

基础研究

氧浓度对人髓核间充质干细胞生物学特性的影响

郭长征, 李 伟, 陶 晖, 杨庆国

(安徽医科大学第一附属医院脊柱外科 230022 安徽省合肥市)

【摘要】目的:分离培养髓核来源的间充质干细胞(MSCs),比较不同氧浓度下细胞的生物学特性,探讨氧浓度对椎间盘退变机制的影响。**方法:**用胶原酶消化法从手术摘除的 4 个腰椎间盘(椎间盘 Pfirrmann 分级为 I 级或 II 级)髓核组织中分离 MSCs,体外培养、传代,观察记录细胞形态。取 P3 代细胞,用流式细胞仪对分离得到的细胞表面抗原 CD90、CD73、CD105、CD44 和 CD31、CD34、CD45 的表达情况进行检测;用成骨、成脂、成软骨培养液诱导培养细胞,分别在 21d、28d、21d 时用茜素红、油红 O、甲苯胺蓝对细胞进行染色,观察其成骨、成脂、成软骨能力。在三气培养箱的低氧条件(2% O₂、5% CO₂、37℃)和常规细胞培养箱的常氧条件(20% O₂、5% CO₂、37℃)下分别培养 P3 代细胞。通过细胞计数统计培养 1d、2d、3d、4d、5d、6d、7d、8d 时的细胞数量,比较不同氧浓度下细胞的生长曲线;使用 Architect c8000 自动生化检测仪检测培养 1d、2d、3d、4d、5d 时培养基的 pH 值和渗透压。实时荧光定量(qRT-PCR)检测不同氧浓度培养下细胞的干性基因 POU 家族类别 5 同位序列 1(POU5F1、OCT4)、NANOG 同位序列(NANOG)、性别决定区 Y 盒 2(SOX2)及扩增基因细胞周期蛋白 D1(CyclinD1、CCND1)、MYC(c-Myc)、低氧诱导基因低氧诱导因子 2α(HIF2α、EPAS1)、能量基因三磷酸腺苷合成酶(ATP5A1)、线粒体相关基因细胞色素 c 氧化酶 IV 亚基 1 型同工酶(COX4I1)、线粒体转录因子 A(TFAM)、线粒体编码细胞色素 c 氧化酶 I(MT-CO1)、MT-CO2 的 mRNA 表达情况。**结果:**分离培养的细胞呈典型的单层贴壁生长,纺锤样;P3 代细胞免疫表型鉴定显示 MSCs 表面分子标记高表达 CD90(80.4%)、CD73(99.9%)、CD105(99.8%)、CD44(95.9%),低表达 CD31(5.3%)、CD34(4.4%)、CD45(6.8%);茜素红、油红 O 染色、甲苯胺蓝染色证实细胞可向骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞分化。根据国际干细胞治疗协会(ISCT)有关 MSCs 的判定标准,分离培养的细胞为髓核 MSCs(NPMSCs)。低氧环境下培养的细胞形态更小,更接近原始 MSCs,细胞增殖更快,低氧时倍增期为 31.22±1.98h,常氧时倍增期为 39.56±2.02h,差异有统计学意义(P<0.05)。不同氧浓度各时间点培养基的 pH 值、渗透压差异无统计学意义(P>0.05),且皆在适合细胞生存的范围。低氧培养下 POU5F1(OCT4)、NANOG、SOX2、CCND1、MYC(c-Myc)、EPAS1、ATP5A1 较常氧培养时显著性升高(P<0.05);COX4I1、TFAM、MT-CO1、MT-CO2 较常氧培养时显著性降低(P<0.05)。**结论:**低氧条件下培养有利于人 NPMSCs 的细胞形态、干性基因、增殖能力等生物学活性的维持。

【关键词】椎间盘退变;髓核间充质细胞;氧浓度;生物学特性

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2017.08.11

中图分类号:R329.2,R681.3 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2017)-08-0740-09

Biological characteristics of human nucleus pulposus mesenchymal stem cell under different oxygen concentrations/GUO Changzheng, LI Wei, TAO Hui, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2017, 27(8): 740-748

【Abstract】 Objectives: To observe the biological effects of different oxygen concentrations on human nucleus pulposus mesenchymal stem cells (NPMSCs) in vitro, and to explore the mechanism of intervertebral disc degeneration. **Methods:** MSCs obtained in this study were isolated from non-degenerative nucleus pulposus (Pfirrmann I or II) which were harvested from 4 patients with congenital scoliosis, and then were cultured and passaged in vitro. The immunophenotypes(CD90, CD73, CD105, CD44, CD31, CD34, CD45) of the third generation cells were identified by flow cytometry, and then were induced into osteogenesis, adipogenic and chondroblast cells which were identified by alizarin red, oil red O and toluidine blue staining, respectively.

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(编号:81601935);安徽省青年科学基金项目(编号:1708085QH180)

第一作者简介:男(1990-),硕士研究生,研究方向:脊柱外科

电话:(0551)62923244 E-mail:1006892843@qq.com.

通讯作者:杨庆国 E-mail:1776368817@qq.com;陶晖 E-mail:taoh19870131@163.com

Briefly, the cells should be identified by the criteria of the International Society for Cellular Therapy (ISCT). The 2% oxygen concentration was set to mimic oxygen level of intervertebral disc degeneration and 20% oxygen concentration was used as normoxic oxygen concentration and then the cells were further cultured in different oxygen concentration (2% O₂, 5% CO₂, 37°C; 20% O₂, 5% CO₂, 37°C; respectively). The morphology of the cells was observed by inverted microscope at different time points and the growth curve was analyzed by cell counting. The pH and osmotic pressure of the culture medium at each time point were measured by using the Architect c8000 automatic biochemical detector. The mRNA expression levels of stemness-related genes (POU5F1, NANOG, SOX2), proliferation-related genes (CCND1, MYC), hypoxia-induced genes (EPAS1), Energy related gene (adenosine triphosphate synthetase, ATP5A1) and mitochondria-related genes [cytochrome c oxidase IV subunit 1 isoenzyme (COX4I1), mitochondrial transcription factor A (TFAM), mitochondrial coding for cytochrome c oxidase I (MT-CO1), MT-CO2] were evaluated by QRT-PCR. **Results:** Nucleus pulposus mesenchymal stem cells (NPMSCs) grew into typical, adherent monolayer cells, with high expressions of CD90 (80.4%), CD73 (99.9%), CD105 (99.8%), CD44 (95.9%) and low expressions of CD31 (5.3%), CD34 (4.4%), CD45 (6.8%). Alizarin red staining showed deposition of large amounts of calcium nodules in NPMSCs. Oil red O staining displayed a large amount of lipid droplets deposited in cells. Chondrogenic differentiation was positive for alcian blue staining. Based on the above results, the cells obtained in this study met the criteria of ISCT and these cells were absolute mesenchymal stem cells. NPMSCs that were cultured in a hypoxic atmosphere (2% O₂) became comparatively smaller in size, with an original spindle-shaped morphology. The growth curve assays showed that the doubling time of NPMSCs at hypoxia was significantly earlier than that of cells grown at normoxia (31.22±1.98h, 39.56±2.02h, respectively, $P<0.05$). The pH and osmolality from different conditions were within limits to promote normal cell growth ($P>0.05$). The major markers of primitive stem cells, POU5F1 (Oct4), NANOG and SOX2 increased in NPMSCs grown at 2% O₂ compared with NPMSCs cultured in 20% O₂ ($P<0.05$). Under the condition of hypoxia, the proliferation-related genes CCND1 (CyclinD1) and MYC (c-Myc) significantly increased ($P<0.05$), and the hypoxia-inducible factor HIF α -related gene EPAS1 was also significantly elevated ($P<0.05$). The relative mRNA expression levels of ATP5A1 and nuclear-encoded energy-related gene, were significantly elevated under hypoxia ($P<0.05$). However, nuclear coding mitochondria-related genes, the mRNA expression levels of COX4I1 and TFAM significantly decreased ($P<0.05$) in hypoxic conditions. Still, the mRNA expression levels of MT-CO1 and MT-CO2 also significantly decreased under hypoxic conditions ($P<0.05$). **Conclusions:** Hypoxic atmosphere (2% O₂) favored a more primitive morphology, higher NPMSC proliferation rate, and better stemness-related genes expression.

[Key words] Intervertebral disc degeneration; Nucleus pulposus mesenchymal stem cell (NPMSCs); Oxygen concentrations; Biological characteristics

[Author's address] Department of Spine Surgery, the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, 230022, China

椎间盘退变是引起腰痛的主要原因,给患者带来不适和功能障碍,同时带来相当大的医疗费用支出^[1,2]。椎间盘退变当前主要的治疗方式是针对疼痛和神经功能障碍的对症治疗,而不是逆转退行过程或修复退行性椎间盘的生物学功能^[3]。干细胞因其可修复受损组织等优点已成为再生医学和临床治疗的研究热点^[4]。2007年Risbud等^[5]首次证实干细胞存在于退变的髓核内,且仍具有再生、分化能力等。然而,在椎间盘退变的过程中内源性髓核间充质干细胞(nucleus pulposus mesenchymal stem cells, NPMSCs)为何保持“静默”状

态,不向类髓核细胞分化修复退变组织,仍需深入研究。既往研究表明,椎间盘内氧浓度范围为1%~5%,椎间盘退变可能使得氧浓度变得更低^[6]。这种低氧环境是否会对NPMSCs的生物学活性产生影响?本研究拟在分离培养NPMSCs的基础上,通过体外常规培养(20% O₂、5% CO₂)及模拟椎间盘退变后低氧浓度培养(2% O₂、5% CO₂),比较不同氧浓度下细胞的形态、增殖能力、干性维持、线粒体合成功能等生物特性,探讨氧浓度对NPMSCs生物活性的影响,从而探索椎间盘退变的机理。

1 材料及方法

1.1 主要试剂及仪器

DMEM-低糖培养基、胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液(PBS)、胎牛血清(FBS)(Sigma, 美国), II 型胶原酶(Gibico, 美国), CD90-APC、CD73-APC、CD105-APC、CD44-APC、CD31-APC、CD34-APC、CD45-APC、抗体(Abcam, 美国); 间充质干细胞(MSCs)成骨、成脂、成软骨诱导培养液(stem cell, 美国); 细胞计数板(上海拜力生物科技); 0.22 μ m 的过滤网(Gibico, 美国); Trizol Reagent、实时荧光定量 PCR (Real-Time PCR) 试剂盒(Takara, 日本); 细培养瓶(Nunc Flasks Nunclon™ Δ with Filter Cap, 丹麦); 六孔板(Corning, 美国); 倒置荧光显微镜(Nikon, 日本); FC500 流式细胞仪(Beckman Coulter, 美国); 7500 定量 PCR 仪(AB, 美国); 三气培养箱(Thermo, 美国); Architect c8000 自动生化检测仪(雅培公司, 美国)。

1.2 NPMSCs 的分离培养

1.2.1 取材 本研究经医院伦理委员会批准, 所有患者均签署知情同意书。椎间盘标本来自安徽医科大学一附院脊柱外科 2016 年 7 月~12 月间 3 例男性腰椎骨折(外伤性)及 1 例女性先天性脊柱侧凸矫形患者术中摘除的融合节段的 4 个椎间盘, 根据 Pfirrmann 椎间盘退变分级系统椎间盘分级, 2 个为 I 级, 2 个为 II 级。

1.2.2 NPMSCs 分离和培养 取 4 例摘除的椎间盘标本, PBS 清洗后, 分别在无菌条件下分离并剪碎髓核组织, 并用 0.02mg/ml 的 II 型胶原酶消化, 置 37℃培养箱过夜, 用 0.22 μ m 的过滤网滤掉碎片。1200 转/min 离心 4min, 弃上清液, 收集细胞, 加入培养基吹打混匀, 将细胞分别接种于 T25cm² 的培养瓶中进行原代培养。静置培养 4~5d, 待细胞贴壁后 3d 换液 1 次, 待细胞融合达到 80%~90% 时进行消化、传代。

1.3 NPMSCs 的鉴定

1.3.1 细胞形态学观察 倒置显微镜下观察贴壁的原代细胞形态。传代后取生长良好的 P3 代细胞显微镜下拍照, 观察并记录细胞形态学特征。

1.3.2 细胞表面抗原的检测 取 P3 代细胞, 制成细胞悬液, 细胞终浓度为 1×10^5 /ml, 每管取细胞 1ml, 共 8 管, PBS 清洗后, 弃掉旧 PBS, 每管再加入 100 μ l 新 PBS, 每管分别加入荧光单克隆抗体

CD90-APC、CD73-APC、CD105-APC、CD44-APC、CD31-APC、CD34-APC、CD45-APC、不加任何抗体(阴性对照)。室温避光孵育, 20min 后用 2ml PBS 清洗后弃上清, 重复 3 次, 重悬于 400 μ l PBS(含 0.5%FBS)中, 用 FC500 流式细胞仪检测, 设定阴性细胞群, 通过 FLOW JO 软件分析每种单抗的阳性细胞表达率。

1.3.3 NPMSCs 诱导分化 (1)成骨分化: 取 P3 代细胞, 按照 3×10^3 个细胞/孔密度接种于六孔板, DMEM 培养液培养至细胞融合率达 70%~80% 左右, 吸去培养液, 加入 2ml hMSCs 成骨诱导培养液进行诱导培养。每 3~4d 更换 1 次培养液, 连续培养 21d 后茜素红染色观察。(2)成脂分化: 取 P3 代细胞, 按上述密度接种, 培养至 70%~80% 融合, 更换成脂诱导培养基, 按照说明书进行培养, 每 3~4d 换液一次, 总计诱导 28d 后用油红 O 染色观察。(3)成软骨分化: 取细胞融合率达 70%~80% 的 P3 代 NPMSCs, 消化后, 制成细胞悬液, 以 5×10^5 个/孔细胞进行微球培养, 加入 DMEM, 24h 后更换诱导培养基[含 DMEM、牛血清白蛋白、牛胰岛素、丙酮酸钠、转化生长因子- β (TGF- β)、成纤维细胞生长因子- β (β -FGF)、ITF、Vitc 和转铁蛋白], 每 2~3d 换液 1 次, 培养 21d 后行甲苯胺蓝染色对成软骨进行定性分析。

1.4 不同氧浓度下培养 NPMSCs 的生物学特性

1.4.1 细胞形态 取生长状态良好的 NPMSCs, 制成细胞悬液, 以 1.2×10^5 个/cm² 的密度接种于 T25cm² 培养瓶(共 48 瓶), 接种时吹打混匀, 保证每瓶接种数量一致, 每瓶加入培养基 5ml。接种后 24 瓶行常规培养(20% O₂, 5% CO₂), 另 24 瓶置于三气培养箱, 将三气培养箱调为低氧浓度(2% O₂, 5% CO₂), 培养 5d 后给未计数的细胞换液。接种后每天拍照观察细胞生长状态、计数, 直至第 8 天; 收集 1~5d 时的培养基, 0.22 μ m 过滤器过滤死细胞后-80℃保存。

1.4.2 增殖情况(生长曲线) 每 24h 将常氧、低氧培养的细胞各取出 3 瓶, 进行计数, 且每瓶计数时技术性重复 2 次。绘制不同条件下 NPMSCs 的生长曲线, 并计算各自倍增时间, 细胞倍增时间(PD)=[logN(t)-logN(t₀)]/log2N[N(t)为细胞传代时的细胞数量, N(t₀)为初始接种细胞的细胞密度]。

1.4.3 培养基 pH 值和渗透压测定 取出-80℃

保存的培养基,4℃解冻。使用 Architect c8000 自动生化检测仪检测各时间点培养基的 pH 值和渗透压。

1.4.4 干性、扩增、低氧诱导因子、线粒体相关基因的表达情况 取生长状态良好的 P3 代细胞,适当密度接种,接种后置于不同条件下培养,当细胞融合率达 70%~80%时取出细胞,利用 qRT-PCR 技术对上述相关基因进行定量。检测步骤如下:利用 RNA 抽提试剂 TRizol 溶液提取总 RNA,浓度测定后,使用反转录试剂盒进行 cDNA 合成。反转录体系如下:在冰上准备反转录体系,反应体系以 10μl 为例,5X PrimeScript™ RT Master Mix (Perfect Real Time);2μl,RNA: 根据所测 RNA 浓度,算出 RNA 体积,RNase Free dH₂O:(8μl-RNA 体积)。逆转录后获得的 cDNA,通过 QPCR 对于性相关基因 POU5F1 (OCT4)、NANOG、SOX2,扩增相关基因 CCND1(CyclinD1)、MYC(c-Myc),低氧诱导 HIF2α 相关基因 EPAS1,线粒体合成功能相关基因 MT-CO2、MT-CO1、ATP5A1、COX4I1、TFAM 进行扩增,管家基因 GAPDH 作内参。引物序列由 Primer 5.0 软件合成(表 1),配制反应液(冰上进行),考虑到吸取误差,配置的预混液体积至少多于反应总体积的 10%,以每孔 20μl 为例:SYBRPremix Ex TaqII 10μl、PCR 前引物 0.8μl、PCR 后引物 0.8μl、ROX Reference Dye II 0.4μl、cDNA 2μl、dH₂O 6μl。7500 定量 PCR 仪采用以下程序进行 Real Time PCR 反应:Stage 1,预变性 Repts、1,95℃、30s;Stage 2,PCR 反应 Repts、40,95℃、5s,60℃、34s。用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算目的基因的相对表达量。

1.5 数据分析

采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,分别对不同氧浓度培养条件下不同培养时间的 NPMSCs 计数、培养基 pH 值、渗透压值、基因相对表达量进行正态分布及方差齐性检验,再通过独立样本 *t* 检验进行两两比较。 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 细胞培养

分离获取的细胞原代培养约 4~5d,倒置显微镜下观察细胞呈贴壁生长、形态多为短纺锤形。培养 12~14d 细胞融汇率可达 80%~90%,可进行传

代。P1 代细胞生长较 P0 代明显增快,细胞大小较 P0 代均一,呈纺锤形,约 5~7d 细胞即可融合,P2 代及 P2 代以后的细胞形态保持均匀一致,为纺锤样梭形(图 1)。

2.2 表面抗原表达

流式细胞仪检测结果显示人 NPMSCs 表面标志高表达 CD90 (80.4%)、CD73 (99.9%)、CD105 (99.8%)、CD44(95.9%),低表达造血干细胞标志 CD31(5.3%)、CD34(4.4%)、CD45(6.8%)(图 2)。

2.3 NPMSCs 体外诱导分化

2.3.1 成骨诱导 加入成骨诱导剂 14d,细胞表面出现细小的钙化结节;随着培养时间的延长,结节逐渐增多;培养 21d,茜素红染色显示,细胞表面存在大量红染的矿化钙盐沉积(图 3)。

2.3.2 成脂诱导 加入成脂诱导剂 14d,可见胞浆中出现细小的脂滴;随着培养时间的延长,脂滴数量增多,脂滴体积增大,折光性增强;诱导 28d,油红 O 染色显示脂滴呈现红色(图 4)。

表 1 RT-PCR 的引物序列

Table 1 Primer sequences used for RT-PCR

引物名称 Primer name	产物大小 Product size (bp)	基因序列 5'-3' Sequence
NANOG 同位序列 NANOG	158	CAAAGGCAAACAACCCACTT TCTGCTGGAGGCTGAGGT
POU 家族类别 5 同位序列 1 POU5F1 (OCT4)	142	AGCGAACCAGTATCGAGAAC TTACAGAACCACACTCGCAC
性别决定区 Y 盒 2 SOX2	110	TACAGCATGTCCTACTCGCAG GAGGAAGAGGTAACACAGGG
细胞周期素 1 CCND1	116	GCCCTCGGTGTCCTACTTCAAAT AGACCTCCTCCTCGCACTTCTGT
MYC 同位序列 MYC(c-MYC)	130	CCAGAGGAGGAACGAGCTAA TTGGACGGACAGGATGTATG
低氧诱导因子 2 EPAS1	110	TGCTACGCCACCACTACCA CAGTTCCGGCAGCAGGTAGG
三磷酸腺苷合 成酶 ATP5A1	149	CCAGGGCTATGAAGCAGGTA AAAGTTGTTGACTGGCAGCA
线粒体编码细胞 色素 c 氧化酶 I MT-CO1	132	ATACCAAACGCCCTCTTCG GGGTCAAGAAGGTGGTGT
线粒体编码细胞 色素 c 氧化酶 II MT-CO2	134	CATAACAGACGAGCTCAACGA GGGCTCAATCGGGAGTA
细胞色素 c 氧 化酶 IV 亚基 1 型同工酶 COX4-1	129	GTTTCACCGCGCTCGTTATC CCTGGATGGGGTTACACCTTC
线粒体转录因子 ATFAM	83	AAGATTCCAAGAAGCTAAGGGTGA CAGAGTCAGACAGATTTTCCAGTTT
管家基因 GAPDH	114	CTCTCTGCTCCTCTGTTTCG ACGACCAAATCCGTTGACTC

2.3.3 成软骨诱导 微球培养 5d 时,肉眼可见细胞团呈乳白色微球,诱导 21d 后,肉眼见呈类球状细胞团块,经甲苯胺蓝染色,可见明显均一大片蓝色的细胞外基质(图 5)。

2.4 不同氧浓度对 NPMSCs 的生物学特性影响

2.4.1 形态比较 倒置显微镜下观察, P3 代 NPMSCs 培养 3d、5d、7d 时,低氧培养细胞较常氧培养更小更短,呈短纺锤形,接近 P0 代细胞形态(图 6)。

2.4.2 增殖能力 两组不同培养时间的细胞计数见表 3。低氧培养较常氧培养细胞增殖更快,提前进入倍增期 ($P < 0.05$),低氧培养时倍增期为

$31.22 \pm 1.98h$,常氧时倍增期为 $39.56 \pm 2.02h$,且培养第 3 天开始低氧培养下细胞数量显著多于常氧培养 ($P < 0.05$),表明低氧下细胞扩增能力更强(表 3)。

2.4.3 培养基 pH 值和渗透压 见表 4。不同氧浓度培养时,各时间点培养基的 pH 值无显著性差异 ($P > 0.05$),渗透压亦无统计学差异 ($P > 0.05$),且上述 pH 值、渗透压值均在利于细胞生长的范围波动^[7]。

2.4.4 干性基因的检测 以 GAPDH 基因作为内参基因, 20% O_2 组作为对照组,比较干性基因 POU5F1 (OCT4)、NANOG、SOX2 基因的表达,定量检测结果显示,相对于常氧组,低氧组的干性基因表达量显著升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 5)。

2.4.5 扩增相关基因及低氧诱导因子相关基因的表达 同样以 GAPDH 基因作为内参,常氧组作为对照组,低氧组作为实验组,比较扩增相关基因 CCND1 (CyclinD1)、MYC (c-Myc),低氧诱导因子 HIF1 α 相关基因 (EPAS1) 的表达情况, RT-QPCR 检测结果显示,相对于常氧组,低氧组的基因表达量显著升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 5)。

2.4.6 线粒体相关基因的表达 按上述方法,将常氧组作对照组,比较两组能量及线粒体相关基因。与线粒体生成、合成有关的基因,由两部分组成,分别为核基因编码的 ATP5A1、COX4I1、TFAM 等,线粒体编码的 MT-CO1、MT-CO2 等组成。



图 1 P3 代髓核间充质干细胞(NPMSCs):光镜下细胞形态均一,呈纺锤样梭形 ($\times 4$)

Figure 1 The third passage cultured NPMSCs from non-degenerative nucleus pulposus generally grew into typical, adherent monolayer cells, with a fibroblast-like appearance ($\times 4$)

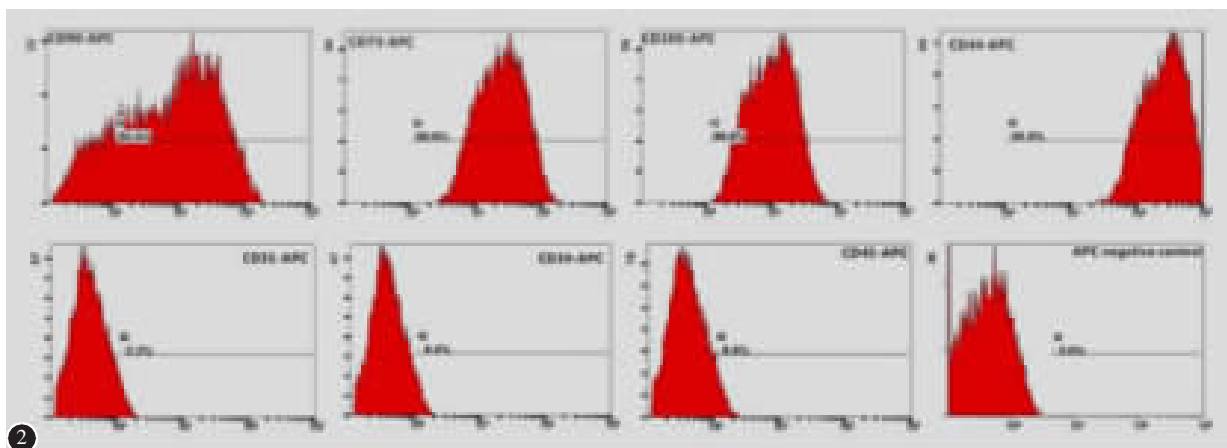


图 2 流式仪检测 P3 代间充质干细胞表面分子的表达情况:高表达 CD90、CD73、CD105、CD44 等间充质干细胞表面标志,低表达造血干细胞标志 CD31、CD34、CD45

Figure 2 Flow cytometry was used to detect surface molecule marker of mesenchymal stem cell. Third passage of non-degenerative cells were highly expressed CD90, CD73, CD105, CD44, and lowly expressed CD31, CD34, CD45

ATP5A1 为三磷酸腺苷合成酶编码基因,与 H⁺转运蛋白相关,又被誉为能量相关基因,相较于常氧组,低氧组 ATP5A1 显著升高($P<0.05$)。COX4I1、TFAM、MT-CO1、MT-CO2 等与线粒体合成、生成功能有关的基因,相对于常氧组,低氧组明显降低($P<0.05$,表 6)。

3 讨论

椎间盘是一个缺乏血管、不可再生的组织^[8]。随着年龄增长,髓核细胞形态发生改变,细胞凋亡

率和死亡率增加,细胞外基质(蛋白多糖、Ⅱ型胶原等)合成减少^[9],从而引起椎间盘退变。而随着椎间盘退变,软骨终板及外周纤维环的不断纤维化及钙化,髓核内原有的营养物质交换会进一步减少直至消失,内部氧分压变得更低,无氧酵解进一步增加,乳酸增多,从而导致椎间盘内微环境呈低氧、低营养、低 pH 值状态^[10]。Brisby 等^[11]的研究结果表明,椎间盘内干细胞可通过调节分泌作用,刺激退变的椎间盘进行内在修复。既往研究证明,退变的髓核组织存在内源性 NPMSCs^[5],那

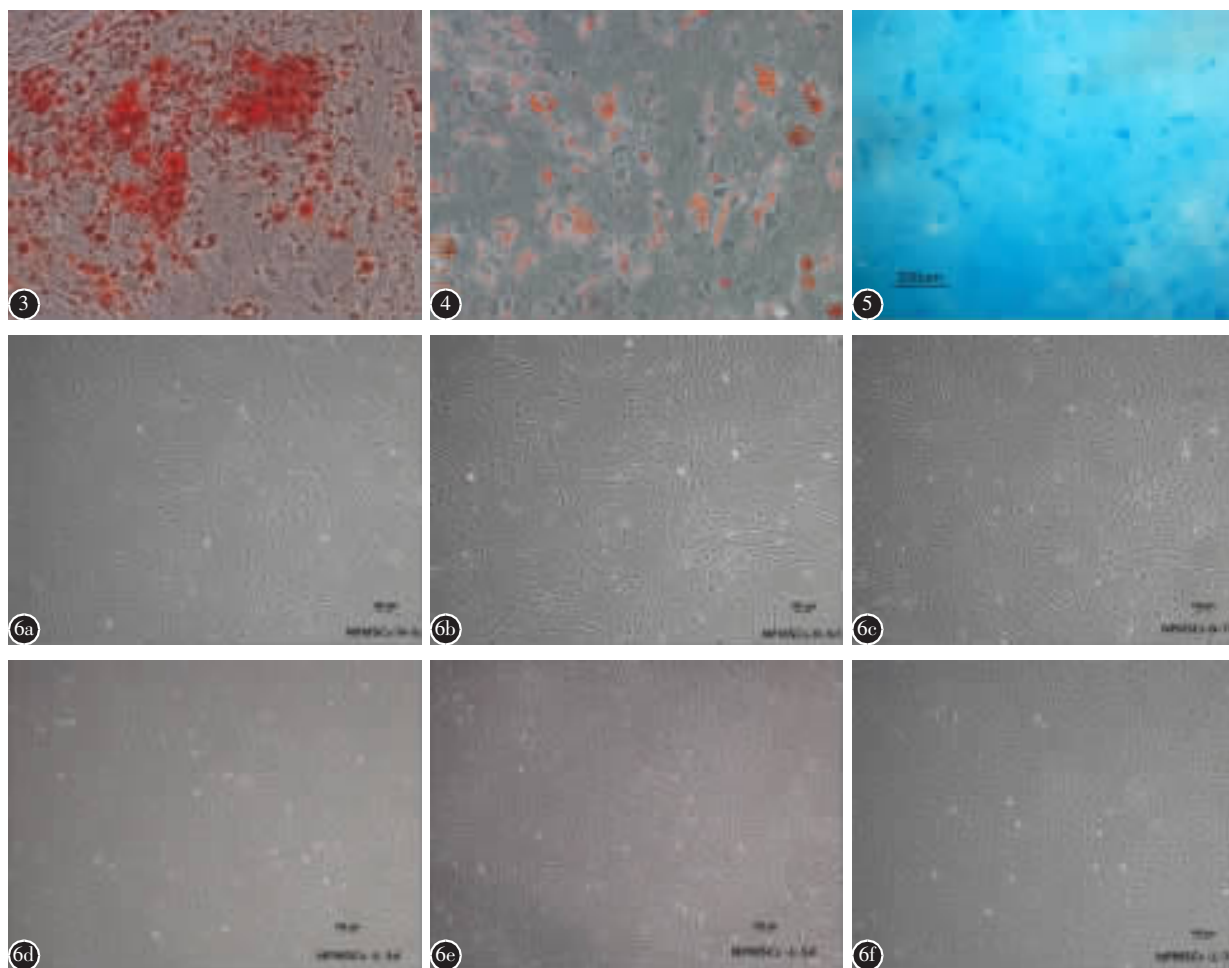


图 3 P3 代细胞成骨诱导 21d 后茜素红染色可见大量红色的钙盐沉积($\times 20$) 图 4 P3 代细胞成脂诱导分化 28d 后油红 O 染色可见细胞胞质内形成大滴红染的脂肪滴($\times 20$) 图 5 P3 代细胞成软骨诱导分化 21d 后甲苯胺蓝染色可见均一大片蓝色的细胞外基质($\times 100$) 图 6 不同氧浓度培养下各时间点的细胞形态(a、b、c 分别为低氧培养 3d、5d、7d 时的细胞形态;d、e、f 分别为常氧培养 3d、5d、7d 时的细胞形态)(倒置显微镜下)

Figure 3 Alizarin red staining showed deposition of large amounts of calcium nodules in NPMSCs after 21 days of osteogenic differentiation ($\times 20$) **Figure 4** Oil Red O staining displayed a large amount of lipid droplets deposited in NPMSCs after 28 days of adipogenic differentiation($\times 20$) **Figure 5** NPMSCs were positive for alcian blue staining after 21 days of chondrogenic differentiation($\times 100$) **Figure 6** The cell morphology of different time point was cultivated under different oxygen concentration a-c, The cell morphology of low oxygen(2% O₂) culture in 3d, 5d and 7d respectively d-f The cell morphology of normal oxygen culture in 3d, 5d and 7d respectively

么为何内源性 NPMSCs 不能分化为类髓核细胞, 从而延缓椎间盘退变呢? 目前有关退变椎间盘内微环境改变对 BMSCs 的存活、增殖及分化的影响已有大量研究, 其中氧浓度是很重要的因素^[12], 而关于微环境改变对内源性 NPMSCs 生物活性的影

表 3 不同氧浓度组髓核间充质干细胞(NPMSCs)不同培养时间的细胞数量 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 The numbers of cells in different oxygen concentrations at different time points		
	2% O ₂ 组 2% oxygen concentration	20% O ₂ 组 20% oxygen concentration
1d	1.20±0.015	1.22±0.022
2d	1.42±0.012	1.38±0.09
3d	2.54±0.023 ^①	2.03±0.031
4d	3.71±0.017 ^①	2.55±0.026
5d	4.93±0.034 ^①	3.24±0.019
6d	6.12±0.010 ^①	4.24±0.028
7d	6.94±0.026 ^①	4.93 ±0.017
8d	7.02±0.024 ^①	5.22±0.015

注: ①与 20% O₂ 组比较 $P<0.05$
Note: ①Compared with 20% oxygen concentration group, $P<0.05$

响研究较少。Blanco 等^[13]的研究发现, 人 NP-MSCs 与 BMSCs 具有相似的生物学特性。因此, 我们推测椎间盘退变后微环境的改变对 NPMSCs 的生物学活性影响可能与 BMSCs 类似。既往研究表明, 椎间盘内氧浓度在体内存在一个梯度范围, 从 1%到 5%, 在退变过程中血供减少、终板钙化等使得氧浓度可能变得更低^[6]。根据以往的研究, 一般选择 2%氧浓度作为椎间盘的缺氧条件^[14-16]。为了体外模拟椎间盘退变的氧浓度, 本研究以人椎间盘来源的 NPMSCs 作为研究对象, 观察 2%氧浓度对 NPMSCs 生物特性的影响, 从而明确椎间盘退变低氧微环境的改变是否为导致内源性 NPMSCs 在椎间盘退变过程中保持“静默”状态的原因。我们从髓核中分离培养 NPMSCs, 体外模拟低氧浓度, 并通过与常氧培养比较, 分析其对细胞的生物学影响。

本研究首先鉴定了从髓核分离培养的细胞, 结果显示: (1)该细胞可以在体外稳定传代; (2)高表达 CD90、CD73、CD105、CD44, 低表达 CD31、

表 4 不同氧浓度组髓核间充质干细胞(NPMSCs)不同培养时间的 pH 值和渗透压值 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Table 4 The pH and osmolality value in different culture point of different oxygen group

	pH 值 pH		渗透压 Osmolality	
	2% O ₂ 组 2% oxygen concentration	20% O ₂ 组 20% oxygen concentration	2% O ₂ 组 2% oxygen concentration	20% O ₂ 组 20% oxygen concentration
1d	7.45±0.043	7.43±0.021	345.02±3.70	347.28±3.27
2d	7.42±0.035	7.40±0.018	355.55±3.33	348.37±2.16
3d	7.38±0.047	7.42±0.024	352.41±2.18	346.29±3.38
4d	7.37±0.044	7.39±0.033	350.37±3.14	351.12±2.77
5d	7.35±0.039	7.38±0.015	349.23±2.76	354.33±2.98

表 5 不同组 NPMSCs 的干性基因、扩增基因及低氧诱导因子相关基因相对表达量 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 5 Relative gene expression of POU5F1 (OCT4), NANOG, SOX2, CCND1 (CyclinD1), MYC (c-Myc) and EPAS1 between different oxygen concentrations group

	2% O ₂ 组 2% oxygen concentration	20% O ₂ 组 20% oxygen concentration
POU5F1	2.050±0.025 ^①	1.004
NANOG	1.422±0.012 ^①	1.003
SOX2	1.251±0.05 ^①	1.002
CCND1	1.251±0.110 ^①	1.000
MYC	2.140±0.045 ^①	1.004
EPAS1	5.152±0.023 ^①	1.002

注: ①与 20% O₂ 组比较 $P<0.05$
Note: ①Compared with 20% oxygen concentration group, $P<0.05$

表 6 不同组 NPMSCs 的线粒体相关基因相对表达量 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 6 Relative gene expression of ATP5A1, COX4I1, TFAM, MT-CO1, MT-CO2 under different oxygen concentrations

	2% O ₂ 组 2% oxygen concentration	20% O ₂ 组 20% oxygen concentration
ATP5A1	1.702±0.04 ^①	1.000
COX4I1	0.628±0.03 ^①	1.000
TFAM	0.801±0.012 ^①	1.000
MT-CO1	0.721±0.045 ^①	1.000
MT-CO2	0.615±0.013 ^①	1.000

注: ①与 20% O₂ 组比较 $P<0.05$
Note: ①Compared with 20% oxygen concentration group, $P<0.05$

CD34、CD45; (3) 体外可以向成脂、成骨、成软骨细胞分化。与国际干细胞协会所提出的间充质干细胞的鉴定标准^[17]相符。本研究实验组氧浓度设定为 2%，对照组氧浓度设定为常规细胞培养浓度(20%)。结果发现低氧培养时，细胞形态更小更短，呈短纺锤形，更接近原始干细胞形态，即对干细胞形态维持更佳。低氧培养时可促进细胞增殖，使 NPMSCs 提前进入倍增期，且通过对干性相关基因 POU5F1、NANOG、SOX2，扩增相关基因 CCND1、MYC 等的检测证实低氧培养更利于细胞干性维持、细胞扩增。Kanichai 等^[12]的研究表明，低氧(2%)可以促进 BMSCs 增殖、细胞集落形成，本研究证实了氧浓度对 NPMSCs 与 BMSCs 的影响有相似的生物学性质。值得注意的是，Li 等^[16]通过对大鼠正常椎间盘来源的 NPMSCs 研究发现，低氧可抑制 NPMSCs 增殖，结论与以人来源的 NPMSCs 研究结果不同；但其也提到大鼠的 NPMSCs 生存力和增殖能力受到低氧的影响较小，而且本研究氧浓度对 NPMSCs 的影响的研究对象与 Li 等所选择种属不同，具体仍需进一步研究证实。此外，本研究还对其相关机制进行了探讨。既往的研究表明，低氧诱导因子 HIF2 α 是低氧的重要效应因子，可诱导缺氧应激反应相关的靶基因转录，因而在低氧时，一些胞内活动如细胞的迁移、存活、分化、凋亡、代谢等随着 HIF2 α 的改变而发生变化^[18,19]。本研究中使用 qRT-PCR 技术检测了 HIF α 相关基因 EPAS1，结果显示低氧培养的细胞 EPAS1 较常氧培养显著上调，说明低氧时细胞生物学的改变可能与低氧诱导因子相关基因的表达增高有关。佐证了 Kanichai 等^[12]的研究结果。

Chung 等^[20]的研究结果表明，未分化细胞的线粒体不成熟，间充质干细胞的线粒体符合未分化细胞的特性，即间充质干细胞为糖酵解表型细胞，胞内为不成熟线粒体。Qu 等^[21]的研究结果表明，间充质干细胞在成脂、成骨诱导分化的过程中，可出现线粒体生物合成和功能的上调。因而我们提出假设，即线粒体生物合成和功能变化是否可由氧气浓度改变而发生。本研究对线粒体生成与合成相关基因定量检测发现，除 ATP5A 外，其余相关基因 MT-CO2、MT-CO1、COX4I1、TFAM 等，在低氧培养时降低，说明常氧培养细胞时细胞的线粒体相关功能更活跃。本研究与 Turner 等^[22]

在 2% 及 20% 的氧浓度下研究胚胎干细胞线粒体功能及相关基因的结果相符。说明低氧培养时能量相关基因 ATP5A1 上调，这与低氧培养时细胞增殖较常氧更快一致。而其他与线粒体生成、合成功能相关基因均发生下调，这说明相比常氧而言，低氧培养三羧酸循环减少，糖酵解加剧。故可能随着低氧时间延长，乳酸积聚，从而加剧椎间盘内微环境的低 pH 状态。

综上所述，2% 氧浓度对 NPMSCs 的增殖具有促进作用，利于细胞干性维持，可显著改变细胞形态、增殖、干性、线粒体活动等生物学特性。在退变的椎间盘缺氧环境中，NPMSCs 表现出更大的生物学潜力。然而，退变后 NPMSCs 所存在的微环境是复杂的，呈现出低氧、低 pH 值、营养物质减少和高渗透压的特点^[9]，我们的前期研究也证实椎间盘内酸环境改变会抑制人 NPMSCs 的增殖和干细胞基因的表达^[23]。关于椎间盘退变后所导致微环境变化后的综合因素对 NPMSCs 生物学特性的影响仍需要进一步研究。

4 参考文献

1. Ciapetti G, Granchi D, Devescovi V, et al. Ex vivo observation of human intervertebral disc tissue and cells isolated from degenerated intervertebral discs[J]. Eur Spine J, 2012, 21(1): 10-19.
2. Oksuz E. Prevalence, risk factors, and preference-based health states of low back pain in a Turkish population [J]. Spine, 2006, 31(25): 968-972.
3. Blanco JF, Graciani IF, Sanchezguijo FM, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from human degenerated nucleus pulposus: comparison with bone marrow mesenchymal stromal cells from the same subjects [J]. Spine, 2010, 35(26): 2259-2265.
4. Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein LE. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011, 12(2): 126-131.
5. 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.
6. Mwale F, Ciobanu I, Giannitsios D, et al. Effect of oxygen levels on proteoglycan synthesis by intervertebral disc cells[J]. Spine, 2011, 36(2): 131-138.
7. Ludwig TE, Levenstein ME, Jones JM, et al. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions [J]. Nat Biotechnol, 2006, 24(2): 185.
8. 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.
9. Stemple DL. Structure and function of the notochord: an essential organ for chordate development[J]. *Development*, 2005, 132(11): 2503–2512.
10. Hudson K D, Alimi M, Grunert P, et al. Recent advances in biological therapies for disc degeneration: tissue engineering of the annulus fibrosus, nucleus pulposus and whole intervertebral discs[J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2013, 24(5): 872–879.
11. Brisby H, Papadimitriou N, Brantsing C, et al. The presence of local mesenchymal progenitor cells in human degenerated intervertebral discs and possibilities to influence these in vitro: a descriptive study in humans [J]. *Stem Cells Dev*, 2013, 22(5): 804–814.
12. Kanichai M, Ferguson D, Prendergast PJ, et al. Hypoxia promotes chondrogenesis in rat mesenchymal stem cells: a role for AKT and hypoxia-inducible factor(HIF)-1 alpha[J]. *J Cell Physiol*, 2008, 216(3): 708–715.
13. Blanco JF, Graciani IF, Sanchezguijo FM, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from human degenerated nucleus pulposus: comparison with bone marrow mesenchymal stromal cells from the same subjects[J]. *Spine*, 2010, 35(26): 2259–2265.
14. Risbud MV, Albert TJ, Guttapalli A, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells towards a nucleus pulposus-like phenotype in vitro: implications for cell-based transplantation therapy[J]. *Spine*, 2004, 29(23): 2627–2632.
15. Felka T, Schäfer R, Schewe B, et al. Hypoxia reduces the inhibitory effect of IL-1beta on chondrogenic differentiation of FCS-free expanded MSC[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2009, 17(10): 1368–1376.
16. 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.
17. Dominici M, Le BK, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement[J]. *Cytotherapy*, 2009, 8(4): 315–317.
18. Bakker, Walbert J, Harris, et al. FOXO3a is activated in response to hypoxic stress and inhibits HIF1-induced apoptosis via regulation of CITED2[J]. *Mol Cell*, 2007, 28(6): 941–953.
19. Beall CM, Cavalleri GL, Deng L, et al. Natural selection on EPAS1(HIF2 alpha) associated with low hemoglobin concentration in Tibetan highlanders[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(107): 11459–11464.
20. Chung S, Arrell DK, Faustino RS, et al. Glycolytic network restructuring integral to the energetics of embryonic stem cell cardiac differentiation[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 48(4): 725–734.
21. Qu X, Liu T, Song K, et al. Induced pluripotent stem cells generated from human adipose-derived stem cells using a non-viral polycistronic plasmid in feeder-free conditions.[J]. *Plos One*, 2012, 7(10): e48161.
22. Turner J, Quek LE, Titmarsh D, et al. Metabolic profiling and flux analysis of MEL-2 human embryonic stem cells during exponential growth at physiological and atmospheric oxygen concentrations[J]. *Plos One*, 2014, 9(11): e112757.
23. Liu J, Tao H, Shen C, et al. Biological behavior of human nucleus pulposus mesenchymal stem cells in response to changes in the acidic environment during intervertebral disc degeneration[J]. *Stem Cells Dev*, 2017, 26(12): 901–911.
- (收稿日期:2017-05-21 末次修回日期:2017-07-18)
(英文编审 唐翔宇/贾丹彤)
(本文编辑 卢庆霞)