基础研究

大鼠骨髓间充质干细胞与髓核细胞共培养对白介素 1β 致髓核细胞退变的影响

胡津铨,袁 文,曹 鹏,杨 晨,高 阳,石长贵
(第二军医大学附属长征医院脊柱外科 200003 上海市)

【摘要】目的:观察大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)与髓核细胞(NPCs)共培养对白介素 1β(IL-1β)致 NPCs 退变的影响。**方法**:在体外分别分离培养大鼠 NPCs 和 BMSCs,分别传至第 3 代,采用流式细胞仪鉴定 BMSCs 纯度,分别测定 CD29、CD31、CD45、CD90 表型。取第 3 代 NPCs 分为 3 组:A 组,无 IL-1β 干预,不与 BMSCs 共培养,设为对照组;B 组,用 IL-1β 干预 NPCs 后不与 BMSCs 共培养;C 组,用 IL-1β 干预 NPCs 后与 BMSCs 细胞借由 transwell 小室间接共培养。IL-1β 干预时间和 BMSCs 共培养时间均为 24h, 之后取出 transwell, 将 3 组 NPCs 通过实时定量荧光 PCR(RT-PCR)观察其解聚蛋白样金属蛋白-4(ADAMTS-4)、解聚蛋白样金属蛋白酶-5(ADAMTS-5)、基质金属蛋白酶-13(MMP-13)基因表达量,同时通过 Annexin V-FITC/propidium iodide (PI)凋亡试剂盒和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)试剂盒观察 3 组 NPCs 凋亡情况。**结果**:流式细胞鉴定结果显示 90%以上的 BMSCs 表现为 CD29、CD90 阳性,小于 5%的 BMSCs 表现为 CD31、CD45 阳性,细胞纯度较好。3 组 NPCs 中 ADAMTS-4、ADAMTS-5、MMP-13 的基因相对表达量:A 组为 0.98±0.19、1.10±0.08、1.21±0.24,B 组为 5.23±0.25、6.92±2.33、23.39±0.09,C 组为 2.31±0.26、3.33±1.52、12.68±0.11, 与 A 组比较,B、C 组均明显升高(P<0.05),C 组与 B 组比较均明显降低(P<0.05)。Caspase-3 活性相对表达量 A 组为 1.20±0.18,B 组为 5.92±0.93,C 组为 2.33±0.52,与 A 组比较,B、C 组明显升高(P<0.05),C 组与 B 组比较明显降低(P<0.05)。细胞凋亡率 A 组为 4.2±2.2,B 组为 17.1±3.7,C 组为 10.5±2.4,与 A 组比较,B、C 组明显升高(P<0.05),C 组与 B 组比较明显降低(P<0.05)。**结论**:与 BMSCs 共培养可有效降低IL-1β致NPCs退变相关因子的基因表达,减少细胞凋亡;BMSCs 可作为种子细胞对椎间盘炎性环境起到“治疗”作用。

【关键词】骨髓间充质干细胞;椎间盘退行性变;髓核细胞;凋亡;共培养
doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2015.04.14
中图分类号:Q813,R681.5 **文献标识码**:A **文章编号**:1004-406X(2015)-04-0361-06

The effect of rat bone marrow mesenchymal stem cells on IL-1β induced degenerative nucleus pulposus cells under the condition of co-culture/HU Jinquan, YUAN Wen, CAO Peng, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2015, 25(4): 361-366

【abstract】Objectives: To investigate the effect of rat bone marrow mesenchymal stem cells(BMSCs) on IL-1β induced degenerative nucleus pulposus cells(NPCs) under the condition of co-culture. **Methods:** NPCs and BMSCs were isolated from SD rat and cultured to the 3rd passage respectively. BMSCs were taken for flow cytometry to analyze the phenotypes of CD29, CD31, CD45, CD90. Experiments were divided into three groups by using the 3rd passage NPCs. Group A, without IL-1β intervention and without BMSCs co-culture were regarded as control group; group B, IL-1β induced NP cells but without BMSCs co-culture; group C, IL-1β induced NP cells and then co-cultured with BMSCs by indirect co-culture transwell. Both IL-1β intervention time and BMSCs co-culture time were set at 24h, then the transwell was removed. The gene (ADAMTS-4, ADAMTS-5, MMP-13) expressions of NPCs through real-time fluorescent quantitative PCR(RT-PCR) were detected in each group, at the same time the Annexin V-FITC/propidium iodide(PI) apoptosis kit and Caspase 3 kits were used to observe the apoptosis in each group. **Results:** BMSCs flow results showed

基金项目:上海市科委国际合作项目(编号:13430721000)
第一作者简介:男(1989-),医学硕士,研究方向:椎间盘退行性病变
电话:(021)81885626 E-mail:hjqspine@163.com
通讯作者:袁文 E-mail:wenyuan2014@126.com

that more than 90% of BMSCs presented as CD29, CD90 positive, less than 5% of BMSCs presented as CD31 and CD45 positive, which showed good uniform. ADAMTS-4, ADAMTS-5, MMP-13 gene relative expressions in each group were obtained by RT-PCR, 0.98±0.19, 1.10±0.08, 1.21±0.24 respectively in group A, 5.23±0.25, 6.92±2.33, 23.39±0.09 respectively in group B, 2.31±0.26, 3.33±1.52, 12.68±0.11 respectively in group C. Compared with group A, the NP cell in group B and group C showed significant increase of ADAMTS-4, ADAMTS-5, MMP-13 gene expression (P<0.05), and compared with group B, the rise of ADAMTS-4, ADAMTS-5, MMP-13 gene expression showed obvious inhibition in group C(P<0.05). In detection of apoptosis, the relative expression of Caspase 3 activity was 1.20±0.18 in group A, 5.92±0.93 in group B, 2.33±0.52 in group C. Compared with group A, the relative expression quantity of Caspase 3 in group B and group C showed significant increase(P<0.05), and compared with group B, the rise of Caspase 3 activity was suppressed obviously in group C(P<0.05). Annexin V-FITC/propidium iodide(PI) by flow cytometry indicated the increase of apoptotic cells in group B and group C compared with that in group A(P<0.05). **Conclusion:** BMSCs effectively decrease the degeneration and apoptosis of NP cells induced by IL-1β under the condition of co-culture. As seed cells, BMSCs have therapeutical effect on intervertebral disc inflammation.

【Key words】 Mesenchymal stem cells; Disc degeneration; Nucleus pulposus cell; Apoptosis; Co-culture system

【Author's address】 Department of Orthopedic Surgery, Changzheng Hospital, Shanghai, 200003, China

随着老龄化社会的进展，椎间盘退行性病变所导致的疾病逐渐成为影响人们生活质量的重要原因之一[1]。学术界普遍认为，椎间盘髓核细胞（NPCs）的异常凋亡或年龄相关性凋亡在椎间盘退行性病变中起到关键性作用[2-4]。退变椎间盘内白介素 1β（IL-1β）的高表达以及抑制 IL-1β 后椎间盘细胞的积极表现证实，炎性过程特别是 IL-1β 所造成的蛋白多糖及Ⅱ型胶原的降解，使椎间盘 NPCs 及纤维环细胞损伤、加速凋亡并导致椎间盘退行性病变[5-9]。因此，在治疗椎间盘退行性病变中，减轻炎症及减少细胞凋亡所造成的负面影响具有重要意义。间充质干细胞（MSCs）来源丰富、活性高，以其低免疫原性、高增殖分化能力及分泌营养因子的特性在大体移植研究中被广泛使用，并被证明具有积极作用[10]。在椎间盘退行性病变中，骨髓间充质干细胞（BMSCs）移植可起到抑制椎间盘退变、增加椎间盘内细胞数量、部分恢复椎间盘高度的效果[11~13]。然而，在大体研究中好的治疗效果不能够分离众多干预因素，存在不可避免的局限性。BMSCs 在椎间盘病变治疗中的抗炎抗凋亡特性尚无明确的文献报道，为了分析 BMSCs 在治疗中的作用，我们采用 NPCs 与 BMSCs 非接触共培养模拟其炎性损伤后 BMSCs 的修复过程，为进一步优化干细胞治疗方案提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

Tanswell 培养板（Corning，美国）；DMEM 培养基（Gbico 公司，美国）；特级胎牛血清（FBS，Gbico 公司，美国）；IL-1β（PeproTech，美国）；Annexin V-FITC/propidium iodide（PI）凋亡试剂盒（BD，美国）；Trizol Riagent（invitrigen，美国）；逆转录试剂盒（First Strand cDNA Synthesis Kit，thermo 美国），Realtime PCR 仪（BIO-RAD 美国）；流式细胞仪（Beckman Coulter，美国）；Caspase-3 活性试剂盒（Beyotime，中国）。

1.2 BMSCs 的分离和培养

清洁级 4 周龄 SD 大鼠 4 只，体重 100±10g。由第二军医大学动物实验中心提供，用 CO_2 窒息处死大鼠，置于 75%乙醇中 10min，于无菌条件下手术取出双侧股骨和胫骨，仔细去除附着的肌肉、肌腱和骨膜等纤维结缔组织，眼科剪分别剪除两端骨骺，用 20ml 注射器吸取 DMEM 培养液从长骨一端冲洗骨髓腔，将骨髓腔中的细胞冲至培养皿中，反复几次，直至骨髓腔变白，离心后以完全培养基（含 10% FBS 的 DMEM 培养基）重悬，收集细胞悬液，接种于培养瓶中。于 37℃、体积分数 5% CO_2、饱和湿度孵育箱中培养。24h 后换液，每 3d 传代一次，取第 3 代细胞进行鉴定后备用。

1.3 NPCs 的分离和培养

将 2 只体重 220g 左右的健康 SD 大鼠采用颈椎脱臼法处死，75%乙醇浸泡 10min，转入超净台内，在无菌条件下取下胸腰段脊柱，彻底清除脊

柱周围肌肉组织,暴露脊柱之间的椎间盘组织,用无菌尖刀片小心划开纤维环,取出白色胶冻样髓核组织,用 PBS 反复漂洗,洗去污物及血渍,将髓核组织用眼科剪剪成约 1mm^3 的小碎块,移入离心管中,加 0.25%胰蛋白酶在 37℃恒温振荡器中振荡消化 30min,1000r/min 离心 5min,弃上清,用 PBS 漂洗 2 次,每次 1000r/min 离心 5min,弃离心液,用 2mg/ml Ⅱ型胶原酶重悬离心碎块组织后在 37℃恒温振荡器中振荡消化 3h,每 15min 摇动一次,1000r/min 离心 5min,弃上清,用 PBS 漂洗 2 次,每次 1000r/min 离心 5min,弃离心液,留取下层沉淀物,加入含 20%FBS 的 DMEM 培养基 7ml 吹打重悬细胞悬液,接种于培养瓶中,置于 37℃、5%CO_2、饱和湿度培养箱中培养,4~5d 后首次换液,去除漂浮在培养基中的组织块,以后每 3d 换液一次,细胞生长至瓶底 90%左右时传代,取第 3 代细胞进行实验。

1.4 共同培养模型的建立以及实验分组

取第 3 代 BMSCs 加入 Transwell 6 孔板上层插槽中,细胞数量为 1×10^6/孔,中间以孔隙 0.4μm 的聚碳酸酯透水膜分隔,使细胞不能通过,但 BMSCs 分泌的细胞因子可以通过半透膜。取第 3 代 NPCs 以相同的密度置于 6 孔板底部,分为 3 组:(1)对照组(A 组),在无血清培养基条件下培养 24h 后更换为完全培养基(含有 10%FBS 的 DMEM 培养基)24h。(2)炎性干预组(B 组),在无血清培养基条件下加入 IL-1β(20ng/ml)干预 24h 后更换为完全培养基 24h。(3)共培养组(C 组),在无血清培养基条件下加入 IL-1β(20ng/ml)干预 24h 后,更换含有完全培养基同时置入预先种入 BMSCs 细胞的 transwell 小室,共培养 24h。3 组实验都分为 2 个阶段,时间各 24h,置于 37℃、5%CO_2、饱和湿度培养箱中培养,对 3 组下层的 NPCs 同时进行相应检测。

1.5 细胞总 RNA 的提取和 Real-time PCR 的检测

将三组下层 NPCs 各加入 1ml Trizol 提取各组 NPCs 总 RNA,混匀后室温静置 5min,吹打分别装入 EP 管中,加入 200μl 的氯仿,上下混匀并置于室温 15min,吸取上层水相,加入 0.5ml 异丙醇混匀,室温放置 10min,离心后去除上清液体,用 1ml 75%的乙醇洗涤沉淀,悬浮后再次离心,弃上清,将沉淀物室温干燥 10min,溶于无 RNA 酶(Rnase)水中。取出 1μg RNA 按照 First Strand cDNA Synthesis Kit 将其逆转录为 cDNA,然后以 cDNA 为模板,进行 Real-time PCR 反应,检测Ⅰ型血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶-4(ADAMTS-4,基因编号:NM_023959.1)、ADAMTS-5(基因编号:NM_198761.1)、基质金属蛋白酶 13(MMP-13,基因编号:NM_133530.1)和 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH,基因编号 NM_017008.4)的表达情况。所用引物均由上海生工科技有限公司合成,序列见表 1。

1.6 流式细胞仪检测

取各组 NP 细胞,以不含乙二胺四乙酸(EDTA)的 0.25%胰蛋白酶消化分离细胞,收集消化所得的悬浮细胞,1000r/min 离心 5min,用 PBS 洗涤细胞 2 次。在细胞悬浮液中加入 5μl Annexin V-FITC 和 5μl PI,混匀后于 2℃~8℃避光孵育 15min,流式细胞仪检测 Annexin V、PI 双染后各组细胞。图像中右下象限细胞为 Annexin V 阳性、PI 阴性细胞,即凋亡早期细胞;右上象限细胞为 Annexin V 阳性、PI 阳性细胞,即凋亡晚期细胞。

1.7 Caspase-3 活性检测

根据 Beyotime 提供的 Caspase-3 活性检测试剂盒说明书进行。用胰酶消化各组贴壁的 NPCs,并收集至备用的细胞培养液中,600g、4℃离心 5min 收集细胞。同前吸尽上清后,按照每 200 万细胞加入 100μl 裂解液的比例加入裂解液,重悬沉淀,冰浴裂解 15min。4℃、16000~20000g 离心 10~15min。通过加入显色底物 Ac-DEVD-pNA(2mM)后混匀为 100μl 的反应体系,注意避免在混匀时产生气泡。37℃孵育 60~120min。通过分光光度仪检测样品在 405nm 波长下的吸光度(A405),扣除空白对照的 A405 即为样品中

表 1 RT-PCR 中目的基因的引物序列

Table 1 Primer sequences used for RT-PCR

基因 Gene	引物名称 Primer name	引物序列 Sequence(5′-3′)
GAPDH	GAPDH-F	CCATCAACGACCCCTTCATT
	GAPDH-R	ATTCTCAGCCTTGACTGTGC
ADAMTS-4	ADAMTS-F	ACAATGGCTATGGACACTGCCTCT
	ADAMTS-R	TGTGGACAATGGCTTGAGTCAGGA
ADAMTS-5	ADAMTS-F	GTCCAAATGCACTTCAGCCACGAT
	ADAMTS-R	AATGTCAAGTTGCACTGCTGGGTG
MMP-13	MMP-13-F	CCCTGGAGCCCTGATGTTT
	MMP-13-R	CTCTGGTGTTTTGGGGTGCT

Caspase-3 催化产生的 pNA 的吸光度。通过标准曲线计算出样品中 pNA 含量，比较两组样品中 Caspase-3 活性。

1.8 统计学分析

所有实验都重复 3 次(n=3)，所有实验数据都以 $\bar{x}\pm s$ 表达，所有数据使用 Graph Pad 5.00 软件进行分析。t 检验分析组间差异性，P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BMSCs 纯度鉴定

BMSCs 传至第 3 代通过流式细胞仪检测 CD29、CD31、CD45、CD90 位点，结果显示 90%以上的 BMSCs 表现为 CD29、CD90 阳性，小于 5%的 BMSCs 的 CD31 及 CD45 阳性(图 1)。说明细胞纯度较好。

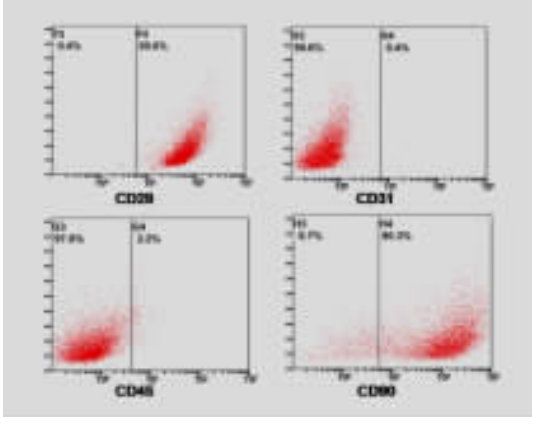

图 1 流式细胞仪分选鉴定结果显示培养的第 3 代 BMSCs 中 CD29 和 CD90 阳性率为大于 90%，CD31 及 CD45 阳性率小于 5%

Figure 1 The identification of isolated BMSCs. More than 90% of the BMSCs were positive for CD29 and CD90, whereas less than 5% of the BMSCs were positive for CD31 and CD45

2.2 NPCs 中退变基因的表达

3 组 NPCs 中退变基因的表达见表 2。与 A 组比较，B、C 组 NPCs 中的 ADAMTS-4、ADAMTS-5、MMP-13 表达均显著性升高，差异有统计学意义(P<0.05)；与 B 组比较，C 组各项退变基因表达量均显著降低，差异有统计学意义(P<0.05)。

2.3 NPCs 凋亡情况

A、B、C 组的 NPCs 凋亡比例分别为 4.2±2.2、17.1±3.7、10.5±2.4。与 A 组相比，B、C 组 NPCs 凋亡明显增加，差异均有统计学意义(P<0.05)；与 B 组比较，C 组 NPCs 凋亡明显下降，差异有统计学意义(P<0.05)。

2.4 NPCs 中 Caspase-3 活性表达

A 组 Caspase-3 活性为 1.20±0.18，B 组为 5.92±0.93，C 组为 2.33±0.52。B、C 组与 A 组比较明显升高，差异有统计学意义(P<0.05)；B 组与 C

表 2 3 组髓核细胞中退变相关基因相对表达量(n=3, $\bar{x}\pm s$)

Table 2 Relative degenerative genes expression of NP cells in 3 groups

	对照组 Group A	B组 Group B	C组 Group C
解聚蛋白样金属蛋白酶-4 ADAMTS-4	0.98±0.19	5.23±0.25①	2.31±0.26①②
解聚蛋白样金属蛋白酶-5 ADAMTS-5	1.10±0.08	6.92±2.33①	3.33±1.52①②
基质金属蛋白酶-13 MMP-13	1.21±0.24	23.39±0.09①	12.68±0.11①②

注：①与 A 组比较，P<0.05，②与 B 组比较，P<0.05

Note: ①Compared with group A, P<0.05; ②Compared with group B, P<0.05

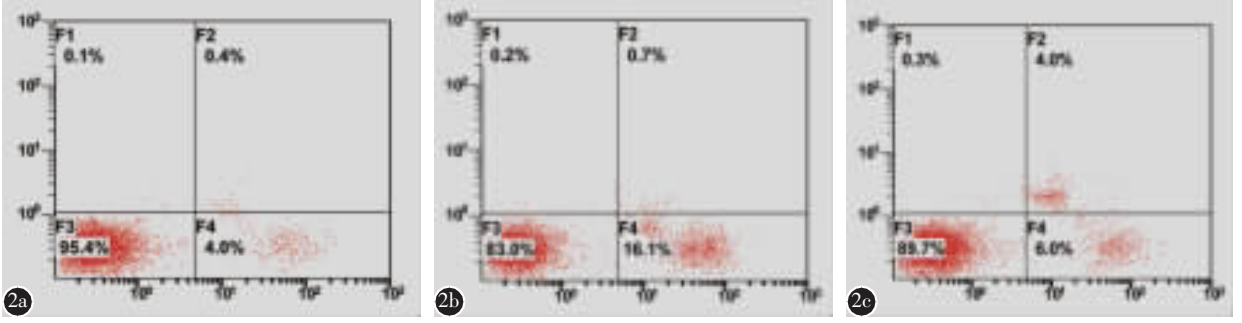

图 2 3 组中髓核细胞(NPCs)的凋亡情况 **a** A 组 NPCs 的凋亡发生率 **b** B 组 NPCs 的凋亡发生率 **c** C 组 NPCs 的凋亡发生率

Figure 2 **a** The apoptotic incidence of NP cells in group A **b** The apoptotic incidence of NP cells in group B **c** The apoptotic incidence of NP cells in group C

组比较活性明显下降，差异有统计学意义（$P<0.05$）。

3 讨论

3.1 干细胞的旁分泌营养作用

在大体实验中，干细胞治疗椎间盘退行性病变表现出积极作用的机制主要在于：(1)直接填补作用。MSCs 在椎间盘环境下，可被诱导分化出 NPCs 的表型，成为类 NPCs，弥补由于细胞数量减少所导致的细胞外基质维持不足，特别是对于椎间盘高度的保持具有重要意义[14]。(2)旁分泌作用。MSCs 可以通过分泌营养因子调节区域的微环境，其通过分泌细胞因子，如肝细胞生长因子(HGF)、血管内皮生长因子(VEGF)、角化细胞生长因子(KGF)、纤维母细胞生长因子 (FGF)、血管生成素-1(Ang-1)等，表达活化增殖、抗炎、抗凋亡的作用[15]。(3)增强细胞作用。在体外实验中 MSCs 对 NPCs 的积极作用已被证实，与 MSCs 共培养后，退变的 NPCs 外基质的升高[16]。

在目前的干细胞治疗椎间盘退行性病变的研究中，大多数的研究往往关注种子细胞即干细胞向 NPCs 的分化，以及在椎间盘中干细胞与相关的生物材料形成的组织工程复合体对于干细胞分化能力的影响。而干细胞通过旁分泌作用对于椎间盘微环境的营养及修复研究较少。在目前组织工程治疗椎间盘退变中，干细胞形成的组织工程复合体多数是通过注射移植入脊柱退变的椎间盘中，大部分退变的 NPCs、纤维环、终板软骨都处于干细胞难以接触的位置。研究干细胞通过旁分泌作用对于椎间盘的微环境的营养作用尤为重要。

3.2 本研究的特点

本研究结果显，BMSCs 在体外与 NPCs 非接触共培养能够抑制退变相关基因的表达，降低 IL-1β 诱导的 NPCs 凋亡和 Caspase-3 活性，说明 BMSCs 通过旁分泌的途径分泌细胞因子，可以达到较好的抗炎性所致椎间盘细胞退变及凋亡的效果。在本研究中，首先采用 IL-1β 诱导 NPCs 产生炎性反应，用 20ng/ml 在无血清培养基中刺激 NPCs 24h[7,17,18]，建立椎间盘退变后 BMSCs 的干预模型，与对照组比较，IL-1β 干预组 NPCs 退变相关基因表达明显上升，如 ADAMTS-4/5、MMP-13，这些都是椎间盘退行性病变中经典的退变指标，可以水解糖胺聚糖，Ⅱ型胶原等细胞外基质，加速椎间盘退变。与对照组比较，B 组细胞凋亡比例明显升高，说明体外模型中炎性因子诱导退变及凋亡模型可行性强。有文献报道含 FBS 的完全培养基可以抑制炎性因子的效果[7]，对实验结果产生干扰。我们在前 24h 的炎性干预阶段选用的是无血清的培养基，虽然无血清培养基对于 NPCs 同样有导致凋亡的作用，但 B 组与对照组差异明显，说明第一阶段的血清剥夺对于细胞凋亡的影响可以忽略。使用 0.4μm 孔径 transwell 小室将两种细胞隔离，在模拟体内炎症刺激后间充干细胞治疗的过程中，Transwell 小室 0.4μm 的孔径保证仅细胞分泌因子可轻易透过而间充质干细胞不能通过变形运动实现迁移[19]，与 B 组比较，C 组的退变及凋亡指标得到抑制，说明共培养模型可以较好地模仿体内的干细胞修复过程。相比体内过程，该模型可独立研究间充质干细胞的旁分泌作用对 NPCs 的影响。其优势在于可以很好地实现两种细胞的分离及共培养，模拟先干预后治疗的干细胞治疗过程，从而可以有针对性地研究在此条件下 NPCs 的变化，以及 BMSCs 的治疗作用等。

3.3 旁分泌作用抗炎抗凋亡的可能机制

本研究结果显示，MSCs 可通过旁分泌作用对 IL-1β 损伤后 NPCs 产生抗炎性反应抗凋亡作用。在其他研究领域中，也有文献有报道 MSCs 的相关抗炎抗凋亡能力以及机制。Yagi 等[20]报道通过 BMSCs 共培养的炎性培养基，可以降低核因子活化 B 细胞 κ 轻链增强子(NFκB)的活性，从而控制一系列炎症反应；Danchuk 等[21]报道 BMSCs 在脂多糖(LPS)诱导的急性肺损伤模型中可以分泌较高浓度的肿瘤坏死因子(TNF)-α-诱导蛋白-6，该成分也被认为具有较强的抗炎能力。还有研究显示，MSCs 可分泌转化生长因子(TGF-β)和前列腺素 E2(prostaglandin E2)，也具有下调 LPS 活性及抑制炎性功能[15,22,23]。Kuwana 等[24]报道在体外及体内都有 MSCs 或者 MSC-培养基可以使 Akt 信号通路活性明显上升，而 Akt 可以通过磷酸化 BLC 相关的细胞死亡的启动子 (phos phorylate the BLC-associated cell death promoter)，来实现抗凋亡的效果。Garcia-Fernandez 等[25]报道 MSCs 通过旁分泌可以分泌大量保护性因子，各种因子有抗氧化及活化 Akt 信号通路等能力，从而发挥抗凋亡作用。

本实验通过使用炎性因子 IL-1β 模拟椎间

盘退行性病变中的细胞损伤,运用 Transwell 插入式培养皿建立 BMSCs 与 NPCs 共同培养的模型,模拟椎间盘退行性病变后 MSCs 的修复过程,结果证实,BMSCs 可通过旁分泌效应有效降低炎性刺激后的 NPCs 的炎性反应程度和凋亡比例。本研究建立的体外模型一定程度上模拟了大体中 BMSCs 通过旁分泌抗炎抗凋亡现象,为研究 BMSCs 的治疗作用机制提供了更简单、精确的途径。

4 参考文献

1. Waddell G. Low back pain: a twentieth century health care enigma[J]. Spine, 1996, 21(24): 2820–2825.
2. Ariga K, Miyamoto S, Nakase T, et al. The relationship between apoptosis of endplate chondrocytes and aging and degeneration of the intervertebral disc[J]. Spine, 2001, 26(22): 2414–2420.
3. Lotz JC, Colliou OK, Chin JR, et al. Compression–induced degeneration of the intervertebral disc: an in vivo mouse model and finite–element study[J]. Spine, 1998, 23(23): 2493–2506.
4. Yamada K, Sudo H, Iwasaki K, et al. Caspase 3 silencing inhibits biomechanical overload –induced intervertebral disk degeneration[J]. Am J Pathol, 2014, 184(3): 753–764.
5. Roberts S, Caterson B, Menage J, et al. Matrix metalloproteinases and aggrecanase: their role in disorders of the human intervertebral disc[J]. Spine. 2000, 25(23): 3005–3013.
6. Zhang CC, Zhou JS, Hu JG, et al. Effects of IGF–1 on IL–1beta –induced apoptosis in rabbit nucleus pulposus cells in vitro[J]. Mol Med Rep, 2013, 7(2): 441–444.
7. Zhao CQ, Liu D, Li H, et al. Interleukin–1beta enhances the effect of serum deprivation on rat annular cell apoptosis [J]. Apoptosis, 2007, 12(12): 2155–2161.
8. Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. The role of interleukin–1 in the pathogenesis of human intervertebral disc degeneration[J]. Arthritis Res Ther, 2005, 7(4): R732–745.
9. Takahashi H, Suguro T, Okazima Y, et al. Inflammatory cytokines in the herniated disc of the lumbar spine [J]. Spine, 1996, 21(2): 218–224.
10. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411): 143–147.
11. Sakai D, Mochida J, Yamamoto Y, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells embedded in atelocollagen gel to the intervertebral disc: a potential therapeutic model for disc degeneration[J]. Biomaterials, 2003, 24(20): 3531–3541.
12. Hiyama A, Mochida J, Iwashina T, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells in a canine disc degeneration model [J]. J Orthop Res, 2008, 26(5): 589–600.
13. Crevensten G, Walsh AJ, Ananthakrishnan D, et al. Intervertebral disc cell therapy for regeneration: mesenchymal stem cell implantation in rat intervertebral discs [J]. Ann Biomed Eng, 2004, 32(3): 430–434.
14. Richardson SM, Walker RV, Parker S, et al. Intervertebral disc cell–mediated mesenchymal stem cell differentiation [J]. Stem Cells, 2006, 24(3): 707–716.
15. Ulivi V, Tasso R, Cancedda R, et al. Mesenchymal stem cell paracrine activity is modulated by platelet lysate: induction of an inflammatory response and secretion of factors maintaining macrophages in a proinflammatory phenotype [J]. Stem Cells Dev, 2014, 23(16): 1858–1869.
16. Strassburg S, Richardson SM, Freemont AJ, et al. Co–culture induces mesenchymal stem cell differentiation and modulation of the degenerate human nucleus pulposus cell phenotype[J]. Regen Med, 2010, 5(5): 701–711.
17. Tian Y, Yuan W, Fujita N, et al. Inflammatory cytokines associated with degenerative disc disease control aggrecanase–1 (ADAMTS–4) expression in nucleus pulposus cells through MAPK and NF–kappaB[J]. Am J Pathol, 2013, 182 (6): 2310–2321.
18. Smith LJ, Chiaro JA, Nerurkar NL, et al. Nucleus pulposus cells synthesize a functional extracellular matrix and respond to inflammatory cytokine challenge following long –term agarose culture[J]. Eur Cell Mater, 2011, 22: 291–301.
19. Yang SH, Wu CC, Shih TT, et al. In vitro study on interaction between human nucleus pulposus cells and mesenchymal stem cells through paracrine stimulation[J]. Spine, 2008, 33(18): 1951–1957.
20. Yagi H, Soto–Gutierrez A, Navarro–Alvarez N, et al. Reactive bone marrow stromal cells attenuate systemic inflammation via sTNFR1[J]. Mol Ther, 2010, 18(10): 1857–1864.
21. Danchuk S, Ylostalo JH, Hossain F, et al. Human multipotent stromal cells attenuate lipopolysaccharide–induced acute lung injury in mice via secretion of tumor necrosis factor–alpha–induced protein 6[J]. Stem Cells Dev, 2011, 2(3): 27.
22. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses[J]. Blood, 2005, 105(4): 1815–1822.
23. Groh ME, Maitra B, Szekely E, et al. Human mesenchymal stem cells require monocyte–mediated activation to suppress alloreactive T cells[J]. Exp Hematol, 2005, 33(8): 928–934.
24. Kuwana H, Terada Y, Kobayashi T, et al. The phosphoinositide–3 kinase gamma–Akt pathway mediates renal tubular injury in cisplatin nephrotoxicity[J]. Kidney Int, 2008, 73(4): 430–445.
25. Garcia–Fernandez M, Delgado G, Puche JE, et al. Low doses of insulin –like growth factor I improve insulin resistance, lipid metabolism, and oxidative damage in aging rats [J]. Endocrinology, 2008, 149(5): 2433–2442.

(收稿日期:2014–11–28 末次修回日期:2015–03–12)

(英文编审 蒋 欣/贾丹彤)

(本文编辑 卢庆霞)