

辛伐他汀对大鼠髓核间充质干细胞增殖及分泌功能的影响

黄泽楠¹, 刘忠军², 王静成³, 冯新民³, 陈 涛³, 毕松超³, 张 亮^{2,3}

(1 扬州大学医学院 225001 扬州市; 2 北京大学第三医院 100191 北京市;

3 江苏省苏北人民医院 225001 扬州市)

【摘要】目的:观察大鼠髓核间充质干细胞(nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cell, NPMSC)的生物学特性和辛伐他汀对髓核间充质干细胞增殖及分泌功能的影响。**方法:**取 8 周龄 SD 大鼠尾椎髓核组织, 采用胶原酶及胰酶序贯消化法分离 NPMSC 并进行体外扩增培养, 观察细胞形态并通过噻唑蓝(MTT)法检测细胞增殖情况。通过流式细胞仪检测细胞免疫表型及逆转录 PCR(reverse transcription PCR, RT-PCR)检测干细胞基因表达进行 NPMSC 的鉴定。取第 3 代 NPMSC 施加不同浓度辛伐他汀干预(0 μ mol/L、0.01 μ mol/L、0.1 μ mol/L、1 μ mol/L), 在干预 1d、3d、7d、14d、21d 后通过 CCK-8 法检测细胞活力, RT-PCR 检测蛋白多糖、II 型胶原、缺氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)、葡萄糖转运蛋白 1(glucose transporter 1, GLUT-1)及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的 mRNA 表达。**结果:**原代细胞早期可形成菊花样细胞集落, 克隆样生长, 传代后细胞生长较原代细胞明显加快, 细胞形态以纺锤形为主。第 3 代细胞高表达干细胞相关阳性表面抗原分子 CD73、CD90 及 CD105, 低表达干细胞相关阴性表面抗原分子 CD45 及 CD11b, 与骨髓间充质干细胞具有相似的干细胞转录因子 Sox2、Oct-4 及 Nanog 表达水平。适当浓度的辛伐他汀(0.01 μ mol/L~0.1 μ mol/L)可促进 NPMSC 增殖及 HIF-1 α 、GLUT-1、VEGF 的 mRNA 表达, 且浓度为 0.1 μ mol/L 时达到最强, 而高浓度辛伐他汀(1 μ mol/L)对细胞增殖能力及 HIF-1 α 、GLUT-1、VEGF 的 mRNA 表达有明显抑制作用。辛伐他汀可使 NPMSC 中出现并促进 II 型胶原及蛋白多糖 mRNA 的表达, 0.1 μ mol/L 浓度达到最强。**结论:**大鼠的髓核组织培养出的 NPMSC 能够表达骨髓间充质干细胞特异性的干性基因, 适当浓度(0.01 μ mol/L~0.1 μ mol/L)的辛伐他汀可促进 NPMSC 增殖和细胞外基质的分泌。

【关键词】辛伐他汀; 椎间盘退变; 缺氧诱导因子-1 α ; 髓核间充质干细胞; 增殖; 分泌; 大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2017.07.08

中图分类号: R-332 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2017)-07-0627-07

Influence of simvastatin on the proliferation and secretion functions of nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cells/HUANG Ze'nan, LIU Zhongjun, WANG Jingcheng, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2017, 27(7): 627-633

【Abstract】Objectives: To investigate the effect of simvastatin at different concentrations on the proliferation and secretion functions of nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cell(NPMSC) in vitro. **Methods:** NPMSC was isolated and cultured with collagenase and sequential trypsin digestion from the caudal spinal nucleus pulposus of 8-week-old Sprague-Dawley rats. Cellular morphology was observed and cellular proliferation was detected by MTT assay. The expressions of CD11b, CD45, CD73, CD90 and CD105 were detected by using flow cytometry. The stem cell transcription factor Sox2, Oct-4 and Nanog expression of NPMSC was measured by using RT-PCR and compared with bone marrow derived mesenchymal stem cell. The third generation NPMSC was incubated in various concentrations of simvastatin(0 μ mol/L, 0.01 μ mol/L, 0.1 μ mol/L and 1 μ mol/L) for 1, 3, 7, 14 and 21 days. The influences of simvastatin on proliferation were assayed with CCK-8 assay, and the type II collagen, aggrecan, hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), glucose transporter 1(GLUT-1) and

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81401830); 中国博士后科学基金二等资助(2015M571714); 江苏省自然科学基金资助项目(BK20140496)

第一作者简介:男(1991-), 医学硕士, 研究方向: 脊柱外科

电话: (0514)87373342 E-mail: 1150826229@qq.com

通讯作者: 张亮 E-mail: zhangliang6320@sina.com

vascular endothelial growth factor(VEGF) mRNA expressions were detected by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR). **Results:** NPMSC isolated from rat nucleus pulposus could form the sunflower-like colonies and exhibit clone-like growth. NPMSC of third passage became homogeneous and exhibited spindle-like morphology. Meanwhile, high expression levels of stem cell-related positive antigen molecules(CD73, CD90, CD105) and low expression levels of negative antigen molecules (CD45, CD11b) were observed. Moreover, NPMSC expressed comparable stem cell-related genes (Sox2, Oct-4, Nanog) with bone marrow mesenchymal stem cells. Simvastatin in a certain range of concentration (0.01 μ mol/L-0.1 μ mol/L) significantly promoted proliferation and secretion(HIF-1 α , GLUT-1, VEGF) functions($P<0.05$). Simvastatin at 0.1 μ mol/L concentration reached the maximum effects on the proliferation and secretion functions of NPMSC ($P<0.05$), while simvastatin at 1 μ mol/L concentration showed proliferation and secretion functions($P<0.05$). Simvastatin promoted the mRNA expression of type II collagen and aggrecan, in which 0.1 μ mol/L concentration reached the maximum effects. **Conclusions:** NPMSCs can be isolated and cultured from the nucleus pulposus of rats, and the cells had the expression of common dry transcription factors. Simvastatin at a certain concentration(0.01 μ mol/L-0.1 μ mol/L) could improve proliferation capability and promote mRNA expressions of collagen type II and aggrecan of NPMSC.

[Key words] Simvastatin; Intervertebral disc degeneration; HIF-1 α ; Nucleus pulposus mesenchymal stem cells; Proliferation; Secretion; Rat

[Author's address] Medical College of Yangzhou University, Yangzhou, 225001, China

目前临床上针对退变性椎间盘疾病的治疗主要为保守治疗和手术治疗,但目前治疗仅能缓解临床症状,无法阻止椎间盘退变的发生与进展^[1]。近年来,利用细胞生物学治疗修复受损椎间盘成为研究热点,并能够在一定程度上修复退变椎间盘组织^[2,3]。2007年,Risbud等^[4]首次证实退变的椎间盘中存在椎间盘内源性干细胞。椎间盘是人体内最大的无血管组织,其内的椎间盘细胞处于一个低氧甚至无氧的微环境中^[5],缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor,HIF)是细胞低氧信号传导的一个主要转录因子,参与多种间充质干细胞的增殖、凋亡等生理病理过程,其下游基因多达上百种,包括葡萄糖转运蛋白1(glucose transporter 1,GLUT-1)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)等^[6]。在退变的椎间盘中,椎间盘内源性干细胞中HIF表达低下,不能及时启动分化及增殖,因此通过激活退变椎间盘中的内源性干细胞来修复并重建退变的椎间盘,有望成为干细胞治疗椎间盘退变性疾病新的方向^[7,8]。近年来辛伐他汀的临床应用范围被不断扩大,研究^[9,10]发现其可能通过刺激HIF表达,对髓核细胞及多种间充质干细胞的增殖、分化及分泌功能有促进作用,可能用于阻止甚至逆转椎间盘退变进程。本研究旨在观察不同浓度的辛伐他汀对大鼠髓核间充质干细胞(nucleus pulposus mesenchymal stem cells,NPMSC)增殖及分泌功

能的影响,并探讨HIF-1 α 、GLUT-1及VEGF在其中的可能作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及器械

清洁级SD大鼠6只(8周龄),雌雄不限,体重(200 $\pm$ 30)g;Ⅱ型胶原酶、磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline,PBS)、噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)(均为Sigma,美国);DMEM/F12培养基(Hyclone,美国);胰蛋白酶(Solaiibo,美国);胎牛血清(Gibco,美国);Trizol试剂(Invitrogen,美国);荧光标记抗大鼠抗体CD105-PE、CD90-FITC、CD73-FITC、CD45-PE、CD11b-PE(eBioscience,美国);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)作为标准化内参;SD大鼠骨髓间充质干细胞(广州赛业生物);RT-PCR引物(上海吉凯生物);CCK8试剂盒(Sigma,美国);培养瓶、6孔及96孔培养板(Corning,美国);Real time PCR仪(Applied Biosystem,美国);荧光显微镜(Olympus,日本);FC500流式细胞仪(Beckman Coulter,美国)。

1.2 NPMSC的分离及培养

无菌条件下从SD大鼠尾椎椎间盘中分离髓核组织,0.2%Ⅱ型胶原酶消化,PBS洗涤,离心,再次洗涤后0.25%的胰蛋白酶消化,边消化边观察,

待细胞团块基本散开后加入含 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 完全培养基终止消化,再次离心,收集细胞。完全培养基重悬后接种至底面积 25cm² 培养瓶,于 37℃、5%CO₂ 恒温箱中培养。每 2~3d 换液,通过倒置显微镜观察细胞生长情况,待细胞铺满瓶底 80%~90% 后胰酶消化传代培养,传至第 3 代备用。

1.3 NPMSC 增殖曲线测定

取 P3 代细胞接种于 96 孔培养板(密度为 1×10^3 个/孔),置于培养箱中培养。接种后 1~10d 分别加入 5mg/ml 的 MTT 溶液 20 μ l,37℃ 孵育 4h,吸去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定各时间点、各孔在 492nm 波长的光密度 OD 值。

1.4 流式细胞仪检测 NPMSC 免疫表型

P3 代 NPMSC 胰酶消化后,调整细胞浓度为 1×10^5 /ml,每管取 1ml 细胞悬液,PBS 洗涤 2 次后弃上清用于标记。每管共 100 μ l 细胞悬液,每管细胞均设同型对照(其内加入 IgG1-PE 抗体),其余管中分别加入荧光单克隆抗体 CD105、CD90、CD73、CD45 及 CD11b,将每管标本与抗体混匀后室温避光孵育 30min,PBS 洗涤后弃上清重悬于 500 μ l PBS(含 1% 多聚甲醛)后上机检测。根据同型对照管的荧光强度设定阴性细胞群,并计算 NPMSC 每种单抗的阳性细胞表达率及荧光强度。

1.5 NPMSC 干细胞相关转录因子测定

P3 代 NPMSC 胰酶消化后提取 RNA,取 5 μ l RNA 反转录得到 cDNA 产物,RT-PCR 检测转录因子 Sox2、Nanog 及 Oct-4 的 mRNA 表达情况,并将 mRNA 表达水平与 SD 大鼠骨髓间充质干细胞进行对比。扩增 β -actin 作为内参对照。RT-PCR 反应步骤:95℃ 20s,95℃ 5s,60℃ 20s,重复 40 个循环,每次循环读取 Ct(cycle threshold)值,重复 3 组。所得各组 Ct 值用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示计算各靶基因相对表达水平。

1.6 实验分组

按 Hatano 法^[1]配置辛伐他汀溶液。将鉴定后的 P3 代 NPMSC 收集,用完全培养基重悬后充分吹打,在 4 个 15ml 离心管中加入等量细胞悬液,然后分别加入不同浓度的辛伐他汀溶液:空白对照组,辛伐他汀 0 μ mol/L;低浓度组,辛伐他汀 0.01 μ mol/L;中浓度组,辛伐他汀 0.1 μ mol/L;高浓度组,辛伐他汀 1 μ mol/L。分别于干预 1d、3d、7d、

14d、21d 后行相关检测。

1.7 细胞活力检测

按 CCK-8 试剂盒说明书进行相关操作:取大鼠 P3 代 NPMSC 以 1×10^4 /ml 密度分别接种于 96 孔板中,根据实验分组施加不同浓度辛伐他汀药物干预,每孔 100 μ l,每组设 5 个复孔。干预后 1d、3d、7d、14d、21d 各组加入 10 μ l CCK-8 溶液,同时设置阴性对照组(无 NPMSC,仅添加相应量培养基、药物及 CCK-8 溶液)。在 37℃ 细胞培养箱中避光孵育 3h 后,利用酶标仪测量 450nm 处吸光度值(OD 值),计算细胞活力[细胞活力=(处理组 OD-空白组 OD)/(对照组 OD-空白组 OD)×100%]。

1.8 RT-PCR 检测辛伐他汀干预后相关因子 mRNA 表达情况

P3 代 NPMSC 施加不同浓度辛伐他汀达到干预时间后,RT-PCR 检测各组 II 型胶原、蛋白多糖、缺氧诱导因子 1 α 、葡萄糖转运蛋白 1 及血管内皮生长因子的引物基因序列(表 1)。

1.9 统计学处理

实验数据采用 SPSS 18.0 进行分析与处理,计量资料均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计学分析多组样本比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),两组间比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态、细胞增殖及细胞鉴定结果

原代细胞接种 72h 后开始贴壁,贴壁细胞早期可形成葵花样细胞集落,克隆样生长,5~7d 后贴壁细胞逐渐增多,增殖细胞从岛状的细胞集落

表 1 引物序列

Table 1 The primer sequence

名称 Name	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')
II 型胶原 Collagen type II	F: AAGAAGCACATCTGTTTGGGA R: CAGTGGACAGTAGACGGAGGA
蛋白多糖 Aggrecan	F: CGAGAATCAAATGGAGCCG R: CACAACACCTTTCACACAGAC
缺氧诱导因子 1 α HIF-1 α	F: GATTCTTCGCTTCTGTGTCTT R: GATTCTTCGCTTCTGTGTCTTC
葡萄糖转运蛋白 1 GLUT-1	F: ATCAAACATGGAACACCGCTAT R: AACCCATAAGCACGGCAGAC
血管内皮生长因子 VEGF	F: ATCAAACATGGAACACCGCTAT R: AACCCATAAGCACGGCAGAC
标准化内参 GAPDH	F: TGACTTCAACAGCGACACCCA R: CACCCTGTTGCTGTAGCCAAA

分化而来,细胞核类圆形,分界清楚,核仁明显,胞浆较淡;培养 4 周后细胞达到 80%~90%左右融合。传代后细胞生长较原代培养时明显加快,细胞形态以纺锤形为主,有少量多角形及梭形,2 周左右细胞即可融合。第 3 代细胞形态基本保持一致为纺锤样长梭形(图 1)。

MTT 分析结果显示,NPMSC 原代细胞接种后 3d 处于慢速增殖期,后逐渐转化至对数生长期(第 5~7 天),此后增殖速度减慢呈现为 S 形增殖曲线(图 2)。

流式细胞仪免疫表型鉴定结果:NPMSC 高表达间充质干细胞相关阳性表面抗原分子 CD105(97.5%)、CD90(98.6%)及 CD73(97.8%),低表达干细胞相关阴性表面抗原分子 CD45 及 CD11b/c。

RT-PCR 干细胞相关基因测定结果:转录因子 Sox2、Nanog 及 Oct-4 基因是干细胞干性维持

基因片段。NPMSC 与骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells,BMMSC)中转录因子 Sox2、Nanog 及 Oct-4 表达量比较,两者无统计学差异(表 2)。表明培养的 NPMSC 细胞属于干细胞,且能够表达干细胞干性维持的关键基因。

2.2 NPMSC 施加不同浓度辛伐他汀后细胞活力检测

与空白对照组比较,施加辛伐他汀刺激后,低浓度组及中浓度组 NPMSC 的增殖活性明显增加($P<0.05$),其中中浓度组 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 对 NPMSC 的增殖促进作用达到最强,与其他浓度组比较差异有统计学差异($P<0.05$);而高浓度组对 NPMSC 增殖能力有明显抑制作用(表 3)。

2.3 NPMSC 施加不同浓度辛伐他汀后相关基因 mRNA 表达情况

RT-PCR 结果显示,未施加辛伐他汀干预时,NPMSC 本身不表达 II 型胶原及蛋白多糖 mRNA,

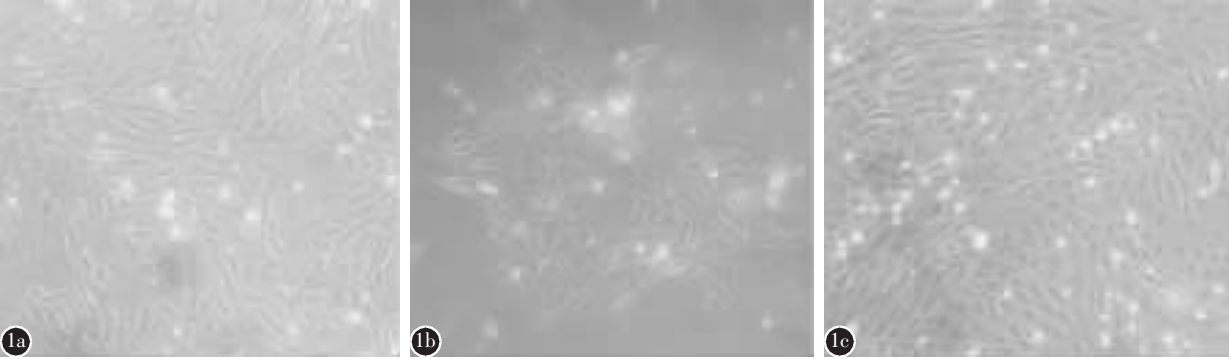


图 1 髓核间充质干细胞形态学观察(倒置相差显微镜 $\times 100$) a 原代细胞贴壁后早期可形成葵花样细胞集落,克隆样生长 b 原代细胞传代后细胞形态以纺锤形为主 c 第 3 代细胞形态基本保持一致为纺锤样长梭形

Figure 1 The cell morphology of primary and passage NPMSC ($\times 100$) a The primary NPMSC form the sunflower-like colonies and exhibit clone-like growth light microscope b Morphology of passaged NPMSC exhibited mainly spindle-like c Morphology of third passage NPMSC became homogeneous and exhibited spindle-like morphology

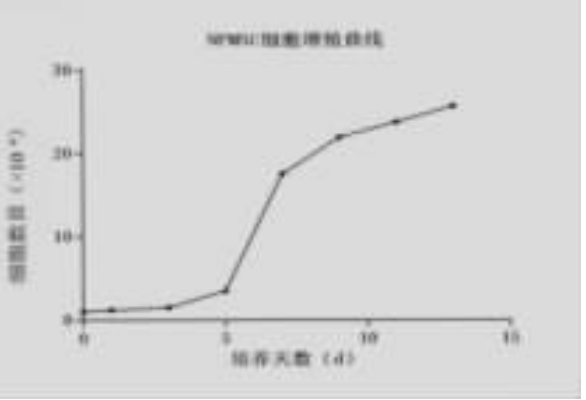


图 2 MTT 法检测 NPMSC 增殖曲线
Figure 2 Growth curve of NPMSC MTT method

表 2 NPMSC 与 BMMSC 的转录因子 Sox-2、Nanog 和 Oct-4 表达量

Table 2 Comparison of stem cell-related transcription factor(Sox2, Oct-4 and Nanog) expression between NPMSC and BMMSC			
	转录因子 Sox-2 transcription factor Sox-2	转录因子 Nanog transcription factor Nanog	转录因子 Oct-4 transcription factor Oct-4
髓核间充质干细胞 NPMSC	1.41 $\pm$ 0.16	1.40 $\pm$ 0.27	1.38 $\pm$ 0.36
骨髓间充质干细胞 BMMSC	1.00 $\pm$ 0.06 ^①	1.00 $\pm$ 0.06 ^①	1.00 $\pm$ 0.07 ^①

注:①与髓核间充质干细胞比较, $P>0.05$
Note: ①Compared with NPMSC group, $P>0.05$

表 3 NPMSC 不同浓度辛伐他汀作用下时间-细胞活力百分比

Table 3 Comparison of NPMSCs viability(%) with different concentrations of simvastatin

培养时间 Cultivated time	空白组 Control group	低浓度组 Low dose group	中浓度组 Medium dose group	高浓度组 High dose group
1	100.0±0.0	102.0±1.3	104.0±0.9	96.0±1.1
3d	100.0±0.0	105.0±1.4	112.0±1.1	82.0±0.7
7d	100.0±0.0	110.0±1.5	123.0±1.8	78.0±0.8
14d	100.0±0.0	107.0±1.8	116.0±1.7	69.0±0.8
21d	100.0±0.0	101.0±1.9	107.0±1.5	64.0±0.7

辛伐他汀干预后可使 NPMSC 中出现 II 型胶原及蛋白多糖 mRNA 表达,且对两者表达均有促进作用。各个时间点上 0.1 μ mol/L 中浓度组表达量均高于 0.01 μ mol/L 低浓度组及和 1 μ mol/L 高浓度组 ($P<0.05$)。NPMSC 中存在 HIF-1 α 、VEGF 及 GLUT-1 的 mRNA 表达,HIF-1 α 表达在辛伐他汀干预后 7d 达到高峰,VEGF 及 GLUT-1 的 mRNA 表达在干预后 14d 时达到高峰,各个时间点上 0.1 μ mol/L 中浓度组表达量均高于 0.01 μ mol/L 低浓度组及和 1 μ mol/L 高浓度组且差异有统计学意义(表 4)。

3 讨论

目前越来越多的证据证明大多数成体组织自身存在干细胞巢,在椎间盘不同部位均证实有髓核间充质干细胞的存在,并已成功进行体外扩增培养^[12,13]。髓核是椎间盘中重要组成部分,其内有丰富的 II 型胶原及蛋白多糖表达,具有缓冲压力的作用,髓核的退变可能是整个椎间盘退变的始动因素^[14]。因此,通过诱导 NPMSC 的生物学活性修复重建退变椎间盘的功能可能是今后椎间盘退变性疾病生物学治疗的方向^[7,8,15]。本研究从 SD 大鼠髓核组织中分离培养的 NPMSC 有贴壁生长特性,传至第 3 代时细胞形态主要以纺锤样长梭形为主,从形态学及生长特性上具备间充质干细胞的特点;同时流式细胞仪检测发现 NPMSC 强阳性表达 MSC 的表面标志 CD73、CD90 及 CD105,而几乎阴性表达造血干细胞表面标志物 CD45 及 CD11b;RT-PCR 发现细胞可表达与骨髓间充质干细胞相同的转录因子 Sox-2、Nanog 及 Oct-4。表明研究所分离培养的细胞为髓核自身干细胞即髓核间充质干细胞。

他汀类药物是经典的降脂药物,除具有降脂作用外,还可通过增加干细胞数量及强化干细胞功能等多方面增强干细胞的治疗作用,其主要作用是抑制 3 羟-3 甲基戊二酸单酰辅酶 A (HMG-CoA)还原酶活性^[9,16]。陈建梅等^[17]研究发现辛伐他汀在一定浓度范围内对骨髓间充质干细胞的增殖及分泌功能有促进作用,其机制可能与 Akt 信号通路有关。Zanette 等^[9]同样证实高浓度的辛伐他汀(1 μ mol/L 及 5 μ mol/L)对胎盘及骨髓间充质干细胞的增殖呈剂量依赖性抑制作用。邹立学等^[10]的研究发现<0.4 μ mol/L 的辛伐他汀对兔髓核细胞活力无明显影响,但可促进细胞 II 型胶原及蛋白多糖的表达。本研究以不同浓度的辛伐他汀干预第 3 代 NPMSC,发现 0.1 μ mol/L 中浓度组及 0.01 μ mol/L 低浓度组的辛伐他汀可显著增强 NPMSC 的增殖能力,同时可促进 NPMSC 表达髓核细胞的细胞外基质成分如蛋白多糖及 II 型胶原 mRNA,且在一定程度上呈剂量及时间依赖关系,在中等浓度 0.1 μ mol/L 时达到最强,且对蛋白多糖及 II 型胶原 mRNA 表达的促进作用随干预时间延长而增强。然而高浓度的辛伐他汀对细胞增殖呈抑制作用,可能与过高浓度辛伐他汀的细胞毒性作用有关。蛋白多糖及 II 型胶原作为髓核细胞重要的组成部分,能够分泌该类细胞外基质是髓核细胞及软骨细胞的特有功能,因此辛伐他汀可能有助于 NPMSC 向髓核细胞分化并分泌相应的细胞外基质,在一定程度及范围内呈剂量及时间依赖性关系。

研究发现脂肪、骨髓、脐带及黄韧带等多种来源的间质干细胞在低氧及其他细胞因子作用下可向髓核细胞分化^[19-21],而 HIF-1 α 作为细胞适应低氧的重要转录调节因子,在细胞正常增殖分化及凋亡的相关基因表达中具有重要作用。Cui 等^[21]的研究发现局部应用辛伐他汀可通过促进 HIF-1 α 及骨形态蛋白 2 表达来诱导骨髓间充质干细胞及内皮祖细胞的迁移和归巢,从而促进骨缺损修复。持续的葡萄糖供应是细胞增殖及分泌细胞外基质的关键。Park 等^[6]的研究发现低氧时脂肪来源间充质干细胞通过 HIF-1 α 介导的 GLUT-1 及 GLUT-3 表达上调实现增加糖摄入。Li 等^[22]进一步研究证实,与脂肪来源间充质干细胞比较,NPMSC 通过 HIF-1 α 介导的 GLUT-1 及 VEGF 表达上调实现更好地促进细胞增殖及分化功能。

表 4 NPMSC 在不同浓度辛伐他汀作用下相关基因的相对表达情况
Table 4 The expression of NPMSC-related genes(Collgen type II, Aggrecan, HIF-1α, GLUT-1, VEGF)

		1d	3d	7d	14d	21d
蛋白多糖 Aggrecan	空白组 Control group	0.91±0.02	0.94±0.03	1.10±0.01	1.12±0.13	1.15±0.02
	低浓度组 Low dose group	1.12±0.03	2.93±0.05	4.16±0.32	6.12±0.42	13.96±0.76
	中浓度组 Medium dose group	1.10±0.01	3.26±0.12 ^①	9.56±0.38 ^①	16.54±0.67 ^①	27.61±0.98 ^①
	高浓度组 High dose group	1.27±0.02	1.32±0.02 ^②	1.35±0.02 ^②	2.17±0.32 ^②	4.52±0.12 ^②
Ⅱ型胶原 Collgen type II	空白组 Control group	0.92±0.03	0.98±0.02	0.95±0.06	1.15±0.12	1.17±0.02
	低浓度组 Low dose group	1.16±0.02	2.13±0.10	7.85±0.45	12.56±0.87	16.34±0.33
	中浓度组 Medium dose group	0.99±0.01	3.16±0.23 ^①	11.63±0.25 ^①	25.51±0.94 ^①	32.64±1.23 ^①
	高浓度组 High dose group	1.13±0.04	1.10±0.02 ^②	1.14±0.11 ^②	1.16±0.08 ^②	1.20±0.08 ^②
缺氧诱导因子 1α HIF-1α	空白组 Control group	1.10±0.03	0.98±0.01	0.94±0.21	0.95±0.01	1.12±0.06
	低浓度组 Low dose group	1.20±0.02	2.34±0.15	6.16±0.44	4.18±0.27	3.96±0.24
	中浓度组 Medium dose group	1.11±0.01	2.56±0.18	17.65±0.86 ^①	9.86±0.54 ^①	7.64±0.47 ^①
	高浓度组 High dose group	1.23±0.05	2.12±0.09 ^②	1.96±0.04 ^②	1.88±0.35 ^②	1.84±0.21 ^②
葡萄糖转运蛋白 1 GLUT-1	空白组 Control group	0.96±0.01	1.16±0.04	1.18±0.02	1.14±0.08	0.89±0.09
	低浓度组 Low dose group	0.99±0.02	1.13±0.03	1.42±0.09	14.96±0.65	8.64±0.23
	中浓度组 Medium dose group	0.87±0.03	1.10±0.01	2.51±0.16 ^①	26.54±0.70 ^①	17.62±0.65 ^①
	高浓度组 High dose group	0.94±0.05	0.98±0.02	1.16±0.03 ^②	2.01±0.02 ^②	2.12±0.14 ^②
血管内皮生长因子 VEGF	空白组 Control group	1.92±0.05	1.12±0.12	1.17±0.02	1.21±0.09	1.32±0.02
	低浓度组 Low dose group	1.62±0.08	1.76±0.22	6.25±0.52	12.34±0.88	8.56±0.46
	中浓度组 Medium dose group	1.96±0.07	2.34±0.31 ^①	8.34±0.73 ^①	14.81±0.87 ^①	10.56±0.83 ^①
	高浓度组 High dose group	1.54±0.10	1.65±0.02	2.64±0.18 ^②	7.65±0.65 ^②	4.95±0.49 ^②

注:①与低浓度组比较, $P<0.05$; ②与中浓度组比较, $P<0.05$
Note: ①Compared with low dose group, $P<0.05$; ②Compared with medium dose group, $P<0.05$

VEGF是 HIF-1 的重要靶基因,同时也是目前所知的作用最强的血管生成刺激因子,可促进大鼠间充质干细胞增殖,且能提高间充质干细胞移植治疗缺血性疾病的疗效^[23-25]。陈建梅等^[16]研究发现辛伐他汀可能通过上调 VEGF 表达来增强骨髓间充质干细胞的增殖作用及促进细胞分泌功能。同时 Tamama 等^[26]研究结果表明 VEGF 可促进低氧状态下骨髓间充质干细胞增殖和分泌生长因子。本研究发现在辛伐他汀刺激下,NPMSC 中 HIF-1α、VEGF 及 GLUT-1 的 mRNA 表达增多,在辛伐他汀干预后 7d HIF-1α 的 mRNA 表达达到高峰,而 GLUT-1 及 VEGF 的表达在干预后 7d 开始

迅速增加,14d 达到高峰,结合既往文献报道, GLUT-1 及 VEGF 是 HIF-1α 重要的下游因子,因此合适浓度的辛伐他汀可能通过 HIF-1α 介导的信号通路,即通过调控 HIF-1α 表达来实现对 VEGF 及 GLUT-1 表达的调控,从而促进 NPMSC 的增殖活性;同时,辛伐他汀可以使得 NPMSC 中出现蛋白多糖及Ⅱ型胶原 mRNA 的表达,在 HIF-1α 表达达到高峰期时开始出现,且持续到干预后 21d,说明辛伐他汀可以促进 NPMSC 向髓核细胞分化,同时分泌髓核细胞的细胞外基质。
综上,本实验通过体外分离培养获得大鼠髓核间充质干细胞,并施加不同浓度辛伐他汀刺激,

发现合适浓度的辛伐他汀可以促进髓核间充质干细胞的增殖,同时可促使髓核间充质干细胞中出现髓核细胞样的细胞外基质成分 mRNA 表达(蛋白多糖及Ⅱ型胶原),其机制可能与 HIF-1 α 信号通路有关,这为临床应用髓核间充质干细胞及辛伐他汀治疗椎间盘退变性疾病提供了新思路。但是本实验尚未在动物水平验证辛伐他汀对髓核间充质干细胞的促增殖和分泌作用,具有一定的局限性,有待进一步深入研究。

4 参考文献

- Bydon M, De la Garza-Ramos R, Macki M, et al. Lumbar fusion versus nonoperative management for treatment of discogenic low back pain: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. J Spinal Disord Tech, 2014, 27(5): 297-304.
- Tong W, Lu Z, Qin L, et al. Cell therapy for the degenerating intervertebral disc[J]. Transl Res, 2017, 181: 49-58.
- Richardson SM, Kalamegam G, Pushparaj PN, et al. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: focus on articular cartilage and intervertebral disc regeneration[J]. Methods, 2016, 99: 69-80.
- 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.
- Urban JP, Smith S, Fairbank JC. Nutrition of the intervertebral disc[J]. Spine, 2004, 29(23): 2700-2709.
- Park HS, Kim JH, Sun BK, et al. Hypoxia induces glucose uptake and metabolism of adiposederived stem cells [J]. Mol Med Rep, 2016, 14(5): 4706-4714.
- 黄泽楠, 冯新民, 王静成, 等. 辛伐他汀调控内源性干细胞进行退变椎间盘的内源性修复和重建 [J]. 中国组织工程研究, 2016, 21(5): 809-814.
- Huang Z, Zhang L, Feng X, et al. A new in vivo method to retard progression of intervertebral disc degeneration through stimulation of endogenous stem cells with simvastatin[J]. Med Hypotheses, 2017, 101: 65-66.
- Zanette DL, Lorenzi JC, Panepucci RA, et al. Simvastatin modulates mesenchymal stromal cell proliferation and gene expression[J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0120137.
- 邹立学, 郑启新, 李景峰, 等. 辛伐他汀对兔髓核细胞的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2010, 27(11): 1618-1620.
- Hatano H, Maruo A, Bolander ME, et al. Statin stimulates bone morphogenetic protein-2, aggrecan, and type 2 collagen gene expression and proteoglycan synthesis in rat chondrocytes [J]. J Orthop Sci, 2003, 8(6): 842-848.
- 时睿, 洪鑫, 王运涛, 等. 大鼠椎间盘巢源性干细胞的体外分离、培养和特性鉴别[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2015, 15(11): 1018-1025.
- 唐勇, 阳普山, 吴剑宏, 等. 人髓核间充质干细胞的分离提纯方式及生物学活性鉴定[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2015, 25(6): 533-540.
- Zhang F, Zhao X, Shen H, et al. Molecular mechanisms of cell death in intervertebral disc degeneration [J]. Int J Mol Med, 2016, 37(6): 1439-1448.
- 张亮. 髓核间质干细胞动员修复重建退变椎间盘[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(53): 8636-8637.
- Park A, Barrera-Ramirez J, Ranasinghe I, et al. Use of statins to augment progenitor cell function in preclinical and clinical studies of regenerative therapy: a systematic review [J]. Stem Cell Rev, 2016, 12(3): 327-339.
- 陈建梅, 张馥敏, 王连生, 等. 辛伐他汀对骨髓间充质干细胞增殖及分泌功能影响的研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2010, 30(1): 20-24.
- Zhang Z, Li F, Tian H, et al. Differentiation of adipose-derived stem cells toward nucleus pulposus-like cells induced by hypoxia and a three-dimensional chitosan-alginate gel scaffold in vitro[J]. Chin Med J(Engl), 2014, 127(2): 314-321.
- Ni L, Liu X, Sochacki KR, et al. Effects of hypoxia on differentiation from human placenta-derived mesenchymal stem cells to nucleus pulposus-like cells[J]. Spine J, 2014, 14(10): 2451-2458.
- Han X, Zhang Y, Li H, et al. Differentiation of human ligamentum flavum stem cells toward nucleus pulposus-like cells induced by coculture system and hypoxia[J]. Spine, 2015, 40(12): E665-674.
- Cui Y, Han X, Wang J, et al. Calvarial defect healing by recruitment of autogenous osteogenic stem cells using locally applied simvastatin[J]. Biomaterials, 2013, 34(37): 9373-9380.
- Li H, Tao Y, Liang C, et al. Influence of hypoxia in the intervertebral disc on the biological behaviors of rat adipose- and nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cells [J]. Cells tissues organs, 2013, 198(4): 266-277.
- Nishimoto-Hazuku A, Hirase T, Ide N, et al. Simvastatin stimulates vascular endothelial growth factor production by hypoxia-inducible factor-1 α upregulation in endothelial cells[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2008, 51(3): 267-273.
- 廖凤玲, 陈日玲, 姜杉, 等. Notch 信号通路对 VEGF 促大鼠间充质干细胞增殖的作用[J]. 中国实验血液学杂志, 2014, 22(4): 1068-1071.
- Pons J, Huang Y, Arakawa-Hoyt J, et al. VEGF improves survival of mesenchymal stem cells in infarcted hearts [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 376(2): 419-422.
- Tamama K, Kawasaki H, Kerpedjieva SS, et al. Differential roles of hypoxia inducible factor subunits in multipotential stromal cells under hypoxic condition [J]. J Cell Biochem, 2011, 112(3): 804-817.

(收稿日期:2017-04-28 末次修回日期:2017-07-11)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 姜雅浩)