

髓核细胞来源外泌体对骨髓间充质干细胞 向髓核样细胞分化的作用

路 康, 杨 匡, 李海音, 周 跃, 李长青

(第三军医大学附属新桥医院 400037 重庆市)

【摘要】目的:探讨人髓核细胞(NPCs)外泌体对人骨髓间充质干细胞(BMSCs)向髓核样细胞分化的作用。**方法:**取腰椎间盘突出症患者手术切除的髓核组织,体外分离培养人 NPCs,采用差速离心法提取 NPCs 的外泌体,利用透射电镜及 Western blot 对外泌体进行大小形态及标志蛋白的检测,同时用 PKH67 荧光染料标记外泌体后与 BMSCs 共孵育 0.5h、2h、4h,在激光共聚焦显微镜下观察 BMSCs 对 NPCs 外泌体的摄取情况;取人 BMSCs 经 NPCs 外泌体诱导 3d、7d、10d、14d 后应用 RT-PCR 检测 BMSCs 中蛋白聚糖(ACAN)、SOX-9、II 型胶原(COL2A1)、角蛋白 19(KRT19)及缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)的 mRNA 表达情况。**结果:**提取的人 NPCs 外泌体为直径为 30~100nm 的圆形或椭圆形结构,其表达 CD63 和 Tsg101,不表达 Calnexin 蛋白。经 PKH67 标记的 NPCs 外泌体可以被 BMSCs 摄取;经 NPCs 外泌体诱导后 7d 开始 BMSCs 中的 ACAN、SOX-9、COL2A1、KRT19 及 HIF-1 α 基因 mRNA 表达均显著性高于未经诱导的 BMSCs($P<0.05$)。**结论:**在体外实验中,人 NPCs 可以分泌外泌体并被 BMSCs 所摄取,诱导 BMSCs 分化为髓核样细胞,可为椎间盘退变的组织工程修复提供更为简单有效的 NPCs 来源。

【关键词】椎间盘退变;外泌体;髓核细胞;骨髓间充质干细胞

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2016.10.11

中图分类号:Q813,R681.5 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2016)-10-0933-06

Exosomes derived from nucleus pulposus cells induced bone marrow mesenchymal stem cells into nucleus pulposus like cells/LU Kang, YANG Kuang, LI Haiyin, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2016, 26(10): 933-938

【Abstract】Objectives: To investigate the role of exosomes derived from nucleus pulposus cells(NPCs) in inducing bone marrow mesenchymal stem cells(BMSCs) differentiation into NP-like cells. **Methods:** The nucleus pulposus was obtained from the surgical specimen of the patient diagnosed as lumbar disc herniation. The NPCs were separated and cultured in vitro, and then the NPC-exosomes were isolated and purified by differential centrifugation. NPC-exosomes were identified by transmission electron microscope(TEM) and immunoblot analysis. To test the uptake of NPC-exosomes by BMSCs, PKH67 labeled NPC-exosomes were co-incubated with BMSCs for 0.5, 2, 4 hours. Fluorescence confocal microscope(FCFM) was used to examine the uptake of NPC-exosomes. After 3, 7, 10, 14 days stimulated by NPC-exosomes, RT-PCR analysis was performed to detect the mRNA expressions of ACAN, SOX9, COL2A1, KRT19 and HIF-1 α in BMSCs. **Results:** Exosomes derived from NPCs were observed on TEM and the size of them was in the range of 30-100nm. Additionally, NPC-exosomes expressed the exosomal markers CD63, TSG101 and no endoplasmic reticulum marker Calnexin. FCM confirmed that NPCs derived exosomes could be transferred into BMSCs. The RT-PCR results showed that with the duration of interaction, ACAN, SOX-9, COL2A1, HIF-1 α and KRT19 mRNA expressions in BM-SCs had significant increases compared with those of the control group($P<0.05$). **Conclusions:** NPCs can secrete exosomes and then interact with BMSCs to induce BMSCs differentiation into NP-like cells. This study provides a more efficient and simple source of NPCs for tissue engineering repair of degenerative

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81572208)

第一作者简介:男(1987-),在读硕士研究生,研究方向:脊柱微创外科治疗的基础与临床

电话:(023)68774328 E-mail: lukang900611@163.com

通讯作者:李长青 E-mail: changqli@163.com

intervertebral disc.

[Key words] Interveterebral disc degeneration; Exosomes; Mesenchymal stem cells; Nucleus pulposus cells

[Author's address] Department of Orthopedic, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China

椎间盘退变性疾病 (degenerative disc disease, DDD) 是引起腰痛的重要原因之一^[1]。目前针对 DDD 的治疗方式为保守治疗、椎间盘切除术、椎间盘置换术以及椎间融合术。这些措施仅能一定程度改善疾病的临床症状,不能从根本上减缓、终止甚至逆转椎间盘退变的进程。近年来,很多研究者将目光投向再生医学方向,希望利用生物因子、干细胞等对退变椎间盘进行干预达到逆转退变、恢复椎间盘生理功能的目的。在椎间盘退变性疾病的再生研究领域,干细胞移植治疗是近年来的研究热点,其中通过特定刺激诱导间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 向髓核细胞 (nucleus pulposus cells, NPCs) 方向分化从而对椎间盘细胞进行补充是重要的组成部分。目前很多研究发现,利用 MSCs 与 NPCs 进行直接接触、间接接触或间接非接触式共培养后, MSCs 可表现出 NPCs 的表型^[2-6],但 MSCs 与 NPCs 间相互作用的具体机制目前仍不清楚,有学者认为其可能是通过旁分泌途径或细胞间直接接触方式进行细胞间信息交流,从而引起两种细胞间的相互影响。外泌体 (exosomes) 作为细胞间信息交流的重要途径引起众多研究者的重视^[7,8]。本研究旨在探索 NPCs 是否可以分泌外泌体,并且通过外泌体途径诱导骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 向髓核样细胞 (NP-like cells) 分化。

1 材料和方法

1.1 试剂及仪器

胎牛血清 (Gibco)、DMEM/F-12 培养基 (Hyclone)、青-链霉素 (Hycone)、BMSCs 培养基 (Cyagen)、PKH67 荧光染料 (Sigma-Aldrich)、anti-CD63/Tsg101/Calnexin 抗体 (Abcam)、Transwell 小室 (8 μ m, Millipore)、人 BMSCs (赛叶科技公司)。主要仪器设备:超速离心机 (Hitachi cp80wx/转子 P70A-980)、透射电子显微镜 (JEM-1400PLUS, Japan)、激光共聚焦显微镜、PCR 仪 (ABI 7500) 等。

1.2 人 NPCs 体外培养

取椎间盘突出症患者手术切除的髓核组织,显微镜下去除终板及纤维环后,用 PBS 彻底冲洗干净,用 0.5mg/ml 浓度的 II 型胶原酶 37℃ 消化 12h 后,收集消化后的细胞悬液,加入等体积含 10% 胎牛血清及 100U/ml 青-链霉素的 DMEM/F-12 培养基,1200r/min 离心 6.5min, 5ml 培养基重悬细胞后接种于 25cm² 透气培养瓶中,于 37℃、5%CO₂ 孵箱中进行培养,3d 更换一次培养基,细胞密度达 80% 时 1:3 传代,选取 P0~P3 NPCs 进行实验。

1.3 人 NPCs 外泌体的提取

过夜离心 (100000g, 4℃) 胎牛血清去除血清中的外泌体,按 10% 胎牛血清、100U/ml 青-链霉素及 DMEM/F-12 配制无外泌体培养基。调整 NPCs 浓度为 2 $\times$ 10⁶/ml,接种至 25cm² 细胞培养瓶中,细胞贴壁后更换无外泌体培养基,48h 后收集细胞培养液,300g、4℃ 离心 10min 去除残余细胞,再经过 2000g 离心 10min 去除死细胞,10000g 离心 30min 去除细胞碎片,0.22 μ m 过滤器过滤后取上清,经 100000g 超速离心 70min,用 PBS 洗涤 1 次,再次 100000g 超速离心 70min,获得的沉淀即为外泌体。PBS 重悬后,BCA 法检测外泌体浓度, -80℃ 低温保存备用。

1.4 外泌体形态观察

滴 20 μ l 外泌体悬液于载样铜网上,室温静置 1min,用滤纸从侧面吸干液体,滴加 2% 磷钨酸溶液 (pH 值 6.8) 30 μ l 于铜网上,室温染色 1min 后滤纸吸干染液,白炽灯下烤 10min。调节工作电压至 120kV,透射电镜下观察并照相。

1.5 外泌体标志蛋白检测

将差速离心得到的外泌体沉淀用 80 μ l 细胞裂解液 (含 1% PMSF) 冰上裂解 30min, BCA 法测蛋白浓度后,加入 5 $\times$ SDS 上样缓冲液 20 μ l,煮沸 5min,加入凝胶上样孔,经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后电转至硝酸纤维素膜上,室温下用含 5% 脱脂牛奶的封闭液封闭处理 1h,经 1 $\times$ TBST 缓冲液洗脱后,加入 CD63、Tsg101、Calnexin 及 β -

actin 单克隆抗体在 4℃ 下过夜, 再次洗脱后, 加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗继续孵育 2h 并用发光底物显影。

1.6 PKH67 荧光标记人 NPCs 外泌体

按照 PKH67 荧光染料试剂盒操作说明标记 NPCs 外泌体。具体步骤为: 避光条件下用 1ml C 液 (试剂盒提供) 将 250μg 的 NPCs 外泌体充分重悬, 另外将 1×10^{-3} M 的 PKH67 原液用 1ml C 液稀释成 2×10^{-6} M 的工作液, 将外泌体与 PKH67 工作液充分混匀后静置 5min, 用 2ml 5%BSA/PBS 加入到以上混合液以中和多余的 PKH67 染料, 最后将 PKH67 标记的外泌体悬液以 100000g、4℃ 离心 70min, 将最后的沉淀以 50μl PBS 重悬。

1.7 BMSCs 摄取 NPCs 外泌体的观察

将 PKH67 标记的 NPCs 外泌体加入预制的 BMSCs 细胞爬片中, 分别避光孵育 0.5h、2h、4h, 对照组为空白 BMSCs。到设定时间后将各组细胞爬片取出用 PBS 洗 3 次, 预冷的 4% 多聚甲醛固定 20min, DAPI 染核, 甘油封片后用激光共聚焦显微镜观察并采集图像, 图像用 LAS AF Lite 软件分析。

1.8 髓核细胞相关蛋白的 mRNA 表达情况

取人 BMSCs 经 NPCs 外泌体诱导 3d、7d、10d、14d 后, TRIZOL 法提取各组 BMSCs 的总 RNA, 参照反转录试剂盒 (TaKaRa Prime Script RT reagent Kit) 说明书进行 cDNA 合成, 用 ABI 7500 型 PCR 仪进行 Real-time PCR 反应, 参照既往文献方法^[4,9], 检测蛋白聚糖 (ACAN)、SOX9 (SRY-related high mobility group-box gene 9)、II 型胶原 (COL2A1)、角蛋白 19 (KRT19)、缺氧诱导因子 1α (HIF-1α) 的 mRNA 表达量。以未经任何处理的 BMSCs 作为空白对照 (A 组), 未经任何处理的 NPCs 作为阳性对照组 (C 组)。引物序列见表 1, 以 β-actin 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 算法得到各组基因 mRNA 的相对表达量。

1.9 统计学方法

所有数据采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 所有实验均至少重复 3 次, 计量数据采用平均值 ± 标准差表示。统计学分析采用单因素方差分析对 A、B、C 组 mRNA 相对表达量的均值进行整体比较, 并用 Bonferroni 统计分析方法进行组间多重比较, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 NPCs 外泌体的鉴定

经差速离心法分离的 NPCs 外泌体在透射电镜下观察, 其形态为圆形或椭圆形, 直径在 30~100nm 范围内, 与文献中经典的外泌体形态大小一致 (图 1)。Western-blot 检测 NPCs 外泌体标志蛋白 CD63、Tsg101 均有表达, 而未检测到阴性蛋白 Calnexin 的表达, 内参为 β-actin (图 2)。

2.2 NPCs 外泌体被 BMSCs 摄取情况

PKH67 标记的 NPCs 外泌体与 BMSCs 共孵育 0.5h、2h、4h 后, 激光共聚焦显微镜下观察, 各时间点的 BMSCs 中均可以观察到绿色点状荧光, 且荧光强度与时间成正相关 (图 3)。

2.3 NPCs 外泌体对 BMSCs 的诱导作用

经 NPCs 外泌体刺激后, ACAN、SOX9、HIF-1α 及 KRT19 的 mRNA 表达量在 B 组 3d、7d 时与空白对照组比较呈逐渐增高趋势, 7d、10d、14d 时表达量相对稳定; COL2A1 的表达量在 3d、7d、10d 随时间逐渐增高, 平台期出现在 10d 以后。14d 时, 各基因表达量与空白组比较均有统计学差异, 与阳性对照组比较均无统计学差异 (表 2)。

3 讨论

在椎间盘退变过程中, 随着 NPCs 的数量减少、活性降低, 最终导致合成细胞外基质减少, 造成髓核脱水。目前组织工程修复退变椎间盘的研究致力于恢复退变髓核的生物学功能, 而通过诱导 MSCs 向 NPCs 分化来补充椎间盘细胞使其发挥正常功能是其重要的内容之一。既往研究表明, 通过 NPCs 与 MSCs 共培养方式, MSCs 可以向髓核样细胞分化, 但其具体作用机制仍不清楚。有研

表 1 基因引物序列表

Table 1 The primer sequence of genes

基因名称 Gene		Primer Sequences(5'-3') 引物序列(5'-3')
蛋白聚糖 Aggrecan	正向 (F) 反向 (R)	ACCAGACTGTCAGATACCCC CATAAAAGACCTCACCTCC
SOX-9	正向 (F) 反向 (R)	GCCTCTACTCCACCTTCACC GTAGACGGGTGTGCCAGT
II 型胶原 Collagen II α1	正向 (F) 反向 (R)	ATTGCCTATCTGGACGAAGC GCAGTGTACGTGAACCTGCT
角蛋白 19 Cytokeratin-19	正向 (F) 反向 (R)	AAGACACACTGGCAGAAACG GATCTGCCGCTCACTATCA
缺氧诱导因子 1α Hypoxia-inducible factor-1α	正向 (F) 反向 (R)	GCCAGACGATCATGCAGCTA ATCCATTGATTGCCCGAGCA
β-actin	正向 (F) 反向 (R)	GTGGGGCGCCCGAGGCACCA CTTCCTTAATGTCACGCACGATTTC

究表明,细胞的直接接触是 NPCs 与 MSCs 共培养下相互作用的必要条件^[2];但 Strassburg 等^[10]发现 NPCs 与 MSCs 在共培养时细胞间紧密连接的形

成或细胞间融合并不是两者相互作用的主要方式,而两种细胞间膜物质成分的相互交换在其中起重要作用。此外,还有研究表明,利用 NPCs 培

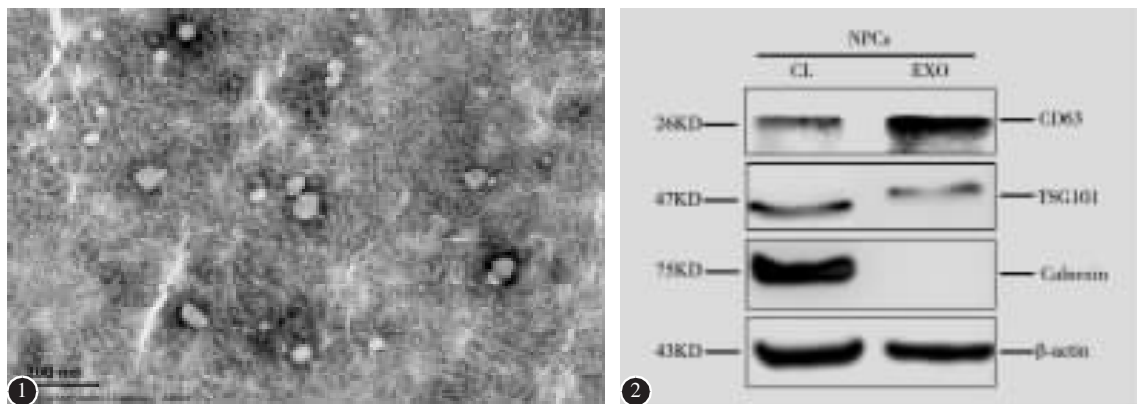


图 1 透射电镜观察 NPCs 外泌体为圆形或椭圆形,直径为 30~100nm 图 2 Western blot 检测 NPCs 外泌体标志蛋白 CD63、Tsg101 表达阳性,而 Calnexin 为阴性(CL:髓核细胞裂解产物;Exo:NPCs 外泌体)

Figure 1 Characterization of NPC-exosomes by transmission electron microscope. NPC-exosomes are roughly identical, ranging from 30-100nm **Figure 2** Western blot to test the exosomal markers. NPC-exosomes express CD63, Tsg101 and no Calnexin(CL: NP cell lysate; Exo: NPC-exosomes)

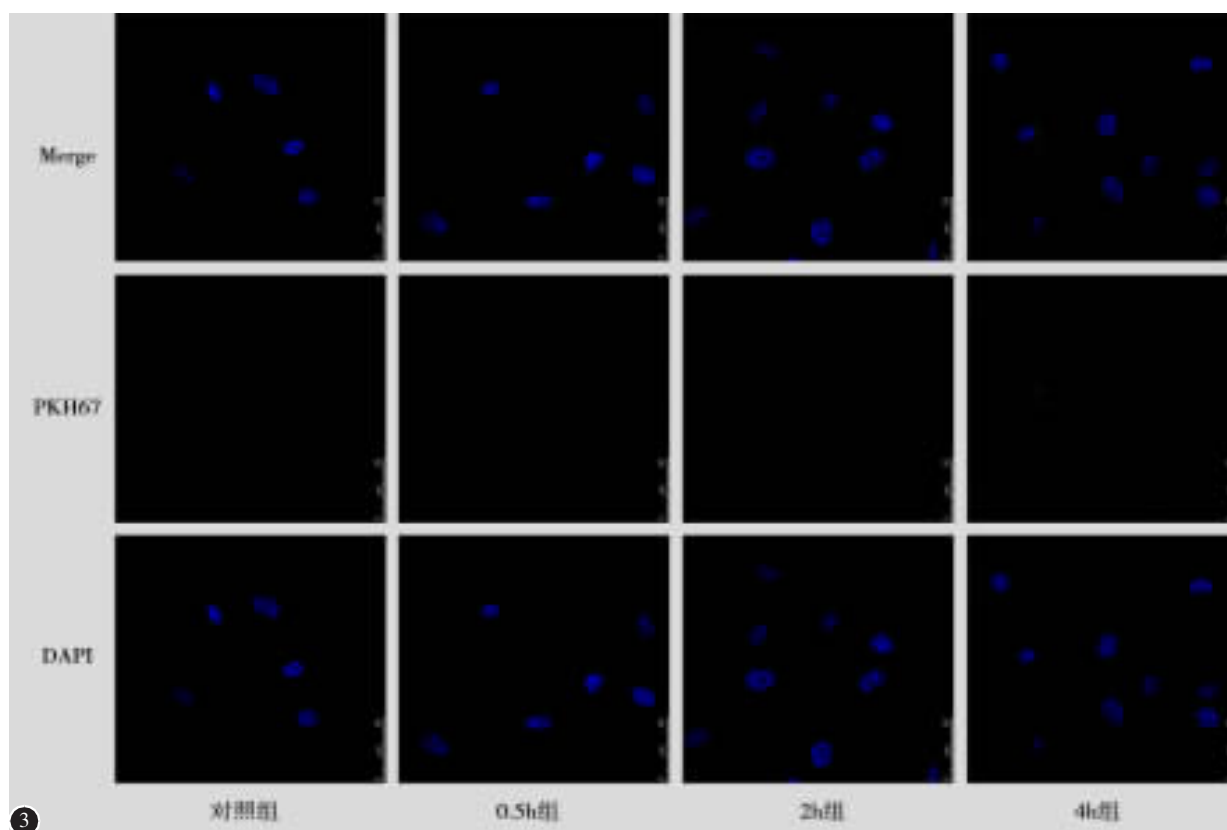


图 3 PKH67 标记的 NPC-exosomes 被 BMSCs 摄取。与对照组相比,各实验组 BMSCs 中均检测到点状绿色荧光,且荧光强度与时间呈正相关

Figure 3 PKH67 labeled NPC-exosomes were absorbed by BMSCs. Compared with control group, a increased punctated green fluorescence with time were observed in BMSCs of all experiment groups

养液同样可以诱导 MSCs 表现出 NPCs 的表型^[11]。外泌体起源于细胞内多泡体 (multivesicular bodies, MVBs), 是直径为 30~100nm (也有报道为 40~120nm^[12]) 的亚细胞双层膜囊泡, 多数外泌体携带有微管蛋白和肌动蛋白等细胞骨架蛋白、四种跨膜蛋白超家族 (CD63、CD9、CD81、CD82)、热休克蛋白 hsp70 和 hsp90、TSG101、Alix 等。同时, 外泌体也拥有反映细胞来源的组织/细胞类型特异性蛋白。此外, 外泌体中也含有各种形式的 RNA, 外泌体通过多泡体 (multivesicular bodies, MVBs) 与细胞膜融合释放到细胞外基质中, 其一般功能是携带起源细胞的特定信息通过旁分泌或远距运输方式与靶细胞进行相互作用, 从而影响后者的生物学行为^[13]。近年来, 我们关注到外泌体这一细胞间信息交换的重要方式, 且外泌体的功能与起源细胞高度相关, 所以我们提出假设, NPCs 可以分泌携带特定 NPCs 信息的外泌体与 BMSCs 相互作用来调节后者的生物学行为。

细胞外囊泡在 30 多年前被首次报道, 到如今发现几乎所有哺乳动物的细胞甚至是真核及原核细胞都可以分泌这些囊泡到细胞外基质中, 胞外囊泡按照其形成方式分为 3 种: 外泌体、微泡 (microvesicles 或 ectosomes^[14]) 和凋亡小体 (apoptotic bodies)^[12]。早期的研究认为, 外泌体执行蛋白运输功能, 特异靶定受体细胞, 交换蛋白和脂类或引发下游信号事件。直到 2007 年, 研究人员发现外泌体也运输核酸, 参与细胞间通讯。目前研究发现,

外泌体内含有与细胞来源相关的蛋白质 rRNA 和 microRNA, 并且外泌体能够通过生物屏障, 在细胞间传递功能性核酸分子, 从而发挥各种生物学功能。本研究结果表明, NPCs 可以分泌细胞外囊泡, 这些囊泡在形态学上与既往报道的外泌体形态大小一致, 同时其表达外泌体标志蛋白 CD63、Tsg101, 这些标志蛋白是转运必需内体分选复合体 (ESCRT) 的组成蛋白, 参与了外泌体的合成及转运^[14、15], 同时我们检测通过差速离心法提取的囊泡中不含有特异性表达于内质网的 Calnexin 蛋白^[16], 证明其杂质较少。

外泌体与靶细胞相互作用的方式有三种: 外泌体膜表面受体与靶细胞直接作用、外泌体膜与靶细胞膜相融合、靶细胞通过内吞作用摄取外泌体^[13]。为了进一步探究 NPCs 外泌体与 BMSCs 作用方式, 我们选用可以均匀标记脂质膜且不影响细胞或外泌体活性的 PKH67 荧光染料对 NPCs 外泌体进行标记, 并观察 NPCs 外泌体与 BMSCs 相互作用情况, 结果显示 NPCs 外泌体可以被 BMSCs 摄取, 在 BMSCs 胞膜上未见 NPCs 外泌体, 所以我们推测 NPCs 外泌体与 BMSCs 相互作用的方式主要是内吞作用。

为了验证我们提出的 NPCs 可以通过外泌体方式诱导 BMSCs 分化的假设, 我们用 NPC 外泌体对 BMSCs 进行诱导并检测其 ACAN、SOX9、COL2A1、HIF-1 α 、KRT19 基因表达情况。结果显示, 与对照组比较, 这些基因的 mRNA 表达均明

表 2 经 NPCs 外泌体诱导不同时间点 BMSC 中 ACAN、SOX9、COL2A1、KRT19、HIF-1 α 的 mRNA 相对表达量

Table 2 RT-PCR analysis of the mRNA expression of ACAN, SOX9, COL2A1, KRT19, HIF-1 α in BMSCs

	A组 Group A	B组 Group B				C组 Group C
		3 days	7 days	10 days	14 days	
蛋白聚糖 Aggrecan	1.00 $\pm$ 0.11	1.30 $\pm$ 0.22 ^①	13.73 $\pm$ 1.13 ^②	14.31 $\pm$ 3.5 ^②	14.77 $\pm$ 2.20 ^②	17.04 $\pm$ 0.73 ^②
SOX-9	1.01 $\pm$ 0.17	2.56 $\pm$ 0.45 ^①	10.59 $\pm$ 0.93 ^②	12.45 $\pm$ 1.63 ^②	12.19 $\pm$ 3.30 ^②	12.94 $\pm$ 1.15 ^②
II 型胶原 Collagen II α 1	1.00 $\pm$ 0.04	1.74 $\pm$ 0.39 ^①	4.32 $\pm$ 0.88 ^①	9.60 $\pm$ 2.23 ^②	9.84 $\pm$ 2.78 ^②	12.12 $\pm$ 1.65 ^②
角蛋白 19Cytokeratin-19	1.01 $\pm$ 0.20	1.45 $\pm$ 0.30 ^①	10.17 $\pm$ 0.42 ^{①②}	12.71 $\pm$ 1.01 ^②	14.73 $\pm$ 2.86 ^②	15.40 $\pm$ 2.24 ^②
缺氧诱导因子 1 α Hypoxia-inducible factor-1 α	1.00 $\pm$ 0.00	3.02 $\pm$ 0.28 ^①	11.68 $\pm$ 1.10 ^②	12.32 $\pm$ 1.35 ^②	11.90 $\pm$ 1.46 ^②	11.67 $\pm$ 1.67 ^②

注: A 组为 BMSCs 空白对照组, B 组为经 NPCs 外泌体诱导不同时间点的 BMSCs, C 组为 NPCs 阳性对照组; ①与 C 组比较 $P < 0.05$; ②与 A 组比较 $P < 0.05$

Note: Group A is the control group that BMSCs without treatment; Group B is treatment group; Group C is NPCs without treatment. ①Compared with group C, $P < 0.05$; ②Compared with group A, $P < 0.05$

显升高,表明 NPC 外泌体可以诱导 BMSCs 向髓核样细胞分化。据此我们推断,无论是直接接触还是非接触式共培养系统中,NPC 外泌体都可能参与了 NPCs 对 BMSCs 的诱导分化作用。由于外泌体是一个富含多种物质的胞外囊泡,其中具体发挥作用的物质成分如 microRNA、特异性蛋白等需要进一步研究。

本研究揭示了外泌体可能是共培养系统下 NPCs 诱导 BMSCs 分化的机制之一,其次,通过 NPCs 外泌体诱导 BMSCs 方式比共培养方式有更明显的优势,例如通过共培养方式获取目的细胞(经诱导后的 BMSCs)的过程更为复杂,尤其是直接共培养后回收 BMSCs 需要经过细胞分选过程,可能会对细胞本身产生影响,在间接共培养中,细胞间相互作用强度较低,即 BMSCs 在分化后表达 NPCs 的表型较弱^[2],而通过提取 NPCs 的外泌体来代替共培养系统,外泌体的浓度可以按照需要进行调节,并且外泌体易于保存及转运,这为体外大量培养成熟髓核细胞提供了更为简单的方法。既往文献报道通过一些生物因子如 TGF- β 、BMP 家族蛋白、FGFs 及 II 型胶原等可以诱导间充质干细胞分化为软骨细胞或类髓核细胞^[17,18],外泌体作为各种生物因子的复合体,是否比单一因子在诱导分化中更具优势还需要进一步研究。

4 参考文献

1. Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010[J]. Lancet, 2012, 380(9859): 2163–2196.
2. Richardson SM, Walker RV, Parker S, et al. Intervertebral disc cell-mediated mesenchymal stem cell differentiation [J]. Stem Cells, 2006, 24(3): 707–716.
3. 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.
4. Vadala G, Studer RK, Sowa G, et al. Coculture of bone marrow mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells modulate gene expression profile without cell fusion[J]. Spine, 2008, 33(8): 870–876.
5. 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.
6. Chen L, Hu X, Fu L, et al. Time differences of bone marrow mesenchymal stem cells and nucleus pulposus-like cells in a non contact co-culture system [J]. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi, 2012, 26(11): 1369–1374.
7. Kourembanas S. Exosomes: vehicles of intercellular signaling, biomarkers, and vectors of cell therapy[J]. Annu Rev Physiol, 2015, 77: 13–27.
8. Tintut Y, Demer LL. Exosomes: nanosized cellular messages[J]. Circ Res, 2015, 116(8): 1281–1283.
9. 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.
10. Strassburg S, Hodson NW, Hill PI, et al. 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.
11. Salzig D, Schmiermund A, Gebauer E, et al. Influence of porcine intervertebral disc matrix on stem cell differentiation [J]. J Funct Biomater, 2011, 2(3): 155–172.
12. EL AS, Mäger I, Breakefield XO, et al. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities [J]. Nat Rev Drug Discov, 2013, 12(5): 347–357.
13. Simons M, Raposo G. Exosomes: vesicular carriers for intercellular communication[J]. Curr Opin Cell Biol, 2009, 21(4): 575–581.
14. Cocucci E, Meldolesi J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles [J]. Trends Cell Biol, 2015, 25(6): 364–372.
15. Hurley JH. ESCRTs are everywhere[J]. EMBO J, 2015, 34(19): 2398–2407.
16. Wada I. Calnexin is involved in the quality-control mechanism of the ER[J]. Seikagaku, 1995, 67(9): 1133–1137.
17. Augustyniak E, Trzeciak T, Richter M, et al. The role of growth factors in stem cell-directed chondrogenesis: a real hope for damaged cartilage regeneration[J]. Int Orthop, 2015, 39(5): 995–1003.
18. Tao Y, Zhou X, Liu D, et al. Proportion of collagen type II in the extracellular matrix promotes the differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells into nucleus pulposus cells[J]. Biofactors, 2016, 42(2): 212–223.

(收稿日期:2016-08-04 末次修回日期:2016-09-02)

(英文编审 唐翔宇/贾丹彤)

(本文编辑 卢庆霞)