

基础研究

大鼠椎间盘巢源性干细胞对退化髓核细胞作用的研究

时睿,洪鑫,王运涛,鲍军平,王锋,王小虎,谢志阳,陈露,张聪,吴小涛

(东南大学附属中大医院脊柱中心 210009 南京市)

【摘要】目的:研究大鼠椎间盘巢源性干细胞(stem cells derived from ISN, ISN-SCs)对衰老髓核细胞(nucleus pulposus cells, NPCs)的作用。**方法:**取 10 只 SD 大鼠(雄性, 10 周龄), 处死后分离获取脊柱功能单位, 显露髓核及椎间盘干细胞巢(stem cell niches of the intervertebral disc, ISN)区域, 解剖显微镜下仔细分离获取髓核和 ISN 组织, 采用 II 型胶原酶消化、细胞滤网过滤后, 将原代 ISN-SCs 和 NPCs 分别重悬于培养液, 接种于普通培养箱培养, 细胞达约 90% 融合后进行传代, 第三代(P3)NPCs 及第四代(P4)ISN-SCs 用于进一步实验。采用三系诱导分化(成骨、成软骨、成脂肪)培养液对 P4 ISN-SCs 分别进行定向诱导分化培养, 采用茜素红、钙钴染色检测其成骨分化能力, 阿利新蓝染色检测其成软骨分化能力, 油红 O 染色检测其成脂肪分化能力; 采用连续传代法, 将 P3 NPCs 连续传代, 制备 NPCs 衰老模型, 衰老相关 β -半乳糖苷酶(senescence associated- β -galactosidase, SA- β -Gal)染色法检测衰老模型的有效性。研究将细胞培养体系进一步分为正常对照组、衰老组、共培养组, 正常对照组采用 P3NPCs 接种, 衰老组采用衰老 NPCs 接种, 共培养组采用 P4 ISN-SCs 与衰老 NPCs 以 1:1 混匀后接种, 各组样本细胞总数及培养环境相同。培养 1 周后, 采用甲苯胺蓝染色检测各组蛋白聚糖表达水平, 采用免疫组化检测各组 II 型胶原蛋白表达水平, 采用实时定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)检测各组 ACAN 和 COL2a1 的 mRNA 表达水平。**结果:**在特定诱导环境下, ISN-SCs 可以定向成骨、成软骨、成脂肪分化。SA- β -Gal 染色显示连续传代后 NPCs 衰老率随着传代次数而逐渐增加, P3 NPCs 未出现明显的衰老[衰老率(3.0 $\pm$ 0.5)%], P5 NPCs 衰老率为(18.3 $\pm$ 0.7)%, P10 NPCs 达到严重衰老标准[衰老率为(86.0 $\pm$ 4.6)%]。胞外基质蛋白检测结果显示:与正常对照组相比, 衰老组的蛋白聚糖甲苯胺蓝染色明显减弱, II 型胶原免疫组化染色强度定量也显著减弱($P < 0.05$); 而接触共培养后, 与衰老组相比, 共培养组中的蛋白聚糖甲苯胺蓝染色明显增强, II 型胶原免疫组化染色强度定量显著增强($P < 0.05$)并恢复至正常水平。qPCR 结果显示:与正常对照组相比, 衰老组的 ACAN 和 COL2a1 的 mRNA 表达水平均显著性降低(分别为 1.00 $\pm$ 0.05 vs 0.43 $\pm$ 0.03, $P < 0.05$; 1.00 $\pm$ 0.03 vs 0.40 $\pm$ 0.02, $P < 0.05$); 接触共培养后, 与衰老组相比, 共培养组中 ACAN 和 COL2a1 的 mRNA 表达水平均显著性增加(分别为 0.43 $\pm$ 0.03 vs 0.99 $\pm$ 0.05, $P < 0.05$; 0.40 $\pm$ 0.02 vs 1.07 $\pm$ 0.04, $P < 0.05$), 且与正常组相比无显著性差异。**结论:**ISN-SCs 具有较好的三系分化能力, 通过接触共培养能够提高胞外基质蛋白和基因的表达水平, 对衰老 NPCs 产生良好的修复作用, 为后续 ISN-SCs 修复椎间盘的体内研究打下理论基础。

【关键词】椎间盘退变; 髓核细胞; 衰老; 修复

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2018.11.11

中图分类号: R339.4 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2018)-11-1034-09

The repair effects of ISN-SCs on senescence nucleus pulposus cells/SHI Rui, HONG Xin, WANG Yuntao, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2018, 28(10): 1034-1042

【Abstract】Objectives: To investigate the repair effects of ISN-SCs(stem cells derived from stem cell niches of intervertebral disc) on senescence NPCs(nucleus pulposus cells). **Methods:** 10 Sprague-Dawley rats(male, 10-week-old) were used for this study. The functional spinal units were isolated after the animals being

基金项目:国家自然科学基金(项目编号:81702201、81572190、81572170、81702203);江苏省自然科学基金(项目编号:BK20170701);江苏省卫生计生委医学科研基金(项目编号:H201533)

第一作者简介:男(1986-),博士研究生在读,研究方向:脊柱外科

电话:(025)83262330 E-mail:shiruisu@163.com

通讯作者:吴小涛 E-mail:wuxiaotaospine@seu.edu.cn

sacrificed. Then, the tissues of ISN (stem cell niches of the intervertebral disc) and nucleus pulposus were isolated anatomically under dissecting microscope. After being digested and filtrated, the harvested primary ISN-SCs and NPCs were resuspended, seeded and cultured under normal condition. The cells were passaged, and P4 ISN-SCs and P3 NPCs were used for further experiments. P4 ISN-SCs were cultured in specific differentiation induction medium (osteogenesis, chondrogenesis and adipogenesis) for 1 induction period before being tested. Alizarin red staining and calcium cobalt staining were used for detecting osteogenesis, alcian blue staining was used for detecting chondrogenesis, and Oil red O staining was used for detecting adipogenesis. The senescence model of NPCs was established by continuous passage, and the effectiveness of model was detected by the staining of senescence associated- β -galactosidase (SA- β -Gal). The cell culture systems were divided into 3 groups: normal control group, senescence group, and co-culture group. Treatments were set as follows P3 NPCs were seeded in the normal control group, senescence NPCs were seeded in the senescence group, and in the co-culture group, P4 ISN-SCs and senescence NPCs were mixed at the blending ratio 1:1 and seeded, total cell number and the culture environment of each specimen were the same. After being cultured for 7 days, further detections were conducted in each group, including toluidine blue staining for aggrecan, immunohistochemical staining for type II collagen, and quantitative real-time polymerase chain reaction(qPCR) for the mRNA expression level of ACAN and COL2a1, which were compared among groups. **Results:** Osteogenic, chondrogenic and adipogenic differentiation of ISN-SCs were observed under the certain induction environment respectively. SA- β -Gal staining indicated that NPCs gradually became senescence as passage increased, with no obvious senescence cells in passage 3($3.0\pm 0.5\%$), less than 20% senescence cells in passage 5($18.3\pm 0.7\%$), and more than 80% senescence cells in passage 10 ($86.0\pm 4.6\%$). When compared to the normal control group, the senescence group expressed less aggrecan and type II collagen (quantification, $P<0.05$). While after co-culturing, the co-culture group expressed more aggrecan and type II collagen (quantification, $P<0.05$) when compared to the senescence group, which was comparable to the normal control group. QPCR results showed that the mRNA expression levels of ACAN and COL2a1 in senescence group significantly decreased when compared to the normal control group (1.00 ± 0.05 vs 0.43 ± 0.03 , $P<0.05$ and 1.00 ± 0.03 vs 0.40 ± 0.02 , $P<0.05$, respectively), and that the mRNA expression levels of ACAN and COL2a1 in co-culture group were significantly increased when compared to the senescence group (0.43 ± 0.03 vs 0.99 ± 0.05 , $P<0.05$ and 0.40 ± 0.02 vs 1.07 ± 0.04 , $P<0.05$, respectively), which was comparable to the normal control group. **Conclusions:** ISN-SCs possess excellent multilineage differentiation capacities. The senescence NPCs can be remarkably repaired in co-culture model, through elevating the expression levels of extra cellular matrix protein and mRNA. ISN-SCs can be utilized for further research on the repair of intervertebral disc degeneration.

[Key words] Intervertebral disc degeneration; Nucleus pulposus cell; Senescence; Repair

[Author's address] Spine Surgery Center, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing, 210009, China

椎间盘退行性改变可引起腰腿痛、感觉障碍、肢体功能障碍等一系列临床症状,严重影响着患者生活质量。临床上针对该类疾病的治疗手段主要有保守治疗、微创手术、开放式手术等。然而,以上措施均无法对退变的椎间盘组织进行修复。目前,基于干细胞的椎间盘退变生物学治疗逐渐受到重视,已有相关研究^[1-3]在外源性干细胞移植修复研究领域取得了较大的进展和早期临床应用,但仍存在诸如移植性创伤、外源性干细胞移植存活率低、修复效果有限等缺陷。近年来,再生医学研究领域中,组织内源性修复研究逐渐受到重视,

并在许多专业学科方面得到了深入的研究和应用;促进组织内源性干细胞(干细胞巢内)靶向迁移、增殖和定向分化,进而产生自我修复效应,是其重要机制之一^[4-6]。而正常的椎间盘组织由于其无血管的组织学特性及骨性终板屏障的作用,体循环和骨髓中的内源性干细胞很难充分到达椎间盘内部,在一定程度上限制了基于干细胞迁移的椎间盘组织内源性修复的深入研究。随着椎间盘干细胞巢(stem cell niches of the intervertebral disc, ISN)的发现及巢源性干细胞(stem cells derived from ISN, ISN-SCs)迁移理论的提出^[7],椎

间盘内源性修复逐渐受到重视。目前已有研究对 ISN-SCs 进行了体内迁移观察^[8-10]和体外分离、培养及鉴定^[11,12]。然而,迁移至椎间盘内部的 ISN-SCs 对椎间盘的修复效果尚缺乏证据支持。鉴于椎间盘退变的核心机制之一是髓核细胞(nucleus pulposus cells,NPCs)的衰老性改变,且 ISN-SCs 迁移路径最终到达髓核部分,与 NPCs 接触产生生物学效应。本研究采用体外细胞接触共培养模型,旨在从 ISN-SCs 对衰老 NPCs 的体外修复作用方面进行鉴定,明确其潜在的椎间盘修复效应,从而为后续相关的体内修复研究打下研究基础,为椎间盘内源性修复奠定理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物、试剂、仪器

SD(Sprague Dawley)大鼠 10 只(雄性,10 周龄);培养基(DMEM/F12,1:1,Gibco);胎牛血清(HyClone);青-链霉素(Gibco);胰酶/EDTA(Gibco);S-D 大鼠三系分化培养液(赛业);碱性磷酸酶钙钴染色试剂盒(凯基);细胞衰老 β -半乳糖苷酶(SA- β -Gal)染色试剂盒(碧云天);甲苯胺蓝染液(贝斯特);DAPI 染色试剂盒(凯基);Collagen2 抗体(凯基);TRIzol 试剂盒(Invitrogen);cDNA 第一链合成试剂盒(Thermo Fisher);Real time PCR Master Mix(TOYOBO);倒置显微镜(Olympus);解剖显微镜(Leica);超净工作台(苏州净化);CO₂ 培养箱(SANYO);梯度 PCR 仪(ABI 公司);引物序列设计采用 Primer Premier 5.0 软件,并由南京金瑞斯科技有限公司合成。

1.2 ISN-SCs 和 NPCs 的分离和培养

按照相关文献^[11-14]的方法,对 ISN-SCs 和 NPCs 进行分离、培养。取 10 只实验大鼠,采用过量的 10%水合氯醛(3ml/100g)腹腔内注射处死大鼠后,分离脊柱功能单位(包括椎体及附件、椎间盘),仔细去除其附着的软组织,分离椎间盘结构(纤维环、髓核、软骨终板),显露出 ISN 区域(骶板外周软骨膜部分,椎体第二骨化中心以下 500 μ m,宽约 100 μ m),解剖显微镜下以手术刀片仔细分离 ISN 组织,将获取的髓核组织和 ISN 组织分别采用 II 型胶原酶溶液消化(0.15% II, 37 $^{\circ}$ C, 6h),采用 70 μ m 孔径细胞滤网进行过滤后,进行离心处理(1000r/min, 5min),将原代 ISN-SCs 和 NPCs 分别重悬于培养液并接种培养;细胞达

约 90%融合后进行传代,第四代(P4)ISN-SCs 及第三代(P3)NPCs 用于后续实验。

另取部分 P4 ISN-SCs 进行三系分化能力鉴定。(1)成骨分化:细胞接种于含普通培养液的培养板,贴壁后更换为 SD 大鼠间充质干细胞成骨分化培养液,进行为期 3 周的诱导分化周期,期间每 3d 更换一次分化培养液;诱导结束后进行茜素红染色、钙钴染色,并于倒置显微镜下观察;(2)成软骨分化:细胞接种于含普通培养液的培养板,贴壁后更换为 SD 大鼠间充质干细胞成软骨分化培养液,进行为期 3 周的诱导分化周期,期间每 3d 更换一次分化培养液,诱导结束后进行阿利新蓝染色,并于倒置显微镜下观察;(3)成脂肪分化:细胞接种于含普通培养液的培养板,贴壁后更换为 SD 大鼠间充质干细胞成脂肪分化培养液,3d 后更换为维持培养液 1d,此为一个循环周期(3d 诱导,1d 维持),待 4 个周期结束后,继续在维持培养液中培养 1 周后进行油红 O 染色,并于倒置显微镜下观察。

1.3 NPCs 衰老模型的制备及鉴定

采用连续传代的方法,制备 NPCs 复制性衰老模型。将 P3 NPCs 进行连续传代后,每代取样进行衰老相关 β -半乳糖苷酶(senescence associated- β -galactosidase,SA- β -Gal)染色,检测细胞衰老情况及衰老模型的有效性。配制染色工作液(临用前现配),细胞样本经 PBS 洗涤、SA- β -Gal 染色固定液固定、再次 PBS 洗涤后,加入染色工作液后 37 $^{\circ}$ C 下孵育过夜,倒置显微镜下拍照并观察计数;每样本随机取 3 个视野进行染色计数,计数染色阳性细胞(蓝色深染),衰老细胞百分比=(每个视野下染色阳性细胞/视野下总细胞数) $\times$ 100%;当衰老细胞百分比恒定且 >80%时,定义为严重衰老,并将此代次的细胞作为有效的 NPCs 衰老模型,用于后续实验。

1.4 分组及处理

根据接种细胞的不同,分为正常对照组、衰老组、共培养组,各组处理如下:(1)正常对照组,取 P3 NPCs,重悬后接种于细胞培养瓶及含 1:7 多聚赖氨酸包被盖玻片的 24 孔板中,置于细胞培养箱中(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 95% 饱和湿度)培养一周;(2)衰老组,取衰老的 NPCs(P10),接种及培养方法同上;(3)共培养组,采用接触共培养的方法,将 ISN-SCs 和衰老 NPCs 进行共培养;细胞计数后,

P4 ISN-SCs 与衰老 NPCs 细胞悬液以细胞含量比例为 1:1 的标准进行混匀,重悬后按照上述方法进行接种和培养。

1.5 ISN-SCs 对衰老 NPCs 修复效果的检测

本研究通过检测胞外基质(蛋白聚糖、Ⅱ型胶原)的蛋白和基因表达,来明确 ISN-SCs 对衰老 NPCs 的修复效果。

1.5.1 甲苯胺蓝染色检测蛋白聚糖表达水平 采用甲苯胺蓝染色,检测上述各组细胞其蛋白聚糖表达水平。将细胞样本(爬片)以 4%的多聚甲醛固定、PBS 浸洗处理后,以甲苯胺蓝液染色 30min,经水洗、冰醋酸液分化、风干、二甲苯透明、中性树胶封固等后续处理后,光学显微镜下观察,随机取 3 个区域拍照保存。

1.5.2 免疫组化染色及定量检测Ⅱ型胶原蛋白表达水平 采用免疫组化染色,检测上述各组细胞其Ⅱ型胶原蛋白表达水平,并进行染色定量。将细胞样本(爬片)以 4%的多聚甲醛固定、PBS 浸洗处理后,以 3% H_2O_2 -甲醇溶液进行酶灭活、山羊血清封闭,随后滴加一抗(1:100 稀释)进行抗原-抗体反应,增强剂处理后滴加通用型 IgG 抗体-Fab 段-HRP 多聚体进行一抗二抗反应,予 2 滴新鲜配制的 DAB 溶液进行显色并镜下适时终止,苏木素染液复染后蒸馏水冲洗干净,梯度乙醇脱水后以中性树胶封固,光学显微镜下观察组织细胞中蛋白的表达情况,随机取 3 个区域拍照保存;采用 Image-Pro Plus (IPP) 6.0 软件进行定量分析,测定各视野下目标区域的积分光密度(integral optical density, IOD)。

1.5.3 qPCR 检测 ACAN 和 COL2a1 的 mRNA 表达水平 采用 qPCR,检测上述各组细胞其 ACAN 和 COL2a1 的 mRNA 相对表达水平;采用管家基因 GAPDH 作为内参,退火温度为 60℃,循环为 40 个,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算各目标基因的相对表达水平;各基因引物序列信息详见表 1。

表 1 各目标基因引物序列信息

Table 1 Sequences of primers for qPCR

	大小 Size(BP)	引物序列 Sequences of primers
GAPDH	103	Sense: 5'-GGCCTTCGGTGTTCCTACC-3' Antisense: 5'-CGCCTGCTTCACCACTTC-3'
ACAN	74	Sense: 5'-GGAGAAGAGACCCAAACAGC-3' Antisense: 5'-GACCCTTCTGGAGAAGCAAG-3'
COL2a1	70	Sense: 5'-GGAAGAGCGGAGACTACTGG-3' Antisense: 5'-TTGCAGAAGACTTTCATGGC-3'

1.6 统计学分析

实验结果的定量数据,包括:不同代次 NPCs 的衰老率,不同分组的Ⅱ型胶原免疫组化染色定量、ACAN 和 COL2a1 的 mRNA 表达水平,采用(均值±标准差)表示;采用 SPSS 20.0 软件进行分析,组间的定量数据采用独立样本 *t* 检验; $P<0.05$ 为具有显著性统计学差异。

2 结果

2.1 ISN-SCs 三系分化能力鉴定

成骨诱导分化后,茜素红染色可见成片红染的钙结节形成,碱性磷酸酶钙钴染色显示广泛的黑染阳性区域,而正常对照组未见明显染色区域(图 1a~d);成软骨诱导分化后,蛋白聚糖阿利新蓝染色可见广泛蓝染的细胞,而正常对照组仅有少量细胞蓝染(图 1e~f);成脂肪诱导分化后油红 O 染色显示成片的红染脂滴,而正常对照组未见明显脂滴(图 1g~h)。说明 ISN-SCs 具有良好的成骨、成软骨、成脂肪定向分化能力。

2.2 NPCs 衰老模型的鉴定

SA- β -Gal 染色结果见图 2。连续传代后,随着细胞代次的增加,NPCs 衰老率也逐渐增加;P3 NPCs 未出现明显的衰老[衰老率(3.0±0.5)%],P5 NPCs 衰老率为(18.3±0.7)%,P10 NPCs 衰老率(86.0±4.6)%。

2.3 ISN-SCs 对衰老 NPCs 修复效果的检测

2.3.1 蛋白聚糖的表达水平 蛋白聚糖甲苯胺蓝染色结果显示:与正常对照组相比,衰老组的染色强度明显减弱,而共培养组的染色强度较衰老组明显增强(图 3)。

2.3.2 Ⅱ型胶原蛋白表达水平 Ⅱ型胶原免疫组化染色及定量检测结果显示:与正常对照组相比,衰老组的染色强度显著性减弱($P<0.05$),而共培养组的染色强度较衰老组显著性增强($P<0.05$),且与正常对照组之间比较无显著性差异($P>0.05$)(图 4,表 2)。说明随着细胞的衰老加重,NPCs 的Ⅱ型胶原蛋白表达水平降低,而通过与 ISN-SCs 的接触共培养则可逆转这一过程。

2.3.3 ACAN 和 COL2a1 的 mRNA 表达水平 PCR 结果显示:与正常对照组(P3 NPCs)相比,衰老组(P10 NPCs)的 ACAN 和 COL2a1 的 mRNA 表达水平均显著性降低($P<0.05$),而共培养组(P10 NPCs+ISN-SCs)的 mRNA 表达水平较衰老

组显著性提高($P<0.05$),且与正常对照组之间比较无显著性差异($P>0.05$,表 2)。

3 讨论

近年来, Henriksson 等^[7]通过动物体内研究提出了 ISN 的概念,随后通过一系列研究^[8-10]观察了 ISN-SCs 在体内迁移现象及其相关影响因素,其迁移至椎间盘内部后,可产生潜在的内源性修复效应。该理论为椎间盘内源性修复研究提供了良好的切入点。

然而,目前尚缺乏研究证实 ISN-SCs 对椎间盘的直接修复效应。本研究在先前的基础上^[11-14],

对 ISN-SCs 和 NPCs 进行了分离和培养,对 ISN-SCs 的三系(成骨、成软骨、成脂肪)分化能力进行了鉴定,采用连续传代的方法制备了 NPCs 复制性衰老模型,评价细胞接触共培养模型体系中胞外基质的蛋白和基因表达水平,以期从体外细胞层面明确 ISN-SCs 对椎间盘的直接修复效应。

在椎间盘退变的发生及进展过程中,衰老的椎间盘细胞(主要是 NPCs)逐渐增加累积^[15-17],细胞外基质合成作用减弱、降解作用增强,导致髓核组织逐渐脱水,失去弹性缓冲作用,形成椎间盘退变的恶性循环过程;因此,在本研究中,我们通过评价 ISN-SCs 对衰老 NPCs 的生物学特性改善作

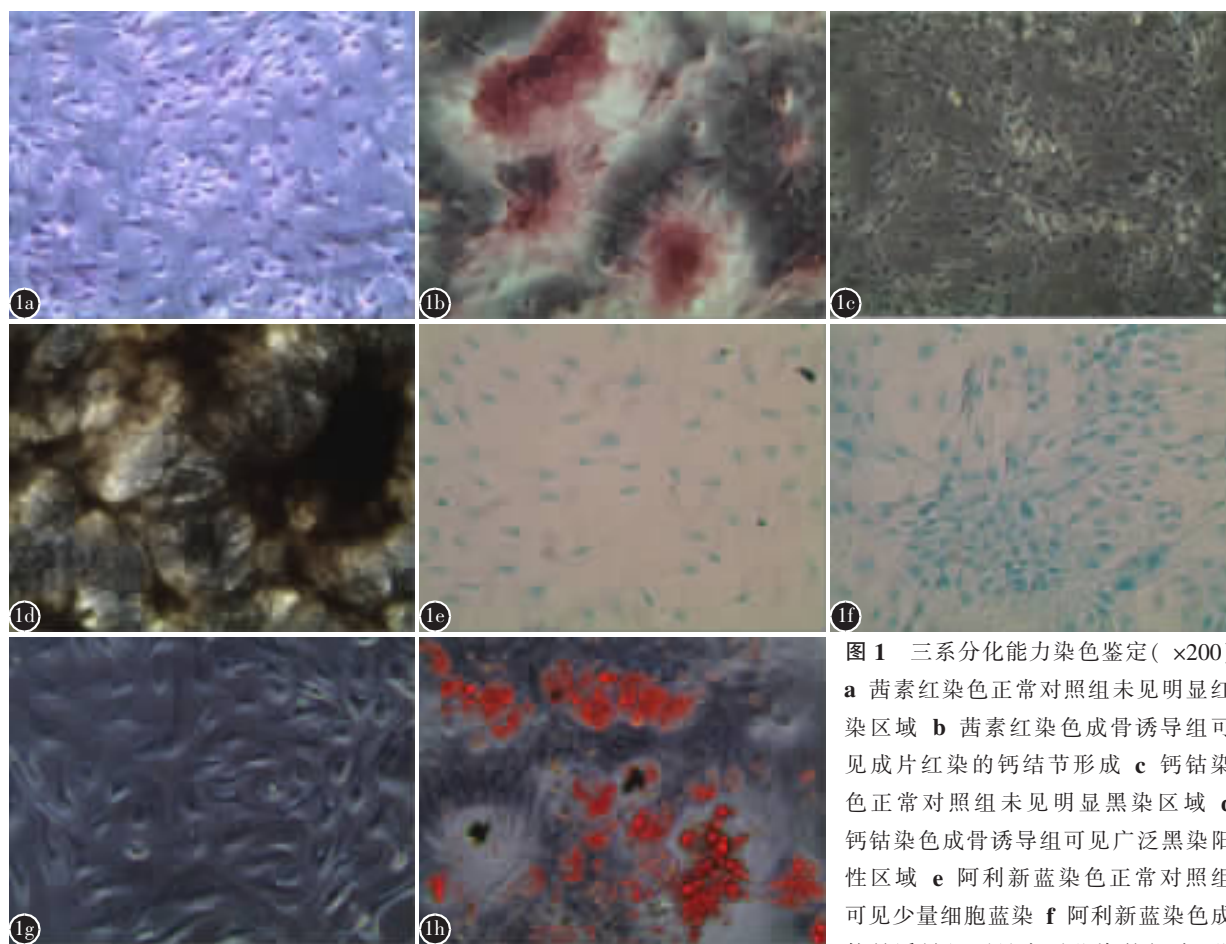


图 1 三系分化能力染色鉴定(×200)
a 茜素红染色正常对照组未见明显红染区域 b 茜素红染色成骨诱导组可见成片红染的钙结节形成 c 钙钴染色正常对照组未见明显黑染区域 d 钙钴染色成骨诱导组可见广泛黑染阳性区域 e 阿利新蓝染色正常对照组可见少量细胞蓝染 f 阿利新蓝染色成软骨诱导组可见广泛蓝染的细胞;蓝

染细胞代表软骨细胞 g 油红 O 染色正常对照组未见明显红染脂滴 h 油红 O 染色成脂诱导组可见成片的红染脂滴

Figure 1 Different staining to identify the multilineage differentiation capacities of ISN-SCs (×200) **a** Alizarin red staining showed no obvious red staining area in the normal control groups **b** While clumpy large calcium nodes were observed in the osteogenesis groups **c** Calcium cobalt stainingshowednegative staining in the normal control groups **d** While extensive black staining area were observed in the osteogenesis groups **e** Alcian blue stainingshowedonly a few cells were stained in the normal control groups **f** Abundant cells were stained in the chondrogenesisgroups **g** Blue stained cells were chondrocyte. Oil red O staining showed no obvious lipid droplets in the normal control groups **h** Crowds of lipid droplets appeared in the adipogenesis groups

用来评价其对椎间盘的修复效果;并选取了相关研究^[18,19]中常用的 NPCs 外基质(蛋白聚糖、Ⅱ型胶原)作为靶向指标,用来评价其生物学活性功能状态。根据文献^[8-10]所述的 ISN-SCs 迁移路径,其最终到达椎间盘髓核部分,与 NPCs 接触并产生一系列生物学效应;因此,我们采用接触共培养模型,以更好地模拟细胞间的接触状态。

在 NPCs 衰老模型的建立方面,为了更好地模拟椎间盘自然退变过程,我们采取连续传代法制备复制性衰老模型,并且采用 SA- β -Gal 染色进行鉴定。结果显示,(1)ISN-SCs 三系诱导分化后,均可见广泛阳性染色,与先前相关研究^[11,12]结果一致,证明 ISN-SCs 具有良好的三系分化能力,同时也进一步间接证明了 ISN-SCs 分离及培养方

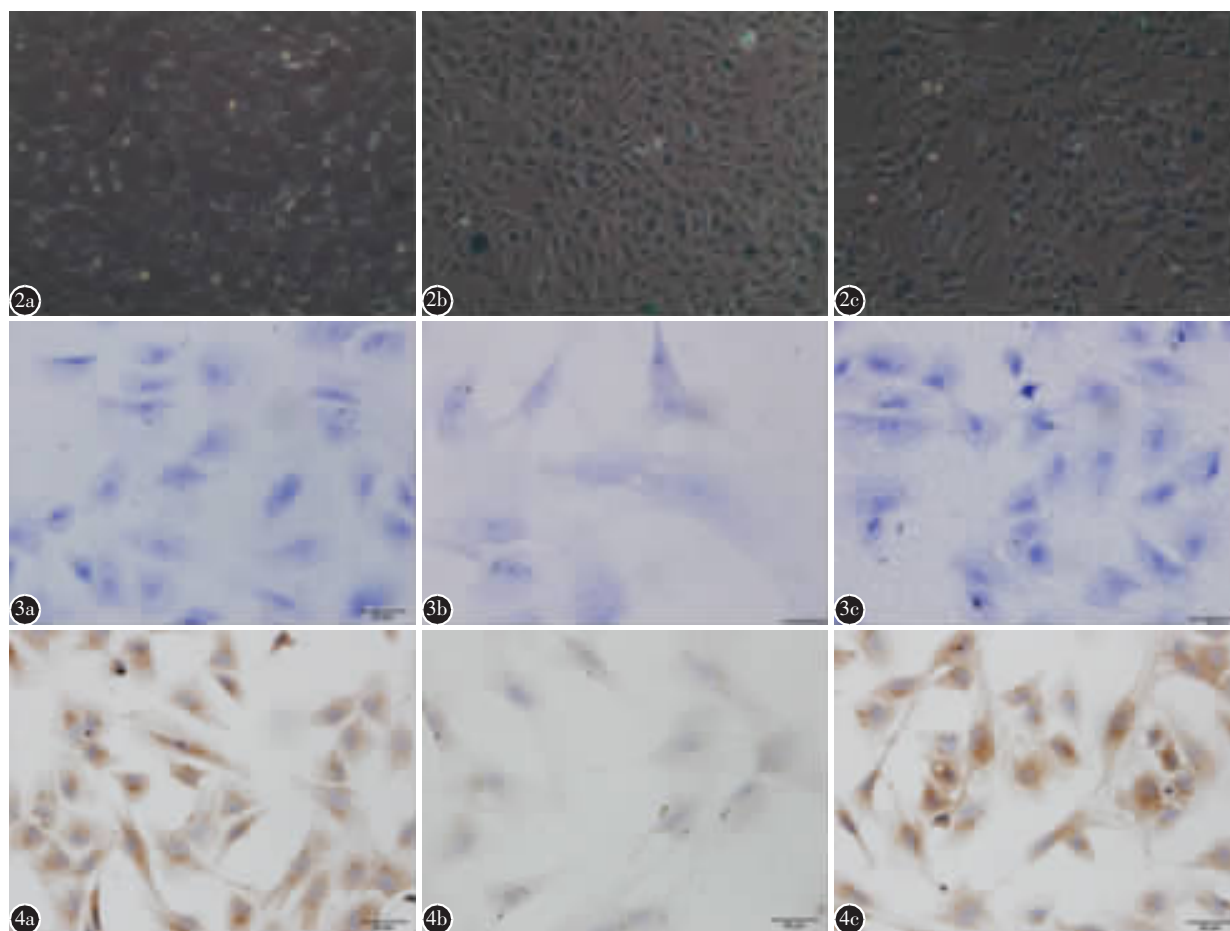


图 2 不同代次 NPCs 的 SA- β -Gal 染色 ($\times 200$)。蓝色深染的即为衰老细胞 **a** P3 NPCs 未出现明显的衰老 **b** P5 NPCs 中逐渐出现少量的衰老细胞($<20\%$) **c** P10 NPCs 可见广泛衰老细胞($>80\%$) **图 3** 蛋白聚糖甲苯胺蓝染色结果 ($\times 400$)。蓝染区即代表蛋白聚糖的表达 **a** 正常对照组染色较深 **b** 衰老组染色强度明显减弱 **c** 共培养组染色强度明显恢复 **图 4** 各组Ⅱ型胶原免疫组化染色 ($\times 400$)。褐色深染区即代表Ⅱ型胶原蛋白的表达 **a** 正常对照组染色较深 **b** 衰老组染色强度明显减弱 **c** 共培养组染色强度明显恢复

Figure 2 SA- β -Gal staining for senescence NPCs in different passages ($\times 200$). The positive senescence cells were stained deep blue **a** No obvious senescence NPCs were observed in passage 3 **b** A small number ($<20\%$) of senescence NPCs were observed in passage 5 **c** Extensive ($>80\%$) senescence NPCs were observed in passage 10 **Figure 3** Toluidine blue staining for aggrecan ($\times 400$). Blue staining area represents expression of aggrecan **a** Deep stained cells were observed in the normal control group **b** The staining was obviously diminished in the senescence group **c** The staining was significantly restored in the co-culture group **Figure 4** Immunohistochemical staining for Collagen II in different groups ($\times 400$). Brown staining area represents expression of Collagen II **a** Deep stained cells were observed in the normal control group **b** The staining was obviously diminished in the senescence group **c** The staining was significantly restored in the co-culture group

法的可靠性;(2)通过连续传代,大鼠 NPCs 约在 P10 代衰老率达到 80%以上,可以获得较为稳定的 NPCs 衰老模型。在椎间盘退变的相关研究中,SA- β -Gal 染色被广泛应用于 NPCs 衰老的鉴定,研究^[15,16]发现随着年龄的增加和椎间盘退变程度的加重,其阳性染色细胞百分比逐渐增加;先前文献^[15]报道,较高等级(Ⅲ~Ⅳ)影像学退变的人类椎间盘中,其 NPCs 衰老率约为 44.11%~46.02%,而该研究选取的衰老标准为阳性染色细胞百分比>80%,该标准的限定保障了 NPCs 衰老模型的有效性;(3)衰老的 NPCs 胞外基质蛋白(蛋白聚糖、Ⅱ型胶原)表达显著性降低,而通过与 ISN-SCs 接触共培养则可逆转此过程;qPCR 检测则从基因水平进一步验证了上述修复效应。这与相关文献^[20,21]报道结果类似:间充质干细胞与 NPCs 接触共培养后,NPCs 的细胞外基质合成显著增加,其细胞活性也显著性提高。Le Visage 等^[22]采用微团共培养体系发现:人类 NPCs 细胞外基质的表达并未见显著性增高,导致该结果差异可能是由于其采用了退变更为严重的椎间盘 NPCs。而在我们的研究中,即便衰老的 NPCs 比例在 80%以上,ISN-SCs 仍然可以对其达到较好的修复效果(细胞外基质的表达水平恢复至正常 NPCs 的表达水平);但是此研究是基于大鼠为实验动物,对于人类椎间盘,ISN-SCs 是否对衰老的 NPCs 也具有如此优良的修复能力,尚需进一步的研究阐明。

在该接触共培养体系中,ISN-SCs 可能通过两方面机制对衰老 NPCs 产生修复效应:(1)ISN-SCs 向 NPCs(类软骨样细胞)分化,表达更多的细胞外基质成分。目前已有众多研究^[23-25]表明,在与 NPCs 共培养体系中,间充质干细胞可定向成软骨性分化,特异性表达 NPCs 样细胞表型。在该研究

的共培养体系中,ISN-SCs 可能同样在 NPCs 分泌的可溶性介质的作用下,产生相应的生物学效应。(2)ISN-SCs 通过旁分泌效应正性影响 NPCs。相关研究显示^[26-28],间充质干细胞与 NPCs 在共培养体系中,呈现出双向传递信息及双向作用的行为模式;说明除了潜在的分化和重新合成细胞外基质等效应,间充质干细胞还可能通过分泌产生生物活性因子(如合成代谢生长因子)而进一步影响 NPCs。已有研究^[29]证明,在微团共培养体系中,间充质干细胞与 NPCs 可自我形成“干细胞核心+NPCs”外层模式,具有优越的免疫调节能力和抗分解代谢作用,可显著减少在低氧和炎性介质环境下分解代谢相关分子的表达;因此,间充质干细胞可以潜在调节退变椎间盘内炎症内环境,改善宿主 NPCs 表型。ISN-SCs 作为间充质干细胞家族的一员^[12],同样可能通过上述两种主要机制发挥着修复作用,后续研究将采用非接触共培养模型探索其具体机制。

尽管该研究结果表明 ISN-SCs 在体外对衰老的 NPCs 具有良好的修复效果,但是尚存在一定的不足之处。先前研究^[30]表明,当改变培养微环境中氧和葡萄糖的含量时,NPCs 和间充质干细胞产生的细胞外基质会发生改变;而该体外研究结果是否也会受到培养环境的影响还需进一步深入探讨;ISN-SCs 在体外对衰老 NPCs 能够产生良好的修复效果,是否能在体内椎间盘微环境下发挥类似效应也需进一步的验证。

综上所述,ISN-SCs 具有较好的三系分化能力,且能够从基因和蛋白水平逆转衰老的 NPCs 细胞外基质表达降低的过程,对其产生良好的修复效应,可以进一步用于椎间盘退变内源性修复的研究。

表 2 Ⅱ型胶原免疫组化染色定量分析及 ACAN 和 COL2a1 的 mRNA 相对表达水平

Table 2 Quantitative analysis of immunohistochemistry for collagen Ⅱ, and the relative mRNA expression levels of ACAN and COL2a1

	正常对照组 Control group	衰老组 Senescence group	共培养组 Co-culture group
Ⅱ型胶原 IHC 定量(IOD) Quantitative Immunohistochemistry for Collagen Ⅱ	36174.32±5188.16	1533.66±95.63 ^①	28377.33±5862.58 ^②
ACAN mRNA 相对表达水平 Relative mRNA expression levels of ACAN	1.00±0.05	0.43±0.03 ^①	0.99±0.05 ^②
COL2a1 mRNA 相对表达水平 Relative mRNA expression levels of COL2a1	1.00±0.03	0.40±0.02 ^①	1.07±0.04 ^②

注:①与对照组相比, $P<0.05$;②与衰老组相比, $P<0.05$;IHC,免疫组化;IOD,积分光密度

Note: ①Compared with normal control group, $P<0.05$; ②Compared with senescence group, $P<0.05$; IHC, immunohistochemistry; IOD, integral optical density

4 参考文献

- 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.
- Mochida J, Sakai D, Nakamura Y, et al. Intervertebral disc repair with activated nucleus pulposus cell transplantation: a three-year, prospective clinical study of its safety[J]. *Eur Cell Mater*, 2015, 29: 202–212.
- Centeno C, Markle J, Dodson E, et al. Treatment of lumbar degenerative disc disease-associated radicular pain with culture-expanded autologous mesenchymal stem cells: a pilot study on safety and efficacy[J]. *J Transl Med*, 2017, 15(1): 197. doi: 10.1186/s12967-017-1300-y.
- 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. doi: 10.1371/journal.pone.0043922. Epub 2012 Sep 11.
- 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. eCollection 2012.
- Yu H, Vu TH, Cho KS, et al. Mobilizing endogenous stem cells for retinal repair[J]. *Transl Res*, 2014, 163(4): 387–398.
- 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(Phila Pa 1976)*, 2009, 34(21): 2278–2287.
- 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(Phila Pa 1976)*, 2012, 37(9): 722–732.
- Sasaki N, Henriksson HB, Runesson E, et al. Physical exercise affects cell proliferation in lumbar intervertebral disc regions in rats[J]. *Spine(Phila Pa 1976)*, 2012, 37(17): 1440–1447.
- 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.
- 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 and 特性鉴定[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2015, 25(11): 1018–1025.
- Shi R, Wang F, Hong X, et al. The presence of stem cells in potential stem cell niches of the intervertebral disc region: an in vitro study on rats[J]. *Eur Spine J*, 2015, 24(11): 2411–2424.
- 朱厚毅, 王运涛, 王锋, 等. 大鼠不同节段椎间盘髓核细胞分离鉴定及生物特性的对比研究 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2015, 29(10): 1290–1295.
- 康新桂, 吴小涛, 王锋, 等. 大鼠尾椎与腰椎髓核组织及细胞的分离培养以及髓核表型的对比研究 [J]. *东南大学学报(医学版)*, 2016, 35(3): 293–301.
- Kim KW, Chung HN, Ha KY, et al. Senescence mechanisms of nucleus pulposus chondrocytes in human intervertebral discs[J]. *J Spine*, 2009, 9(8): 658–666.
- Roberts S, Evans EH, Kletsas D, et al. Senescence in human intervertebral discs[J]. *Eur Spine J*, 2006, 15(3): 312–316.
- Gruber HE, Ingram JA, Norton HJ, et al. Senescence in cells of the aging and degenerating intervertebral disc: immunolocalization of senescence-associated beta-galactosidase in human and sand rat discs[J]. *Spine(Phila Pa 1976)*, 2007, 32(3): 321–327.
- Cs-Szabo G, Ragasa-San Juan D, Turumella V, et al. Changes in mRNA and protein levels of proteoglycans of the annulus fibrosus and nucleus pulposus during intervertebral disc degeneration[J]. *Spine(Phila Pa 1976)*, 2002, 27(20): 2212–2219.
- 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.
- Yamamoto Y, Mochida J, Sakai D, et al. Upregulation of the viability of nucleus pulposus cells by bone marrow-derived stromal cells: significance of direct cell-to-cell contact in coculture system[J]. *Spine*, 2004, 29(14): 1508–1514.
- Watanabe T, Sakai D, Yamamoto Y, et al. Human nucleus pulposus cells significantly enhanced biological properties in a coculture system with direct cell-to-cell contact with autologous mesenchymal stem cells[J]. *J Orthop Res*, 2010, 28(5): 623–630.
- Le Visage C, Kim SW, Tateno K, et al. Interaction of human mesenchymal stem cells with disc cells: changes in extracellular matrix biosynthesis [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2006, 31(18): 2036–2042.
- Li X, Lee JP, Balian G, et al. Modulation of chondrocytic properties of fat-derived mesenchymal cells in co-cultures with nucleus pulposus[J]. *Connect Tissue Res*, 2005, 46(2): 75–82.
- Lu ZF, Zandieh DB, Wuisman PI, et al. Differentiation of adipose stem cells by nucleus pulposus cells: configuration effect[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 359(4): 991–996.
- 常献, 周跃, 李长青. 人软骨终板干细胞与退变髓核细胞体外非接触共培养的实验研究[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2015, 25(1): 54–61.

综述

脊柱微创手术中患者辐射暴露和应对措施的研究进展

Radiation exposure and countermeasures to patients
in minimally invasive spine surgery

范永飞, 刘 刚

(南京大学医学院附属东部战区总医院骨科 210000 南京市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2018.11.12

中图分类号: R818 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2018)-11-1042-04

在脊柱外科手术中,由于术中放射仪器的使用,几乎所有人体组织均可观察到辐射暴露的组织效应^[1],术中高剂量放射可引起皮肤红斑、白内障形成、甲状腺肿瘤和其他恶性肿瘤等一系列并发症的产生^[2,3]。患者遭受的辐射暴露主要与以下方面相关:(1)总透视时间,包括定位及术中操作所需透视时间^[4];(2)透视位置,侧位透视产生的直接辐射和散射辐射分别是正位透视的 200 倍和 30 倍^[5];(3)患者体重及体积,有研究表明,严重肥胖(BMI>35)与辐射暴露显著相关^[6]。且射线输出和皮肤与辐射源的距离取决于患者体积大小,对于体积较大患者,射线输出增加以保证透视图像清晰度,同时,辐射源与皮肤距离减小,可能诱发皮肤损伤^[5]。椎间盘切除术中,Mariscalco 等^[7]比较了传统手术方式和微创手术中手术人员的辐射暴露,发现微创手术中的暴露程度更高。临床上采用了几种方式减少术中手术人员的辐射暴露:(1)铅板、铅衣、甲状腺盾等对人体组织及器官进行保护;(2)增加手术人员与辐射源和患者的距离,以减少直接辐射和散射辐射;(3)在脉冲和低剂量模式下进行透视检查;(4)改进透视仪器,如:迷你 C 型臂

透视机^[8-10]。尽管以上措施明显降低了手术人员遭受的辐射暴露,但并未对患者进行相应的防护,甚至会增加术中患者的辐射暴露,笔者通过对辐射暴露的不良影响、传统手术及微创手术方式对患者产生的辐射作一综述,希望得到临床工作者的重视。

1 辐射暴露的影响

在术中成像过程中,手术人员和患者都会遭受到直接辐射和散射辐射。直接辐射是射线从辐射源射出时吸收的辐射,是患者和手术人员辐射暴露的主要来源;散射辐射通常来自手术环境中的患者皮肤表面的折射,散射辐射是手术人员远离手术台时的主要暴露形式^[8]。术中成像产生的辐射暴露可以通过直接或间接诱导 DNA 损伤和活性氧物质产生而导致细胞损伤,随后的细胞应激反应可通过复制或凋亡机制导致细胞死亡^[11],相反,如果不发生细胞死亡,肿瘤增殖的风险可能会增加,这是由于 DNA 病变细胞的持续存在和复制以及随后的基因组不稳定性^[12]。

辐射暴露的生物学效应可进一步描述为确定性效应或随机性效应。确定性效应是一种剂量依赖性效应,且在达到辐射暴露的特定阈值后,可观察到短期病理反应。如若有超过该阈值的额外暴露,这些影响随之恶化^[13]。与确定性效应相关的病理反应包括脱发、皮肤红斑、皮肤

第一作者简介:男(1993-),硕士在读,研究方向:脊柱外科
电话:(025)80860023 E-mail:fanyongfei_nju@163.com
通讯作者:刘刚 E-mail:liug2002xian@163.com

26. Richardson SM, Walker RV, Parker S, et al. Intervertebral disc cell-mediated mesenchymal stem cell differentiation [J]. Stem Cells, 2006, 24(3): 707-716.
27. 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.
28. 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.

29. Ouyang A, Cerchiari A, Tang X, et al. Effects of cell type and configuration on anabolic and catabolic activity in 3D co-culture of mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells[J]. J Orthop Res, 2017, 35(1): 61-73.
30. Naqvi SM, Buckley CT. Extracellular matrix production by nucleus pulposus and bone marrow stem cells in response to altered oxygen and glucose microenvironments [J]. J Anat, 2015, 227(6): 757-766.

(收稿日期:2018-04-01 修回日期:2018-08-18)

(英文编审 庄乾宇/贾丹彤)

(本文编辑 姜雅浩)