

椎间盘源性干细胞的基础研究进展

Basic research progress of discogenic stem cells

王晨峰, 王海滨, 卢旭华

(海军军医大学第二附属医院骨科 200003 上海市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2021.02.13

中图分类号: R318, R681.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2021)-02-0183-06

椎间盘退变 (intervertebral disc degeneration, IVDD) 是脊柱退行性疾病的重要病理基础之一。目前治疗椎间盘退变性疾病的方法主要集中于缓解症状, 而非解决根本问题或恢复椎间盘本身的结构和功能^[1]。为了修复重建椎间盘组织, 研究者研发了许多方法并取得了一定成果, 例如干细胞治疗^[2]和基因治疗^[3]等。其中, 干细胞生物治疗一直是再生医学领域的研究热点。

传统观点认为椎间盘细胞处于一种低氧、低营养、高压和高渗的内环境中, 纤维环和髓核不具备损伤修复的能力, 故针对椎间盘的生物治疗常选择移植外源性干细胞, 其中包括骨髓间充质干细胞 (bone marrow derived mesenchymal stem cells, BMSCs)、脂肪源性间充质干细胞 (adipose derived mesenchymal stem cells, ADSCs) 和脐带间充质干细胞 (umbilical cord mesenchymal stem cells, UCMSCs)。近年来的研究发现, 在正常和退变的椎间盘组织中可分离培养出椎间盘源性成体干细胞, 如纤维环干细胞 (annulus fibrosus-derived stem cells, AFSCs)、髓核干细胞 (nucleus pulposus-derived stem cells, NPSCs) 和软骨终板干细胞 (cartilage endplate-derived stem cells, CESC_s)^[4], 三者作为内源性干细胞有望成为修复重建椎间盘组织的重要工具。笔者对椎间盘源性成体干细胞的相关基础研究进行综述。

1 椎间盘源性干细胞的发现

2004 年, 卢旭华等^[5]开展了对纤维环成纤维细胞成骨潜能的研究。之后, 不少学者相继从不同动物的正常和退变椎间盘组织中获取了干细胞^[6,7]。2007 年, Rishud 等^[8]尝试从人类退变椎间盘组织分离培养 AFSCs 和 NPSCs, 最终发现一批表达 CD105+、CD166+、CD63+、CD49a+、CD90+ 和 CD73+ 等表面抗原的细胞。之后, 围绕椎间盘源性干细胞的研究陆续展开, 结果证实椎间盘组织中确有内源性干

细胞存在。Feng 等^[9]于 2010 年报道从人体未发生退变的纤维环中分离培养出具备多向分化能力的 AFSCs, 证明非退变和退变椎间盘组织都存在干细胞。Blanco 等^[10]从人退变髓核组织中分离培养出 NPSCs, 并证明其与 BMSCs 具有非常相似的特性。Liu 等^[11]首次证实 CESC_s 存在于人退变椎间盘中, 并发现其细胞形态、增殖率、细胞周期、免疫表型和干细胞基因表达与 BMSCs 相似, 并可诱导为成骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞, 在成骨和软骨形成方面优于 BMSCs。

2 椎间盘源性干细胞的鉴定

椎间盘源性干细胞普遍具有间充质干细胞特性, 其表面特异性标记物符合国际干细胞治疗协会 (International Society for Cellular Therapy, ISCT)^[12]关于多能间充质干细胞的最低鉴定标准, 即: ①在标准培养基内可贴壁生长; ②高表达 CD105+、CD73+ 和 CD90+ (≥95%), 并低表达 CD45-、CD34-、CD14- 或 CD11b-、CD79α- 或 CD19- 和人类白细胞 DR 抗原 (human leukocyte antigen-DR, HLA-DR)-; ③在体外培养可发生成骨、成脂肪和成软骨三系分化。

常用的鉴定分选技术包括流式细胞术和磁珠分选等实验技术, 用来检测 AFSCs、NPSCs 和 CESC_s 的细胞表面特异性标记物并对干细胞进行分选鉴定 (表 1)。研究结果显示, AFSCs、NPSCs 和 CESC_s 符合该类干细胞表面特异性标记物表型表达要求, 同时, 有部分学者还认为干细胞可能有其各自特异性表达的细胞表面标记物, 如基质细胞抗原 1 (stromal cell antigen-1, STRO-1) 可能是 CESC_s 的细胞表面特异表达标记物^[11,19], 酪氨酸蛋白激酶受体 2 (tyrosin kinase receptor 2, Tie 2) 和神经节苷脂 2 (disialoganglioside 2, GD 2) 可作为 NPSCs 的细胞表面特异标记物^[20]等。但关于椎间盘源性干细胞表面特异性标记物仍需进一步研究。

3 椎间盘源性干细胞的生物学特性

3.1 干细胞形态特征

椎间盘原代细胞从椎间盘组织分离培养后, 可获得

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81071507, 81802185)

第一作者简介: 男 (1996-), 在读硕士研究生, 研究方向: 骨科

电话: 18359269201 E-mail: wangchenfeng0102@163.com

通讯作者: 卢旭华 E-mail: xuhualu@hotmail.com; 王海滨 E-mail: wanghb0222@163.com

表 1 纤维环干细胞 (AFSCs)、髓核干细胞 (NPSCs)、软骨终板干细胞 (CESCs) 鉴定技术和表面特异性标记物

	检测技术	阳性标记物	阴性标记物
AFSCs			
人非退变椎间盘 ^[9]	流式细胞术	CD29, CD49e, CD51, CD73, CD90, CD105, CD166, CD184, Stro-1	CD24, CD31, CD34, CD45, CD106, CD117, CD133
人退变椎间盘 ^[13]	免疫组织化学法	CD14, CD29, CD44, CD105	CD34, CD45
人退变椎间盘 ^[14]	流式细胞术	CD73, CD90, CD105	CD34, CD45, HLA-DR
人退变椎间盘 ^[15]	流式细胞术	CD73, CD90, CD105	CD19, CD34, CD45, HLA-DR
兔椎间盘 ^[16]	PCR	CD29, CD44, CD166	CD4, CD8, CD14
NPSCs			
人退变椎间盘 ^[10]	流式细胞术	CD73, CD90, CD105, CD106	CD14, CD19, CD34, CD45, HLA-DR
人退变椎间盘 ^[14]	流式细胞术	CD73, CD90, CD105	CD34, CD45, HLA-DR
人退变椎间盘 ^[17]	流式细胞术	CD73, CD90, CD105	CD34, CD45, HLA-DR
人退变椎间盘 ^[15]	流式细胞术	CD73, CD90, CD105	CD19, CD34, CD45, HLA-DR
大鼠尾椎间盘 ^[18]	流式细胞术	CD29, CD44, CD90	CD34, CD45
CESCs			
人退变椎间盘 ^[11]	流式细胞术	CD44, CD73, CD90, CD105, CD166	CD14, CD19, CD34, CD45, CD133, HLA-DR
人退变椎间盘 ^[19]	流式细胞术	CD73, CD90, CD105	CD14, CD19, CD34, CD45, HLA-DR
人退变椎间盘 ^[20]	流式细胞术	CD73, CD90, CD105	CD14, CD19, CD34, CD45, HLA-DR
人退变椎间盘 ^[21]	流式细胞术	CD73, CD90, CD105	CD14, CD19, CD34, CD45, HLA-DR
小鼠椎间盘 ^[22]	流式细胞术	CD29, CD44, CD90	CD34, CD45

干细胞集落,大部分集落呈紧凑型圆形结构,这些细胞的形态多表现为均匀的梭形或多边形,与 BMSCs 相似^[14],有时呈平行或涡流状排列的特征性^[15]。当 AFSCs、NPSCs 和 CESC 进行第一代和第二代培养时,AFSCs 细胞形态类似于长纺锤状的成纤维细胞,NPSCs 形态似多边形,而 CESC 则近似圆形,与后两者相比,AFSCs 显得更为细长。

3.2 干细胞增殖迁移能力

在细胞增殖能力方面,AFSCs、NPSCs、CESCs 和 BMSCs 的生长趋势无明显差异^[15]。而在细胞迁移能力上,Liu 等^[14]为比较椎间盘内源性干细胞的迁移能力,设计了伤口愈合实验,研究发现三类干细胞均具有迁移能力,但存在一定的差异,其迁移能力大小为:CESCs>AFSCs>NPSCs,即 CESC 迁移能力最高,NPSCs 最低。相比于椎间盘源性干细胞,BMSCs 可能具有更强的迁移能力,但仍需进一步研究^[15]。

3.3 干细胞分化潜能

AFSCs、NPSCs 和 CESC 三类椎间盘源性干细胞皆具有成骨、成脂肪和成软骨的能力。卢旭华等^[24]以山羊为模型,研究发现山羊颈椎间盘纤维环组织在骨融合过程中具有成骨潜能,并提出成骨机制可能为纤维环内成纤维细胞的软骨内化骨。

Wang 等^[15]将三类椎间盘内源性干细胞与 BMSCs 进行比较,发现四类细胞的分化能力有高低之分。Liang 等^[14]比较了 AFSCs、NPSCs 和 CESC 的特性,发现 AFSCs 在三系分化能力上更为显著。但是在测定细胞活性时发现与

NPSCs 和 AFSCs 相比,CESC 的活性较低,因此作者推测三种干细胞活性的差异可能与 CESC 较难分离纯化有关。

研究者通过测定成骨、成脂肪和成软骨分化的特异性基因表达量,比较了椎间盘源性干细胞三系分化能力。不同文献报道的结果存在一定差异(表 2)。这可能与获取样本个体性别、退变程度、实验测量方法不同等因素有关。

椎间盘源性干细胞不仅具有成骨、成脂肪和成软骨分化的能力,还可分化为神经细胞。Erwin 等^[25]通过细胞和动物实验,发现 NPSCs 可分化为多种神经细胞,其中以少突胶质前体细胞最为常见。Ishii 等^[26]诱导 NPSCs 分化成类施万细胞(Schwann-like cells),将其植入坐骨神经横断的小鼠模型后,发现移植的类施万细胞可促进神经轴突的形成,增强周围神经的再生功能。而 Lazzarini 等^[27]尝试诱导 NPSCs 分化为神经细胞,发现诱导后形成的细胞形态近似于神经细胞,但不具备成熟神经细胞的功能,需进一步研究来明确定向分化的条件。椎间盘源性干细胞可从退变和非退变的椎间盘组织中获取,且具备成神经的潜能,为神经修复提供了一个重要的细胞来源。此外,也有学者^[9]发现椎间盘源性干细胞可分化为血管内皮细胞,但仍需做进一步的研究。

椎间盘源性干细胞还具有与其他干细胞不同的生物学特性。与 BMSCs 对比,CESC 具有较强的成骨和成软骨分化能力^[11],而从退变髓核组织中分离培养的 NPSCs 则表现为较弱的成脂肪分化能力^[28]。Wu 等^[29]将人 NPSCs 和

UCMSCs 两者的生物学特性进行了比较,发现 NPSCs 细胞表面特异性标记物 CD29 和 CD105 表达水平较低,UCMSCs 具有更强的三系分化能力^[29]。Han 等^[30]比较 NPSCs 与 ADSCs 在酸性条件下的生存能力、增殖能力和基质代谢的改变,发现相比于 ADSCs, NPSCs 更能耐受酸性环境,其生物学活性受到的抑制程度较弱,并高表达 Aggrecan 和 COL-2 和低表达 MMP-2 和 ADAMTS4 等基因。

4 椎间盘源性干细胞的组织工程研究

椎间盘源性干细胞可应用于组织工程再生研究,但其生物学活性受到多种因素的影响,如微环境、细胞间相互作用和组织支架材料等。目前,其围绕影响因素展开的研究取得了一定成果。

4.1 微环境

干细胞在增殖、分化和迁移等过程中需要依托于一定的微环境,只有在适当的条件下,干细胞才能更好地进行相关生物学活动。缺氧、高糖、营养成分缺乏等相对恶劣的微环境,一方面促进了椎间盘源性干细胞的分化能力,而另一方面也抑制了椎间盘源性干细胞的生存生长并促使其凋亡(表 3)^[30-40]。

为使椎间盘源性干细胞更好地适应微环境,相关的组织工程应用也陆续展开。Li 等^[38]发现环孢素 A 可通过减轻氧化应激损伤,有效抑制压力负荷诱导的 NPSCs 凋亡。Tian 等^[37]探讨缺氧和营养缺乏条件对人 NPSCs 生物学活性的影响,发现 PI3K/Akt 信号通路可能对人 NPSCs 具有

保护作用;Nan 等^[39]的研究发现柚皮苷(Naringin)可通过 PI3K/Akt 信号通路,减轻 H₂O₂ 诱导的大鼠 NPSCs 凋亡。Chen 等^[40]发现血红素加氧酶-1(Heme oxygenase-1)介导的自噬可对大鼠 NPSCs 氧化损伤发挥保护作用;Ying 等^[41]发现基质细胞源性因子-1 α (Stromal cell-derived factor-1)可能是一种重要的化学诱导剂,可在椎间盘退变过程中大量产生,用于促进内源性干细胞的增殖和募集。

4.2 细胞间相互作用

细胞之间相互作用也是干细胞研究的热点。近年来,一些椎间盘共培养方法也陆续报道。BMSCs 与退变髓核(nucleus pulposus, NP)细胞共同培养,可以诱导 BMSCs 向正常 NP 样细胞分化,同时可刺激椎间盘组织中退变 NP 细胞重新获得未退变细胞表型,两者共同参与椎间盘的修复过程^[42]。NPSCs 与 NP 细胞共同培养时, NPSCs 可作为 NP 细胞的“滋养细胞”,促进细胞增殖和细胞外基质的合成^[43];He 等^[44]通过体外共培养实验研究 CESC 对 NP 细胞增殖的影响及其机制,发现 CESC 可能通过旁分泌途径促进 NP 细胞的增殖。Allon 等^[45]模拟退变椎间盘组织内环境,设计了一种适用于细胞共培养的新型生物反应容器,并以间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)或 NP 细胞单独培养作为对照,发现 MSC 和 NP 细胞共同培养时可产生更多的生物基质蛋白,提出细胞共培养比单一细胞培养在组织工程领域应用具有更大优势。

4.3 联合组织支架材料

细胞所处的微环境是影响其生物活性的关键因素,在组织工程再生策略的研究中,组织支架材料也可影响干细胞的分化过程。在组织工程与再生医学领域,支架材料作为种植与培养细胞的三维材料,具有生物相容性、生物可降解性,并具有与特定组织相匹配的机械强度等性能。Liu 等^[46]通过静电纺丝技术制造纤维型聚氨酯支架来培养兔 AFSCs,经培养后发现 AFSCs 高表达 1 型胶原蛋白(collagen-1, COL-1)和 Aggrecan 基因,并向外层纤维环细胞分化。Zhu 等^[47]设计了一种具有生物降解性的聚醚碳酸酯聚氨酯(poly ether carbonate urethane urea, PECUU)支架,该装置可促使兔 AFSCs 高表达 COL-1 基因,并诱导 AFSCs 向成纤维细胞分化。Yuan 等^[48]构建一种 3D 微孔支架来培养 CEP 细胞,发现所制备的细胞与原生 CEP 细胞形态功能相似。

4.4 动物实验

椎间盘内源性干细胞不仅具有干细胞的生物学活性,还可作为椎间盘退变修复治疗策略的新选择,并在动物研究中取得一定进展。Wang 等^[49]将 AFSCs、NPSCs、CESCs 和 BMSCs 四种干细胞分别移植入新西兰白兔椎间盘中观察 NP 组织的再生情况,发现 CESC 促进 NP 组织再生的能力最强,并可有效防止 NP 脱水引起的椎间盘组织塌陷,有望成为 NP 组织工程应用的种子细胞来源。Chen 等^[50]比较了移植 NP 细胞和 NPSCs 治疗兔椎间盘退变模型的效果,发现 NPSCs 的治疗效果明显优于 NP 细

表 2 椎间盘源性干细胞三系分化能力比较

分化类型	分化强弱排序	排序依据基因
成骨分化	CESC>AFSC>BMSC>NPSC ^[15] AFSC>NPSC>CESC ^[4] AFSC>CESC>NPSC ^[4]	RUNX-2、ALP、OC RUNX-2 COL-1
成脂肪分化	BMSC>NPSC>CESC>AFSC ^[15] AFSC>CESC>NPSC ^[4]	APP、LPL、PPAR-2 PPA、LPL
成软骨分化	CESC>AFSC>BMSC>NPSC ^[15] CESC>AFSC>NPSC ^[4]	SOX-9、COL-2、Aggrecan SOX-9、COL-2

注:以上结果均依据特定分化基因的表达量进行排序

表 3 微环境对椎间盘源性干细胞生物学活性的影响

干细胞来源	环境影响因素	结果
人 CESC ^[36]	缺氧环境	抑制 CESC 向成骨分化
人 CESC ^[33]	高糖环境	抑制 CESC 成软骨分化,促进成骨分化
人 NPSC ^[37]	缺氧、营养缺乏	促进 NPSC 细胞凋亡,抑制细胞活力
人 NPSC ^[38]	压力负荷	促进 NPSC 细胞凋亡
大鼠 NPSC ^[30]	酸性环境	抑制 NPSC 细胞活力、增殖和相关细胞基质的合成
大鼠 NPSC ^[39]	柚皮苷	促进 NPSC 向 NP 细胞分化,减少细胞凋亡
大鼠 NPSC ^[40]	血红素加氧酶-1	抑制 NPSC 凋亡

胞。Wang 等^[51]将负载水凝胶的 NPSCs 注入大鼠退变椎间盘内,发现水凝胶可促进 NPSCs 的增殖,并使其在椎间盘内长期存活,促进椎间盘组织的再生修复。

5 提升干细胞生存能力的方法

目前已知多种内环境因素均可影响干细胞的生物性能,而提升干细胞的生存能力是干细胞生物治疗的重要环节。许多研究尝试提升干细胞在“恶劣”环境下的生存能力。概括起来有两种策略:一是减弱不利因素,如抑制干细胞凋亡、衰老等;二是加强有益因素,如提升干细胞数量,激活干细胞增殖分化能力等^[52-54]。相关研究见表 4^[38,51,55-57]。更多微环境影响因素有待进一步探讨,从而更好地提升干细胞的治疗效能。

6 临床应用中可能存在的问题

AFSCs、NPSCs 和 CESC 三者均表现出较强的增殖分化能力,具有良好的生物相容性,与 BMSCs 生物学活性相似,且相比于外源性干细胞,椎间盘内源性干细胞对机体免疫排斥反应较弱,能更好地适应椎间盘内部相对“恶劣”的环境。

椎间盘内源性干细胞作为种子细胞,应用于组织工程和再生医学等学科具有较好的前景,但仍然局限于基础研究,将其体外实验和动物模型实验成果转化到临床应用需要解决的问题主要有以下几方面:(1)椎间盘内源性干细胞 AFSCs、NPSCs 和 CESC 三者的表面特异性标记物尚未完全清楚,无法精确地分离纯化,需进一步研究该类干细胞特异性分离培养的技术;(2)体外实验不能准确反映体内环境压力、细胞代谢和细胞-组织相互作用等方面的情况,因此内源性干细胞在进行移植治疗过程中未必会如预期那般顺利修复受损组织^[58];(3)如何确保内源性干细胞向特定的方向诱导分化,而不是背道而驰,这是椎间盘再生工程难以回避的问题^[8];(4)目前注射移植还是主要的治疗途径,在注射过程中免不了损伤外层纤维环,也可能存在部分干细胞从损伤处漏出等问题;(5)体外扩增干细

胞培养基的选用、移植干细胞的最佳数量和注射移植干细胞的载体等,以确保细胞成活率、降低排异反应,也是需要着重考虑的方面;(6)移植的干细胞成功率往往极低,如果是异体干细胞移植,其成瘤性及安全性也应关注,并需大量临床试验进一步研究确证^[59-61]。

7 小结与展望

综上所述,椎间盘内源性干细胞 AFSCs、NPSCs 和 CESC 三者具有间充质干细胞样特性,符合 ISCT 关于多能间充质干细胞的最低评价标准,具有良好的增殖分化潜能,在组织工程和再生医学方向上有较大的潜力,值得进一步探索挖掘。干细胞治疗的机制是将体外培养的健康干细胞移植到患者或自身体内,以达到病变细胞损伤修复和功能重建的目的。但是目前,干细胞的研究仍存在许多问题,极大地限制了干细胞生物治疗的应用。因此,实现椎间盘内源性干细胞自身增殖修复退变及损伤的生物治疗方式是一种可以尝试的选择,但仍需深入研究。

8 参考文献

- Hu B, He R, Ma K, et al. Intervertebral disc-derived stem/progenitor cells as a promising cell source for intervertebral disc regeneration [J]. Stem Cells Int, 2018, 2018: 7412304.
- Silverman LI, Dulatova G, Tandeski T, et al. In vitro and in vivo evaluation of discogenic cells, an investigational cell therapy for disc degeneration [J]. Spine J, 2020, 20(1): 138-149.
- Banala RR, Vemuri SK, Dar GH, et al. Efficiency of dual siRNA-mediated gene therapy for intervertebral disc degeneration (IVDD) [J]. Spine J, 2019, 19(5): 896-904.
- Liang L, Li X, Li D, et al. The characteristics of stem cells in human degenerative intervertebral disc [J]. Medicine(Baltimore), 2017, 96(25): e7178.
- 卢旭华. 颈椎间盘纤维环成纤维细胞成骨潜能的研究[D]. 第二军医大学, 2004.
- Henriksson H, Thormemo 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.
- Melrose J, Smith SM, Fuller ES, et al. Biglycan and fibromodulin fragmentation correlates with temporal and spatial annular remodelling in experimentally injured ovine intervertebral discs[J]. Eur Spine J, 2007, 16(12): 2193-2205.
- 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.
- Feng G, Yang X, Shang H, et al. Multipotential differentiation of human anulus fibrosus cells: an in vitro study[J]. J Bone Joint Surg Am, 2010, 92(3): 675-685.
- Blanco JF, Sanchez-Guijo FM, Hernandez-Campo P. Isola-

表 4 椎间盘内源性修复的策略

干细胞来源	研究干预因素	研究结果
人 NPSCs ^[55]	阿米洛利	酸性条件可以抑制 NPSCs 生物学活性,而阿米洛利(抗酸药物)可以通过提高 NPSCs 生物学活性
人 NPSCs ^[38]	环孢素 A	环孢素 A 通过减轻氧化应激损伤,有效抑制压力负荷诱导的 NPSCs 凋亡
人 NPSCs ^[56]	淫羊藿苷	在冷冻培养基中加入淫羊藿苷可提高冷冻保存的人 NPSCs 生存能力和活性
大鼠 NPSCs ^[51]	水凝胶	注射负载水凝胶的 NPSCs 可促进退变椎间盘组织的再生
大鼠 NPSCs ^[57]	TGF/IGF	TGF-β3 和 IGF-1 协同作用增强 NPSCs 生存和分化能力

- tion and characterization of mesenchymal stromal cells from human degenerated nucleus pulposus[J]. *Spine*, 2010, 35(26): 2259–2265.
11. 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.
12. 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.
13. Gruber HE, Riley FE, Hoelscher GL, et al. Human annulus progenitor cells: analyses of this viable endogenous cell population[J]. *J Orthop Res*, 2016, 34(8): 1351–1360.
14. Liu S, Liang H, Lee SM, et al. Isolation and identification of stem cells from degenerated human intervertebral discs and their migration characteristics[J]. *Acta Biochim Biophys Sin(Shanghai)*, 2017, 49(2): 101–109.
15. Wang H, Zhou Y, Chu TW, et al. Distinguishing characteristics of stem cells derived from different anatomical regions of human degenerated intervertebral discs [J]. *Eur Spine J*, 2016, 25(9): 2691–2704.
16. Liu C, Guo Q, Li J, et al. Identification of rabbit annulus fibrosus-derived stem cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (9): e108239.
17. Jia Z, Yang P, Wu Y, et al. Comparison of biological characteristics of nucleus pulposus mesenchymal stem cells derived from non-degenerative and degenerative human nucleus pulposus[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(6): 3574–3580.
18. Li B, Sun C, Sun J, et al. Autophagy mediates serum starvation-induced quiescence in nucleus pulposus stem cells by the regulation of P27[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 118.
19. Huang B, Liu LT, Li CQ, et al. Study to determine the presence of progenitor cells in the degenerated human cartilage endplates[J]. *Eur Spine J*, 2012, 21(4): 613–622.
20. Xiong CJ, Huang B, Zhou Y, et al. Macrophage migration inhibitory factor inhibits the migration of cartilage end plate-derived stem cells by reacting with CD74[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43984.
21. Yuan C, Pu L, He Z, et al. BNIP3/Bcl-2-mediated apoptosis induced by cyclic tensile stretch in human cartilage endplate-derived stem cells[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(1): 235–241.
22. Zuo R, Wang Y, Li J, et al. Rapamycin induced autophagy inhibits inflammation-mediated endplate degeneration by enhancing Nrf2/Keap1 signaling of cartilage endplate stem cells [J]. *Stem Cells*, 2019, 37(6): 828–840.
23. Sakai D, Nakamura Y, Nakai T, et al. Exhaustion of nucleus pulposus progenitor cells with ageing and degeneration of the intervertebral disc [J]. *Nat Commun*, 2012, 3: 1264.
24. 卢旭华, 赵定麟, 陈德玉, 等. 山羊颈椎间盘纤维环组织成骨潜能的体内观察[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2005, 15(6): 357–360+388.
25. Erwin WM, Islam D, Eftekarpour E, et al. Intervertebral disc –derived stem cells: implications for regenerative medicine and neural repair[J]. *Spine(Phila Pa 1976)*, 2013, 38(3): 211–216.
26. Ishii T, Sakai D, Schol J, et al. Sciatic nerve regeneration by transplantation of in vitro differentiated nucleus pulposus progenitor cells[J]. *Regen Med*, 2017, 12(4): 365–376.
27. Lazzarini R, Guarnieri S, Fulgenzi G, et al. Mesenchymal stem cells from nucleus pulposus and neural differentiation potential: a continuous challenge[J]. *J Mol Neurosci*, 2019, 67(1): 111–124.
28. Li XC, Tang Y, Wu JH, et al. Characteristics and potentials of stem cells derived from human degenerated nucleus pulposus: potential for regeneration of the intervertebral disc[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2017, 18(1): 242.
29. Wu H, Zeng X, Yu J, et al. Comparison of nucleus pulposus stem/progenitor cells isolated from degenerated intervertebral discs with umbilical cord derived mesenchymal stem cells [J]. *Exp Cell Res*, 2017, 361(2): 324–332.
30. Han B, Wang HC, Li H, et al. Nucleus pulposus mesenchymal stem cells in acidic conditions mimicking degenerative intervertebral discs give better performance than adipose tissue-derived mesenchymal stem cells[J]. *Cells Tissues Organs*, 2014, 199(5–6): 342–352.
31. Yao Y, Song W, Deng Q, et al. General regulatory effects of hypoxia on human cartilage endplate-derived stem cells: a genome-wide analysis of differential gene expression and alternative splicing events [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16 (3): 3001–3009.
32. Liu Y, Li Y, Nan LP, et al. The effect of high glucose on the biological characteristics of nucleus pulposus –derived mesenchymal stem cells[J]. *Cell Biochem Funct*, 2020, 38(2): 130–140.
33. Sun C, Lan W, Li B, et al. Glucose regulates tissue-specific chondro –osteogenic differentiation of human cartilage endplate stem cells via O –GlcNAcylation of Sox9 and Runx2 [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 357.
34. He Z, Pu L, Yuan C, et al. Nutrition deficiency promotes apoptosis of cartilage endplate stem cells in a caspase – independent manner partially through upregulating BNIP3 [J]. *Acta Biochim Biophys Sin(Shanghai)*, 2017, 49(1): 25–32.
35. Yurube T, Buchser WJ, Moon HJ, et al. Serum and nutrient deprivation increase autophagic flux in intervertebral disc annulus fibrosus cells: an in vitro experimental study[J]. *Eur Spine J*, 2019, 28(5): 993–1004.
36. Yao Y, Deng Q, Sun C, et al. A genome-wide analysis of the gene expression profiles and alternative splicing events during the hypoxia-regulated osteogenic differentiation of human cartilage endplate-derived stem cells[J]. *Mol Med Rep*,

- 2017, 16(2): 1991–2001.
37. Tian D, Liu J, Chen L, et al. The protective effects of PI3K/Akt pathway on human nucleus pulposus mesenchymal stem cells against hypoxia and nutrition deficiency [J]. *J Orthop Surg Res*, 2020, 15(1): 29.
38. Li Z, Chen S, Ma K, et al. CsA attenuates compression-induced nucleus pulposus mesenchymal stem cells apoptosis via alleviating mitochondrial dysfunction and oxidative stress [J]. *Life Sciences*, 2018, 205: 26–37.
39. Nan LP, Wang F, Ran D, et al. Naringin alleviates H₂O₂-induced apoptosis via the PI3K/Akt pathway in rat nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cells[J]. *Connect Tissue Res*, 2020, 61(6): 554–567.
40. Chen S, Liu S, Zhao L, et al. Heme oxygenase-1-mediated autophagy protects against oxidative damage in rat nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cells[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 9349762.
41. Ying J, Han Z, Pei S, et al. Effects of stromal cell-derived factor-1 α secreted in degenerative intervertebral disc on activation and recruitment of nucleus pulposus-derived stem cells[J]. *Stem Cells Int*, 2019, 2019: 9147835.
42. 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.
43. Tao YQ, Liang CZ, Li H, et al. Potential of co-culture of nucleus pulposus mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells in hyperosmotic microenvironment for intervertebral disc regeneration[J]. *Cell Biol Int*, 2013, 37(8): 826–834.
44. He Z, Jia M, Yu Y, et al. Roles of SDF-1/CXCR4 axis in cartilage endplate stem cells mediated promotion of nucleus pulposus cells proliferation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 506(1): 94–101.
45. Allon AA, Butcher K, Schneider RA, et al. Structured bilaminar coculture outperforms stem cells and disc cells in a simulated degenerate disc environment[J]. *Spine(Phila Pa 1976)*, 2012, 37(10): 813–818.
46. Liu C, Zhu C, Li J, et al. The effect of the fibre orientation of electrospun scaffolds on the matrix production of rabbit annulus fibrosus-derived stem cells[J]. *Bone Res*, 2015, 3: 15012.
47. Zhu C, Li J, Liu C, et al. Modulation of the gene expression of annulus fibrosus-derived stem cells using poly(ether carbonate urethane)urea scaffolds of tunable elasticity[J]. *Acta Biomater*, 2016, 29: 228–238.
48. Yuan D, Chen Z, Zhou Y, et al. Regenerative intervertebral disc endplate based on biomimetic three-dimensional scaffolds [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2017, 42(5): E260–E266.
49. 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.
50. Chen X, Zhu L, Wu G, et al. A comparison between nucleus pulposus-derived stem cell transplantation and nucleus pulposus cell transplantation for the treatment of intervertebral disc degeneration in a rabbit model [J]. *Int J Surg*, 2016, 28: 77–82.
51. Wang F, Nan LP, Zhou SF, et al. Injectable hydrogel combined with nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cells for the treatment of degenerative intervertebral disc in rats [J]. *Stem Cells Int*, 2019, 2019: 8496025.
52. Liu Y, Li Y, Nan LP, et al. Insights of stem cell-based endogenous repair of intervertebral disc degeneration [J]. *World J Stem Cells*, 2020, 12(4): 266–276.
53. Ma K, Chen S, Li Z, et al. Mechanisms of endogenous repair failure during intervertebral disc degeneration [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2019, 27(1): 41–48.
54. Clouet J, Fusellier M, Camus A, et al. Intervertebral disc regeneration: from cell therapy to the development of novel bioinspired endogenous repair strategies [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2019, 146: 306–324.
55. Liu J, Tao H, Wang H, 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.
56. Chen S, Deng X, Ma K, et al. Icaritin improves the viability and function of cryopreserved human nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cells [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 3459612.
57. Tao Y, Zhou X, Liang C, et al. TGF- β 3 and IGF-1 synergy ameliorates nucleus pulposus mesenchymal stem cell differentiation towards the nucleus pulposus cell type through MAPK/ERK signaling[J]. *Growth Factors*, 2015, 33(5–6): 326–336.
58. Pattappa G, Li Z, Peroglio M, et al. Diversity of intervertebral disc cells: phenotype and function[J]. *J Anatomy*, 2012, 221(6): 480–496.
59. Alt EU, Senst C, Murthy SN, et al. Aging alters tissue resident mesenchymal stem cell properties[J]. *Stem Cell Res*, 2012, 8(2): 215–225.
60. Yasen M, Fei Q, Hutton WC, et al. Changes of number of cells expressing proliferation and progenitor cell markers with age in rabbit intervertebral discs [J]. *Acta Biochim Biophys Sin(Shanghai)*, 2013, 45(5): 368–376.
61. Silva MJ, Holguin N. Aging aggravates intervertebral disc degeneration by regulating transcription factors toward chondrogenesis[J]. *FASEB J*, 2019, 34(2): 1970–1982.

(收稿日期:2020-10-11 末次修回日期:2020-12-22)

(本文编辑 卢庆霞)