

基础研究

大鼠椎间盘巢源性干细胞的体外
分离、培养和特性鉴定

时 睿, 洪 鑫, 王运涛, 鲍军平, 王 锋, 蔡 峰, 康新桂, 吴小涛

(东南大学附属中大医院脊柱外科中心 210009 南京市)

【摘要】目的:对大鼠椎间盘干细胞巢来源的干细胞(ISN-SCs)进行体外分离、培养和特性鉴定。**方法:**以 10 周龄雄性 SD 大鼠作为研究对象,按照解剖区域分离椎间盘干细胞巢组织(骰板外周软骨膜部分),用 II 型胶原酶消化获取细胞后进行体外培养,选用第四代细胞进行干细胞相关特性的鉴定;采用流式细胞技术测定细胞周期;MTT 法测定增殖曲线;流式细胞技术检测干细胞相关表型;qPCR 检测干细胞相关基因的表达水平;细胞三系诱导分化培养后采用茜素红染色及钙钴染色检测成骨分化能力,阿利新蓝染色检测成软骨分化能力,油红 O 染色检测成脂肪分化能力,qPCR 检测多向分化相关基因的表达水平。**结果:**大鼠 ISN-SCs 呈成纤维样细胞,多触角,具有贴壁能力,是一种慢周期细胞,高表达干细胞相关阳性表面抗原分子 CD29、CD90、CD44,低表达干细胞相关阴性表面抗原分子 CD34、CD45、CD19、CD11b;成骨诱导分化后茜素红染色和钙钴染色均为阳性,成软骨分化后阿利新蓝染色阳性,成脂肪分化后油红 O 染色阳性,且各分化相关基因(成骨:Runx2、OPN、OCN;成软骨:SOX-9、COL2a1、ACAN;成脂肪:PPAR γ 、C/EBP α)表达水平较对照组显著增高,其与骨髓间充质干细胞(BMSCs)具有相似的干细胞相关基因(NANOG、SOX-2、OCT-4)表达水平。**结论:**ISN-SCs 具备干细胞的生物学特性,在体外经诱导后可以向软骨细胞及脂肪细胞转化,可为椎间盘的自体生物学修复研究提供良好的细胞来源。

【关键词】椎间盘;干细胞巢;间充质干细胞;细胞分化;细胞免疫表型

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2015.11.11

中图分类号:Q813.1 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2015)-11-1018-08

In vitro isolation, culture and characteristics identification of rat stem cells derived from potential stem cell niches of the intervertebral disc/SHI Rui, HONG Xin, WANG Yuntao, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2015, 25(11): 1018-1025

【Abstract】Objectives: To investigate the isolation, culture and identification of rat stem cells derived from potential stem cell niches of the intervertebral disc(ISN-SCs). **Methods:** Sprague Dawley rats(male, 10 weeks old) were used as the experimental animals in this study. Tissues of potential stem cell niches of the intervertebral disc (ISN) were separated from the anatomical regions (the perichondrium areas outside of the epiphyseal plate) before being digested by type II collagenase. After being harvested, the cells were cultured and expanded in vitro, and passage 4 populations were used for further analysis. The flow cytometry was used to detect the cell cycle and immunophenotypes of ISN-SCs. The MTT method was used to determine proliferation curve of the cells. qPCR analysis was used to determine the relative mRNA expression level of stem cell-related genes. After being cultured in the differentiation medium, the cells were stained by alizarin red and calcium cobalt for osteogenesis, alcian blue for chondrogenesis, and oil red O for adipogenesis. Also, the relative expression of multipotential differentiation-related genes were determined by qPCR. **Results:** Rat ISN-SCs were fibroblast-like cells with multi-tentacles forming vortexes partially. They were slow-cycling cells with the ability of adherence to plastic. Meanwhile, high expression levels of stem cell-related positive antigen molecules(CD29, CD90, CD44) and low expression levels of negative antigen molecules(CD34, CD45, CD19,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81272035)

第一作者简介:男(1986-),在读博士研究生,研究方向:脊柱外科基础与临床

电话:(025)83262331 E-mail:shiruisu@163.com

通讯作者:吴小涛 E-mail:wuxiaotao@medmail.com.cn

CD11b) were observed. Besides, positive results were detected in alizarin red and calcium cobalt staining for osteogenesis, alcian blue staining for chondrogenesis, and oil red O staining for adipogenesis. Also, the differentiation-related gene(osteogenesis: Runx2, OPN and OCN; chondrogenesis: SOX-9, COL2a1 and ACAN; adipogenesis: PPAR γ and C/EBP α) expression levels significantly increased in the corresponding induction group compared with the controls. Moreover, ISN-SCs expressed comparable stem cell-related genes(NANOG, SOX-2, OCT-4) with bone marrow mesenchymal stem cells(BMSCs). **Conclusions:** ISN-SCs belong to the MSC family and possess multipotent differentiation capacities. These findings will contribute to further studies on the migration of ISN-SCs into intervertebral disc (IVD) and its self-repair effect. Meanwhile, a new perspective on biological strategy for IVD self-regeneration is proposed.

【Key words】 Intervertebral disc; Stem cell niches; Mesenchymal stem cells; Cell differentiation; Cell immunophenotype

【Author's address】 Spine Surgery Center, Zhongda Hospital, Southeast University, Medical School of Southeast University, Nanjing, 210009, China

椎间盘退变性疾病(IVDD)是指因椎间盘组织自然或在各种因素刺激下退变而引起的相关疾病,其发病率较高,可以引起诸如腰痛、坐骨神经痛等一系列临床症状。目前,临床上针对 IVDD 的治疗方法主要为对症和手术治疗,尚不能从根源上修复退变的椎间盘组织;其细胞生物学治疗仍然主要处于基础研究阶段,其中干细胞移植治疗 IVDD 的相关研究取得了重大进展,能够在一定程度上对退变的椎间盘组织进行修复^[1-4]。然而,干细胞移植的缺陷难以避免,比如存在移植性创伤和外源性干细胞在椎间盘内酸性、低氧、营养匮乏的环境下生存率较低等问题,如何避免或解决这些修复障碍是提高细胞生物学治疗 IVDD 的关键。近来,Henriksson 等^[5-8]提出了“椎间盘干细胞巢(ISN)”的概念:骺板外周软骨膜区域内具有大量持续增殖的慢周期细胞;并证实了 ISN 源性干细胞(ISN-SCs)在体内向椎间盘内部迁移促进修复的理论。该理论为 IVDD 的细胞生物学治疗提供了新的研究方向和思路——促进 ISN-SCs 内源性迁移。目前尚缺乏关于 ISN-SCs 的体外研究,阻碍了对其迁移相关特性的进一步探索。本研究旨在体外分离、培养 ISN-SCs,并对其进行干细胞相关特性的鉴定,从而为后续的关于 ISN-SCs 向椎间盘内迁移及促修复的体内、外研究提供种子细胞来源和研究基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物、试剂、仪器

Sprague-Dawley (SD)大鼠(雄性,10 周龄);培养基(DMEM/F12,1:1,Gibco 公司);胎牛血清

(HyClone 公司);青-链霉素(Gibco 公司);胰酶/乙二胺四乙酸(EDTA)(Gibco 公司);噻唑蓝(MTT,Sigma 公司);二甲基亚砜(DMSO,Sigma 公司);细胞周期检测试剂盒(南京凯基);酶标仪(Thermo 公司);流式细胞仪(BD 公司);倒置显微镜(Olympus 公司);解剖显微镜(Leica 公司);超净工作台(苏州净化);CO₂培养箱(SANYO 公司);藻红蛋白(PE)-偶联单克隆抗体:CD29-PE、CD90-PE、CD45-PE(eBioscience 公司),CD34-PE、CD44-PE(Abcam 公司);异硫氰酸荧光素(FITC)-偶联单克隆抗体:CD19-FITC(Abcam 公司),CD11b-FITC(BD 公司);SD 大鼠三系分化(成骨、成软骨、成脂肪)培养液(广州赛业生物);干细胞三系分化定量检测试剂盒(上海杰美);碱性磷酸酶钙钴染色试剂盒(南京凯基);TRIzol 试剂盒(Invitrogen 公司);分光光度计(Shimadzu 公司);梯度 PCR 仪(ABI 公司);引物序列设计采用 Primer Premier 5.0 软件,由南京金斯瑞科技有限公司合成。

1.2 ISN-SCs 的分离和培养

用过量水合氯醛腹腔注射处死 3 只大鼠,无菌环境下解剖分离其 L3~L6 脊柱功能单位。解剖显微镜下利用眼科手术器械仔细去除附着于脊柱功能单位上的肌肉、韧带等组织,去除椎间盘组织如髓核、纤维环、软骨终板等结构,暴露软骨终板下椎体骨组织。采用磷酸盐缓冲液(PBS)溶液反复冲洗后,根据文献^[9]描述的椎间盘干细胞巢解剖区域(骺板外周软骨膜部分,椎体第二骨化中心以下 500 μ m,宽约 100 μ m),利用手术刀片分离干细胞巢组织(图 1)。每只大鼠分离的组织分别采



图 1 分离的脊柱功能单位, 去除椎间盘组织后暴露软骨下椎体骨组织, 显露椎间盘干细胞巢(ISN)区域(蓝色弧形区域); 横向箭头指向椎体, 纵向箭头指向脊髓

Figure 1 Intervertebral disc tissues were carefully detached from the functional spinal unit to expose the stem cell niches of intervertebral disc (ISN), which is indicated by the blue arc area. The horizontal arrow indicates vertebral body, and the vertical arrow indicates spinal cord

用 0.15% 的 II 型胶原酶溶液 37℃ 下消化 6h, 经孔径 70 μ m 滤网过滤, 过滤液离心 (1000r/min、5min)。细胞重悬于培养液 (DMEM/F12 含 10% 胎牛血清、1% 青-链霉素) 后接种于 25cm² 培养瓶, 置于细胞培养箱中培养。每 3d 更换一次培养液, 倒置显微镜下观察细胞生长情况。细胞达 90% 融合后, 采用 0.25% 胰酶/EDTA 进行消化, 并按 1:3 的比例进行传代。取第四代 (P4) ISN-SCs 备用。

1.3 细胞周期的测定

0.25% 胰酶/EDTA 消化获取 P4 代细胞 (>2 $\times$ 10⁵ 个), PBS 洗涤后重悬于 100 μ l PBS, 取 50 μ l 细胞悬液, 按照细胞周期试剂盒的说明, 分别加入试剂 A、B、C, 随后采用流式细胞仪进行检测, 采用 CellQuest 软件获取数据, ModFit 软件分析细胞周期。

1.4 细胞增殖曲线的测定

取 P4 代细胞接种于 96 孔细胞培养板 (密度 1000 个/孔), 置于培养箱中培养。在接种后 1~10d 分别加入 20 μ l MTT (5mg/ml), 37℃ 孵育 4h, 吸除培养孔内溶液后, 每孔加入 150 μ l DMSO, 37℃ 孵育 30min, 充分摇匀后, 采用酶标仪测量各时间点各孔在 492nm 波长的光密度 (OD 值)。

1.5 细胞免疫表型的测定

按照表面抗原分子的不同分组, 各组分别取 P4 代细胞 (1 $\times$ 10⁶ 个) 重悬于 100 μ l 冷 PBS, 按照试剂说明书分别加入相应的 PE-或 FITC-偶联单克隆抗体 (CD29-PE、CD90-PE、CD45-PE、CD34-PE、CD44-PE、CD19-FITC、CD11b-FITC), 并设立同型对照组, 4℃ 避光孵育 30min, 冷 PBS 洗涤细胞后重悬于 300 μ l 冷 PBS, 采用单通道流式细胞仪对样本进行分析, 计算各样本阳性染色细胞百分比。

1.6 三系分化能力的测定

成骨诱导分化: 将 P4 代细胞接种于含普通培养液的 96 孔细胞培养板 (1.5 $\times$ 10⁴ 个/孔), 24h

后细胞贴壁, 更换培养液为 SD 大鼠间充质干细胞成骨分化培养液, 每 3d 更换一次分化培养液, 诱导分化周期 3 周; 对照组采用普通培养液培养; 按照成骨分化定量检测试剂盒说明, 进行茜素红染色并在倒置显微镜下观察, 随后采用溶解液溶解染色剂, 采用酶标仪测量 562nm 波长的 OD 值, 进行茜素红染色定量检测; 按照钙钴染色试剂盒说明, 采用钙钴染色法评估成骨分化细胞碱性磷酸酶活性情况。

成软骨诱导分化: 方法同上, 接种细胞密度为 2 $\times$ 10⁴ 个/孔, 诱导培养液为 SD 大鼠间充质干细胞成软骨分化培养液, 诱导分化周期结束后, 按照成软骨分化定量检测试剂盒说明, 进行阿利新蓝染色并在倒置显微镜下观察, 随后采用溶解液溶解染色剂, 采用酶标仪测量 595nm 波长的 OD 值, 进行阿利新蓝染色定量检测。

成脂肪诱导分化: 方法同上, 接种细胞密度为 1.5 $\times$ 10⁴ 个/孔, 培养液分为 SD 大鼠间充质干细胞成脂肪分化诱导培养液和维持培养液, 依次进行四个“诱导 3d-维持 1d”循环周期后, 继续在维持培养液中培养 1 周; 对照组采用普通培养液培养; 按照成脂肪分化定量检测试剂盒说明, 进行油红 O 染色并在倒置显微镜下观察, 随后采用溶解液溶解染色剂, 采用酶标仪测量 520nm 波长的 OD 值, 进行油红 O 染色定量检测。

1.7 分化相关基因及干细胞相关基因的测定

采用实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测; 细胞三系分化后, 分别检测诱导组和对照组细胞各分化相关基因的 mRNA 表达水平, 包括成骨相关基因 (Runx2、OPN、OCN)、成软骨相关基因 (SOX-9、COL2a1、ACAN) 和成脂肪相关基因 (PPAR γ 、C/EBP α)。将 ISN-SCs 的干细胞相关基因 (NANOG、SOX-2、OCT-4) mRNA 表达水平与骨髓间充质干细胞 (BMSCs, 取自本研究大鼠股骨、胫骨骨髓, 分离、培养方法参照先前的研究^[4]) 进行对比, 进一

步明确其干细胞特性;qPCR 采用管家基因 GAPDH 作为内参,退火温度 60℃,40 个循环,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算各靶基因相对表达水平,各引物序列信息见表 1。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析;定量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间的定量数据比较采用独

立样本 t 检验; $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 细胞形态、细胞周期及增殖曲线特点

原代细胞培养第 4 天即可见圆形细胞集落形成,约 10d 后细胞集落生长密集而首次传代;后续代次之间时间间隔约为 7d;P4 代 ISN-SCs 呈成纤维样细胞,具有多触角,显微镜下大体形成部分漩涡状结构(图 2)。流式细胞分析结果显示约 $(86.11 \pm 1.71)\%$ 的细胞处于 G0/G1 期(图 3);MTT 分析结果显示其在最初 3d 处于慢速增殖期,逐渐转化至对数生长期(第 4~7 天),此后增殖速度减慢,呈现为“S”型增殖曲线(图 4)。

2.2 细胞免疫表型特点

流式细胞分析结果显示,ISN-SCs 高表达干细胞相关阳性表面抗原分子 CD29、CD90 和 CD44,低表达干细胞相关阴性表面抗原分子 CD34、CD45、CD19 和 CD11b(图 5、表 2)。

2.3 三系分化能力及分化相关基因的表达

成骨诱导分化后茜素红染色可见成片较大的钙结节形成,对照组未见明显钙结节(图 6a、6b);诱导分化的细胞碱性磷酸酶钙钴染色显示广泛的阳性染色区域,对照组未见明显阳性染色区(图 6c、6d);茜素红染色定量结果显示,诱导组较对照组在 562nm 处 OD 值显著性增加;qPCR 结果显示诱导组成骨相关基因 Runx2、OPN、OCN mRNA 表达水平较对照组显著性增高(表 3、4)。成软骨诱导分化后阿利新蓝染色可见细胞广泛蓝染,而对照组仅有少数细胞蓝染(图 6e、6f);染色定量结果显示,诱导组较对照组在 595nm 处 OD 值显著性增加;qPCR 结果显示诱导组成软骨相关基因(SOX-9、COL2a1、ACAN)mRNA 表达水平较对照组显著性增高(表 3、4)。成脂肪诱导分化后油红 O 染色显示成片脂滴形成,对照组未见明显脂滴(图 6g、6h);染色定量结果显示,诱导组较对照组在 520nm 处 OD 值显著性增加;qPCR 结果显示诱导组成脂肪相关基因(PPAR γ 、C/EBP α)mRNA 表达水平较对照组显著性增高(表 3、4)。

2.4 干细胞基因的表达

qPCR 结果显示 ISN-SCs 与 BMSCs 具有相似的干细胞相关基因的表达水平,其中 NANOG 基因的表达水平在 ISN-SCs 中显著性增高(表 5)。

表 1 各引物序列详细信息

Table 1 Detailed information of the primers for qPCR

靶基因 Target Gene	大小 Size (bp)	引物序列 Primers sequences
GAPDH	103	上游引物 Sense 5'-GGCCTTCCGTGTTCTTACC-3'
		下游引物 Antisense 5'-CGCCTGCTTACCACCTTC-3'
NANOG	76	上游引物 Sense 5'-TG GTTGAAGACTAGCAACGG-3'
		下游引物 Antisense 5'-AATAGCTGCAATGGATGCTG-3'
SOX-2	117	上游引物 Sense 5'-AGCAAGTACTGGCAAGACCA-3'
		下游引物 Antisense 5'-CGATATCAACCTGCATGGAC-3'
OCT-4	104	上游引物 Sense 5'-GAGGAAGCTGACAACAACGA-3'
		下游引物 Antisense 5'-CACCTCACACGGTTCTCAAT-3'
Runx2	138	上游引物 Sense 5'-GCGTCCTATCAGTTCCCAAT-3'
		下游引物 Antisense 5'-ATCAGCGTCAACACCATCAT-3'
OPN	103	上游引物 Sense 5'-TCCAGGAGTTTCCCTGTTTC-3'
		下游引物 Antisense 5'-TGACCTTGATAGCCTCATCG-3'
OCN	70	上游引物 Sense 5'-CCTAGCAGACACCATGAGGA-3'
		下游引物 Antisense 5'-GTCAGAGAGGCAGAATGCAG-3'
ACAN	74	上游引物 Sense 5'-GGAGAAGAGACCCAAACAGC-3'
		下游引物 Antisense 5'-GACCCTTCTGGAGAAGCAAG-3'
COL2a1	70	上游引物 Sense 5'-GGAAGAGCGGAGACTACTGG-3'
		下游引物 Antisense 5'-TTGCAGAAGACTTTTCATGGC-3'
SOX-9	110	上游引物 Sense 5'-GCCTGGACTGTATGTGGATG-3'
		下游引物 Antisense 5'-TCTGTCCGATGTCTCTCTGC-3'
PPAR γ	99	上游引物 Sense 5'-TCTCACAATGCCATCAGGTT-3'
		下游引物 Antisense 5'-AGACTCTGGGTTTACAGTGGT-3'
C/EBP α	101	上游引物 Sense 5'-CCAGAAGGCTGAGTTGTGAA-3'
		下游引物 Antisense 5'-GGTCCCAGTGTCTTCATCCT-3'

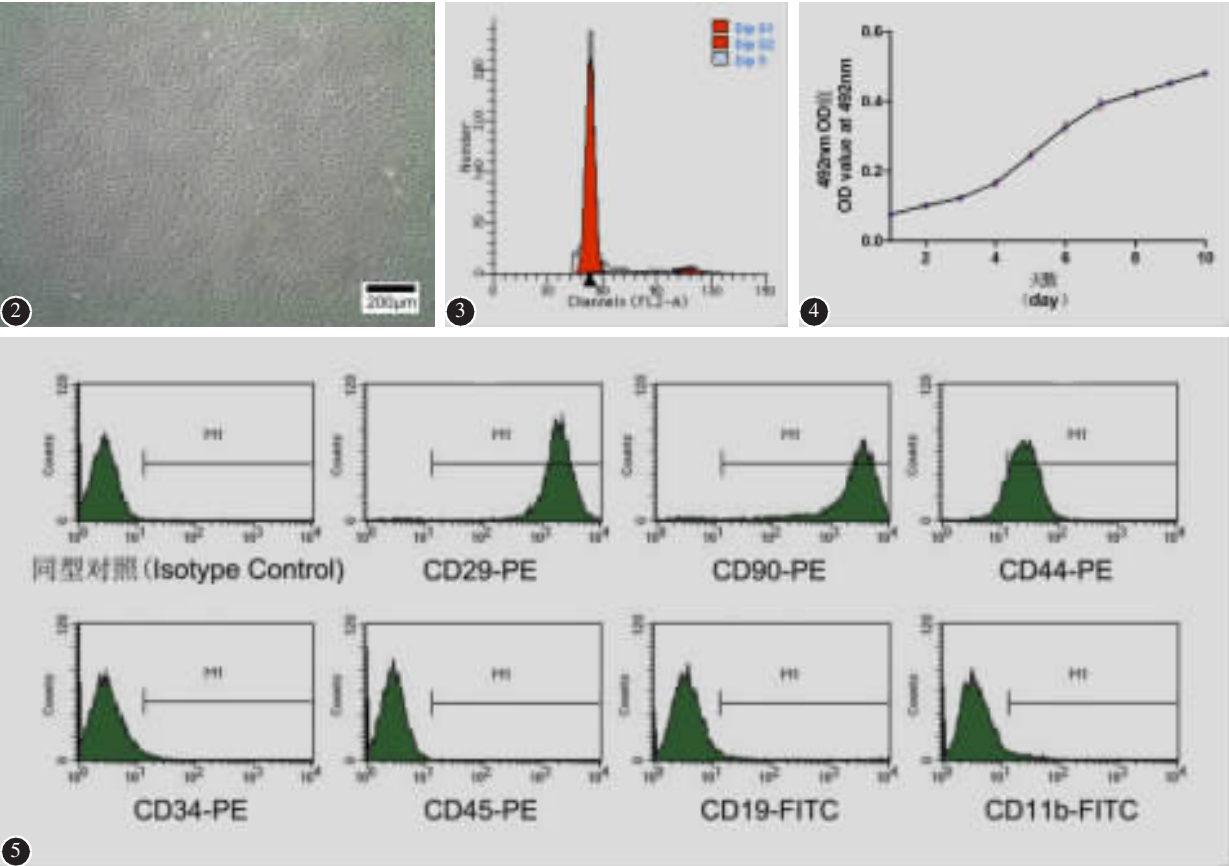


图 2 P4 代 ISN-SCs 的形态特点：纤维样、多触角、局部形成漩涡状 图 3 流式细胞图显示 ISN-SCs 细胞周期 图 4 ISN-SCs 生长曲线图(MTT 法测定) 图 5 ISN-SCs 免疫表型流式细胞图;通过与同型对照组对比计算阳性染色细胞百分比

Figure 2 Morphological characteristics of P4 ISN-SCs: fibroblast-like, with multi-tentacles, and forming vortices partially **Figure 3** Representative flow cytometry figure of ISN-SCs cell cycle **Figure 4** Growth curve of ISN-SCs (MTT method) **Figure 5** Flow cytometry figure of ISN-SCs immunophenotypes. The percentage of positively stained cells was calculated relative to the isotype control

表 2 ISN-SCs 表面抗原分子表达情况

Table 2 The cell surface antigens expression of ISN-SCs

抗原分子 Antigen	均值(%) Mean value(%)	标准差(%) Standard deviation(%)
CD29	99.42	0.30
CD90	98.80	0.60
CD44	86.47	3.71
CD34	1.37	0.15
CD45	0.82	0.17
CD19	1.68	0.10
CD11b	1.40	0.08

3 讨论

IVDD严重影响着人们的日常生活。目前临床上对其治疗措施仍然主要采用保守治疗和手术治疗,前者往往无法达到根治效果,后者也存在无法

完好保留椎间盘组织结构或出现手术相关并发症等不良结果的可能。关于 IVDD 的生物学治疗(尤其是干细胞移植治疗)虽然取得了较大的进展,却仍然存在一些难以避免的缺陷或者技术挑战^[9]。

自从 Schofield 等^[10]于 1978 年首次提出“干细胞巢”概念以来,许多组织或器官中的干细胞巢逐渐被发现,比如呼吸系统、消化系统、神经系统、心脏、脂肪组织、皮肤、骨髓、胎盘组织等^[11]。干细胞巢定义为一个含有邻近细胞和细胞外基质的动态微环境,其具有调节内部干细胞活性和行为的能力^[10-12]。同时,众多研究结果表明,促进内源性干细胞巢内的干细胞迁移至邻近组织从而达到修复效果,是组织内源性修复的一个重要机制^[13-17]。随着 ISN 的发现^[5-8],其在体内对椎间盘的生物学作用也逐渐受到重视。有研究指出其在维持椎间盘

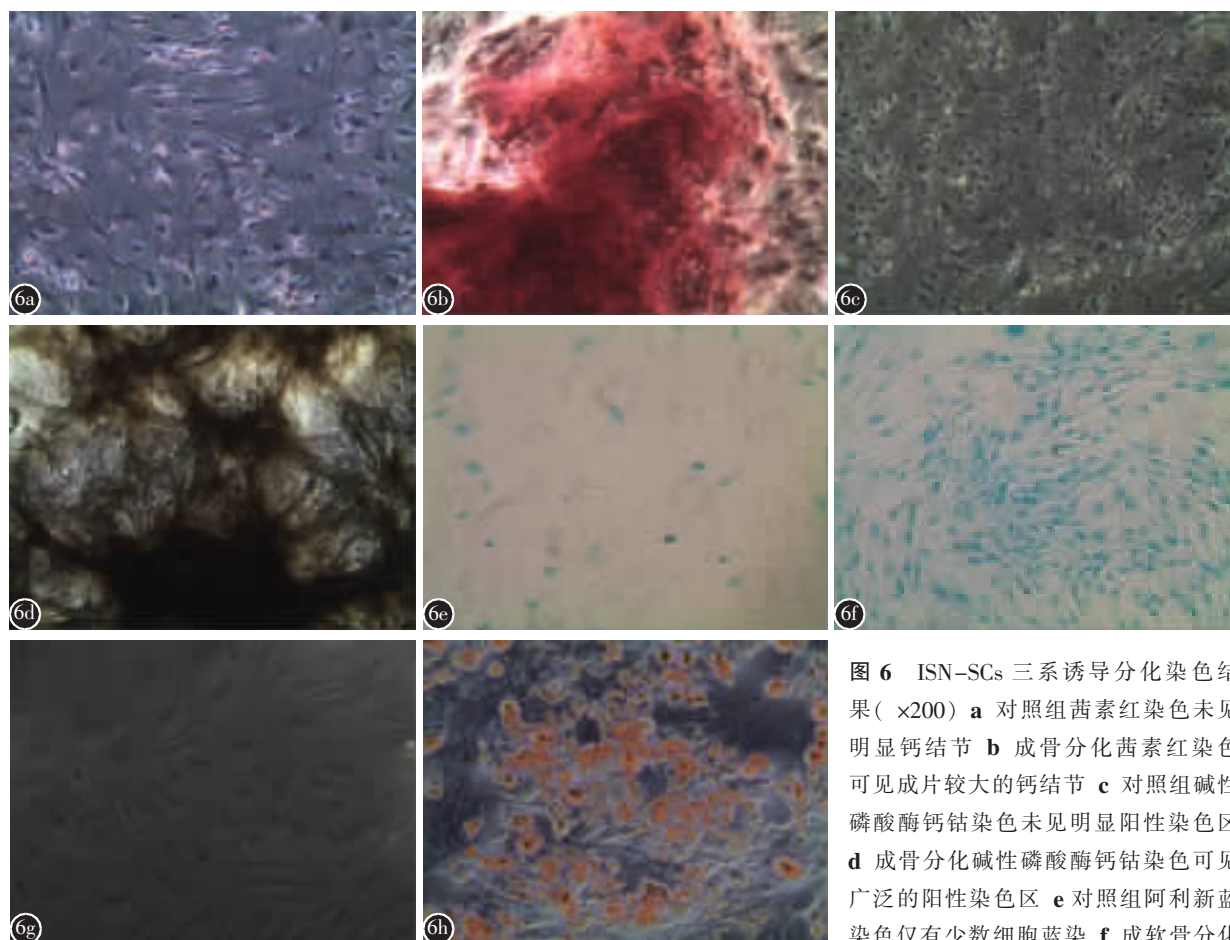


图 6 ISN-SCs 三系诱导分化染色结果 (×200) a 对照组茜素红染色未见明显钙结节 b 成骨分化茜素红染色可见成片较大的钙结节 c 对照组碱性磷酸酶钙钴染色未见明显阳性染色区 d 成骨分化碱性磷酸酶钙钴染色可见广泛的阳性染色区 e 对照组阿利新蓝染色仅有少数细胞蓝染 f 成软骨分化阿利新蓝染色可见细胞广泛蓝染 g 对照组油红 O 染色未见明显脂滴形成 h 成脂肪分化油红 O 染色可见成片脂滴形成

Figure 6 Multilineage differentiation capacities of ISN-SCs(×200) **a** For alizarin red staining, no obvious calcium nodes were observed in the control groups **b** clumpy large calcium nodes were observed in the osteogenesis groups **c** For calcium cobalt staining of alkaline phosphatase, negative staining were observed in the control groups **d** extensive areas of positive staining were observed in the osteogenesis groups **e** For alcian blue staining of aggrecan, only small number of cells were stained in the control groups **f** large number of cells were stained in the chondrogenesis groups **g** For oil red O staining, no obvious lipid droplets were observed in the control groups **h** crowds of lipid droplets were observed in the adipogenesis groups

形态和功能方面可能发挥着重要作用^[5];进一步的研究则支持了 ISN-SCs 的迁移过程有助于椎间盘再生的理论^[7],同时明确了 ISN-SCs 的迁移途径^[6,7]:由 ISN 迁移至纤维环和椎间盘内部。此前已有研究^[18,19]表明,体循环内的 BMSCs 可以通过椎体终板迁移至椎间盘内部,但由于椎体终板的屏障作用,迁移作用十分有限;而 ISN-SCs 的迁移则可绕过椎体终板障碍,通过较为疏松的纤维环组织到达椎间盘内部,使得“迁移-修复”过程成为可能。Sasaki 等^[8]发现规律的跑步锻炼可以促进大鼠 ISN-SCs 向椎间盘内部迁移,并可以促进椎间盘内部细胞的增殖;邓超等^[20]也通过动物

模型发现,持续压力会影响椎间盘内干细胞的迁移和分布,轻度压力可以增加 ISN 区域及椎间盘

表 3 ISN-SCs 三系诱导分化染色定量分析 ($\bar{x} \pm s$, OD 值)

Table 3 Quantitative staining analysis of multilineage differentiation of ISN-SCs

	对照组 Control Group	诱导组 Induction Group
成骨分化 Osteogenesis	0.119±0.014	0.437±0.031 ^①
成软骨分化 Chondrogenesis	0.073±0.005	0.227±0.009 ^①
成脂肪分化 Adipogenesis	0.056±0.002	0.154±0.013 ^①

注:①与对照组比较 $P < 0.05$

Note: Compared with control group, $P < 0.05$

表 4 ISN-SCs 三系诱导分化相关基因 mRNA 表达水平
($\bar{x}\pm s$)

Table 4 The mRNA expression levels of multilineage differentiation of ISN-SCs

	对照组 Control Group	诱导组 Induction Group
成骨分化 Osteogenesis		
Runx2	1.000±0.035	3.063±0.365 ^①
OPN	1.000±0.045	14.917±1.653 ^②
OCN	1.000±0.039	92.182±11.526 ^②
成软骨分化 Chondrogenesis		
SOX-9	1.000±0.045	1.776±0.073 ^②
COL2a1	1.000±0.011	13.545±2.185 ^①
ACAN	1.000±0.019	5.537±0.377 ^①
成脂肪分化 Adipogenesis		
PPAR γ	1.004±0.116	19.143±0.856 ^②
C/EBP α	1.004±0.111	9.019±0.451 ^①

注:与对照组比较^① $P<0.05$, ^② $P<0.001$

Note: Compared with control group, ^① $P<0.05$; ^② $P<0.001$

表 5 不同来源干细胞相关基因 mRNA 表达水平
($\bar{x}\pm s$)

Table 5 The mRNA expression levels of the stem cell-related genes

	NANOG	SOX-2	OCT-4
骨髓间充质干细胞 BMSCs	1.001±0.063	1.024±0.277	1.001±0.060
椎间盘巢源性干细胞 ISN-SCs	1.410±0.165 ^①	1.398±0.096	1.591±0.362

注:①与骨髓间充质干细胞比较 $P<0.05$

Note: ^①Compared with BMSCs, $P<0.05$

内干细胞数量,而重度压力作用效果相反。上述研究均提示 ISN-SCs 内源性迁移至椎间盘内部可能是椎间盘自我修复和再生的一个重要机制。因此,促进 ISN-SCs 内源性迁移修复椎间盘组织也为 IVDD 的细胞生物学治疗提供了新思路。

目前,关于 ISN-SCs 的体外研究较为缺乏,阻止了对其“迁移-修复”机制的进一步探索。鉴于难以获取人体椎间盘干细胞巢区域组织,本研究选取大鼠作为研究对象,成功分离、培养了 ISN-SCs,并对其进行了干细胞相关特性的鉴定。国际细胞治疗协会(International Society for Cellular Therapy,ISCT)建议的多能间充质干细胞的几个基本特性为^[21]:(1)具有贴壁能力;(2)具有特殊的干细胞免疫表型;(3)具有多向分化能力。本研究结果显示,ISN-SCs 为纤维样、多触角细胞,具有贴壁的能力;流式细胞检测 ISCT^[21]提出

的或相关研究^[22]中常用于干细胞鉴定的表面抗原分子,细胞免疫表型特点为 CD29+、CD90+(均>95%),CD44+(86.47%),CD34-、CD45-、CD19-、CD11b-(均<2%),其中 CD44 的阳性率较之前的研究结果稍低^[23,24],CD44 的表达差异同样见于不同的干细胞研究^[23-25],这可能是由于不同的细胞培养环境和细胞代次的影响造成;由于 CD44 与干细胞迁移特性相关^[26],所以其表达差异可能预示着不同的细胞迁移能力,较高的阳性表达率可能表明 ISN-SCs 具有较强的迁移能力;ISN-SCs 三系分化结果显示其具有较好的成骨、成软骨、成脂肪能力,同时诱导分化后各分化相关基因表达较对照组显著性增加,这也与染色定量结果相一致。以上研究结果表明,ISN-SCs 满足了多能间充质干细胞的 3 个基本特性,属于间充质干细胞家族一员。此外,本研究还将 ISN-SCs 的干细胞相关基因表达水平与 BMSCs 进行了比较,证明其干细胞表达水平与 BMSCs 相当,其中 NANOG 的表达水平还高于 BMSCs 中的表达($P<0.05$),而 NANOG 的表达是干细胞多能特性的关键因素,进一步证明了 ISN-SCs 的干细胞特性。同时,细胞周期分析结果显示,ISN-SCs 为慢周期细胞(G0/G1 期细胞比例>85%),这与关于 ISN 的体内研究结果^[5,7,8]相一致。有研究^[27]表明,干细胞的慢周期特性同样与其多能性密切相关。研究结果还显示,ISN-SCs 呈现与相关研究^[28,29]中不同组织来源干细胞相似的增殖曲线。

综上所述,ISN-SCs 属于间充质干细胞,具有多向分化的能力。本研究结果为后续进行基于 ISN-SCs 迁移的椎间盘内源性修复研究提供了种子细胞来源,奠定了研究基础,有利于开辟椎间盘的自体生物学修复研究的新领域。后续研究应该着力于探讨 ISN-SCs 迁移机制,寻找促进其迁移的方法,明确其对椎间盘的修复效果。

4 参考文献

1. 邵建树,吴小涛,王运涛,等.兔骨髓间充质干细胞与髓核细胞共培养后的营养效应和类髓核分化效应[J].中国脊柱脊髓杂志,2009,19(5):381-387.
2. Wang H, Zhou Y, Huang B, et al. Utilization of stem cells in alginate for nucleus pulposus tissue engineering[J]. Tissue Eng Part A, 2014, 20(5-6): 908-920.
3. Clarke LE, Richardson SM, Hoyland JA. Harnessing the potential of mesenchymal stem cells for IVD regeneration [J].

- Curr Stem Cell Res Ther, 2015, 10(4): 296–306.
4. Cai F, Wu XT, Xie XH, et al. Evaluation of intervertebral disc regeneration with implantation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) using quantitative T2 mapping: a study in rabbits[J]. *Int Orthop*, 2015, 39(1): 149–159.
 5. Henriksson H, Thornemo M, Karlsson C, et al. 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*, 2009, 34(21): 2278–2287.
 6. Henriksson HB, Lindahl A, Skioldebrand E, et al. Similar cellular migration patterns from niches in intervertebral disc and in knee-joint regions detected by in situ labeling: an experimental study in the New Zealand white rabbit [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2013, 4(5): 104.
 7. Henriksson HB, Svala E, Skioldebrand E, et al. Support of concept that migrating progenitor cells from stem cell niches contribute to normal regeneration of the adult mammal intervertebral disc: a descriptive study in the New Zealand white rabbit[J]. *Spine*, 2012, 37(9): 722–732.
 8. Sasaki N, Henriksson HB, Runesson E, et al. Physical exercise affects cell proliferation in lumbar intervertebral disc regions in rats[J]. *Spine*, 2012, 37(17): 1440–1447.
 9. Sakai D, Andersson GBJ. Stem cell therapy for intervertebral disc regeneration: obstacles and solutions [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2015, 11(4): 243–256.
 10. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell[J]. *Blood cells*, 1978, 4(1–2): 7–25.
 11. Jedrzejak M, Skowron K, Czekaj P. Stem cell niches exposed to tobacco smoke[J]. *Przegl Lek*, 2012, 69(10): 1063–1073.
 12. Voog J, Jones DL. Stem cells and the niche: a dynamic duo [J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 6(2): 103–115.
 13. Wang K, Zhao X, Kuang C, et al. Overexpression of SDF-1 α enhanced migration and engraftment of cardiac stem cells and reduced infarcted size via CXCR4/PI3K pathway[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(9): e43922.
 14. Christie KJ, Turnley AM. Regulation of endogenous neural stem/progenitor cells for neural repair—factors that promote neurogenesis and gliogenesis in the normal and damaged brain[J]. *Front Cell Neurosci*, 2013, 6: 70. doi: 10.3389/fncel.2012.00070.
 15. Madhavan L, Collier TJ. A synergistic approach for neural repair: cell transplantation and induction of endogenous precursor cell activity[J]. *Neuropharmacology*, 2010, 58(6): 835–844.
 16. Saha B, Jaber M, Gaillard A. Potentials of endogenous neural stem cells in cortical repair [J]. *Front Cell Neurosci*, 2012, 6: 14. doi: 10.3389/fncel.2012.00014.
 17. Yu H, Vu TH, Cho KS, et al. Mobilizing endogenous stem cells for retinal repair[J]. *Transl Res*, 2014, 163(4): 387–398.
 18. Tam V, Rogers I, Chan D, et al. A comparison of intra-venous and intradiscal delivery of multipotential stem cells on the healing of injured intervertebral disk [J]. *J Orthop Res*, 2014, 32(6): 819–825.
 19. Sakai D, Nishimura K, Tanaka M, et al. Migration of bone marrow-derived cells for endogenous repair in a new tail-looping disc degeneration model in the mouse: a pilot study [J]. *Spine J*, 2015, 15(6): 1356–65.
 20. 邓超, 蔡显义, 孙永青, 等. 压力影响干细胞向兔椎间盘内迁移的初步研究[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2013, 21(12): 4–7.
 21. 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.
 22. Boxall SA, Jones E. Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells[J]. *Stem Cells Int*, 2012, 2012: 975871. doi: 10.1155/2012/975871.
 23. 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.
 24. Barzilay R, Sadan O, Melamed E, et al. Comparative characterization of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells from four different rat strains[J]. *Cytotherapy*, 2009, 11(4): 435–442.
 25. Rebelatto CK, Aguiar AM, Moretao MP, et al. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue[J]. *Exp Biol Med* (Maywood), 2008, 233(7): 901–913.
 26. Zhu H, Mitsuhashi N, Klein A, et al. The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(4): 928–935.
 27. Reems JA, Torok-Storb B. Cell cycle and functional differences between CD34+/CD38hi and CD34+/38lo human marrow cells after in vitro cytokine exposure[J]. *Blood*, 1995, 85(6): 1480–1487.
 28. Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, et al. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle[J]. *Cell Tissue Res*, 2007, 327(3): 449–462.
 29. Liu C, Guo Q, Li J, et al. Identification of rabbit annulus fibrosus-derived stem cells [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(9): e108239.
- (收稿日期: 2015-06-21 末次修回日期: 2015-10-18)
(英文编审 蒋欣/贾丹彤)
(本文编辑 卢庆霞)