

组织工程学黄韧带干细胞的筛选与鉴定

韩小博, 李海音, 陈 斌, 常 献, 杨 匡, 张 伟, 周 跃, 李长青

(解放军第三军医大学附属新桥医院骨科 400037 重庆市)

【摘要】目的:通过 Fibronectin 介导进行差别粘附法筛选出人黄韧带干细胞并进行鉴定,探讨其作为组织工程种子细胞的可行性。**方法:**从椎间孔镜或椎间盘镜微创手术中获取 10 例人黄韧带标本,机械-酶消化法联合获取原代细胞,扩增第二代后接种于 Fibronectin 包被过的培养瓶。流式细胞仪检测细胞表面特异性标志物。免疫组化方法测定干细胞表达相关特异性蛋白。使用干细胞诱导培养基(实验组)向成骨、成脂、成软骨多向诱导分化,使用常规生长培养基培养者作为阴性对照(对照组),分别行茜素红染色、油红 O 染色、阿利辛兰染色鉴定。PT-PCR 检测成骨、成脂肪、成软骨基因表达。取同一患者的髂骨骨髓提取骨髓间充质干细胞,统计分析黄韧带干细胞与骨髓间充质干细胞的细胞周期、增殖能力和干性基因表达差异。**结果:**原代细胞形态呈三角形或多角形,经 Fibronectin 介导粘附培养后形态比较均一,呈长梭形克隆群。流式细胞仪检测筛选后的黄韧带干细胞 CD90、CD73 阳性率>96.8%,CD105 阳性率>95.9%,而 stro-1 为阴性。实验组茜素红染色呈强阳性,油红 O 染色可见大小不等脂滴呈红色,阿利辛兰染色大量蛋白聚糖聚集呈蓝色,对照组均为阴性。PT-PCR 测定实验组成骨基因(OC、ALP、RUNX-2)、成脂肪基因(LPL、APP、PPAR2)、成软骨基因(COL II、AGG、SOX9)显著上调,其中 RUNX-2 在对照组有低水平表达。免疫组化显示黄韧带干细胞和骨髓间充质干细胞均表达 α -SMA、I 型胶原、纤连蛋白,但均不表达 II 型胶原。两种干细胞均超过 80% 的细胞比例处于 G0/G1 期提示都有很强自我更新能力($P>0.05$)。CCK-8 检测不同时间点两种细胞的增殖能力,在第 1~10 天时 OD 值逐渐增加,第 10~14 天达稳定状态,二者有相似的增殖能力($P>0.05$)。两种干细胞均表达干性基因 NONAG、OCT-4、SOX2,组间差异无显著性($P>0.05$)。**结论:**通过 Fibronectin 差别粘附筛选法可有效筛选纯化出黄韧带干细胞,其可向成骨、成脂、成软骨多向分化,为组织工程技术治疗退变椎间盘提供了新的种子细胞。

【关键词】人;黄韧带干细胞;骨髓间充质干细胞;髓核;Fibronectin 差别粘附法;组织工程

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2014.12.08

中图分类号:Q813.1 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2014)-12-1099-10

Selection and identification of tissue engineering human ligamentum flavum-derived stem cells/HAN Xiaobo, LI Haiyin, CHEN Bin, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2014, 24(12): 1099-1108

【Abstract】 Objectives: To select ligamentum flavum-derived stem cells by fibronectin differential adhesion assay, and to determine whether MSCs exist in the human ligamentum flavum which provide cell candidates for cell-based regenerative medicine and tissue engineering. **Methods:** The samples of ligamentum flavum were collected from transforaminal endoscopic surgery or microendoscopic discectomy surgery for lumbar degenerative disease, and primary ligamentum flavum was obtained by mechanical method combined with collagenase I. Primitive cells proliferating to passage 2 were transferred to culture flasks coated with fibronectin. The cells' special markers were detected by flow cytometry. Cell clusters were analyzed by Immunohistochemical Staining for expression of stem cell-related proteins and were induced to differentiate into osteoblasts, chondrocytes and adipocytes under differentiation medium (experimental group). Negative control wells were maintained in basal Medium. The two groups were stained with alizarin red staining, oil red O and alcian blue respectively. RT-PCR was used to analyze the mRNA expressions of osteogenic, adipogenic- and chondrogenic-related genes. Human BM-MSCs were isolated from bone marrow aspirates taken from the iliac crest

第一作者简介:男(1987-),医学硕士,研究方向:椎间盘组织工程

电话:(023)68774328 E-mail:hxb3062005012@126.com

通讯作者:周跃 E-mail:happyzhou@vip.163.com;李长青 E-mail:changqli@163.com

of the same patient. Statistical analysis was used to test the proliferation capacity, cell cycle and stem cell gene expression, and the results were compared with bone marrow MSCs(BM-MSCs). **Results:** The primary cell morphology was triangle and multiangular, but the cells became comparatively uniformly fibroblastic-like. The percentages of CD73 and CD90 positive cells were more than 96.8%, while the percentage of CD105-positive cells was more than 95.9%, but negative for stro-1. Osteogenic differentiation group was strongly positive by alizarin red staining. In the adipogenic assay, it exhibited characteristic intracellular lipid droplets that could be stained with Oil Red O. In the chondrogenic micromass culture medium, chondrogenic induction micromass formed a sulfated proteoglycan-rich extracellular matrix which exhibited a positive alcian blue staining, while the non-induction group was negative. The mRNA analysis of RT-PCR results revealed that the osteogenesis-related genes(ALP, OC, RUNX-2), the adipogenesis-related genes(PPAR-2, APP, LPL) and chondrogenesis-related genes(AGG, COL II, SOX-9) all markedly increased in induced group compared with the control(non-induction, growth) group($P>0.05$), interestingly, the low-level expression of RUNX-2 was detected in the non-induction group. Immunocytochemistry staining further confirmed that all LFSCs and BMMSCs expressed type I α -SMA, fibronectin, collagen-I, but no collagen-II. The cell cycle showed remarkably capable of self-renewal of more than 80% of the BMMSCs and LFSCs were in the G0/G1 phase. The OD value increased from day 1 to day 10 and reached a plateau from day 10 to day 14($P>0.05$), both stem cell types exhibited similar growth tendencies. The stem cell gene(NONAG, OCT-4, SOX2) expression in the LFSCs was similar to that in BM-MSCs and the differences were not significant ($P>0.05$). **Conclusions:** The ligamentum flavum-derived stem cells obtained by fibronectin differential adhesion assay have capacity for osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation, which can be used as a new candidate for cell-based regenerative medicine and tissue engineering.

[Key words] Human; Ligamentum flavum-derived stem cells; Bone mesenchymal stem cells; Nucleus pulposus; Fibronectin differential adhesion assay; Tissue engineering.

[Author's address] Department of Orthopedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, China

腰痛主病因是腰椎间盘突出^[1],退变本质是盘内有核细胞数量减少和功能降低,包括细胞衰老^[2,3]、凋亡^[4,5]、细胞外基质(Ⅱ型胶原、蛋白聚糖、含水量)减少、合成代谢和分解代谢失衡、软骨终板退变导致营养供应的减少等改变,形成腰椎间盘突出、椎管狭窄、脊柱不稳时导致腰痛。通过药物、手术解除压迫等治疗仅限于解除症状,组织工程技术则能针对椎间盘退变早期来恢复其结构和功能,已经成为研究的热点。目前发现的种子细胞包括椎间盘内纤维环细胞、髓核细胞、软骨终板细胞、脊索源性细胞,盘外来源主要是脂肪、上皮、牙髓、骨髓、肌肉、腱、女性经血等^[6-8]组织中的各类间充质干细胞、胚胎干细胞以及其经基因修饰的永生化细胞^[9-11]。虽然大量数据显示不同组织来源的间充质干细胞可作为椎间盘组织工程椎间盘自体移植干细胞库^[12],但大部分组织来源有限,不能满足临床需要。我们提纯鉴定了黄韧带干细胞,并与骨髓间充质干细胞作比较以了解其是否具备相似的生物学性能,为日后研究椎间盘组织工程提供新的种子细胞。

1 材料与方法

1.1 标本的选择

样本收集前通过新桥医院伦理审查委员会批准和患者知情同意。黄韧带标本来源于 8 例经椎间孔镜和 2 例经椎间盘镜突出髓核摘除术的患者,平均年龄 50.2 ± 14.94 岁(28~71 岁),男性 8 例,女性 2 例,手术节段为 L3/4、L4/5。选择标准: MRI 检查示黄韧带无肥厚,CT 检查无骨化发生,HE 染色进一步确认无骨化及其他组织污染。用同一患者髂骨骨髓提取骨髓间充质干细胞作为对照。

1.2 分离培养黄韧带干细胞

获得的黄韧带组织解剖显微镜下用眼科剪将其剪成 1mm^3 大小,置于 3mg/ml 的 I 型胶原酶中消化 12h。含血清培养基中和酶后,收集细胞悬液通过 $40\mu\text{m}$ 细胞滤器过滤,在离心机以 1000 转速度离心 5min,弃上清后用含 α -minimum essential medium 培养基(α -MEM;Invitrogen,Carlsbad,CA)、16.6%牛血清(FBS;Invitrogen)、100 单位/ml 盘尼西林(Invitrogen)、 $100\mu\text{g/ml}$ 链霉素重悬。用

fibronectin(FN;Sigma,UK)10 μ g/ml 加入 0.1M PBS 包被培养瓶^[13]。将细胞悬液移入第 1 个培养瓶,30min 后将未贴壁的细胞悬液全部移至第 2 个培养瓶,1h 后将第 2 个培养瓶未贴壁的细胞及悬液移至第 3 个培养瓶。第 1、2、3 个培养瓶在移走未贴壁的细胞及悬液后立即添加 5ml 新鲜的合成培养基,置于 37℃、5% CO₂、95%湿度条件的孵箱中培养,倒置相差显微镜下观察生长情况,1 周换两次培养基。黄韧带细胞一般贴壁需 3d 时间,达 80%时 1:3 传代。15d 后,计算克隆集落和集落形成率。使用无菌克隆环(Sigma,UK)挑选分离干细胞克隆集落。

1.3 分离培养骨髓间充质干细胞

用无菌 10ml 注射器抽吸 5ml 骨髓,吸取 10000 单位肝素抗凝。通过 1.073g/ml Percoll 溶液 1000 $\times$ g 离心 30min。PBS 冲洗细胞 3 次,有核细胞重悬于培养基(DMEM-F12、10%牛血清、100U/ml 双抗)中,放置于 5% CO₂、37℃孵箱中。24h 后更换培养基。此后每周更换 2 次培养基,达 90%时用胰酶消化 1~2min 后 1:3 传代,第三代用于试验。骨髓间充质干细胞使用琼脂糖凝胶分选,形成集落样生长后,扩增细胞集落^[14]。

1.4 黄韧带干细胞表面表型鉴定

经过筛选后的黄韧带干细胞达 90%后时,胰酶消化后用含有 5mmol/L EDTA 的 PBS 重悬。分别加入异硫氰酸荧光素 (FITC-) 和藻红蛋白 (PE-) 标记的鼠抗人单克隆抗体 CD34-PE、CD73-PE、CD90-FITC、CD29-FITC、CD44-FITC、CD45-FITC、CD133-PE、CD105-FITC、STRO-1-FITC(R&D Systems parent company)与 PBS 配成浓度为 10 μ g/ml 待用,并编号 1~9,将配好含抗体的液体重悬至少 1 $\times$ 10⁵ 个细胞至每个 EP 管中,放置 4℃冰箱孵育 1h 后,2000r/min 离心 5min 后弃上清,PBS 洗 3 遍,1ml PBS 重悬,通过流式细胞仪(CellQuest software)单通道 Fluorescently Activated Cell Sorting 分析检测,并设立 FITC- 和 PE-同行对照组。

1.5 黄韧带干细胞多向分化鉴定和免疫组织化学染色

成骨分化:使用成骨培养基包含 10%胎牛血清、10nmol/L 地塞米松、10mmol/L β -甘油磷酸钠、0.1mmol/L L-抗坏血酸培养黄韧带干细胞。阴性对照使用常规生长培养基培养。经过 21d 诱导

分化,细胞经 4%多聚甲醛固定 30min 后,PBS 洗 3 遍,茜素红染色 5min 后显微镜下观察拍照。成脂分化:使用包含基础培养基 175ml、10%胎牛血清、10 μ g/ml 胰岛素、500 μ mol/L IBMX、100 μ mol/L 罗格列酮、1 μ mol/L 地塞米松的诱导分化 A 液培养干细胞 72h,而后换成包含基础培养基 175ml、10%胎牛血清、2%双抗、谷氨酰胺 2ml、10 μ g/ml 胰岛素的 B 液培养 24h,此 96h 为一次循环,共进行 5 次循环后使用脂肪诱导维持培养基培养至第 30 天。4%多聚甲醛固定,PBS 洗 3 遍后油红 O 染色 30min 显微镜下观察拍照。成软骨分化:采用微球诱导培养法,计数 2.5 $\times$ 10⁵/ml 个黄韧带来源的干细胞至 15ml 离心管中,150r/min 离心 5min 使细胞聚集成球,加入成软骨诱导基础培养基、地塞米松、抗坏血酸、ITS、丙酮酸钠、脯氨酸、TGF- β 35ml 诱导培养基,36h 内避免吹散细胞小球,TGF- β 3 在每次换液时加入,待 3d 后小球自由漂浮于离心管中。每 3d 换液至 28d 后甲醛固定、石蜡切片,阿利新蓝染色 30min 显微镜下观察拍照。对照组使用常规 α -MEM,21d 后阿利新蓝染色。

1.6 免疫组织化学染色比较黄韧带干细胞与骨髓间充质干细胞特异表型

实验分 4 组,每组为骨髓间充质干细胞和黄韧带干细胞。制备细胞爬片,用 4%的多聚甲醛固定 60min。30%过氧化氢+纯甲醇(1:50)室温浸泡 30min 灭活内源性的过氧化物酶。滴加 5% BSA 封闭液 20min,去液后分别滴加 1:100 稀释的平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、1:50 纤维连接蛋白 (fibronectin)、1:100 I 型胶原、1:100 II 型胶原 (R&D Systems,US),37℃过夜,PBS 洗涤 2min $\times$ 3 次。加生物素化的兔抗羊 IgG,37℃ 20min,PBS 洗涤 2min $\times$ 3。滴加试剂 SABC,37℃ 20min,PBS 洗涤 5min $\times$ 4。DAB 显色,无水乙醇脱水、二甲苯透明、树胶封片,光镜观察,胞体及细胞外基质出现黄染为阳性。

1.7 细胞周期检测

黄韧带干细胞和骨髓间充质干细胞在 72%酒精 4℃固定 72h,PBS 洗 3 遍,加入 1ml 碘化吡啶和 50 μ l RNase 储备液 4℃孵育 3h 后使用 FACS Calibur flow cytometer(BD,USA)仪器采用 Cell Quest software(BD,USA)分析检测两种干细胞的细胞周期,每个样品细胞数需达 $\geq$ 20,000 个。10 例患者细胞周期测定值取平均值 $\pm$ 标准差。

1.8 细胞增殖能力检测

比较黄韧带干细胞和骨髓间充质干细胞增殖能力, CCK-8(Dojindo Laboratories, Japan)按试剂说明书第 1、3、5、7、10、14 天时在 96 孔板每 3000 个细胞的孔中加入 10μl CCK-8 试剂孵育 4~6h, 分光光度计 450nm(BioRad, USA)检测 OD 值, 每个实验重复 3 次统计均数和标准误。

1.9 RT-PCR 检测基因表达情况

应用 Trizol 试剂提取各组总 RNA, 吹打并混匀, 在室温下静置 5min, 加入氯仿 0.2ml 在 4℃、12000r/min 条件下离心 5min, 吸取上层水相加入 DEPC 处理过的 1.5ml PCR 管中, 加入等体积的异丙醇混匀静置 10min, 在 4℃、12000r/min 条件下离心 10min, 弃上清后加入冰的 75%无水乙醇 1ml 洗涤, 在 4℃、7500r/min 离心 10min 弃上清。底层为白色透明 RNA, 空气中干燥 20min, 溶于 20μl DEPC 中并测 OD 值, 内参使用 β-actin, 由 Primer 5.0 软件生成引物序列(表 1)。取总 RNA 5μl (1~2μg)、oligo dT12-15 引物(100ng/μl)1μl (400~500ng)、DEPC H₂O 7μl。上述试剂混匀, 70℃, 5min 变性, 迅速置于冰上冷却约 2~5min。加入 RNasin(40U/μl)1μl、MMLV RT 5×Buffer 4μl、

4dNTP(10mmol/L each)1μl、MMLV RT(200U/μl)1μl。混匀, 37℃, 60min(反转录反应)。95℃, 10min(反转录酶灭活)。取一 0.2ml PCR 管, 按序加入 H₂O 37μl、PCR 10×Buffer 5μl、正向引物 1μl、反向引物 1μl、dNTP 4μl、Taq (2U/μl)1μl、cDNA 模板 1μl, 扩增目的片段 PCR 循环反应。每例标本测量三次, 三个样本随机选择。反应结束后取 5μl 反应产物琼脂糖凝胶电泳, 凝胶扫描仪分析。与内参 β-actin 条带的比值为 mRNA 表达水平参数。

1.10 数据分析

应用 SPSS 10.0 软件对结果进行统计学分析:组织学数据定性分析, 计量资料结果采用 $\bar{x} \pm s$ (n=10)。黄韧带干细胞与骨髓间充质干细胞之间定量数据比较采用配对 t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄韧带干细胞筛选

本实验研究的黄韧带组织术前 MRI/CT 评估无肥厚、骨化(图 1a、b), 解剖显微镜下去除脂肪等混杂组织(图 1c), HE 染色进一步确定无骨化、肥厚, 无脂肪组织、血液污染(图 1d)。筛选前细胞

表 1 干性基因引物序列
Table 1 Primer Sequences for RT-PCR analysis

目的基因 Gene	引物 Primer Sequences	退火温度 TA(℃)	循环数 Cycles
SOX-2	Forward CCCCCCTGTGTTACCTCTTC Reverse GCCCGCTCTGCTAGTGCTG	61	32
NANOG	Forward ACCCCGTTTCACTGTGTTAGC Reverse GACGGCAGCCAAGTTATTAAA	62	32
OCT4	Forward GGCAAGCGATCAAGCAGCGAC Reverse GGGAAAGGGACCGAGGAGTAC	61	32
RUNX-2	Forward ACGACAACCGCACCATGGT Reverse CTGTAATCTGACTCTGTCTCT	59	30
ALP	Forward TGGAGCTTCAGA AGCTCAACACCA Reverse ATCTCGTTGTCTGAGTACCAGTCC	59	28
OC	Forward ATGAGAGCCCTCACACTCCTC Reverse GCCGTAGAAGCGCCGATAGGC	59	30
PPAR-2	Forward CGAGGGCGATCTTGACAGGAA Reverse CAGGGGGGTGATGTGTTTGAAAC	55	30
APP	Forward CTGTCCAAGTCCAACAGCAA Reverse ACGTTGCCAGCTTTACGTCT	55	30
LPL	Forward TCCGCGTGATTGCAGAGAGAG Reverse TGCTGCTTCTTTTGGCTCTGACT	55	30
AGG	Forward TGAGGAGGGCTGGAACAAGTACC Reverse GGAGGTGTAATTGCAGGGAACA	57	28
COL II	Forward TTTCCCAGGTCAAGATGGTC Reverse TCACCTGGTTTTCCACCTTC	57	30
SOX-9	Forward TGGCCGAGATGATCCTAAAAATAA Reverse GCGCTTGATAGGTCATGTTTGT	57	30
β-actin	Forward GTGGGGCGCCCGACGCACCA Reverse CTTCCTTAATGTCACGCACGATTTC	55	45

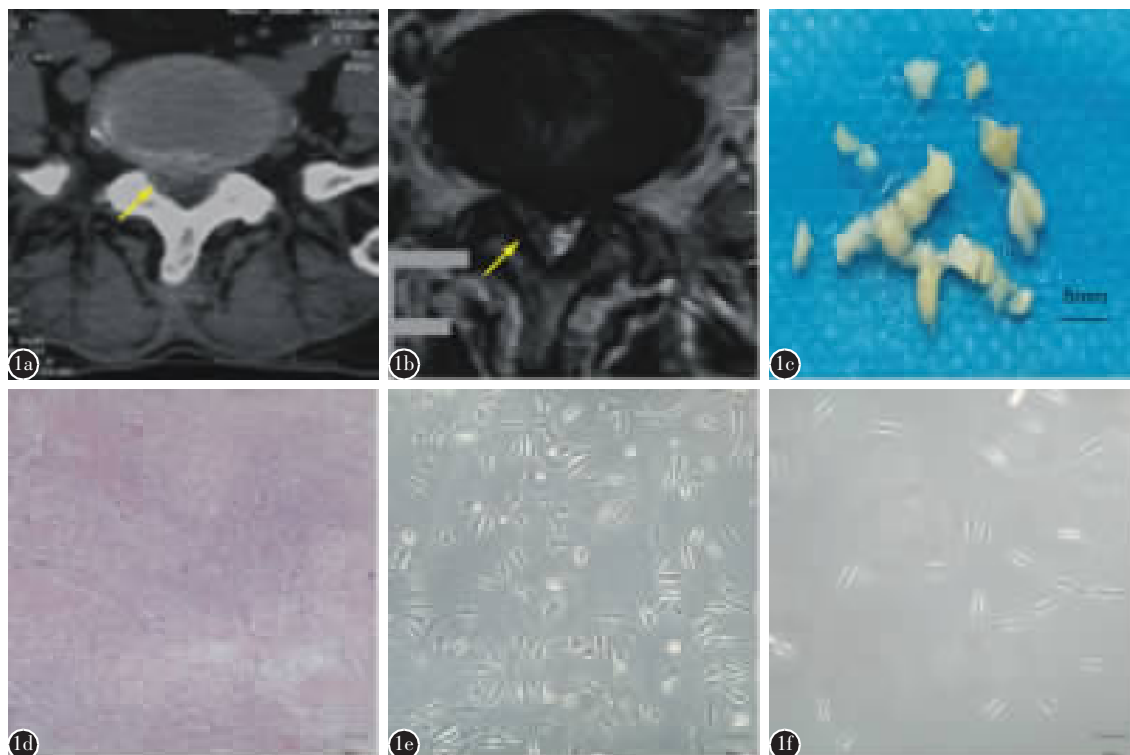


图 1 **a** 术前 CT 示没有发生骨化的黄韧带(箭头所指) **b** 术前 MRI 示没有发生肥厚的黄韧带(箭头所指) **c** 黄韧带人体标本形态, 外观呈黄色 **d** 黄韧带组织 HE 染色未见骨化、肥厚 **e** 筛选前黄韧带细胞形态多样, 呈三角或多角 **f** 筛选后细胞形态大部分呈梭形, 形态单一

Figure 1 **a** CT showed no ossification **b** MRI showed no hypertrophy **c** Gross morphology of ligamentum flavum showed yellow **d** Histologic morphology with HE staining (ligamentum flavum) showed no hypertrophy and ossification **e** Before selection, the morphology of ligamentum flavum cells showed triangular or polygonal **f** After selection, the morphology of ligamentum flavum cells shows fusiform and uniform

形态种类多样有三角、梭形、多角形(图 1e), 通过 Fibronectin 差别粘附筛选法得到形态均一的黄韧带干细胞(图 1f)。

2.2 细胞表面标志物检测结果

流式细胞仪检测筛选之后黄韧带干细胞的表面标志物结果见表 2。CD29、CD44、CD73、CD90、CD105 呈强阳性, CD34、CD45、CD133、STRO-1 阴性表达。其与骨髓间充质干细胞表面标志物基本一致, 仅 STRO-1 两者间差异有显著性 ($P < 0.05$)。

2.3 黄韧带干细胞多向诱导分化结果

成脂肪诱导: 培养液诱导 30d 后相差显微镜下可观察到细胞质内有水滴状的小脂滴出现, 随诱导时间推移, 脂滴逐渐增大, 同时细胞形状有所变化, 多边形细胞增多; 对照孔黄韧带干细胞形态变化不明显(图 2a)。成骨诱导: 21d 后诱导孔内细胞形态逐渐变成方形及多角形, 细胞体变短, 细胞

透亮性变差, 可见广泛结节状矿化颗粒沉着, 茜素红染色呈广泛存在的红色, 局部呈红褐色, 着色区域内可见大量钙结节, 部分结节融合呈小团块状

表 2 细胞表面标志物流式细胞仪检测结果
Table 2 The percentages of cell surface marker by flow cytometry(%)

抗体名称 Antibody	LFSCs	BMSCs
CD29	99.30±0.69	99.12±0.83
CD44	99.60±0.34	99.43±0.44
CD73	98.40±1.12	96.82±2.24
CD90	99.40±0.42	97.77±1.82
CD105	99.70±0.28	99.22±0.69
STRO-1	6.46±0.87	98.37±1.18 ^①
CD34	0.902±0.25	0.87±0.33
CD45	0.939±0.13	0.88±0.16
CD133	1.12±0.87	1.34±0.79

注: 与 LFSCs 组比较 $P < 0.05$

Note: Compared with LFSCs, $P < 0.05$

红色;对照孔内细胞未见明显着色,干细胞形态变化不明显(图 2b)。成软骨诱导:经 Pellet 法培养 28d 后,细胞团块呈椭圆形,随着时间推移逐渐增大。行阿利新蓝染色显示中心局部地方因缺氧细胞自动分离空缺,细胞形态呈圆形或类圆形变化,细胞体蓝染,细胞间亦可见大量蓝染的粘多糖(图 2c)。未诱导组使用 α -MEM 培养 28d 后阿利辛兰染色为阴性(图 2f)。

2.4 免疫组织化学

所有黄韧带来源的干细胞表达 I 型胶原(图 3a),但仅有部分骨髓间充质干细胞表达(图 3e)。同样 α -SMA 也出现相同的结果(图 3b、f)。骨髓间充质干细胞和黄韧带干细胞均表达纤维连接蛋白(图 3c、g),而不表达 II 型胶原(图 3d、h)。

2.5 细胞周期比较

流式细胞仪测定骨髓间充质干细胞与黄韧带干细胞细胞周期见表 3。结果显示一小部分细胞 $S1+G2+M<20\%$ 。至少超过 84% 骨髓间充质干细胞

和黄韧带干细胞处于 G0/G1 期,两种细胞之间无明显统计学意义($P>0.05$)。

2.6 细胞增殖能力比较

每个时间点黄韧带干细胞均稍高于骨髓间充质干细胞,但无明显统计学差异($P>0.05$)。提示黄韧带干细胞与骨髓间充质干细胞增殖能力相似(表 4)。

2.7 RT-PCR 检测结果

成骨基因(OC、ALP、RUNX-2)、成脂肪基因(LPL、APP、PPAR2)、成软骨基因(COL II、AGG、SOX9)显著上调,其中 RUNX-2 在对照组有低水平表达(表 5)。黄韧带干细胞与骨髓间充质干细胞都表达干性基因(OCT-4、NANOG 及 SOX-2)(图 4,表 6),而且基因表达稳定,无明显统计学差异($P>0.05$)。

3 讨论

3.1 干细胞的筛选、鉴定和多能性

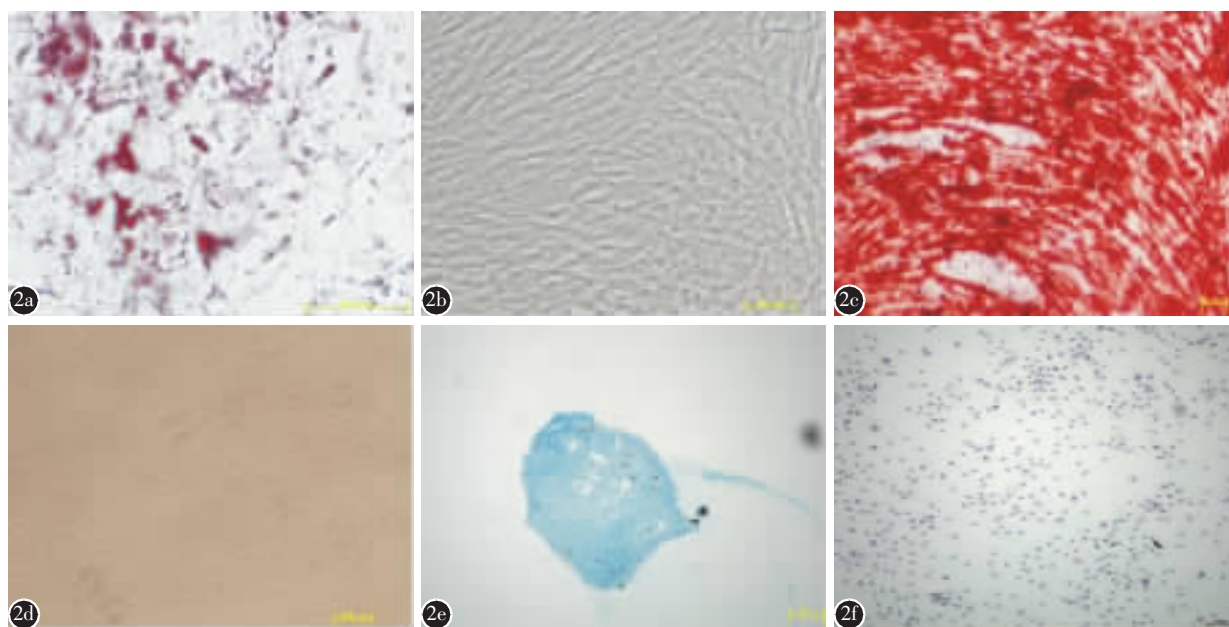


图 2 a 成脂肪诱导 30d,倒差显微镜可见大小不等油红 O 染色的脂肪小滴 b 对照组细胞未见明显着色,形态变化不明显 c 成骨诱导 21d,茜素红染色可见广泛结节状矿化颗粒沉着 d 对照组未见明显着色,细胞形态变化不明显 e 成软骨诱导 28d,阿利新蓝染色后呈蓝色,提示诱导分化后蛋白聚糖合成 f 对照组使用普通基培养 28d 后阿利新蓝染色为阴性

Figure 2 a The presence of lipid vacuoles stained with oil red O evaluate adipogenic induction, cells cultured under induced conditions exhibited intracellular lipid vacuoles after 30 days of adipogenic induction b Cultured in the growth medium for 30 days were negative red O, cell morphology did not change significantly c Osteogenic differentiation was confirmed by the deposition of an alizarin red positive mineralized matrix for 21 days d Cultured in the growth medium for 3 weeks were negative, Cell morphology did not change significantly e After 28 days, alcian blue revealed the depositions of glycosaminoglycan f The aggregates growth with the non-induction medium and alcian blue staining is negative

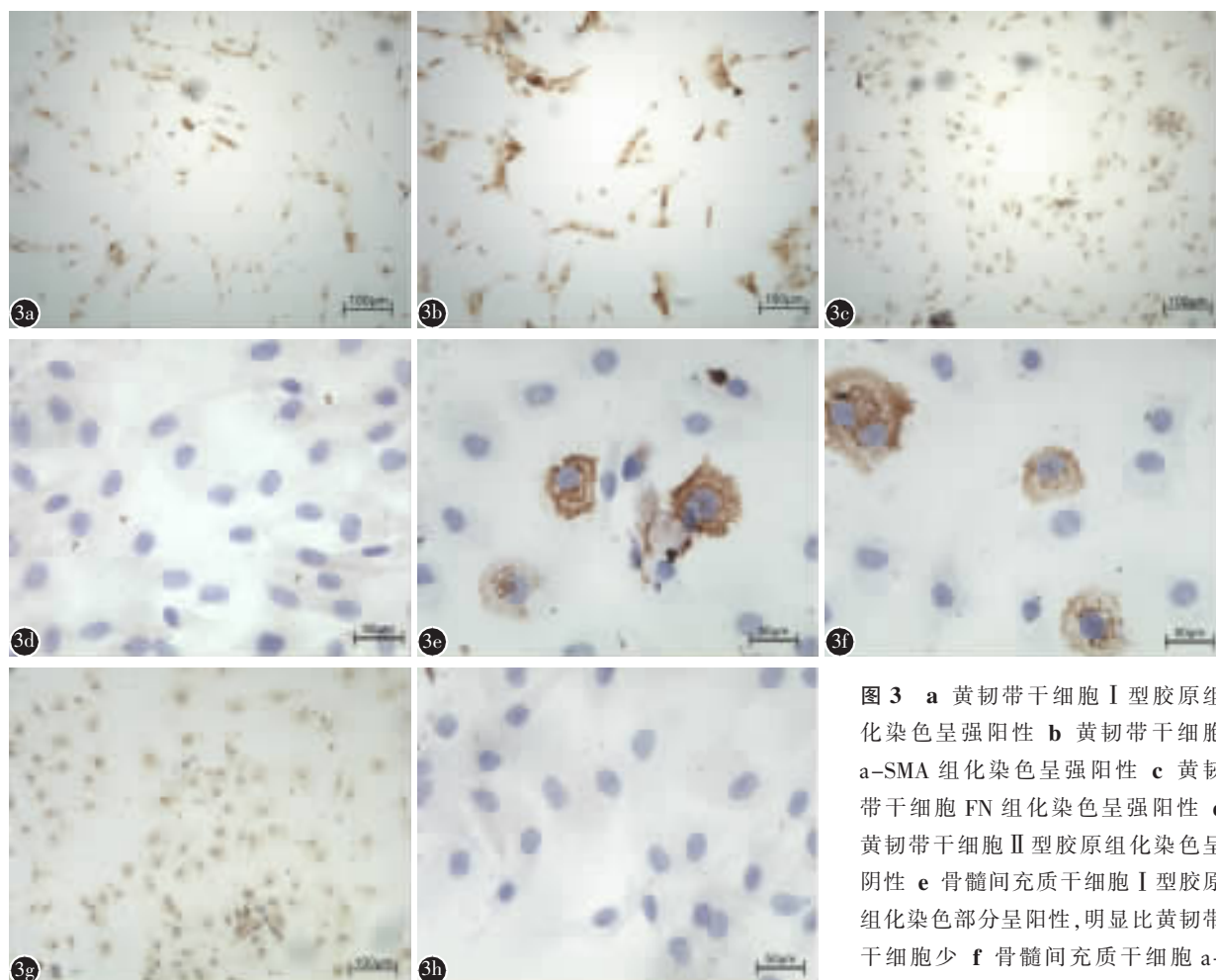


图 3 a 黄韧带干细胞 I 型胶原组化染色呈强阳性 b 黄韧带干细胞 a-SMA 组化染色呈强阳性 c 黄韧带干细胞 FN 组化染色呈强阳性 d 黄韧带干细胞 II 型胶原组化染色呈阴性 e 骨髓间充质干细胞 I 型胶原组化染色部分呈阳性,明显比黄韧带干细胞少 f 骨髓间充质干细胞 a-SMA 组化染色部分呈阳性 g 骨髓间

充质干细胞 FN 组化染色呈阳性,明显比黄韧带干细胞少 h 骨髓间充质干细胞 II 型胶原组化染色呈阴性,与黄韧带干细胞一致

Figure 3 a LFSCs expressed type I collagen with immunocytochemistry staining b LFSCs expressed a-SMA with Immunocytochemistry staining c LFSCs expressed fibronectin with Immunocytochemistry staining d LFSCs expressed type II collagen with Immunocytochemistry staining e BMSCs partially expressed type I collagen with Immunocytochemistry staining f BMSCs partially expressed a-SMA with Immunocytochemistry staining g BMSCs expressed fibronectin with Immunocytochemistry staining h The express of type II collagen were negative

以 MSCs 为代表的大量成体干细胞在来源和应用上具有一定的优势,如可以大量获取,又能避免伦理问题。Gomes 等^[15]首次发现同种间充质干细胞移植可抑制椎间盘退变,他提出植入的种子细胞不但在体内要分化为髓核细胞还要产生健康的细胞外基质。虽然直接移植髓核细胞最为理想,以及以往发现的胚胎干细胞、脊索细胞、基因修饰的祖细胞、诱导性多能干细胞^[16]可以诱导向类髓核细胞分化,但它们都有取材不易、难以获取足够数量的细胞、致瘤性等不利于自体移植,这些缺点均限制了其在临床上大量扩增和应用。临床上人

体干细胞在组织标本中的含量极低,如不进行筛选,从组织标本中获取的细胞是多种分化细胞的集合体。近年已有不少实验研究报道在不同组织细胞中筛选干细胞的方法,如 Jones 等^[17]通过 Fibronectin 进行差别黏附筛选得到的人表皮干细胞纯度达到 90%以上, Fibronectin 是细胞外基质的糖蛋白,介导干细胞粘附,以此调节细胞形状和细胞骨架的组装, Fibronectin 差别黏附筛选法促进细胞铺展和迁移,并可通过迁移途径决定细胞分化方向等特性提纯干细胞,提示 Fibronectin 可以被用于 MSCs 的筛选,本实验采用了该技术对

表 3 骨髓间充质干细胞与黄韧带干细胞的细胞周期
($\bar{x}\pm s, \%$)

Table 3 The cell cycle of BM-MSCs and LFSCs			
	<i>n</i>	骨髓间充质干细胞 BMSCs	黄韧带干细胞 LFSCs
G0/G1	10	84.8770±1.6636	84.8390±1.8389
S1+G2+M	10	15.1230±1.6636	15.2340±1.8709

表 4 骨髓间充质干细胞和黄韧带干细胞的增殖能力
($\bar{x}\pm s$)

Table 4 The proliferation capacity of BM-MSCs and LFSCs			
分组 Group		骨髓间充质干细胞 BMSCs	黄韧带干细胞 LFSCs
1d		0.90±0.17	0.94±0.25
3d		1.32±0.19	1.36±0.16
5d		1.67±0.19	1.68±0.23
7d		1.83±0.16	1.85±0.20
10d		1.89±0.20	1.87±0.21
14d		1.96±0.20	2.02±0.25

表 5 成骨、成脂肪、成软骨 mRNA 表达量
Table 5 The express mRNA of Osteogenic

	诱导组 Induction group	对照组 Control group
骨钙蛋白 OC	0.624±0.063	0.350±0.041
碱性磷酸酶 ALP	0.45±0.025	0.236±0.014
骨分化转录因子 RUNX-2	0.69±0.036	0.44±0.013
脂蛋白脂肪酶 LPL	0.673±0.032	0.357±0.011
脂蛋白 APP	0.650±0.038	0.303±0.016
过氧化物酶体激活受体 2 PPAR2	0.635±0.061	0.224±0.022
胶原 II COL II	0.553±0.013	0.201±0.013
蛋白聚糖 AGG	0.664±0.013	0.223±0.013
软骨生成转录因子 SOX9	0.466±0.013	0.159±0.013



图 4 RT-PCR 检测黄韧带干细胞和骨髓间充质干细胞均表达 NANOG(1)、OCT-4(2)、SOX2(3)
Figure 4 Stem cell genes[NANOG (1), OCT-4(2) and SOX-2(3)] were expressed both in BMSCs and LFSCs

表 6 干性基因
Table 6 Stem cell genes
($\bar{x}\pm s$)

	OCT-4	NANOG	SOX-2
骨髓间充质干细胞 BMSCs	0.628±0.013	0.652±0.016	0.606±0.028
黄韧带干细胞 LFSCs	0.614±0.023	0.662±0.012	0.596±0.033

人黄韧带组织中的干细胞进行了筛选提纯。黄韧带干细胞同 BM-MSCs 同属间充质干细胞，表达多种干细胞表面标记，运用流式细胞仪分选技术提示表达了 CD90、CD29、CD44、CD73、CD105 干性标志物。有趣的是未表达造血系表面标志物 stro-1，它是间充质干细胞、红系、牙槽干细胞和成骨祖细胞比较公认的特异性标志物，没有证据显示不表达 stro-1 就会失去干性^[18]。而且 Wu 报道用 Y-27632-assisted 单层培养系统选出胚胎前体干细胞 stro-1 为阴性^[19]同样具有很强的干性分化能力，所以研究发现的 stro-1 阴性结果可能是鉴定黄韧带干细胞的阴性标志物之一。接下来我们从特异性染色和定向基因表达水平验证了多向分化能力，经多向诱导分化培养基在体外定向诱导后，分别行茜素红、阿利辛兰、油红 O 染色显示可以成骨、成软骨、成脂肪方向分化。诱导后表达成骨基因：OC、ALP、RUNX-2，成脂肪基因：LPL、APP、PPAR2，成软骨基因：COL II、AGG、SOX9 显著上调，其中 RUNX-2 在未诱导组有低水平表达，可能与人体黄韧带长时间受力学影响成骨方面基因有所表达，这也提示黄韧带骨化的机制。实验严谨的结合了表观染色和基因表达水平的检测来评价提纯干细胞的多能性，依据国际细胞治疗协会 (International Society for Cellular Therapy, ISCT) 提出对 MSCs 的最低标准：①贴壁生长；②能向骨、软骨和脂肪细胞分化；③标志物 CD105、CD73 及 CD90 阳性率>95%，CD34 及 CD45 阳性表达率<2%^[19]。本实验结果充分展示了 Fibronectin 差别黏附法能够有效筛选较高纯度的黄韧带干细胞，不仅表达了多种干性标志物，而且具有多向分化的能力符合 ISCT 对间充质干细胞的定义。

3.2 黄韧带干细胞应用于组织工程学的可行性及意义

成功分离和鉴定黄韧带干细胞是我们评价黄韧带干细胞作为组织工程种子细胞的前提，经过分选提纯后可以得到满意的干细胞来源，纯度好、

形态均一。就自我更新、细胞周期、干性基因表达等多方面与骨髓间充质干细胞比较以评价应用于组织工程学的可行性。自我更新应用测定细胞周期和增殖能力来评价,从细胞周期来看骨髓间充质干细胞与黄韧带干细胞没有明显统计学差异。Reems 等^[20]报道绝大部分祖细胞在 G0/G1 期,因此 G0/G1 期所占的比例与细胞多能性有关,本实验处于 G0/G1 期超过 84%提示干细胞在干性维持上较好。CCK-8 测定增殖能力来看黄韧带干细胞与骨髓间充质干细胞具有相似的增殖能力。表达特异性蛋白方面免疫组化显示黄韧带干细胞软骨诱导 II 型胶原成阳性,未诱导时为阴性。并且表达 I 型胶原、 α -SMA 强于骨髓间充质干细胞,二者一致表达 FN 并未发现有明显差异,提示黄韧带干细胞表达特异性蛋白与骨髓间充质干细胞相似但有差异点。RT-PCR 结果显示骨髓间充质干细胞与黄韧带干细胞均高表达 NONAG、OCT-4、SOX2,它们是调节干细胞多能性和自我更新能力的转录因子,被认为是干细胞的特异性标志物^[21]。从细胞周期、细胞增殖能力、免疫组化染色、干性基因表达来比较黄韧带干细胞与骨髓间充质干细胞相似,实验获得的黄韧带干细胞具有自我更新能力和多能性可作为组织工程种子细胞。我们可以利用目前研究成果,将黄韧带干细胞与髓核细胞共培养或构建定向分化微环境诱导向髓核细胞分化为移植做准备。同样有意义的是在微创手术中黄韧带组织取材容易,对机体损伤小,而且接受完微创手术后可以作为自体干细胞移植库挽救已经发生退变的椎间盘具有良好的临床应用价值。

3.3 展望

如何利用种子细胞、微环境(“土壤”)高效地诱导黄韧带干细胞向髓核分化对组织工程研究成果转化医学具有重要的意义。它的成功对盘源性腰痛、纤维环损伤和“黑色间盘”、防止临近节段退变、防止过度的椎间盘切除等退变性疾病具有积极的治疗意义。这些治疗方式的建立需要表型稳定的种子细胞和合适的微环境^[23,24],不仅用于临床的可行性要大,最好可以通过微创注射到发生退变的椎间盘,达到恢复椎间盘细胞的数量,从而减缓椎间盘退变。本实验研究充分证明了黄韧带组织干细胞来源充足、较强的自我更新能力和多能性,使我们寻找到了新的组织工程和再生医学种子细胞,今后还需对通过与髓核共培养、改造合

适微环境等方式向我们所期望既能保持干性特征、又能定向分化为髓核细胞进一步研究。以下几方面还需要进一步解决:(1)深入揭示干细胞向髓核定向分化的分子调控机制和表观遗传修饰机制;(2)筛选和确定干细胞向髓核细胞分化各阶段的表面标志物;(3)优化干细胞向髓核细胞分化的培养方案,有效地提高分化效率及建立诱导向特定类型定向分化的方案并探讨其调控机制。不同来源、不同方法和不同因子组合诱导多能干细胞分化潜能以及成瘤性是否有差别。随着研究的深入,建立更完善的定向分化方案,并用合适的材料和方式达到减缓椎间盘退变的进程会离我们越来越接近。

4 参考文献

1. Cheung KM, Karppinen J, Chan D, et al. Prevalence and pattern of lumbar magnetic resonance imaging changes in a population study of one thousand forty-three individuals [J]. Spine, 2009, 34(9): 934-940.
2. Kim KW, Chung HN, Ha KY, et al. Senescence mechanisms of nucleus pulposus chondrocytes in human intervertebral discs[J]. Spine J, 2009, 9(8): 658-666.
3. 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.
4. Zhao CQ, Wang LM, Jiang LS, et al. The cell biology of intervertebral disc aging and degeneration[J]. Ageing Res Rev, 2007, 6(3): 247-261.
5. Jiang L, Zhang X, Zheng X, et al. Apoptosis, senescence, and autophagy in rat nucleus pulposus cells: Implications for diabetic intervertebral disc degeneration [J]. J Orthop Res, 2013, 31(5): 692-702.
6. Waddington RJ, Youde SJ, Lee CP, et al. Isolation of Distinct Progenitor Stem Cell Populations from Dental Pulp [J]. Cells Tissues Organs, 2009, 189(1-4): 268-274.
7. Hu X, Zhou Y, Zheng X, et al. Differentiation of menstrual blood-derived stem cells toward nucleus pulposus-like cells in a coculture system with nucleus pulposus cells [J]. Spine, 2014, 39(9): 754-760.
8. Luo W, Xiong W, Qiu M, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells towards a nucleus pulposus-like phenotype utilizing simulated microgravity In vitro [J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2011, 31(2): 199-203.
9. Risbud MV, Guttapalli A, Tsai TT, et al. Evidence for skeletal progenitor cells in the degenerate human intervertebral disc[J]. Spine, 2007, 32(23): 2537-2544.
10. Sheikh H, Zakharian K, De la Torre RP, et al. In vivo

- intervertebral disc regeneration using stem cell-derived chondroprogenitors[J]. J Neuros Spine, 2009, 10(3): 265-272.
11. 王海, 周跃, 李长青, 等. 椎间盘组织工程学种子细胞来源的研究进展[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2012, 22(1): 77-81.
12. Richardson SM, Hoyland JA, Mobasher R, et al. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: opportunities and challenges for articular cartilage and intervertebral disc tissue engineering[J]. J Cell Physiol, 2010, 222(1): 23-32.
13. Williams R, Khan IM, Richardson K, et al. Identification and clonal characterisation of a progenitor cell sub-population in normal human articular cartilage[J]. PLoS One, 2010, 5(10): e13246.
14. Liu LT, Li CQ, Zhou Y, et al. Characteristics of stem cells derived from the degenerated human intervertebral disc cartilage endplate[J]. Plos One, 2013, 6(10): 1-14.
15. Gomes ME, Bossano CM, Johnston CM, et al. In vitro localization of bone growth factors in constructs of biodegradable scaffolds seeded with marrow stromal cells and cultured in a flow perfusion bioreactor[J]. Tissue Eng, 2006, 12(1): 177-188.
16. Saraiya M, Nasser R, Zeng Y, et al. Reversine enhances generation of progenitor-like cells by dedifferentiation of annulus fibrosus cells [J]. Tissue Eng Part A, 2010, 16 (4): 1443-1455.
17. Jones PH, Watt FM. Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression[J]. Cell, 1993, 73(4): 713-724.
18. Dominici M, Le-Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. Cytotherapy, 2006, 8(4): 315-317.
19. Wu R, Gu B, Zhao X, et al. Derivation of multipotent nestin(+)/CD271 (-)/STRO-1 (-) mesenchymal-like precursors from human embryonic stem cells in chemically defined conditions[J]. Hum Cell, 2013, 26(1): 19-27. doi: 10.1007/s13577-011-0022-3. Epub 2011 Jun 15.
20. Reems JA. Cell cycle and functional differences between CD34+/CD38hi and CD34+/38lo human marrow cells after in vitro cytokine exposure[J]. Blood, 1995, 85: 1480-1487.
21. Carlin R, Davis D, Weiss M, et al. Expression of early transcription factors Oct-4, Sox-2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2006, 4: 8.
22. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. Cytotherapy, 2006, 8(4): 315-317.
23. Wu R, Gu B, Zhao X, et al. Derivation of multipotent nestin(+)/CD271 (-)/STRO-1 (-) mesenchymal-like precursors from human embryonic stem cells in chemically defined conditions[J]. Hum Cell, 2013, 26(1): 19-27.
24. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes[J]. Hepatology, 2007, 46(1): 219-228.
- (收稿日期: 2014-07-28 修回日期: 2014-10-24)
(英文编审 蒋欣/贾丹彤)
(本文编辑 彭向峰)

消息

中国中西医结合学会脊柱医学专业委员会第八届学术年会征文通知

中国中西医结合医学会脊柱医学专业委员会自 2007 年在北京成立以来,在全国同仁的大力支持下,积极地推动了我国脊柱医学领域的基础研究和诊疗新技术的迅速发展,学会的学术工作越来越受到全国中西医骨科同仁的欢迎和支持。为了进一步加强我国中西医结合脊柱学科的发展与完善,推动脊柱外科的创新与发展,展示近年来我国脊柱外科领域所取得的成果与进展,拟定于 2015 年 5 月 22 日~24 日在洛阳召开由中国中西医结合医学会脊柱医学专业委员会主办、河南省洛阳正骨医院河南省骨科医院脊柱外科承办的“中国中西医结合学会脊柱医学专业委员会第八届学术年会”,会议将特邀国内外著名脊柱外科专家作专题讲演,并邀请国内同道参会交流。

投稿要求:1.征文范围:脊柱相关疾病的中医、西医及中西医结合基础和临床研究;上颈椎伤病诊疗新技术;脊柱微创、融合与非融合治疗;椎间盘源性疾病的非手术诊疗手段;脊柱脊髓损伤的康复和功能重建。2.征文要求:(1)提供 400 字结构式论文摘要(包括题目、目的、方法、结果及结论)。请尽快将发言题目发至会议邮箱,以便安排日程。(2)来稿注明作者姓名、工作单位、通信地址、邮编及联系电话。(3)要求用 E-mail 投稿,E-mail:zxyjh2015@126.com。

截稿日期:2015 年 3 月 31 日。联系人:杨磊 13592077531。