutierrez-CosIo S, Herrero C, San Miguel JF, Brinon JG. 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．

[18] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]． Cytotherapy, 2006, 8(4): 315–317.

[19] Humzah MD, Soames RW. Human intervertebral disc: structure and function [J]. Anat Rec, 1988, 220: 337-356.

[20] Gries NC, Berlemann U, Moore RJ, Vernon-Roberts B. Early histologic changes in lower lumbar discs and facet joints and their correlation [J]. Eur Spine J, 2000, 9: 23-29.

[21] Buckwalter JA. Aging and degeneration of the human intervertebral disc [J]. Spine, 1995, 20(11): 1307–1314.

[22] Taylor JR, Twomey LT. The development of the human intervertebral disc. In: Ghosh P, editor. The biology of the intervertebral disc [J]. Boca Raton (FL): CRC Press Inc, 1988, p. 39–82.

[23] Hunter CJ, Matyas JR, Duncan NA. Cytomorphology of notochordal and chondrocytic cells from the nucleus pulposus: a species comparison [J]. J Anat, 2004, 205(5): 357-362.

[24] Heathfield SK, Le Maitre CL, Hoyland JA. Caveolin-1 expression and stress-induced premature senescence in human intervertebral disc degeneration [J]. Arthritis Res Ther, 2008, 10(4): R87.

[25] Feng G, Yang X, Shang H. Multipotential differentiation of human anulus fibrosus cells: an in vitro study [J]. J Bone Joint Surg Am, 2010, 92(3): 675-685.

[26] Lori A. Setton, Jun Chen. Intervertebral disc cell mechanics and biological responses to load [J]. Curr Opin Orthop, 2004, 15: 331-340.

[27] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. Cytotherapy, 2006, 8(4): 315-317.

[28] Loeffler M, Roeder I. Tissue stem cells: definition, plasticity, heterogeneity, self-organization and models-a conceptual approach [J]. Cells Tissues Organs, 2002, 171: 8-26.

[29] Richardson SM, Hughes N, Hunt JA, Freemont AJ, Hoyland JA. Human mesenchymal stem cell differentiation to NP-like cells in chitosan-glycerophosphate hydrogels [J]. Biomaterials, 2008, 29(1): 85-93.

[30] Henriksson H, Thornemo M, Karlsson C, Hagg O, Junevik K, Lindahl A. Identification of cell proliferation zones, progenitor cells and a potential stem cell niche in the intervertebral disc region: a study in four species [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2009, 34(21): 2278-2287.

[31] Brisby H, Papadimitriou N, Brantsing C, Bergh P, Lindahl A, Barreto Henriksson H. 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.

[32] [32] Risbud MV, Guttapalli A, Tsai TT, Lee JY, Danielson KG, Vaccaro AR. Evidence for skeletal progenitor cells in the degenerate human intervertebral disc [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2007, 32(23): 2537-2544.

[33] Sakai D, Nakamura Y, Nakai T, Mishima T, Kato S, Grad S. Exhaustion of nucleus pulposus progenitor cells with ageing and degeneration of the intervertebral disc [J]. Nat Commun, 2012, 3: 1264.

[34] Stoyanov JV, Gantenbein-Ritter B, Bertolo A, Aebli N, Baur M, Alini M. Role of hypoxia and growth and differentiation factor-5 on differentiation of human mesenchymal stem cells towards intervertebral nucleus pulposus-like cells [J]. Eur Cell Mater, 2011, 21: 533-547.

[35] Minogue BM, Richardson SM, Zeef LA, Freemont AJ, Hoyland JA. Characterization of the human nucleus pulposus cell phenotype and evaluation of novel marker gene expression to define adult stem cell differentiation [J]. Arthritis Rheum, 2010, 62(12): 3695-3705.

[36] Sakai D, Mochida J, Iwashina T, Hiyama A, Omi H, Imai M. Regenerative effects of transplanting mesenchymal stem cells embedded in atelocollagen to the degenerated intervertebral disc [J]. Biomaterials, 2006, 27(3): 335-345.

[37] Strassburg S, Richardson SM, Freemont AJ, Hoyland JA. Coculture induces mesenchymal stem cell differentiation and modulation of the degenerate human nucleus pulposus cell phenotype [J]. Regen Med, 2010, 5(5): 701-711.

[38] Tao F, Li F, Li G, Pan F. Differentiation of mesenchymal stem cells into nucleus pulposus cells in vitro [J]. J HuazhongUniv Sci Technolog Med Sci, 2008, 28(2): 156-158.

[39] Appelbaum FR. Hematopoietic-cell transplantation at 50 [J]. N Engl J Med, 2007, 357: 1472-1475.

[40] Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemo- poiesis [J]. Blood Rev, 2006, 20: 161-171.

[41] Krampera M, Pizzolo G, Aprili G, Franchini M. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair [J]. Bone, 2006, 39: 678-683.

[42] Jethva R, Otsuru S, Dominici M, Horwitz EM. Cell therapy for disorders of bone [J]. Cytotherapy, 2009, 11: 3-17.

[43] Feng G, Zhao X, Liu H, Zhang H, Chen X, Shi R, Liu X, Zhao X, Zhang W, Wang B. Trans- plantation of mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells in a degenerative disc model in rabbits: a comparison of 2 cell types as potential candidates for disc regeneration [J]. J Neurosurg Spine, 2011, 14(3): 322-329.

[44] Gomez-Barrena E, Rosset P, Muller I, Giordano R, Bunu C. Bone regeneration: stem cell therapies and clinical studies in orthopaedics and traumatology [J]. J Cell Mol Med, 2011, 15: 1266-1286.

[45] Okazaki R, Inoue D, Shibata M, Saika M, Kido S. Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) alpha or beta [J]. Endocrinology, 2002, 143: 2349-2356.

[46] Mayer H, Bertram H, Lindenmaier W, Korff T, Weber H, Weich H. Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) expression in human mesenchymal stem cells: autocrine and paracrine role on osteoblastic and endothelial differentiation [J]. J Cell Biochem, 2005, 95: 827-839.

[47] Higuchi C, Myoui A, Hashimoto N, Kuriyama K, Yoshioka K. Continuous inhibition of MAPK signaling promotes the early osteoblastic differentiation and mineralization of the extracellular matrix [J]. J Bone Miner Res, 2002, 17: 1785-1794.

[48] Adams MA, Dolan P, McNally DS. The internal mechanical functioning of intervertebral discs and articular cartilage, and its relevance to matrix biology [J]. Matrix Biol, 2009, 28: 384-389.

[49] Barclay WW, Axanova LS, Chen W. Characterization of adult prostatic progenitor/stem cells exhibiting self-renewal and multilineage differentiation [J]. Stem Cells, 2008, 26: 600-610.

[50] Gay IC, Chen S, MacDougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells [J]. Orthod Craniofac Res, 2007, 10: 149-160.

[51] Bi Y, Driss Ehirchiou, Tina M Kilts. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche [J]. Nat Med, 2007, 13: 1219-1227.

[52] Adams MA, Dolan P, McNally DS. The internal mechanical functioning of intervertebral discs and articular cartilage, and its relevance to matrix biology [J]. Matrix Biol, 2009, 28: 384-389.

[53] Anderson DG, Tannoury C. Molecular pathogenic factors in symptomatic disc degeneration [J]. Spine J, 2005, 5: 260-266.

[54] Feng G, Zhao X, Liu H, Zhang H, Chen X. Transplantation of mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells in a degenerative disc model in rabbits: a comparison of 2 cell types as potential candidates for disc regeneration [J]. J Neurosurg Spine, 2011, 14: 322-329.

[55] Chun HJ, Kim YS, Kim BK, Kim EH, Kim JH. Transplantation of human adipose-derived stem cells in a rabbit model of traumatic degeneration of lumbar discs [J]. World Neurosurg, 2012, 78: 364-371.

[56] Sakai D, Mochida J, Iwashina T, Hiyama A, Omi H. Regenerative effects of transplanting mesenchymal stem cells embedded in atelocollagen to the degenerated intervertebral disc [J]. Biomaterials, 2006, 27: 335-345.

[57] Yoshikawa T, Ueda Y, Miyazaki K, Koizumi M, Takakura Y. Disc regeneration therapy using marrow mesenchymal cell transplantation: a report of two case studies [J]. Spine (Phila Pa

1976), 2010, 35: 475-480.

[58] Orozco L, Soler R, Morera C, Alberca M, Sanchez A. Intervertebral disc repair by autologous mesenchymal bone marrow cells: a pilot study [J]. Transplantation, 2011, 92: 822-828.

[59] Mwale F, Ciobanu I, Giannitsios D, Roughley P, Steffen T, Antoniou J. Effect of oxygen levels on proteoglycan synthesis by intervertebral disc cells [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2011, 36: 131-138.

[60] Korecki CL, MacLean JJ, Iatridis JC. Characterization of an in vitro intervertebral disc organ culture system [J]. Eur Spine J, 2007, 16(7): 1029-1037.

[61] Gawri R, Mwale F, Ouellet J, Roughley PJ, Steffen T, Antoniou J. Development of an organ culture system for long-term survival of the intact human intervertebral disc [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2011, 36(22): 1835-1842.

[62] Vadala G, Sowa G, Hubert M, Gilbertson LG, Denaro V. Mesenchymal stem cells injection in degenerated intervertebral disc: cell leakage may induce osteophyte formation [J]. J Tissue Eng Regen Med, 2012, 6: 348-355.

[63] Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC. Spontaneous human adult stem cell transformation [J]. Cancer Res, 2005, 65: 3035-3039.

[64] Sakai D, Mochida J, Iwashina T, Hiyama A, Omi H, Imai M. Regenerative effects of transplanting mesenchymal stem cells embedded in atelocollagen to the degenerated intervertebral disc [J]. Biomaterials, 2006, 27(3): 335-345.

[65] Chun HJ, Kim YS, Kim BK, Kim EH, Kim JH, Do BR. Transplantation of human adipose-derived stem cells in a rabbit model of traumatic degeneration of lumbar discs [J]. World Neurosurg, 2012, 78(3-4): 364-371.

[66] Cheung KM, Karppinen J, Chan D, Ho DW, Song YQ, Sham P. Prevalence and pattern of lumbar magnetic resonance imaging changes in a population study of one thousand forty-three individuals [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2009, 34(9): 934-940.

[67] Orozco L, Soler R, Morera C, Alberca M, Sanchez A, Garcia-Sancho J. Intervertebral disc repair by autologous mesenchymal bone marrow cells: a pilot study [J]. Transplantation, 2011, 92(7): 822-828.

[68] Yoshikawa T, Ueda Y, Miyazaki K, Koizumi M, Takakura Y. Disc regeneration therapy using marrow mesenchymal cell transplantation: a report of two case studies [J]. Spine (Phila Pa 1976),

2010, 35(11): 475-480.

综述

**椎间盘退变干细胞再Th综述**

下腰痛已经是发达国家致残的一种主要疾病[1]，在我国发病率、致残率也是逐年升高，大约84%的人都会经历下腰痛[2, 3]。与大多数肌肉骨骼疾病一样，下腰痛的患病率随着年龄的增长而逐渐增加[4]，随着生活方式、工作压力和全球老龄化的发展，下腰痛发病率在将来还会继续增加[5, 6]。下腰痛不但对个人造成了很大的痛苦，也对整个社会造成很大的经济负担。据估计在英国每年治疗下腰痛疾病直接的医疗成本、丧失劳动能力和致残社会福利造成间接花费接近120亿英镑[7]。

虽然很多因素都能导致下腰痛，但越来越多的证据表明椎间盘退变仍是导致下腰痛的主要原因[8-10]，椎间盘完整功能的丧失和脊柱节段运动不稳定导致了疼痛和致残。

**1椎间盘Th物学**

椎间盘的功能是通过每个椎体的机械运动来保持脊柱的稳定性。椎间盘是由三部分组成：中央凝胶状的髓核、外周的纤维环和终板软骨细胞。每个椎间盘区域内含有细胞外基质（ECM），是椎间盘内特有的成分。成人髓核细胞是由小的圆形类软骨细胞组成，内含有丰富的细胞外基质包括蛋白聚糖、II型胶原[11]。髓核组织的高渗透压吸附了带负电荷附着蛋白聚糖的粘多糖[12]。这种吸收水的能力使得髓核组织内富含水分，加上周围被富含I型胶原纤维环的环绕，使得椎间盘能够承受很高的轴向负荷。与髓核细胞不同，在相邻两个椎体之间的纤维环细胞在细胞形态上是成纤维细胞。纤维环被含有透明软骨细胞的终板固定[11]。终板连接椎间盘到相邻的椎体，使得营养物质和废物能够在椎体、椎间盘和血液系统之间进行交换[13]。

**2椎间盘退变**

椎间盘退变的原因目前还有许多不同的看法，包括内环境（机械压力、营养缺乏）、遗传因素等[14, 15]。然而，椎间盘退变生物学研究已经非常深入，希望在不久对椎间盘

退变的病因会有更好的认识。

随着椎间盘退变，椎间盘内细胞的自我平衡发生改变，组织合成代谢降低分解代谢增加[17]。在髓核组织内的ECM分解代谢增加，导致椎间盘内含水量减少，纤维环形成裂隙，最终椎间盘高度降低[18]。在椎间盘退变的不同阶段，还有一个变化就是细胞数量早期增加（试图组织再生），后期细胞数量逐步减少[11]。

虽然椎间盘退变的启动因素不是很清楚，但是它是由细胞驱动的一个进程。椎间盘细胞自身产生的促炎性细胞因子增加，包括IL-1β、IL-6、肿瘤坏死因子-α（TNF）、前列腺素E2[17, 19]。这些细胞因子的增加与细胞因子拮抗剂无关（例如：在椎间盘退变过程中IL-1β表达增加但是IL-1β受体拮抗剂表达没有变化），这就导致了炎症应答和细胞外基质分解代谢的增加[20]。这些细胞因子的增加刺激了细胞外基质代谢酶的增加，即基质金属蛋白酶（MMPs）和ADAMTSs（a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs）。在椎间盘退变过程中MMP-1, -3，-7，-9，-10[21]，-13 和ADAMTS-1, -4，-5，-9, -15表达增加，尤其在髓核组织中[17]。相反的，内源性基质金属蛋白酶抑制剂（TIMPs）却没有随着降解酶的表达增加而发生变化，结果导致了ECM降解酶的激活[17]。

随着分解代谢的发生变化，椎间盘内的细胞因子迅速增加尤其是IL-1，改变了合成代谢基因和基质蛋白的表达[17]。这些变化包括髓核内蛋白聚糖的合成减少和II型胶原向I型胶原的转变[17]。细胞外基质的变化表现为蛋白聚糖的减少，从而导致渗透压降低、髓核组织含水量减少[12]。随着髓核组织内含水量的减少，纤维环就会承受更大负荷[22]。纤维环结构的破坏导致髓核组织微小损伤和突出。

随着椎间盘退变的进展，血管和疼痛有关的神经纤维生长，穿过纤维环和髓核组织延伸到正常无血管的椎间盘内，导致免疫细胞的渗透和疼痛的增加[23, 24]。这些机制导致了新血管的形成和未知的新神经纤维残留。然而这些证据说明髓核组织内蛋白聚糖（对神经纤维和内皮细胞抑制作用[27]）和纤维环内脑信号蛋白3A（抑制神经纤维生长[28]）表达减少。包括神经生长因子（NGF）[29, 30]、脑源性神经营养因子（BDNF）[29, 30]、结缔组织生长因子（CTGF）[31]在的内生长因子增加促进了神经纤维生长和新

生血管的形成。

**3目前治疗椎间盘退变的方法**

最初，下腰痛的治疗方法常使用非甾体类抗炎药（NSAIDs）短期缓解疼痛有非常好的疗效[32]。其他的保守治疗方法有理疗和运动疗法，目的是改善脊柱的运动和调整正确的姿势。然而，保守治疗有很多局限性，更积极的侵入性的治疗方法包括硬脊膜外麻醉或注释皮质激素，麻醉药直接注射到脊柱疼痛区域；但这些治疗方的成功率仍需要解决[33]。

脊柱融合术仍是最常用的外科手术方法，微创手术未能很好的缓解疼痛。退变或突出的椎间盘被取出，椎体通过金属棒、骨水泥或者基于细胞的骨化（注射BMPs同时移植自体髂骨到椎间盘内，导致椎体骨化融合）融合[34-36]。虽然急性疼痛常采用这样的处理方式，但是从长期观察疗效发现很多患者后期又出现疼痛、脊柱活动性减弱、相邻椎间盘退变[37]。Charite [38], ProDisc [39], 和Flexicore [40]等研究发现：除了椎体融合外，使用人工椎间盘和脊柱融合术疗效是一样的。脊柱融合术、椎间盘置换有很多缺点，主要是引起相邻椎间盘的退变（5年内椎间盘置换、脊柱融合发生率分别是9.2%和28.6%）[41]。此外，人工椎间盘有可能导致椎体不稳定、磨损、增加脊髓损伤的风险、炎症等[42]。因此，目前的治疗手段长期疗效欠佳，随着慢性下腰痛发病率的增加，急需要一种新兴的基于生物和细胞的治疗方法来替代。

基于这一点，生长因子被用来治疗椎间盘退变。生长因子包括TGF-β[43, 44]、IGF-1[-45]、EGF-1[43]、GDF-5[46]、BMP-2[47]、BMP-7[48]、BMP-12[49]能够刺激椎间盘

内细胞外基质增加，减少分解代谢细胞因子和酶的表达。迄今为止，在动物和人体体外体内模型已经证实生长因子对椎间盘退变有治疗作用[51]。然而这些治疗局限性表现在必须依靠椎间盘内的细胞才能发挥作用（这些细胞已经表现出细胞数量减少，细胞表型改变[52]），多次注射生长因子（考虑到细胞因子的半衰期）[53]。另外，生长因子注射到退变椎间盘内可能会增加椎间盘内细胞的新陈代谢，引起代谢产物增加，进一步增加椎间盘退变的进程[54]。值得关注的是，注射重组BMP-7注射到椎间盘退变的患者体内，并没有观察到对治疗椎间盘退变有效。

目前的治疗方法集中在恢复细胞的数量，椎间盘功能和减轻疼痛。因此，对于椎间盘退变的治疗，研究集中在寻找基于细胞疗法的种子细胞。

**4再Th医学战略**

**4.1细胞的选择**

细胞疗法的提出包括自体移植细胞到退变的椎间盘髓核组织内，或者结合生物支架材料同时移植。因此，需要选择合适的种子细胞来进行移植。自体的髓核细胞在椎间盘退变动物模型试验中已经证明可以阻止椎间盘退变[55]，另一项随机的临床试验证明髓核细胞注射到患者退变的椎间盘内能够缓解疼痛、椎间盘内含水量增加[56]。然而，虽然髓核细胞在治疗椎间盘退变上有一定疗效，但从椎间盘髓核组织中获取髓核细胞本身就有可能会造成椎间盘的退变[57]。此外，从退变椎间盘内提取的髓核细胞，由于降解酶表达增加[17]、细胞外基质蛋白表达减少[58]、细胞衰老增加[59]，所以不足以满足细胞再生的目的。最近一项研究表明，使用同种异体的幼稚软骨细胞做为可供选择的细胞来源。患者移植扩增培养的软骨细胞（来源于尸体关节软骨），移植一年后患者疼痛减轻，MIR显示椎间盘退变改善[60]。然而，关节软骨细胞并不是最适合椎间盘退变修复组织工程的种子细胞[61]。椎间盘被认为是无免疫反应的组织（由于其内部无血管的特点），因此自体细胞移植是理想的选择。最近的研究表明椎间盘内可能有内源性的前体/祖细胞或者有干细胞样特性的细胞，为我们的研究提供了一个新方向。

有证据表明椎间盘内有祖细胞的存在，这些细胞表达干细胞标记物（Notch1、

Delta4、Jagged1、C-KIT、Ki67、STRO-1）[62, 63]，从退变椎间盘内还分离培养出具有成骨、成脂、成软骨分化能力的细胞[64]。Sakai等[65]从鼠和人的髓核组织内提取出髓核祖细胞，这些细胞的比例随着年龄和退变明显减少。虽然这些内源性干细胞有巨大的应用潜力，但对于是否在椎间盘内细胞再生或刺激诱导再生还需要进一步研究。

成人间充质干细胞（MSCs）是一种更好的自体来源的祖细胞，它能很容易的从骨髓、脂肪组织中分离出BM-MSCs和AD-MSCs。越来越多的研究表明这些间充质干细胞能够向类髓核细胞分化[61, 66, 67, 68-70]。另外，移植BMSC到兔椎间盘退变模型

和对照组相比能够使椎间盘退变得到改善[68]。还有研究小组把10位椎间盘退变引起下腰痛患者的自体BMSC移植入椎间盘内，观察到与椎体融合相似的治疗效果[71]。这些有关人和动物的实验提示MSC移植可能是椎间盘再生一种很有潜力的治疗方法。

**4.2了解髓核细胞**

为了能成功的运用MSC治疗椎间盘退变，有必要了解靶细胞的细胞表型，以便能正确的分化和发挥其功能。髓核细胞被认为是类软骨细胞，表达传统的软骨基因

（(COL2A1, aggrecan, SOX9），MSC向髓核细胞分化常用这几个细胞表型来进行判定[61, 72]。尽管髓核细胞和关节软骨有类似的基质成分，但是两种细胞PG和collagens比例却不同，髓核细胞和关节软骨细胞PG: collagen比值分别是27: 1和2:1[73]，这表明髓核细胞与软骨细胞相比也许有截然不同的细胞表型。此外，两种组织之间的个体差异也表明是由截然不同的细胞组成[74, 75, 76]。

最近有研究小组运用基因芯片技术证实在髓核细胞和软骨细胞之间存在表型基因表达差异，这些椎间盘内分子表型（FOXF1, PAX1, KRT-8, -18, -19, CA12）的功能还不清楚，这些细胞表型对于定义髓核细胞的表型具有非常重要的意义[67, 77]。事实上这些标记物（尤其是CA12和细胞角蛋白）最近被用来证明MSC向类髓核细胞分化（椎间盘细胞分化），并且学术界把它作为一个特别的标记物。虽然在椎间盘再生方面BMSC被认为是研究最深入最广泛的种子细胞，但最近有人提出ADMSC也许比BMSC更适合作为种子细胞，因为ADMSC分化出的细胞表型更接近髓核细胞[67]。在体的动物实验也证明对于椎间盘再生ADMSC是更合适的选择[78]。更重要的是，

ADMSC可以避免周围组织成骨和骨赘的形成，这些情况在注射BMSC导致椎间盘破裂时都可能发生[78]。

**4.3诱导MSC向椎间盘细胞分化**

目前已经有许多的方法诱导MSC向椎间盘细胞分化。这些方法包括添加生长因子，分离和培养使用特殊的培养条件，模仿体内环境的三维培养，在组织中保持圆形的细胞形态。MSC首次向软骨细胞分化是添加细胞因子TGF-β[79]。除了TGF-β，其他的生长因子包括IGF-1、IGF-2、BMPs、尤其是BMP-7，也能诱导MSC向软骨细胞分化[80-82]。目前，参照以前髓核细胞特定的标记物，GDF-5比TGF-β能更好的诱导MSC向类髓核细胞分化。以后的科学研究可能代替生长因子，相比目前采用的方法能诱导出更接近髓核细胞的细胞表型。

诱导MSC向椎间盘细胞分化也可以采用共培养的方法。MSC可以直接和椎间盘细胞培养，这种培养方法可以诱导BMSC和ADMSC向类髓核细胞分化[69, 83]。此外，在BMSC和髓核细胞共培养是一种双向的刺激[84]，这就致使退化髓核细胞的细胞表型改善[69]。这就说明MSC移植能够通过旁分泌作用于退化的髓核细胞，恢复其正常椎间盘细胞的功能起到修复的目的。

**4.4 Th物支架材料**

移植干细胞到退变的椎间盘，尤其当外科手术摘除了髓核组织后，这就需要运用生物支架材料。为移植细胞选择合适的支架材料和微环境能够促进形成新的组织[85]。细胞整合在生物材料上能够提高细胞移植后的存活率，传导机械负荷，这也是细胞外基质最重要的功能，甚至诱导MSC的分化。有研究表明没有外源性细胞因子的作用下，壳聚糖/甘油磷酸酯（C/GP）水凝胶够诱导MSC在体外分化[61]。基于水凝胶的其他聚合物和多糖被认为是椎间盘再生理想的支架材料，包括（PEG）/水凝胶[86]、壳聚糖/甘油磷酸酯[87]、PEG[88]、II型胶原透明质酸[89]，由于这些生物材料和髓核组织有很多相似性（含水的胶冻状物质），研究发现通过针头或内窥镜注射移植可能引起纤维环的轻微损伤[86]。最近的一项研究表明自体的透明质酸水凝胶移植到牛尾的椎间盘内能够促进MSC分化。研究者还发现在提前诱导MSC与水凝胶结合是不必要的结果不如直接移植[90]。除了凝胶，还有其他重要的条件包括机械完整性和生物降解能力，这些为椎间盘移植提供机械性能，使移植的细胞取代水凝胶重新合成细胞外基质。

**4.5椎间盘健康和疾病**

椎间盘的内环境对于移植的细胞或接种细胞的生物材料有非常重要的影响。椎间盘是人类最大的无血管组织，距椎间盘中心8mm外的组织中才有血液供应，因此造成了只有大概1%含氧量[91]。相对较低PH值（在严重的椎间盘退变PH减少到5.7[92]）、低营养、无血管导致有限的营养物质交换和废物的产生。因此椎间盘内的髓核细胞主要依靠糖酵解来提供能量。尽管以前的研究有所冲突[93, 94]，吸烟、动脉粥样硬化会减少终板的血液供应[95]，也与椎间盘退变有关，会加剧椎间盘的退变。椎间盘内高含量

GAG导致组织内渗透压增高（450-550mOsm，高于大多数的其他组织[12]），这对于椎间盘产生膨胀压力来承受机械负荷具有非常重要的作用[96]。椎间盘内细胞也会承受各种机械刺激，包括拉伸、静水压和剪切力。研究发现这些机械刺激对椎间盘细胞的代谢产生影响，这些影响依赖于刺激的大小、频率、类型[97]。事实上，这些所有的影响因素都会导致椎间盘退变，髓核细胞虽然在数量上减少，但是髓核细胞依然能够在这种恶劣的微环境中生存和发挥功能[75]。值得注意的是，MSC细胞却不能有这样的适应能力，在这样的微环境中生存和发挥功能。研究证明移植MSC到椎间盘退变模型能够使椎间盘退变得到改善[68]，但是MSC移植到更多的椎间盘退变模型或者人退变的椎间盘（低营养、低PH值、高表达的炎性细胞因子、高渗透压、高机械负荷）能否取得成功还是不很清楚。因此，是否在移植前需要先分化MSC还有待进一步研究。有研究证明椎间盘退变微环境因素（如低糖、高渗透压、低PH值）会影响MSC的生理功能、细胞活力、细胞增值和细胞外基质标记物的表达[98, 99]。这些研究结果提示，未分化的MSC不适合直接移植到退变的椎间盘，椎间盘退变恶劣微环境可能会要求提前诱导MSC。

**4.6椎间盘再Th展望**

由于独特的微环境和细胞的耐受性，椎间盘是很难再生的组织。因为MSC容易获得、有向椎间盘分化能力（与髓核细胞表面标志物表达相似），成人MSC似乎是椎间盘再生的有发展前途的细类型。然而退变椎间盘内环境对移植细胞的影响还需要进一步研究。虽然动物椎间盘退变模型是非常有用的，但需要更精确的反映人类椎间盘自然退变的过程，符合椎间盘微环境的改变。基于上述要求，对于椎间盘生物学研究的需要，进一步改进椎间盘体内实验模型。具体的讲，就是移植细胞和椎间盘微环境之间的相互作用[100, 101]。这些体内的模拟系统包括含氧量、营养、PH、渗透压、细胞因子水平、机械负荷。理论上讲，所有这些影响因素能够独立地控制，能够维持细胞的活力和组织的完整性，为研究干细胞移植后的疗效提供一个合适的模型。通常这些模型涉及髓核细胞降解酶，不能准确的反应临床表现。因此需要改进干细胞移植到退变椎间盘的方法。最近研究表明，包含水凝胶的载体对促进干细胞分化和产生细胞外基质具有重要的作用。然而，改进水凝胶材料需要生物材料能抵抗机械负荷、易于注

射，刺激细胞分化促进细胞外基质形成，能进行生物降解，确保再生的组织具有完整的功能。

有实验已经证明，椎间盘退变患者采用自体MSC治疗方法能够减轻疼痛，但还需要进一步实验来继续证明干细胞疗法治疗椎间盘退变的疗效和安全性[71]。同样也需要进一步了解祖细胞和刺激这些细胞启动椎间盘组织内源性再生。

**4.7临床上干细胞疗法治疗下腰痛**

MSC细胞疗法在动物试验中已经显示出椎间盘组织再生巨大的潜力，它能够提升椎间盘高度、增加含水量、产生细胞外基质[68, 78]。人类临床试验的疗效是减轻疼痛，而动物实验无法体现出这一点。下腰痛的原因显然是多种原因造成的，大约有40%患者与椎间盘退变有关[8]。小规模的有关使用自体椎间盘细胞和MSC细胞移植能够减轻疼痛，减少残疾，提高椎间盘内的含水量，椎间盘高度没有增加[71, 102]。这些研究都提示MSC细胞疗法至少在目前临床治疗中是有效的，还需要更多的临床试验来观察长期疗效。虽然MSC注射一般情况下是安全的，但MSC有泄漏到椎间盘外引起骨赘的风险[103]。因此细胞移植需要选用合适的生物支架材料，而且在注射过程中应该操作非常仔细。如果这种治疗方法被证明是有长期疗效和高安全性，那么对于治疗椎间盘退变和慢性下腰痛将是革命性的进展。

**5结论**

细胞疗法为治疗这种增加患者痛苦和花费巨大的疾病提供很有潜力的治疗方法。随着人口老龄化和慢性肌肉骨骼疾病的增加，社会和家庭的负担更加增大。通过不同科学领域的合作（生物、化学、材料学等），结合临床医师和政府支持，这个领域的研究将会取得更大成果。对于椎间盘再生的细胞疗法的研究越来越深入，包括种子细胞、生物材料、培养条件、结果的评定等等。最新的研究结果表明更好的髓核细胞表面标记物的确定有助于MSC向椎间盘细胞分化结果的判定。研究移植细胞和退变的椎间盘组织之间的相互作用有助于寻找治疗椎间盘退变更适宜的干细胞

参考文献

[1] Stewart WF, Ricci JA, Chee E, Morganstein D, Lipton R. Lost productive time and cost due to common pain conditions in the US workforce [J]. JAMA, 2003, 290(18): 2443-2454.

[2] Walker BF. The prevalence of low back pain: a systematic review of the literature from 1966 to 1998 [J]. J Spinal Disord, 2000,13(3): 205-217.

[3] Hoy D, Bain C, Williams G, March L, Brooks P, Blyth F. A systematic review of the global prevalence of low back pain [J]. Arthritis Rheum, 2012, 64(6): 2028-2037.

[4] Papageorgiou AC, Croft PR, Ferry S, Jayson MI, Silman AJ. Estimating the prevalence of low back pain in the general population. Evidence from the South Manchester Back Pain Survey [J]. Spine (Phila Pa 1976), 1995, 20(17): 1889-1894.

[5] Harkness EF, Macfarlane GJ, Silman AJ, McBeth J. Is musculoskeletal pain more common now than 40 years ago: two population-based cross-sectional studies [J]. Rheumatology (Oxford), 2005, 44(7): 890-895.

[6] Hershkovich O, Friedlander A, Gordon B, Arzi H, Derazne E, Tzur D. Associations of body mass index and body height with low back pain in 829,791 adolescents [J]. Am J Epidemiol, 2013, 178(4): 603-9.

[7] Maniadakis N, Gray A. The economic burden of back pain in the UK [J]. Pain, 2000, 84(1): 95-103.

[8] Cheung KM, Karppinen J, Chan D, Ho DW, Song YQ, Sham Pl. Prevalence and pattern of lumbar magnetic resonance imaging changes in a population study of one thousand forty-three individuals [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2009, 34(9): 934-940.

[9] Samartzis D, Karppinen J, Mok F, Fong DY, Luk KD, Cheung KM. A population-based study of juvenile disc degeneration and its association with overweight and obesity, low back pain, and diminished functional status [J]. J Bone Joint Surg Am, 2011, 93(7): 662-670.

[10] Takatalo J, Karppinen J, Niinimaki J, Taimela S, Nayha S, Mutanen P. Does lumbar disc degeneration on magnetic resonance imaging associate with low back symptom severity in young Finnish adults [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2011,36(25): 2180-2189.

[11] Trout JJ, Buckwalter JA, Moore KC. Ultrastructure of the human intervertebral disc: II. Cells of the nucleus pulposus [J]. Anat Rec, 1982, 204(4):307-314.

[12] Urban JP, McMullin JF. Swelling pressure of the inervertebral disc: influence of proteoglycan and collagen contents [J]. Biorheology, 1985, 22(2):145-157.

[13] Brodin H. Paths of nutrition in articular cartilage and intervertebral discs [J]. Acta Orthop Scand, 1955,24(3): 177-183.

[14] AdamsMA, Roughley PJ. What is intervertebral disc degeneration, and what causes it [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2006, 31(18): 2151-2161.

[15] Mayer JE, Iatridis JC, Chan D, Qureshi SA, Gottesman O, Hecht AC. Genetic polymorphisms associated with intervertebral disc degeneration [J]. Spine J, 2013, 13(3): 299-317.

[16] Gopal D, Ho AL, Shah A, Chi JH. Molecular basis of intervertebral disc degeneration [J]. Adv Exp Med Biol, 2012, 760: 114-133.

[17] Le Maitre CL, Pockert A, Buttle DJ, Freemont AJ, Hoyland JA. Matrix synthesis and degradation in human intervertebral disc degeneration [J]. Biochem Soc Trans, 2007, 35(Pt 4): 652-655.

[18] Urban JP, Roberts S. Degeneration of the intervertebral disc [J]. Arthritis Res Ther, 2003, 5(3): 120-130.

[19] Podichetty VK. The aging spine: the role of inflammatorymediators in intervertebral disc degeneration [J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2007, 53(5): 4-18.

[20] Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of human intervertebral disc degeneration [J]. Arthritis Res, 2005, 7(4): 732-745.

[21] Richardson SM, Doyle P, MinogueBM, GnanalinghamK, Hoyland JA. Increased expression of matrix metalloproteinase-10, nerve growth factor and substance P in the painful degenerate intervertebral disc [J]. Arthritis Res Ther, 2009, 11(4): R126.

[22] Adams MA, McNally DS, Dolan P. 'Stress' distributions inside intervertebral discs. The effects of age and degeneration [J]. J Bone Joint Surg Br,1996, 78(6): 965-972.

[23] Freemont AJ, Peacock TE, Goupille P, Hoyland JA, O'Brien J, Jayson MI. Nerve ingrowth into diseased intervertebral disc in chronic back pain [J]. Lancet, 1997, 350(9072): 178-181.

[24] Hughes SP, Freemont AJ, Hukins DW, McGregor AH, Roberts S. The pathogenesis of degeneration of the intervertebral disc and emerging therapies in the management of back pain

[J]. J Bone Joint Surg Br, 2012, 94(10): 1298-1304.

[25] Chan CC, Roberts CR, Steeves JD, Tetzlaff W. Aggrecan components differentially modulate nerve growth factor-responsive and neurotrophin-3-responsive dorsal root ganglion neurite growth [J]. J Neurosci Res, 2008, 86(3): 581-592.

[26] Johnson WE, Caterson B, Eisenstein SM, Hynds DL, Snow DM, Roberts S. Human intervertebral disc aggrecan inhibits nerve growth in vitro [J]. Arthritis Rheum, 2002, 46(10): 2658-2664.

[27] Johnson WE, Caterson B, Eisenstein SM, Roberts S. Human intervertebral disc aggrecan inhibits endothelial cell adhesion and cell migration in vitro [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2005, 30(10):1139-1147.

[28] Tolofari SK, Richardson SM, Freemont AJ, Hoyland JA. Expression of semaphorin 3A and its receptors in the human intervertebral disc: potential role in regulating neural ingrowth in the degenerate intervertebral disc [J]. Arthritis Res Ther, 2010, 12(1): R1.

[29] Purmessur D, Freemont AJ, Hoyland JA. Expression and regulation of neurotrophins in the nondegenerate and degenerate human intervertebral disc [J]. Arthritis Res Ther, 2008,10(4): R99.

[30] Richardson SM, Purmessur D, Baird P, Probyn B, Freemont AJ, Hoyland JA. Degenerate human nucleus pulposus cells promote neurite outgrowth in neural cells [J]. PLoS One, 2012, 7(10): e47735.

[31] Ali R, Le Maitre CL, Richardson SM, Hoyland JA, Freemont AJ. Connective tissue growth factor expression in human intervertebral disc: implications for angiogenesis in intervertebral disc degeneration [J]. Biotech Histochem, 2008, 83(5): 239-245.

[32] Roelofs PD, Deyo RA, Koes BW, Scholten RJ, van Tulder MW. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for low back pain: an updated Cochrane review [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2008, 33(16): 1766-1774.

[33] Staal JB, de Bie RA, de Vet HC, Hildebrandt J, Nelemans P. Injection therapy for subacute and chronic low back pain: an updated Cochrane review [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2009, 34(1): 49-59.

[34] Vaccaro AR, Patel T, Fischgrund J, Anderson DG, Truumees E, Herkowitz H. A pilot safety and

Efficacy study of OP-1 putty (rhBMP-7) as an adjunct to iliac crest autograft in posterolateral lumbar fusions [J]. Eur Spine J, 2003, 12(5): 495-500.

[35] SouthwickWO, Robinson RA. Surgical approaches to the vertebral bodies in the cervical and lumbar regions [J]. J Bone Joint Surg Am,1957, 39-A(3): 631-644.

[36] Lewis G. Viscoelastic properties of injectable bone cements for orthopaedic applications: state-of-the-art review [J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2011, 98(1):171-191.

[37] Ghiselli G, Wang JC, Bhatia NN, Hsu WK, Dawson EG. Adjacent segment degeneration in the lumbar spine [J]. J Bone Joint Surg Am, 2004, 86-A(7): 1497-1503.

[38] Guyer RD, McAfee PC, Banco RJ, Bitan FD, Cappuccino A, Geisler FH. Prospective, randomized, multicenter Food and Drug Administration investigational device exemption study of lumbar total disc replacement with the CHARITE artificial disc versus lumbar fusion: five-year follow-up [J]. Spine J, 2009, 9(5): 374-386.

[39] Zigler J, Delamarter R, Spivak JM, Linovitz RJ, Danielson 3rd GO, Haider TT. Results of the prospective, randomized, multicenter Food and Drug Administration investigational device exemption study of the ProDisc-L total disc replacement versus circumferential fusion for the treatment of 1-level degenerative disc disease [J]. Spine(Phila Pa 1976), 2007, 32(11): 1155-1162.

[40] Sasso RC, Foulk DM, Hahn M. Prospective, randomized trial of metal-on-metal artificial lumbar disc replacement: initial results for treatment of discogenic pain [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2008, 33(2): 123-131.

[41] Zigler JE, Glenn J, Delamarter RB. Five-year adjacent-level degenerative changes in patients with single-level disease treated using lumbar total disc replacement with ProDisc-L versus circumferential fusion [J]. J Neurosurg Spine, 2012, 17(6): 504-511.

[42] Kostuik JP. Complications and surgical revision for failed disc arthroplasty [J]. Spine J, 2004, 4(6 Suppl): 289S-291S.

[43] Thompson JP, Oegema Jr TR, Bradford DS. Stimulation of mature canine intervertebral disc by growth factors [J]. Spine (Phila Pa 1976), 1991, 16(3): 253-260.

[44] Gruber HE, Fisher Jr EC, Desai B, Stasky AA, Hoelscher G, Hanley Jr EN. Human intervertebral disc cells from the annulus: threedimensional culture in agarose or alginate and responsiveness to

TGF-beta1 [J]. Exp Cell Res, 1997, 235(1): 13-21.

[45] Osada R, Ohshima H, Ishihara H, Yudoh K, Sakai K, Matsui H. Autocrine/paracrine mechanism of insulin-like growth factor-1 secretion, and the effect of insulin-like growth factor-1 on proteoglycan synthesis in bovine intervertebral discs [J]. J Orthop Res, 1996, 14(5): 690-699.

[46] Walsh AJ, Bradford DS, Lotz JC. In vivo growth factor treatment of degenerated intervertebral discs [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2004, 29(2): 156-163.

[47] Fei QM, Jiang XX, Chen TY, Li J, Murakami H, Tsai KJ. Changes with age and the effect of recombinant human BMP-2 on proteoglycan and collagen gene expression in rabbit anulus fibrosus cells [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2006, 38(11): 773-779.

[48] Zhang Y, Phillips FM, Thonar EJ, Oegema T, An HS, Roman-Blas. Cell therapy using articular chondrocytes overexpressing BMP-7 or BMP-10 in a rabbit disc organ culture model [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2008, 33(8): 831-838.

[49] ZhangY, Anderson DG, Phillips FM, Thonar EJ, He TC, Pietryla D. Comparative effects of bone morphogenetic proteins and Sox9 overexpression on matrix accumulation by bovine anulus fibrosus cells: implications for anular repair [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2007, 32(23): 2515-2520.

[50] Moon SH, Nishida K, Gilbertson LG, Lee HM, Kim H, Hall RA. Biologic response of human intervertebral disc cells to gene therapy cocktail [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2008, 33(17): 1850-1855.

[51] Imai Y, Okuma M, An HS, Nakagawa K, Yamada M, Muehleman C. Restoration of disc height loss by recombinant human osteogenic protein-1 injection into intervertebral discs undergoing degeneration induced by an intradiscal injection of chondroitinase ABC [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2007, 32(11): 1197-1205.

[52] Gruber HE, Hanley Jr EN. Analysis of aging and degeneration of the human intervertebral disc.

Comparison of surgical specimens with normal controls [J]. Spine (Phila Pa 1976), 1998, 23(7): 751-757.

[53] Larson 3rd JW, Levicoff EA, Gilbertson LG, Kang JD. Biologic modification of animal models of intervertebral disc degeneration [J]. J Bone Joint Surg Am, 2006, 88 Suppl 2: 83-87.

[54] Masuda K. Biological repair of the degenerated intervertebral disc by the injection of growth factors [J]. Eur Spine J, 2008, 17 Suppl 4: 441-451.

[55] Hohaus C, Ganey TM, Minkus Y, Meisel HJ. Cell transplantation in lumbar spine disc degeneration disease [J]. Eur Spine J, 2008, 17 Suppl 4: 492-503.

[56] Meisel HJ, Siodla V, Ganey T, Minkus Y, HuttonWC, Alasevic OJ. Clinical experience in cell-based therapeutics: disc chondrocyte transplantation A treatment for degenerated or damaged intervertebral disc [J]. Biomol Eng, 2007, 24(1): 5-21.

[57] Carragee EJ, Don AS, Hurwitz EL, Cuellar JM, Carrino JA, Herzog R. ISSLS prize winner: does discography cause accelerated progression of degeneration changes in the lumbar disc: a ten-year matched cohort study [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2009, 34(21): 2338-2345.

[58] Sive JI, Baird P, JeziorskM, Watkins A, Hoyland JA, Freemont AJ. Expression of chondrocyte markers by cells of normal and degenerate intervertebral discs [J]. Mol Pathol, 2002, 55(2): 91-97.

[59] Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. Accelerated cellular senescence in degenerate intervertebral discs: a possible role in the pathogenesis of intervertebral disc degeneration [J]. Arthritis Res Ther, 2007, 9(3): R45.

[60] Coric D, Pettine K, Sumich A, BoltesMO. Prospective study of disc repair with allogeneic chondrocytes presented at the 2012 Joint Spine Section Meeting [J]. J Neurosurg Spine, 2013, 18(1): 85-95.

[61] Richardson SM, Hughes N, Hunt JA, Freemont AJ, Hoyland JA. Human mesenchymal stem cell differentiation to NP-like cells in chitosan-glycerophosphate hydrogels [J]. Biomaterials, 2008, 29(1): 85-93.

[62] Henriksson H, Thornemo M, Karlsson C, Hagg O, Junevik K, Lindahl A. Identification of cell proliferation zones, progenitor cells and a potential stem cell niche in the intervertebral disc region: a study in four species [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2009, 34(21): 2278-2287.

[63] Brisby H, Papadimitriou N, Brantsing C, Bergh P, Lindahl A, Barreto Henriksson H. 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.

[64] Risbud MV, Guttapalli A, Tsai TT, Lee JY, Danielson KG, Vaccaro AR. Evidence for skeletal progenitor cells in the degenerate human intervertebral disc [J]. Spine (Phila Pa 1976). 2007,

32(23): 2537-2544.

[65] Sakai D, Nakamura Y, Nakai T, Mishima T, Kato S, Grad S. Exhaustion of nucleus pulposus progenitor cells with ageing and degeneration of the intervertebral disc [J]. Nat Commun, 2012, 3: 1264.

[66] Stoyanov JV, Gantenbein-Ritter B, Bertolo A, Aebli N, Baur M, Alini M. Role of hypoxia and growth and differentiation factor-5 on differentiation of human mesenchymal stem cells towards intervertebral nucleus pulposus-like cells [J]. Eur Cell Mater, 2011, 21: 533-547.

[67] Minogue BM, Richardson SM, Zeef LA, Freemont AJ, Hoyland JA. Characterization of the human nucleus pulposus cell phenotype and evaluation of novel marker gene expression to define adult stem cell differentiation [J]. Arthritis Rheum, 2010, 62(12): 3695-3705.

[68] Sakai D, Mochida J, Iwashina T, Hiyama A, Omi H, Imai M. Regenerative effects of transplanting mesenchymal stem cells embedded in atelocollagen to the degenerated intervertebral disc [J]. Biomaterials, 2006, 27(3): 335-345.

[69] Strassburg S, Richardson SM, Freemont AJ, Hoyland JA. Coculture induces mesenchymal stem cell differentiation and modulation of the degenerate human nucleus pulposus cell phenotype [J]. Regen Med, 2010, 5(5):701-711.

[70] Tao F, Li F, Li G, Pan F. Differentiation of mesenchymal stem cells into nucleus pulposus cells in vitro [J]. J HuazhongUniv Sci Technolog Med Sci, 2008, 28(2): 156-158.

[71] Orozco L, Soler R, Morera C, Alberca M, Sanchez A, Garcia-Sancho J. Intervertebral disc repair by autologous mesenchymal bone marrow cells: a pilot study [J]. Transplantation, 2011, 92(7): 822-828.

[72] Henriksson HB, Svanvik T, Jonsson M, Hagman M, Horn M, Lindahl A. Transplantation of human mesenchymal stems cells into intervertebral discs in a xenogeneic porcine model [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2009, 34(2): 141-148.

[73] Mwale F, Roughley P, Antoniou J. Distinction between the extracellular matrix of the nucleus pulposus and hyaline cartilage: a requisite for tissue engineering of intervertebral disc [J]. Eur Cell Mater, 2004, 8: 58-63.

[74] Henriksson HB, Brisby H. Development and regeneration potential of the mammalian intervertebral disc [J]. Cells Tissues Organs, 2013, 197(1): 1-13.

[75] Ludwinski FE, Gnanalingham K, Richardson SM, Hoyland JA. Understanding the native nucleus pulposus cell phenotype has important implications for intervertebral disc regeneration strategies [J]. Regen Med, 2013, 8(1): 75-87.

[76] Smith LJ, Nerurkar NL, Choi KS, Harfe BD, Elliott DM. Degeneration and regeneration of the intervertebral disc: lessons from development [J]. Dis Model Mech, 2011, 4(1): 31-41.

[77] Minogue BM, Richardson SM, Zeef LA, Freemont AJ, Hoyland JA. Transcriptional profiling of bovine intervertebral disc cells: implications for identification of normal and degenerate human intervertebral disc cell phenotypes [J]. Arthritis Res Ther, 2010, 12(1): R22.

[78] Chun HJ, Kim YS, Kim BK, Kim EH, Kim JH, Do BR. Transplantation of human adipose-derived stem cells in a rabbit model of traumatic degeneration of lumbar discs [J]. World Neurosurg, 2012, 78(3–4): 364-371.

[79] Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells [J]. Exp Cell Res, 1998, 238(1): 265-272.

[80] Chiou M, Xu Y, Longaker MT. Mitogenic and chondrogenic effects of fibroblast growth factor-2 in adipose-derived mesenchymal cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 343(2): 644-652.

[81] Knippenberg M, Helder MN, Zandieh Doulabi B, Wuisman PI, Klein-Nulend J. Osteogenesis versus chondrogenesis by BMP-2 and BMP-7 in adipose stem cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 342(3): 902-908.

[82] Longobardi L, O'Rear L, Aakula S, Johnstone B, Shimer K, Chytil A. Effect of IGF-I in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF-beta signaling [J]. J Bone Miner Res, 2006, 21(4): 626-636.

[83] Sun Z, Liu ZH, Zhao XH, Sun L, Chen YF, Zhang WL. Impact of direct cell co-cultures on human adipose-derived stromal cells and nucleus pulposus cells [J]. J Orthop Res, 2013, 31: 1804-1813.

[84] Strassburg S, Hodson NW, Hill PI, Richardson SM, Hoyland JA. Bi-directional exchange of membrane components occurs during co-culture of mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells [J]. PLoS One, 2012, 7(3): e33739.

[85] Iatridis JC, Nicoll SB, Michalek AJ, Walter BA, Gupta MS. Role of biomechanics in

Intervertebral disc degeneration and regenerative therapies: what needs repairing in the disc and what are promising biomaterials for its repair [J]. Spine J, 2013, 13(3): 243-262.

[86] Frith JE, Cameron AR, Menzies DJ, Ghosh P, Whitehead DL, Gronthos S. An injectable hydrogel incorporating mesenchymal precursor cells and pentosan polysulphate for intervertebral disc regeneration [J]. Biomaterials, 2013, 34: 9430-9440.

[87] Cheng YH, Yang SH, Liu CC, Gefen A, Lin FH. Thermosensitive hydrogel made of ferulic acid-gelatin and chitosan glycerophosphate [J]. Carbohydr Polym, 2013, 92(2): 1512-1519.

[88] Francisco AT, Mancino RJ, Bowles RD, Brunger JM, Tainter DM, Chen YT. Injectable laminin-functionalized hydrogel for nucleus pulposus regeneration [J]. Biomaterials, 2013, 34(30): 7381-7388.

[89] Calderon L, Collin E, Velasco-Bayon D, MurphyM, O'Halloran D, Pandit A. Type II collagen-hyaluronan hydrogel–a step towards a scaffold for intervertebral disc tissue engineering [J]. Eur Cell Mater, 2010, 20: 134-148.

[90] Peroglio M, Eglin D, Benneker LM, Alini M, Grad S. Thermoreversible hyaluronan-based hydrogel supports in vitro and ex vivo disc-like differentiation of human mesenchymal stem cells [J]. Spine J, 2013, 13: 1627-1639.

[91] Bartels EM, Fairbank JC, Winlove CP, Urban JP. Oxygen and lactate concentrations measured in vivo in the intervertebral discs of patients with scoliosis and back pain [J]. Spine (Phila Pa 1976), 1998, 23(1): 1-7.

[92] Diamant B, Karlsson J, Nachemson A. Correlation between lactate levels and pH in discs of patients with lumbar rhizopathies [J]. Experientia, 1968, 24(12): 1195-1196.

[93] Rodriguez AG, Rodriguez-Soto AE, Burghardt AJ, Berven S, Majumdar S, Lotz JC. Morphology of the human vertebral endplate [J]. J Orthop Res, 2012, 30(2): 280-287.

[94] Roberts S, Urban JP, Evans H, Eisenstein SM. Transport properties of the human cartilage endplate in relation to its composition and calcification [J]. Spine (Phila Pa 1976), 1996, 21(4): 415-420.

[95] Battie MC, Videman T, Gill K, Moneta GB, Nyman R, Kaprio J. 1991 Volvo Award in clinical sciences. Smoking and lumbar intervertebral disc degeneration: an MRI study of identical twins [J]. Spine (Phila Pa 1976), 1991, 16(9): 1015-1021.

[96] Urban JP, Maroudas A. Swelling of the intervertebral disc in vitro [J]. Connect Tissue Res, 1981, 9(1): 1-10.

[97] Gilbert HT, Hoyland JA, Millward-Sadler SJ. The response of human anulus fibrosus cells to cyclic tensile strain is frequencydependent and altered with disc degeneration [J]. Arthritis Rheum, 2010, 62(11): 3385-3394.

[98] Wuertz K, Godburn K, Neidlinger-Wilke C, Urban J, Iatridis JC. Behavior of mesenchymal stem cells in the chemical microenvironment of the intervertebral disc [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2008, 33(17): 1843-1849.

[99] Liang C, Li H, Tao Y, Zhou X, Li F, Chen G. Responses of human adipose-derived mesenchymal stem cells to chemical microenvironment of the intervertebral disc [J]. J Transl Med, 2012, 10: 49.

[100] Korecki CL, MacLean JJ, Iatridis JC. Characterization of an in vitro intervertebral disc organ culture system [J]. Eur Spine J, 2007, 16(7): 1029-1037.

[101] Gawri R, Mwale F, Ouellet J, Roughley PJ, Steffen T, Antoniou J. Development of an organ culture system for long-term survival of the intact human intervertebral disc [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2011, 36(22): 1835-1842.

[102] Yoshikawa T, Ueda Y, Miyazaki K, Koizumi M, Takakura Y. Disc regeneration therapy using marrow mesenchymal cell transplantation: a report of two case studies [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2010, 35(11): E475-480.

[103] Vadala G, Sowa G, Hubert M, Gilbertson LG, Denaro V, Kang JD. 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.

致**谢**

四年的时光转瞬即逝，衷心感谢导师马迅教授四年来对我的谆谆教诲和悉心指导，导师精湛的手术境界、科学的思维方式、严谨的工作作风、一丝不苟的工作态度、渊博的学识、达观的人生境界，是我一生学习的楷模，使我受益终生。师恩似海，我将永远铭记。

衷心感谢ft西医科大学第二医院血液科实验室、中心实验室全体老师在实验过程中给予的热情指导和帮助。

衷心感谢师姐张丽博士、师兄关晓明博士、薛晨辉硕士、张明硕士、宋亮硕士以及所有在实验完成过程中帮助过我的师兄、师弟，你们的支持与鼓励是我前进的动力。

衷心感谢我的博士同学曹坤、杨光照、郝海龙、刁海鹏、郭相杰、王贵明、张聪明、贾祎佳、王晓娟、郭志平、王家谱等在课题完成及论文修改方面给予的热情帮助，你们的友谊是我最大的财富。

衷心感谢ft西医科大学第一医院病理科白淘博士在实验中的热情帮助。衷心感谢ft西医科大学动物中心的大力支持。

特别感谢我的家人，感谢我的父母、爱人和儿子，感谢你们一直以来对我的理解、支持、鼓励和爱护，你们是我最坚强的后盾、避风的港湾，为我排除了一切后顾之忧，让我完成艰辛的学业。

再次衷心感谢所有帮助过我的各位老师、同学、亲人和朋友！

**在学期间承担/参与的科研课题与研究成果**

**研究成果**

[1] **Hui Zhang**, Xun Ma, Li Zhang, Xiaoming Guan, Tao Bai, Chenhui Xue. The ability to form cartilage of NPMSC and BMSC in SD rats [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(4): 4989-4996.

**个人简历**

张辉，男，1974年11月16日出生，汉族，ft西省长治市人。

1993年9月考入ft西医科大学临床医学专业，1998年7月本科毕业并获得医学学士学位。毕业后在ft西医科大学第一医院急诊科工作

2004年9月考入ft西医科大学第一临床医学院急诊医学专业，2006年7月研究生毕业并获得急诊医学硕士学位。

2011年9月考入ft西医科大学第二临床医学院骨科专业，攻读博士学位。