

不同胶原支架对髓核间充质干细胞分化的影响

王 瑾^{1,2}, 陈其昕¹, 陶轶卿¹, 李方财¹

(1 浙江大学医学院附属第二医院骨科 310009 浙江省杭州市; 2 浙江省立同德医院骨科 310009 浙江省杭州市)

【摘要】目的:比较不同胶原支架中髓核间充质干细胞(NPMSCs)的细胞存活、增殖能力和分化相关基因及蛋白表达等方面的差异。**方法:**在体外构建 I 型、I/II 型混合和 II 型胶原支架,观察其显微结构、孔隙率及降解特性。从健康雄性大鼠尾椎提取 NPMSCs,分别采用细胞微球、I 型胶原、I/II 型混合胶原、II 型胶原支架培养,其中细胞微球作为对照。通过乳酸脱氢酶(LDH)检测材料生物毒性,CCK-8 测定细胞增殖,实时定量 PCR 和 Western Blot 测定 SOX9、聚集蛋白聚糖、I 型胶原和 II 型胶原的基因和蛋白表达水平,阿尔新蓝组织学染色检测硫酸蛋白聚糖的表达。**结果:**I 型、I/II 型混合和 II 型胶原支架孔隙率均为 90%以上,构建 21d 后的降解率分别为(10.30±0.66)%、(9.87±0.71)%和(10.40±0.53)%。培养后 7d 细胞 LDH 检测结果 I 型、I/II 型混合和 II 型胶原支架组分别为 12.24±0.65、12.13±1.03、12.67±1.15,与对照组 12.50±1.32 比较无显著性差异($P>0.05$)。胶原支架中培养 5d 及 7d 的细胞 CCK-8 检测结果(I 型胶原组为 0.67±0.04、1.20±0.05, I/II 型混合胶原组为 0.62±0.05、1.20±0.07, II 型胶原组为 0.69±0.02、1.34±0.04)明显高于对照组(0.53±0.03、1.02±0.02)($P<0.05$)。培养 21d 后,三种胶原支架组与对照组比较,SOX9、I 型胶原、II 型胶原及聚集蛋白聚糖的基因表达均显著上升($P<0.05$),其中 II 型胶原支架组上述基因表达量最高,与 I 型及 I/II 型混合胶原支架组有显著性差异($P<0.05$);与对照组比较, I 型胶原支架组中仅 I 型胶原及聚集蛋白聚糖的蛋白表达上升($P<0.05$); I/II 型混合及 II 型胶原支架组中 SOX9、I 型胶原、II 型胶原及聚集蛋白聚糖的蛋白表达有显著上升($P<0.05$),其中 II 型胶原支架组上述蛋白表达量最高,且与 I 型及 I/II 型混合胶原支架组有显著性差异($P<0.05$)。阿尔新蓝组织学染色检测硫酸蛋白聚糖在 II 型胶原支架组表达明显高于其余各组。**结论:**I 型胶原、I/II 型混合胶原、II 型胶原支架均促进 NPMSC 的分化,而 II 型胶原支架促进 NPMSC 成髓核细胞分化作用尤为显著。II 型胶原是髓核组织工程学的理想生物支架材料。

【关键词】椎间盘;髓核组织工程学;II 型胶原;细胞分化

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2015.06.11

中图分类号:R318.17 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2015)-06-0541-08

Effect of different type of collagen scaffold for nucleus pulposusmesenchymal stem cell differentiation/
WANG Jin, CHEN Qixin, TAO Yiqing, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2015, 25(6):
541-548

【Abstract】Objectives: To investigate the cell viability, proliferation and differentiation-related gene and protein expression of nucleus pulposus mesenchymal stem cells(NPMSCs) in different types of collagen scaffolds. **Methods:** Type I, type I/II and type II collagen scaffolds were formed in vitro, and microstructure, porosity and degradability were detected. NPMSCs isolated from coccygeal vertebra of healthy male rats were cultured as micromass or in type I collagen (COL-I), type I/II collagen (COL-I/II), type II collagen scaffold(COL-II), and micromass served as control. Cytotoxicity and cell proliferation were detected by lactate dehydrogenase (LDH) and CCK-8 methods respectively. Differentiation related gene and protein expressions were examined by real-time quantitative PCR and western Blotting respectively, including SOX9, aggrecan, type I collagen and type II collagen. Alcian blue staining was used to investigate sulfate proteoglycan expression. **Results:** The porosity of each of collagen scaffolds was measured by more than 90%, and the degradability of COL-I, COL-I/II and COL-II was detected as (10.30±0.66)%, (9.87±0.71)%, (10.40±

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81171756,81472114)

第一作者简介:男(1990-),医师,硕士,研究方向:脊柱外科

电话:(0571)87783515 E-mail:21318405@zju.edu.cn

通讯作者:李方财 E-mail:leerich@sohu.com

0.53)% respectively in 21d. Collagen scaffolds showed great biocompatibility. There was no difference of LDH among groups at the 7th day(12.24±0.65, 12.13±1.03, 12.67±1.15 and 12.50±1.32, $P>0.05$). Collagen scaffolds enhanced proliferation of NPMSC after 5d and 7d culture (COL-I 0.67±0.04, 1.20±0.05; COL-I/II 0.62±0.05, 1.20±0.07; COL-II 0.69±0.02, 1.34±0.04) were much higher than those of control group(CTL 0.53±0.03, 1.02±0.02, $P<0.05$). After 21d culture, the mRNA expressions of SOX9, type I collagen, type II collagen and aggrecan were increased significantly in collagen scaffold groups compared to control group. Among those, COL-II group was the highest one and there was significant differences compared to the other groups ($P<0.05$). Moreover, the expression of protein in COL-I group was up-regulated in type I collagen and aggrecan. SOX9, type I collagen, type II collagen and aggrecan were up-regulated in COL-I/II and COL-II group, compared to control group, COL-II had the highest protein expression. Alcian blue staining also showed that sulfate proteoglycan synthesis was up-regulated in COL-II group. **Conclusions:** All of type I, type I/II and type II collagen scaffolds can promote NPMSCs' differentiation towards nucleus pulposus cell type, and the effect of type II collagen scaffolds is most significant. Type II collagen is the ideal biological material for nucleus pulposus tissue engineering.

[Key words] Intervertebral disc; Nucleus pulposus tissue engineering; Type II collagen; Differentiation

[Author's address] Department of Orthopedics, 2nd Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou, 310009, China

随着社会老龄化的加剧,椎间盘退行性疾病已造成了愈见严重的医疗及经济负担^[1]。既往研究认为髓核退变是椎间盘退变的早期表现及可能的始动因素之一^[2]。髓核细胞外基质成分作为潜在的组织工程学材料,其生物学特性逐渐受到关注和研究^[3-7]。II型胶原作为健康髓核组织的主要细胞外基质成分,是维持髓核正常生理功能、构成髓核微环境的重要功能蛋白^[8,9]。既往研究发现在椎间盘各结构中都存在间充质干细胞^[10-13]。其中,髓核间充质干细胞(nucleus pulposus mesenchymal stem cells, NPMSCs)表现为多分化潜能,但其表达的髓核细胞分化及功能相关蛋白 SOX9、II型胶原和聚集蛋白聚糖等与正常髓核细胞仍有较大差距,且没有在髓核退变的过程中发挥生物学修复作用。本研究中,我们通过对I型胶原、I/II型混合胶原以及II型胶原支架的生物毒性及其中培养的NPMSCs表达的SOX9、胶原和聚集蛋白聚糖等基因和蛋白进行比较,探讨I型和II型胶原对NPMSCs分化的影响及II型胶原作为髓核组织工程学支架材料的优劣。

1 材料和方法

1.1 主要材料与试剂

鸡胸软骨II型胶原,II型胶原酶,胎牛血清,DMEM低糖培养基,青霉素-链霉素,谷氨酰胺,乙酸,氢氧化钠,磷酸盐缓冲液(PBS),阿尔新蓝(Sigma-Aldrich公司)。鼠尾I型胶原(杭州生友

生物技术有限公司)。CCK-8试剂盒(日本同仁化学)。羟基脯氨酸及乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒(南京建成生物工程有限公司)。RNAiso,cDNA合成试剂盒,SYBR green PCR试剂盒(TAKARA公司)。实时定量PCR引物(上海生工生物有限公司)。BCA蛋白定量试剂盒和增强化学发光检测试剂(Pierce公司)。聚乙烯二氟化物(PVDF)膜(Millipore公司)。一抗(抗SOX9、抗I型胶原、抗II型胶原、抗聚集蛋白聚糖、抗 β -actin抗体)和二抗(羊抗鼠IgG-HRP,羊抗兔IgG-HRP)(Santa Cruz公司)。

1.2 细胞培养

根据前期研究使用的方法^[14],从12只雄性Sprague Dawley大鼠(200~250克,6周龄)尾椎间盘组织中分离提取NPMSCs。将大鼠麻醉处死后,所有髓核经显微分离后用PBS冲洗2遍,用0.2%II型胶原酶,37℃恒温摇床(50RPM)中消化2h。使用含10%胎牛血清的DMEM低糖培养基终止消化,600倍重力加速度(600g)离心,获得的所有细胞用DMEM低糖培养基(10%胎牛血清,1%青霉素-链霉素和1%谷氨酰胺)均匀重悬,培养24h后,更换培养液,去除悬浮的细胞以及组织碎片。传代培养使用DMEM低糖培养基(10%胎牛血清,1%青霉素-链霉素和1%谷氨酰胺),并置于37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱中,第3代细胞用于后续实验。

1.3 胶原三维支架的构建

鼠尾 I 型胶原和鸡胸软骨 II 型胶原分别溶于乙酸溶液(0.006M, 0.06M), 终浓度 5mg/ml。含细胞的三维胶原支架制备^[14]: 将 60% (v/v, 体积比) 的胶原加到 3.6%NaOH 中 (I 型胶原使用 0.1M NaOH, II 型胶原使用 1M NaOH), 加入 6.4% 10 倍浓缩的 PBS(10×PBS), 充分混匀; 后加入 30% (v/v) 的细胞悬液, 充分混合后加入 48 孔板, 每孔 300μl (细胞浓度 1×10^4 /ml)。100μl 胶原加入 96 孔板用于细胞增殖测定。将 48 (或 96) 孔板置于 37℃、5%CO₂ 饱和湿度的培养箱中 1h, 待胶原支架稳定后加入 500μl (或 200μl) 培养基, 用于后续检测。以上述比例, 使用培养基代替细胞悬液, 制备不含细胞的三维胶原支架, 用于扫描电子显微镜观察及材料特性的检测。取 1×10^6 /ml 细胞悬液 300μl 于 15ml 离心管, 离心 400g 5min, 置于培养箱中, 形成细胞微球, 作为对照组 (细胞密度 1000/孔的 96 孔板用于细胞增殖测定的对照组)。实验组包括 I 型胶原组、I/II 型混合胶原组 (I:II=50%:50%) 及 II 型胶原组。培养基每 3d 更换一次。

1.4 胶原支架显微结构观察和孔隙率、降解速率的测定

1.4.1 不含细胞的三维胶原支架 使用戊二醛固定, 扫描电子显微镜 (S-3700N, 日立) 观察支架的微观结构。

1.4.2 孔隙率的测定 将胶原支架真空冷冻干燥后称重 (W_s); 将其浸入盛满乙醇, 质量为 W_1 的比重瓶中, 超声震荡, 使乙醇充分充盈于胶原支架孔隙中, 脱气, 加满乙醇并称重, 质量记为 W_2 ; 取出胶原支架后, 称量剩余乙醇与比重瓶质量, 记为 W_3 。孔隙率计算公式: $P = (W_2 - W_3 - W_s) / (W_1 - W_3) \times 100\%$ 。

1.4.3 降解速率测定 将胶原支架置于 PBS 中, 37℃恒温, 震荡, 分别在 7、14、21d 取样, 检测降解液中羟基脯氨酸含量, 以计算胶原支架的降解速率。

1.5 细胞增殖测定

细胞增殖用 CCK-8 进行测定。96 孔板培养的细胞于培养后 1、3、5、7d 加入 10% CCK-8 溶液 100μl, 37℃、5%CO₂ 孵育 2h, 提取 80μl 上清于空白 96 孔板, 排除胶原支架对吸光度值的测定干扰。通过酶标仪 (Bio-Rad) 测量 450nm 吸光度值。

1.6 细胞毒性试验

用 NPMSCs 释放在细胞培养基中的 LDH 作为细胞毒性和细胞破坏的标准标记物。用 LDH 释放试验检测评估三维支架潜在细胞毒性作用。将胶原支架中细胞培养 1、3、7d 的培养基转移到 15ml 离心管, 根据操作说明进行细胞毒性测定, 通过酶标仪测量 450nm 吸光度值。

1.7 分化相关基因的检测

细胞在胶原中或形成微球后培养 21d 进行基因检测。使用 RNAiso 提取细胞总 RNA。总 RNA (<1000ng) 在 20μl 体系利用 cDNA 合成试剂盒进行逆转录合成 cDNA, 获得的 cDNA 用焦碳酸二乙酯 (diethylpyrocarbonate, DEPC) 水 1:10 比例稀释储存在 -20℃。实时定量 PCR 使用 SYBR green PCR 试剂盒进行检测。检测目的基因包括 SOX9、I 型胶原、II 型胶原、聚集蛋白聚糖, 18sRNA 作为内参。应用 AB StepOnePlus 实时定量 PCR 仪, 进行实时定量 PCR 检测。使用 $\Delta\Delta CT$ 法进行数据量化 $n = 2^{-(\Delta CT_{\text{目的基因}} - \Delta CT_{18S-RNA})}$ 。使用的引物如表 1 所示。

1.8 分化相关蛋白的检测

细胞在胶原中或形成微球后培养 21d 进行蛋白检测。从细胞中提取总蛋白, 使用 BCA 蛋白定量试剂盒进行浓度测定。用 10% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶进行蛋白电泳, 并将蛋白转移到聚乙二烯二氟化物 (PVDF) 膜。PVDF 膜用 5% 脱脂牛奶的 TBS-T 室温封闭 1h。然后用适当的一抗 (抗 SOX9、抗 I 型胶原、抗 II 型胶原、抗聚集蛋白聚糖抗体; 1:500), 以及作为内参的抗 β -actin 抗体 (Santa Cruz, 1:2000) 进行杂交, 4℃过夜。然后, PVDF 膜与二抗室温孵育 1h (羊抗鼠 IgG-HRP, 羊抗兔 IgG-HRP; 1:5000), 使用增强化学发光检测试剂检测免疫反应条带, 并进行胶

表 1 实时定量 PCR 检测所用的引物序列

Table 1 RT-PCR primers for indicated genes used in this work

基因 Gene	引物序列 (Primer sequence) (5' to 3')
SOX-9	正向 (Forward) AGGAAGCTGGCAGACCACTACC 反向 (Reverse) GGGTCTCTTCTCGCTCTCGTTCA
I 型胶原 Collagen-I	正向 (Forward) ACCTCCGGCTCTGCTCCTCTTA 反向 (Reverse) GACAGCACTCGCCCTCCGCTTTT
II 型胶原 Collagen-II	正向 (Forward) CTGCTGGAGCAGCAAGAGC 反向 (Reverse) GTGGACAGTAGACGGAGGAAAG
聚集蛋白聚糖 Aggrecan	正向 (Forward) CTAGCTGCTTAGCAGGGATAACG 反向 (Reverse) GATGACCCGCAGACTCACAAG
18sRNA	正向 (Forward) GAATTCACAGTAAGTGCGGGTCATA 反向 (Reverse) CGAGGGCCTCACTAAACCATC

片曝光。使用 Image J 测量阴影密度量化每个样品的相对水平。目标蛋白(SOX9, I 型胶原, II 型胶原, 聚集蛋白聚糖)的表达量用光密度(optical density, OD, 目标蛋白质)/OD(β -actin)表示。

1.9 硫酸蛋白聚糖染色检测

细胞微球及含细胞胶原培养 21d, 经多聚甲醛固定后, 行冰冻切片, 连续切片厚度 $5.0\mu\text{m}$ 。切片用 3% 醋酸洗涤 30s, 阿尔新蓝染液染色 30min, 3% 醋酸洗 30s, 流水冲洗, 二甲苯透明, 中性树胶封固, 观察细胞及细胞外基质中阿尔新蓝染色的程度与范围。

1.10 统计分析

数据分析使用 SPSS 16.0 软件, 所有数据均表示为平均值 $\pm$ 标准差。统计显著性检测, 各组均数比较使用 one-way Anova, 两两比较使用 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 胶原支架扫描电子显微镜观察、孔隙率及降解速率

胶原支架的微观形态见图 1。I 型胶原表现以反复折叠的片层结构为主(图 1a); II 型胶原表现为条索状结构(图 1c); I/II 型混合胶原与 II 型胶原相似, 而条索结构直径较大(图 1b)。I 型胶原支架的孔隙率为 $(92.67 \pm 1.53)\%$, I/II 型混合胶原支架为 $(93.00 \pm 1.61)\%$, II 型胶原支架为 $(93.67 \pm 2.17)\%$ 。三种胶原支架孔隙率均为 90% 以上, 完全可以满足组织工程支架的要求。3 种胶原支架的降解速率见表 2。在模拟条件下, 三种胶原降解速率无明显差异($P > 0.05$)。降解 21d, 三种胶原支架降解率为 10%, 基本满足了干细胞分化的

需求。

2.2 细胞增殖和细胞毒性

对照组、I 型胶原组、I/II 型混合胶原组和 II 型胶原组的细胞增殖情况见表 3。在培养后 1、3d, 实验组与对照组的 OD 值比较无显著性差异($P > 0.05$); 培养后 5、7d, 实验组 OD 值明显高于对照组($P < 0.05$)。此外, B 组和 C 组在 4 个时间点均无显著性差异($P > 0.05$); 而 D 组 OD 值在培养后 7d 显著高于其余实验组($P < 0.05$)。

4 组细胞的 LDH 测定结果见表 4。在培养后 1、3、7d, 实验组与对照组比较 LDH 的释放均无显著性差异($P > 0.05$), 表明 I 型和 II 型胶原支架均无明显的细胞毒性。

2.3 基因及蛋白表达分析

培养后 21d, 四组 NPMSCs 的 SOX9、I 型胶原、II 型胶原、聚集蛋白聚糖基因的相对表达量见表 5; 蛋白的表达情况见图 2, 相对表达量见表 6。与对照组相比, 3 种胶原支架组表达成髓核细胞分化的相关基因(SOX9、II 型胶原、聚集蛋白聚糖)均有上升($P < 0.05$)。在蛋白水平, I/II 型混合胶原组及 II 型胶原组 SOX9、II 型胶原、聚集蛋白聚糖的表达均有上升($P < 0.05$), I 型胶原组聚集蛋白聚糖的表达有所上升($P < 0.05$), 而 SOX9 和 II 型胶原的表达与对照组比较无显著性差异($P > 0.05$)。I/II 型混合胶原组与 I 型胶原组比较, 在基因水平 II 型胶原基因表达量上调($P < 0.05$), 而在蛋白水平仅 SOX9 蛋白表达上调($P < 0.05$), 其他检测指标均无显著性差异($P > 0.05$)。II 型胶原支架组与其他两种胶原支架组比较, SOX9、II 型胶原、聚集蛋白聚糖的表达增加更为显著($P < 0.05$)。3 个实验组 I 型胶原的基因及蛋白的表达

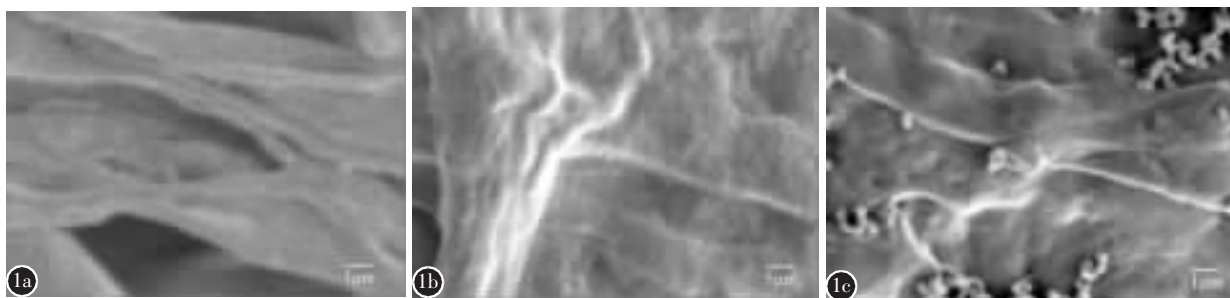


图 1 胶原支架的扫描电子显微镜图像($\times 2000$)(a I 型胶原支架 b I/II 型混合胶原支架 c II 型胶原支架); I 型胶原支架表现为反复折叠的片层状结构, I/II 型混合胶原与 II 型胶原表现为条索状结构

Figure 1 Scanning electron micrograph of scaffolds ($\times 2000$)(a COL-I b COL-I/II c COL-II). COL-I appeared folded lamellar structure, and COL-I/II and COL-II rope-like structure

表 2 各胶原支架不同时间点的降解率 ($n=3, \bar{x} \pm s$)**Table 2** Collagen scaffolds' degradability on 7d, 14d, and 21d of 3 groups

	I 型胶原 COL-I	I/II 型混合胶原 COL-I/II	II 型胶原 COL-II
7d	1.93±0.40	1.97±0.50	1.93±0.47
14d	7.27±0.71	7.10±0.95	6.80±0.70
21d	10.30±0.66	9.87±0.71	10.40±0.53

表 3 细胞在 I 型、I/II 型混合及 II 型胶原支架中培养不同时间的增殖情况 (OD 值, $n=6, \bar{x} \pm s$)**Table 3** Effect of collagen type I and collagen type II on cell proliferation on days 1, 3, 5 and 7. The error bars indicate the standard deviations of three independent assays(OD value)

	对照组 (CTL group)	I 型胶原组 (COL-I group)	I/II 型混合胶原组 (COL-I/II group)	II 型胶原组 (COL-II group)
1d	0.18±0.01	0.19±0.01	0.18±0.01	0.19±0.01
3d	0.26±0.01	0.27±0.01	0.27±0.01	0.28±0.01
5d	0.53±0.03	0.67±0.04 ^①	0.62±0.05 ^①	0.69±0.02 ^①
7d	1.02±0.02	1.20±0.05 ^①	1.20±0.07 ^①	1.34±0.04 ^{①②③}

注:①与对照组比较 $P<0.05$;②与 I 型胶原组比较 $P<0.05$;③与 I/II 型混合胶原组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared to CTL, $P<0.05$; ②Compared to COL-I, $P<0.05$; ③Compared to COL-I/II, $P<0.05$

表 4 4 组细胞的 LDH 检测结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)**Table 4** The result of LDH test from each group

	对照组 (CTL group)	I 型胶原组 (COL-I group)	I/II 型混合胶原组 (COL-I/II group)	II 型胶原组 (COL-II group)
1d	23.17±0.15	23.10±1.97	22.13±1.47	23.00±0.50
3d	12.50±1.80	12.83±0.76	12.80±0.35	12.65±0.97
7d	12.50±1.32	12.24±0.65	12.13±1.03	12.67±1.15

表 5 培养 21d 后 NPMSCs 基因的相对表达量($n=6, \bar{x} \pm s$)**Table 5** Relative gene expression of NPMSCs from each group on day 21

	对照组 CTL group	I 型胶原组 COL-I group	I/II 型混合胶原组 COL-I/II group	II 型胶原组 COL-II group
SOX9	1.00±0.07	1.08±0.02 ^①	1.11±0.04 ^①	2.89±0.99 ^{①②③}
I 型胶原 Collagen I	1.00±0.02	1.41±0.11 ^①	1.46±0.21 ^①	1.49±0.06 ^①
II 型胶原 Collagen II	1.00±0.04	1.71±0.12 ^①	2.48±0.02 ^{①②}	44.48±1.26 ^{①②③}
聚集蛋白聚糖 Aggrecan	1.00±0.02	2.01±0.06 ^①	1.99±0.22 ^①	2.45±0.29 ^{①②③}

注:SOX9、I 型胶原、II 型胶原和聚集蛋白聚糖的基因表达已经过内参 18S RNA 标准化,并设空白对照组为 1。①与对照组比较 $P<0.05$;②与 I 型胶原组比较 $P<0.05$;③与 I/II 型混合胶原组比较 $P<0.05$

Note: Expression of classic markers SOX9, collagen I, collagen II and aggrecan were normalized to 18sRNA and to control group.

①Compared to CTL, $P<0.05$; ②Compared to COL-I, $P<0.05$; ③Compared to COL-I/II, $P<0.05$

水平与对照组比较有所升高,但实验组之间 I 型胶原的表达并无显著性差异($P>0.05$)。

2.4 硫酸蛋白聚糖染色分析

对照组细胞外基质呈较浅的蓝色,细胞周边部分被阿尔新蓝染色,中心部分多呈未染状态;I 型胶原组和 I/II 型胶原组细胞外基质染色相对较深,细胞周围部分被深染;II 型胶原组细胞外基质染色最深,细胞周围部分强染(图 3)。

3 讨论

干细胞治疗和组织工程学的进展为椎间盘退行性疾病的治疗提供了新的思路。但既往研究结果显示,椎间盘干细胞治疗尚未取得理想的效果,现有的干细胞体内移植研究只能部分逆转或延缓椎间盘退变的进程^[16,17]。组织工程学中,支架材料是促进细胞粘附、增殖及可能作用于干细胞并诱导其分化的重要组分。我们的前期研究应用 PLGA 荷载脂肪干细胞治疗退变椎间盘取得了一定的效果^[18]。而 PLGA 等生物支架材料的降解导致髓核微环境进一步恶化是降低组织工程学疗效的可能原因之一^[19,20]。选择一种适用于髓核环境的生物支架材料可能是提高组织工程治疗椎间盘退行性病变疗效的有效方法。

II 型胶原是健康髓核富含的主要胶原成分,是行使髓核主要功能的关键蛋白之一。随着椎间盘退变的发生和发展,髓核中的 II 型胶原成分逐渐被 I 型胶原所取代。II 型胶原既往被用于包被 PLGA 等生物材料,修复软骨等组织损伤^[21]。本研究中,我们构建了单纯的 II 型胶原支架,并比较了 II 型胶原支架和 I 型胶原及混合胶原支架的生物学特性。

本研究通过 CCK-8 检测细胞增殖活性及 LDH 检测细胞毒性,表明胶原支架的三维结构能够促进 NPMSCs 增殖能力,且没有明显的细胞毒性作用,证实 I 型或 II 型胶原支架均具有良好的生物相容性。同时实时定量 PCR 和蛋白免疫印迹实验检测髓核细胞分化的相关功能基因及蛋白的表达,包括 SOX9、II 型胶原和聚集蛋白聚糖,结果表明胶原支架能上调上述基因及蛋白的表

达,而且 II 型胶原组的上调作用显著高于 I 型胶原组和 I / II 型胶原组。这一结果表明 II 型胶原支架能够有效促进 NPMSCs 髓核细胞分化。组织学染色结果同样证实了这一观点, II 型胶原组无论分泌于细胞外基质或细胞内合成的硫酸蛋白聚糖均明显高于其余实验组及对照组。相关研究证实,胶原和间充质干细胞表面整合素结合可能诱导间充质干细胞的分化,而 II 型胶原的配体整合素 $\alpha 10\beta 1$ 正是诱导成软骨分化的关键蛋白^[22-24]。

同时, II 型胶原促进髓核干细胞分化而 I 型胶原并没有明显的促分化功能,这一结论可能为椎间盘退行性疾病的非可逆性提供了合理的解释。人类的椎间盘退行性疾病及退变椎间盘模式动物均证实这一疾病不具有可逆性。我们以及其他的相关研究均证实了椎间盘各个结构中,包括终板、纤维环和髓核,都含有间充质干细胞^[10-13]。然而,这些干细胞并没有在椎间盘退变的过程中发挥生物学修复作用。本研究中,在含有 I 型胶原的实验组中,NPMSCs 表达髓核细胞分化相关的基因及蛋白(SOX9、II 型胶原和聚集蛋白聚糖)仅有部分提高,与 II 型胶原组相比有显著差距。而髓核退变过程的细胞外基质改变,正是 II 型胶原比例下降, I 型胶原比例上升。上述结果表明,髓核组织中 II 型胶原成分的含量可能对 NPMSCs 分化及其生物学修复功能有着重要的影响。

本研究尚有一些局限性:(1)混合胶原的比例没有设置梯度。本研究已初步证实了 II 型胶原促进 NPMSCs 分化的作用。而 I 型和 II 型胶原比例梯度的设置可能更好地证实髓核退变过程中 II 型胶原含量对干细胞修复的影响。(2)细胞因子等的

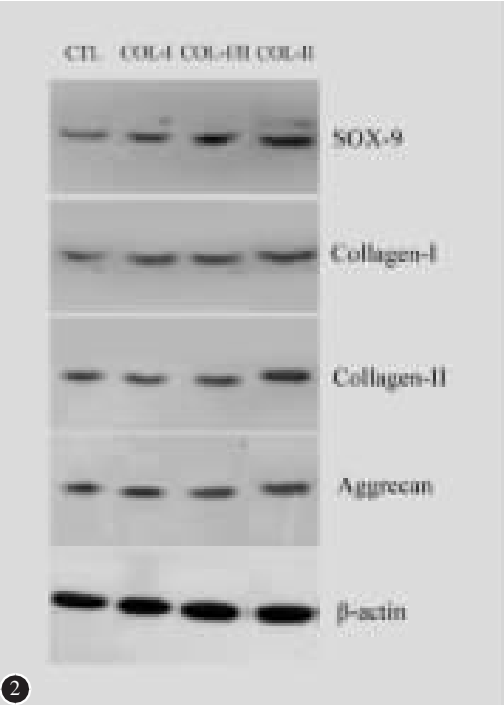


图 2 培养 21d 后 NPMSCs 的蛋白表达的免疫印迹结果
Figure 2 Protein expression of SOX-9, collagen II, aggrecan and β -actin from each group of NPMSCs on day 21

表 6 培养 21d 后 SOX9、I 型胶原、II 型胶原和聚集蛋白聚糖的蛋白表达 (n=6, $\bar{x} \pm s$)
Table 6 Densitometric data of western blotting in sox-9, collagen I, collagen II and aggrecan were normalized to β -actin and to the day 21 control group

	对照组 CTL group	I 型胶原组 COL- I group	I / II 型混合胶原组 COL- I / II group	II 型胶原组 COL- II group
SOX9	1.00±0.06	1.01±0.04	1.15±0.04 ^{①②}	1.76±0.05 ^{①②③}
I 型胶原 Collagen I	1.00±0.04	1.24±0.03 ^①	1.25±0.06 ^①	1.32±0.04 ^①
II 型胶原 Collagen II	1.00±0.05	1.00±0.03	1.02±0.07	1.59±0.07 ^{①②③}
聚集蛋白聚糖 Aggrecan	1.00±0.04	1.12±0.05 ^①	1.13±0.06 ^①	1.54±0.06 ^{①②③}

注:蛋白表达已经过内参 β -actin 标准化,并设空白对照组为 1。①与对照组比较 $P<0.05$,②与 I 型胶原组比较 $P<0.05$,③与 I / II 型混合胶原组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared to CTL, $P<0.05$; ②Compared to COL- I, $P<0.05$; ③Compared to COL- I / II, $P<0.05$

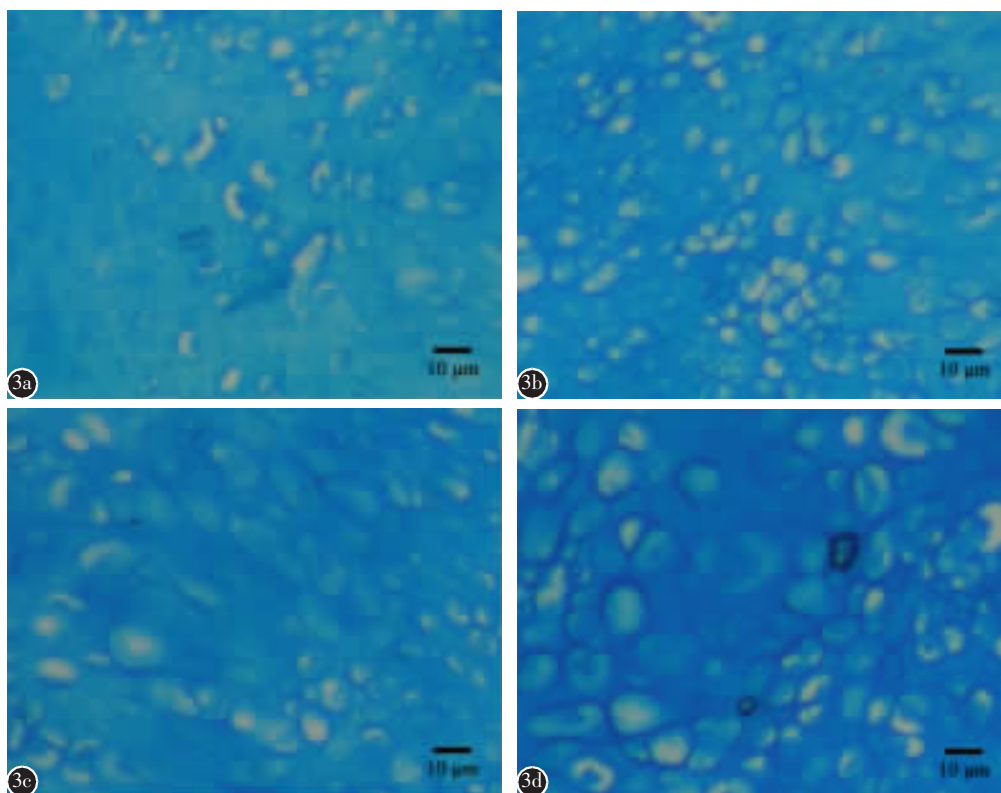


图3 细胞阿尔新蓝染色(×200)(a 对照组 b I型胶原支架组 c I/II型混合胶原支架组 d II型胶原支架组),其中II型胶原支架组细胞外基质染色最深

Figure 3 Alcian blue staining(×200) **a** Control **b** COL-I **c** COL-I/II **d** COL-II. Extracellular matrix was stained remarkably by alcian blue in COL-II group

影响。本研究为证实II型胶原的促分化作用,排除了生长因子的干扰。而在组织工程学修复的过程中,生长因子同样十分重要,我们将在后续的实验引入适当的生长因子,致力于提高髓核生物学修复效果。同样髓核退变的过程中细胞释放出众多炎症因子和生长因子等,这些细胞因子同样影响NPMSCs的迁移、增殖和分化等生物学功能,从而影响髓核的退变和修复^[25]。

综上所述,I型胶原、I/II型混合胶原、II型胶原支架均促进NPMSC的分化,而II型胶原支架促进NPMSC成髓核细胞分化作用尤为显著。II型胶原是髓核组织工程学的理想生物支架材料。

4 参考文献

1. Katz JN. Lumbar disc disorders and low-back pain: socioeconomic factors and consequences [J]. J Bone Joint Surg Am, 2006, 88 (2): 21-24.
2. Smith LJ, Nerurkar NL, Choi KS, et al. Degeneration and re-

generation of the intervertebral disc: lessons from development [J]. Dis Model Mech, 2011, 4(1): 31-41.

3. Kandel R, Roberts S, Urban JP. Tissue engineering and the intervertebral disc: the challenges[J]. Eur Spine J, 2008, 17 (4): 480-491.
4. Higuchi A, Ling QD, Hsu ST, et al. Biomimetic cell culture proteins as extracellular matrices for stem cell differentiation [J]. Chem Rev, 2012, 112(8): 4507-4540.
5. Cheng NC, Chang HH, Tu YK, et al. Efficient transfer of human adipose-derived stem cells by chitosan/gelatin blend films[J]. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2012, 100 (5): 1369-1377.
6. Jurgens WJ, Lu Z, Zandieh-Doulabi B, et al. Hyperosmolarity and hypoxia induce chondrogenesis of adipose-derived stem cells in a collagen type 2 hydrogel [J]. J Tissue Eng Regen Med, 2012, 6(7): 570-578.
7. Yuan M, Yeung CW, Li YY, et al. Effects of nucleus pulposus cell-derived acellular matrix on the differentiation of mesenchymal stem cells[J]. Biomaterials, 2013, 34(16): 3948-3961.
8. Bruehlmann SB, Rattner JB, Matyas JR, et al. Regional variations in the cellular matrix of the annulus fibrosus of the

- intervertebral disc[J]. *J Anat*, 2002, 201(2): 159–171.
9. Nerlich AG, Boos N, Wiest I, et al. Immunolocalization of major interstitial collagen types in human lumbar intervertebral discs of various ages[J]. *Virchows Arch*, 1998, 432(1): 67–76.
10. Erwin WM, Islam D, Eftekarpour E, et al. Intervertebral disc-derived stem cells: implications for regenerative medicine and neural repair[J]. *Spine*, 2013, 38(3): 211–216.
11. Tao YQ, Liang CZ, Li H, et al. Potential of co-culture of nucleus pulposus mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells in hyperosmotic microenvironment for intervertebral disc regeneration[J]. *Cell Biol Int*, 2013, 37(8): 826–834.
12. Liu LT, Huang B, Li CQ, et al. Characteristics of stem cells derived from the degenerated human intervertebral disc cartilage endplate[J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26285.
13. Chan SC, Gantenbein-Ritter B. Intervertebral disc regeneration or repair with biomaterials and stem cell therapy—feasible or fiction[J]. *Swiss Med Wkly*, 2012, 142: w13598.
14. Lu ZF, Doulabi BZ, Wuisman PI, et al. Influence of collagen type II and nucleus pulposus cells on aggregation and differentiation of adipose tissue-derived stem cells[J]. *J Cell Mol Med*, 2008, 12(6B): 2812–2822.
15. Hulmes DJ. Building collagen molecules, fibrils, and suprafibrillar structures[J]. *J Struct Biol*, 2002, 137(1–2): 2–10.
16. Richardson SM, Hoyland JA, Mobasheri 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.
17. Chen WH, Liu HY, Lo WC, et al. Intervertebral disc regeneration in an ex vivo culture system using mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma[J]. *Biomaterials*, 2009, 30(29): 5523–5533.
18. Liang CZ, Li H, Tao YQ, et al. Dual release of dexamethasone and TGF- β 3 from polymeric microspheres for stem cell matrix accumulation in a rat disc degeneration model[J]. *Acta Biomater*, 2013, 9(12): 9423–9433.
19. Hughes SP, Freemont AJ, Hukins DW, et al. 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.
20. Liu Y, Ghassemi AH, Hennink WE, et al. The microclimate pH in poly(D, L-lactide-co-hydroxymethyl glycolide) microspheres during biodegradation[J]. *Biomaterials*, 2012, 33(30): 7584–7593.
21. Hsu SH, Chang SH, Yen HJ, et al. Evaluation of biodegradable polyesters modified by type II collagen and Arg-Gly-Asp as tissue engineering scaffolding materials for cartilage regeneration[J]. *Artif Organs*, 2006, 30(1): 42–55.
22. Loeser RF, Sadiev S, Tan L, et al. Integrin expression by primary and immortalized human chondrocytes: evidence of a differential role for α 1 β 1 and α 2 β 1 integrins in mediating chondrocyte adhesion to types II and VI collagen[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2000, 8(2): 96–105.
23. Camper L, Hellman U, Lundgren-Akerlund E. Isolation, cloning, and sequence analysis of the integrin subunit α 10, a β 1-associated collagen binding integrin expressed on chondrocytes[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(32): 20383–20389.
24. Knudson W, Loeser RF. CD44 and integrin matrix receptors participate in cartilage homeostasis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2002, 59(1): 36–44.
25. Podichetty VK. The aging spine: the role of inflammatory mediators in intervertebral disc degeneration[J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2007, 53(5): 4–18.
- (收稿日期:2014-12-28 末次修回日期:2015-06-04)
(英文编审 郑国权/贾丹彤)
(本文编辑 李伟霞)