

脂肪干细胞与纤维环细胞共培养后的 类纤维环分化效应研究

胡旭琪 张小磊 郑旭浩 吴畏 江立波 倪晓余 余洋 周一飞 徐华梓*

(温州医学院附属第二医院, 温州 325000)

摘要 干细胞移植是治疗椎间盘退变的新方向, 而对纤维环的修复是治疗椎间盘退变的前提。该研究利用Transwell共培养系统在常氧(20%)及低氧(2%)条件下探讨共培养诱导后SD大鼠脂肪干细胞向类纤维环细胞的分化能力。1,9-Dimethylmethylene blue(DMMB)检测表明, 低氧组脂肪干细胞诱导7, 14, 21 d后及常氧组脂肪干细胞诱导14 d及21 d后与对照组脂肪干细胞相比分泌氨基聚糖明显增加($P<0.05$), 且共培养14 d及21 d后低氧组脂肪干细胞较常氧组脂肪干细胞分泌氨基聚糖含量明显增多($P<0.05$)。qRT-PCR检测结果表明, 与对照组相比, 共培养14 d及21 d后常氧组及低氧组ADSCs *COL I*、*COL II*及*Aggrecan* mRNA表达均明显增强($P<0.05$), 且低氧组ADSCs表达量高于常氧组($P<0.05$)。COL I、COL II免疫组化及阿利辛染色也证实了上述结果。由此说明共培养可以诱导脂肪干细胞向类纤维环细胞分化, 且低氧(2%)有利于这种分化的发生。

关键词 脂肪干细胞; 纤维环细胞; 共培养; 椎间盘退变

In vitro Differentiation of Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells toward Annulus Fibrosus-like Cells by Co-culturing with Annulus Fibrosus Cells

Hu Xuqi, Zhang Xiaolei, Zheng Xuhao, Wu Wei, Jiang Libo, Ni Xiao, Yu Yang, Zhou Yifei, Xu Huazi*

(The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China)

Abstract In this research, we studied the differentiation ability of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) toward annulus fibrosus-like cells by co-culturing with annulus fibrosus cells (AFCs) under normoxia (20% O₂) or hypoxia (2% O₂) respectively. 1,9-Dimethylmethylene blue (DMMB) assay found glycosaminoglycan synthesis of hypoxia group which co-cultured for 7, 14, 21 d and normoxia group which co-cultured for 14, 21 d was significantly upregulated ($P<0.05$). The ADSCs in hypoxia group produced more glycosaminoglycan than those in normoxia group ($P<0.05$). The expression of collagen type I (*COL I*), collagen type II (*COL II*) and *Aggrecan* was estimated by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. After 14 d and 21 d of co-culture, the expression of COL I, COL II and *Aggrecan* was significantly upregulated in hypoxia group and normoxia group ($P<0.05$). And ADSCs in hypoxia group demonstrated more COL I, COL II and *Aggrecan* expression than those in normoxia group ($P<0.05$). These results suggested that with a co-culture system, ADSCs can differentiate into annulus fibrosus-like cells. Further, the oxygen concentration significantly influenced the ADSCs differentiation.

收稿日期: 2013-02-17 接受日期: 2013-03-12

浙江省“重中之重”学科开放基金(批准号: 2011GK001)和温州市科学技术局资助项目(批准号: S20100048、Y20100357、Y20100211)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0577-88879034, E-mail: spinexu@163.com

Received: February 17, 2013 Accepted: March 12, 2013

This work was supported by Zhejiang Extremely Key Subject of Surgery (Grant No.2011GK001) and Wenzhou Science and Technology Bureau Foundation (Grant No.S20100048, Y20100357, Y20100211)

*Corresponding author. Tel: +86-577-88879034, E-mail: spinexu@163.com

网络出版时间: 2013-05-24 15:06 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130524.1506.002.html>

Key words adipose-derived mesenchymal stem cell; annulus fibrosus cell; co-culture; degenerative disc disease

由于社会人口老龄化问题的突出,下腰痛成了日益严重的健康问题。目前,下腰痛的发病机制尚未明确,研究普遍认为椎间盘退变(degenerative disc disease, DDD)是引起下腰痛的主要原因^[1-3]。

随着组织工程、细胞生物技术的发展以及对椎间盘退变机制的深入研究,干细胞对DDD的治疗作用受到越来越多学者的关注。许多研究表明,干细胞可诱导分化为类髓核细胞^[4-7],成为干细胞移植治疗DDD的基础。脂肪干细胞(adipose-derived mesenchymal stem cells, ADSCs)具有自我增殖及多向分化能力,且来源丰富易于收集,患者容易接受^[8-9],因此它成为干细胞移植治疗DDD的理想种子细胞。

目前,对干细胞移植治疗DDD的细胞实验及临床试验主要针对干细胞向类髓核细胞分化,但对DDD的发病机制研究表明,纤维环细胞(annulus fibrosus cells, AFCs)对维持椎间盘正常功能发挥着重要作用。因此,本研究利用孔径为0.4 μm 的Transwell共培养系统(Corning, USA),在常氧(20%)及低氧(2%)条件下分别将ADSCs与AFCs作直接接触共培养,探讨ADSCs的类纤维环分化效应,为ADSCs治疗DDD提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与动物 SD大鼠脂肪干细胞购自广州赛业(Cyagen)生物科技有限公司,并由该公司提供CD29、CD44、CD90、CD34、CD45流式细胞检测及成脂、成骨诱导分化等相关鉴定。SD大鼠由温州医学院动物中心提供,动物的饲养和实验均得到温州医学院伦理委员会批准。

1.1.2 主要试剂与仪器 DMEM-F12培养基、胰酶(Gibco公司),胎牛血清(Hyclone公司),II型胶原酶、阿利新染液(Sigma公司),I型胶原及II型胶原小鼠抗大鼠多克隆抗体(Abcam公司),Trizol试剂(Invitrogen公司),逆转录试剂盒(Thermo公司)。

CO₂培养箱(Thermo公司),倒置相差显微镜(Nikon公司),酶标仪(TECAN公司),细胞计数仪(TC10, BIO-RAD公司),荧光定量PCR仪(Roche公

司),扫描电镜(HITACH公司)。

1.2 方法

1.2.1 纤维环细胞的分离培养 取150 g左右的SD大鼠5只,麻醉后无菌条件下取出腰椎转移至无菌操作台。PBS洗2遍后在10倍显微镜下用显微剪挑除髓核,收集纤维环后加入0.25%胰酶37 °C消化30 min,离心去除上层液体,再加入0.1% II型胶原酶消化4 h。200目滤网过滤,滤液继续离心去除上层液体,再加入5 mL含1%双抗、10% FBS的DMEM-F12重悬沉淀细胞。最后将重悬液转移至25 cm²培养瓶,置于37 °C、饱和湿度、含体积分数为0.05的CO₂的培养箱中培养。第4天首次换液,以后每3天换液。待细胞接近90%汇合时,0.25%胰酶消化1 min,以1:2传代培养。

1.2.2 ADSCs与AFCs共培养 本实验用2代AFCs及3代ADSCs在0.4 μm 孔径的Transwell系统中共培养。按Choi等^[10]的方法行细胞直接接触共培养:首先将Transwell嵌套倒置,将1 \times 10⁴个AFCs接种至倒置的嵌套膜上待5 h后细胞贴壁将Transwell放回6孔板内,将1 \times 10⁴个三代ADSCs接种至嵌套膜上。

实验分组如下:(1)常氧组(normoxia group):常氧(20%)条件下AFCs与ADSCs直接接触共培养7, 14, 21 d;(2)低氧组(hypoxia group):低氧(2%)条件下,AFCs与ADSCs直接接触共培养7, 14, 21 d;(3)对照组(control group):ADSCs于普通6孔板中贴壁后检测,即0 d。

1.2.3 扫描电镜观察细胞直接接触共培养 共培养第7 d,实验组中随机取3孔Transwell嵌套置于一普通6孔板中,PBS漂洗3遍,2%的戊二醛4 °C固定过夜。PBS漂洗,系列脱水,醋酸异戊酯置换,临界点干燥,表面喷金后行扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)观察。

1.2.4 阿利辛染色检测蛋白聚糖多聚体 在各时间点,常氧组、低氧组分别取3孔Transwell嵌套,将贴附在膜上层的ADSCs消化并接种至普通6孔板内。待细胞贴壁后PBS洗3遍,4%多聚甲醛固定30 min,PBS洗3遍后室温下加入0.5%的阿里辛染液30 min。PBS漂洗洗去多余染液,酒精梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片观察。以对照组ADSCs作为对照。

1.2.5 I型胶原、II型胶原免疫组化 在各时间点, 常氧组、低氧组分别取3孔Transwell嵌套, 将贴附在膜上层的ADSCs消化并接种至普通6孔板内。待细胞贴壁后PBS洗3遍, 4%的多聚甲醛固定半小时, PBS洗3遍; 加0.5% Triton X-100室温下30 min; 3%过氧化氢室温孵育15 min; PBS洗3遍; 滴加山羊血清37 °C孵育30 min; 滴加I型胶原一抗(1:100稀释)或II型胶原一抗(1:200稀释), 4 °C过夜; PBS洗3遍, 滴加二抗37 °C孵育30 min; PBS洗3遍, 滴加DAB显色1 min; PBS洗3遍, 苏木素复染, 流水冲洗30 min, 封片, 观察。以对照组ADSCs作为对照。

1.2.6 1,9-Dimethylmethylene blue(DMMB)检测氨基聚糖 在各时间点, 常氧组、低氧组分别取3孔Transwell嵌套, 将贴附在膜上层的ADSCs消化并接种至普通6孔板内分别在低氧(2%氧浓度)、常氧(20%氧浓度)下培养2天。参照Yoon等^[11]的方法, 将培养液收集入YM-50离心超滤管(Milipore)后5 000×g离心30 min, 氨基聚糖(glycosaminoglycan, GAG)浓度浓缩20倍。分别取20 μL浓缩的培养液与200 μL DMMB染液(含3.4 mg/mL甘氨酸、2.37 mg/mL NaCl、0.01 mol/L HCl、0.016 mg/mL DMMB)混合, 酶标仪记录波长525 nm处的吸光度(D)值。用硫酸软骨素作标准曲线(0~150 μg/mL), 测定每个样本的GAG浓度。消化收集每孔细胞, 用细胞计数器计数细胞数量, GAG含量以每孔GAG总量/该孔细胞数表示。同样方法测定对照组GAG含量, 最后实验组GAG含量以与对照组测量结果比值表示。

1.2.7 定量逆转录PCR(quantitative reverse transcription PCR, qRT-PCR)检测COL I、COL II及Aggrecan的mRNA表达 各时间点分别收集各组贴附transwell嵌套膜上层的细胞, 以Trizol试剂裂解细胞抽提细胞总RNA, 测定RNA浓度。然后将RNA反转录成cDNA, 以18S rRNA为内参, 利用cDNA为模板进行荧光定量PCR。反应条件: 95 °C预变性5 min, 随后95 °C变性30 s, 60 °C退火30 s, 72 °C延伸45 s, 共进行45个循环, 再72 °C延伸10 min。结果用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算目的基因的相对表达量。本实验所有引物由英潍捷基(Invitrogen)生物科技有限公司设计合成, 其中COL I的上、下游引物分别为5'-TGA TGC CAA CGT GGT CCG-3'和5'-TCG ATC CAG TAC TCT CCG CTC T-3'; COL II的上、下游引物分别为5'-GAA GCA CAT CTG GTT TGG AG-3'和5'-TTG GGG TTG

AGG GTT TTA CA-3'; Aggrecan的上下游分别为5'-TAG AGA AGA AGA GGG GTT AGG-3'和5'-AGC AGT AGG AGC CAG GGT TAT-3'; 内参18 S rRNA的上下游引物分别为5'-GGA CAC GGA CAG GTT GAC AG-3'和5'-CGG ACA TCT AAG GGC ATCA CA-3'。

1.3 统计学处理

结果采用SPSS16.0统计学软件分析, 数据以($x\pm s$)表示。7, 14, 21 d的常氧组、低氧组及0 d的对照组进行单因素方差分析, 常氧组与低氧组之间比较用Student's *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞直接接触共培养(扫描电镜)

共培养7 d后扫描电镜示分别位于Transwell膜正反面的ADSCs和AFCs各自伸出伪足, 穿入0.4 μm孔隙中从而两种细胞通过伪足直接接触(图1)。

2.2 诱导后ADSCs分泌蛋白聚糖多聚体(阿利辛染色)

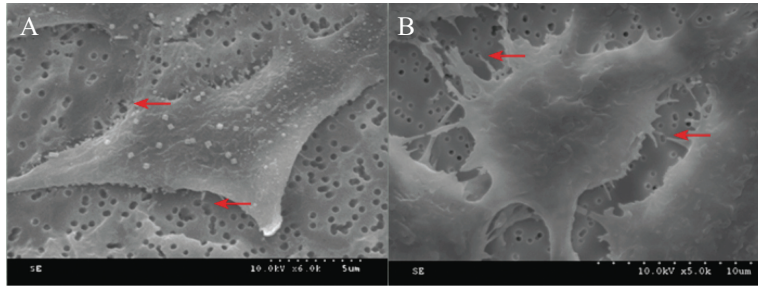
共培养诱导后阿利辛染色检测ADSCs蛋白聚糖多聚体(Aggrecan)分泌(图2)。与对照组相比(图2A和图2E), 共培养后常氧组及低氧组ADSCs胞浆异染性明显升高, 且随着共培养时间延长这种异染性明显增强。

2.3 诱导后ADSCs COL I和COL II检测(免疫组化)

COL II免疫组化显示, 常氧诱导7 d的ADSCs呈阳性(图3B), 而低氧诱导7 d的ADSCs呈弱阳性, 个别细胞胞浆呈黄色(图3F); 诱导14 d ADSCs呈多角形, 细胞形态清晰, 胞核呈紫色, 细胞胞浆呈颗粒状棕黄色, 其中低氧诱导的ADSCs II型胶原免疫组化着色更深(图3G); 诱导21 d ADSCs呈阳性, 但个别细胞形态皱缩呈针尖样; 而0 d的ADSCs作为对照组呈阴性, 胞浆无明显着色(图3A和图3E)。类似的COL I免疫组化示共培养诱导后ADSCs细胞形态逐渐从梭型转变为多角形, 且细胞胞浆呈颗粒状黄色, 共培养诱导14 d及21 d后尤为明显, 而对照组呈阴性(图4)。

2.4 诱导后ADSCs氨基聚糖分泌量(DMMB检测)

共培养后各时间点常氧组及低氧组ADSCs GAG相对含量(其中常氧对照组的ADSCs GAG含量设为1, 图5), 低氧组ADSCs诱导7, 14, 21 d后与对照组ADSCs相比分泌GAG明显增加($P<0.05$), 且各时间点GAG含量随着共培养时间的延长明显增

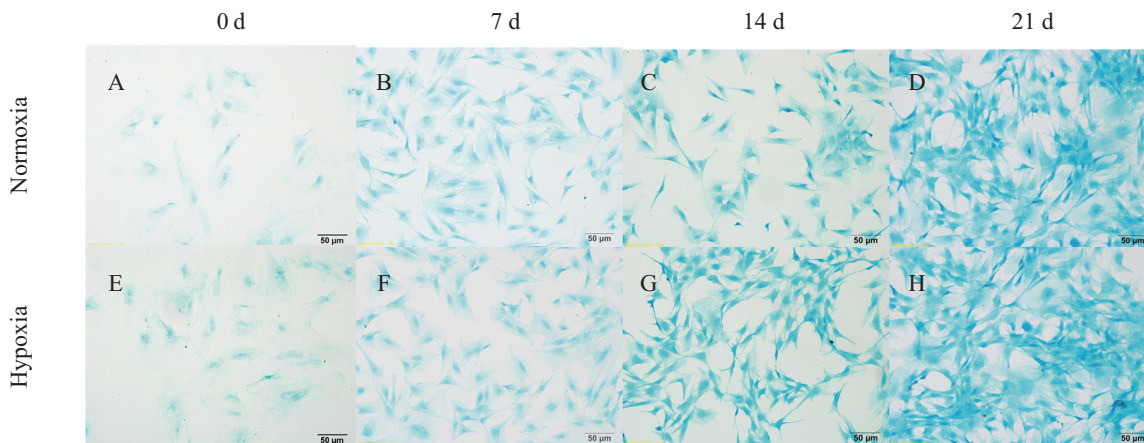


A: ADSCs伪足伸入Transwell膜上的0.4 μm小孔内(红色箭头所示); B: AFCs伪足伸入Transwell膜上的0.4 μm小孔内(红色箭头所示)。

A: on the front side of the membrane, the cytoplasmic process of ADSCs were extending toward AFCs through pores of membrane; B: AFCs on the reverse side of the membrane were adhering ADSCs of the front side by extending cytoplasmic process via pores of membrane.

图1 扫描电镜示Transwell膜上下两种细胞伸出伪足通过Transwell膜上0.4 μm小孔发生直接接触

Fig.1 Electron microscopic found that ADSCs and AFCs directly contacted each other by extending cytoplasmic process through 0.4 μm pores of membrane

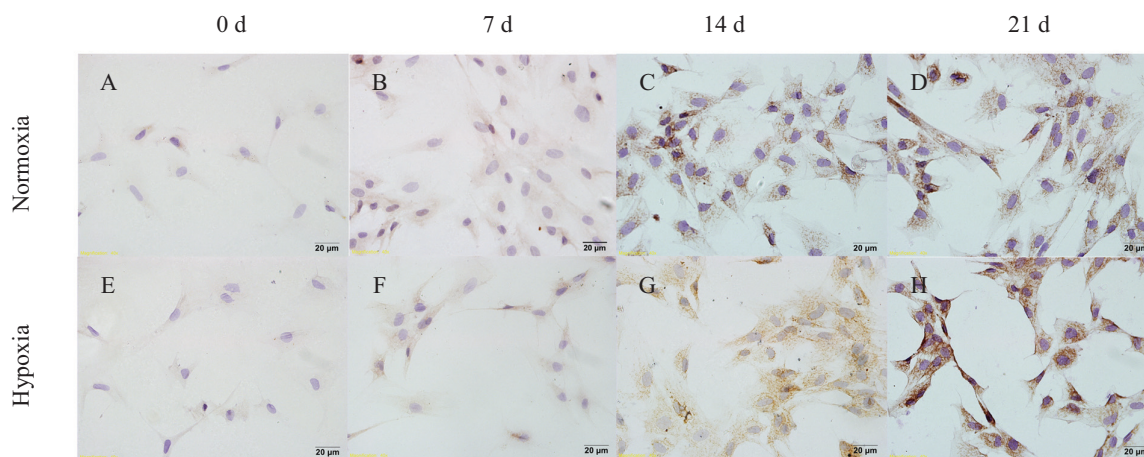


A,E: 常氧对照、低氧对照阿利辛染色; B,F: 7 d常氧组、低氧组阿利辛染色; C,G: 14 d常氧组、低氧组阿利辛染色; D,H: 21 d常氧组、低氧组阿利辛染色。

A,E: alcian blue staining of normoxia control and hypoxia group; B,F: alcian blue staining of normoxia group and hypoxia group for 7 d; C,G: alcian blue staining of normoxia group and hypoxia group for 14 d; D,H: alcian blue staining of normoxia group and hypoxia group for 21 d.

图2 共培养后阿利辛染色检测ADSCs分泌蛋白聚糖多聚体

Fig.2 Aggrecan production in ADSCs after co-culture detected by Alcian blue staining

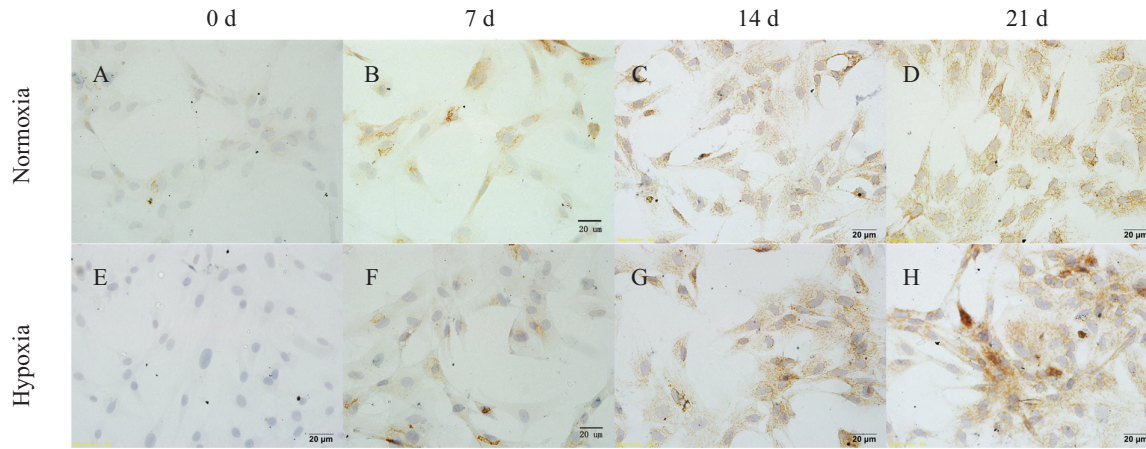


A,E: 常氧对照、低氧对照组II型胶原免疫组化; B,F: 7 d常氧组、低氧组II型胶原免疫组化; C,G: 14 d常氧组、低氧组II型胶原免疫组化; D,H: 分别为21 d常氧组、低氧组II型胶原免疫组化。

A,E: COL II immunohistochemical staining of normoxia control and hypoxia control; B,F: COL II immunohistochemical staining of normoxia group and hypoxia group for 7 d; C,G: COL II immunohistochemical staining of normoxia group and hypoxia group for 14 d; D,H: COL II immunohistochemical staining of normoxia group and hypoxia group for 21 d.

图3 共培养后ADSCs COL II免疫组化结果

Fig.3 COL II immunohistochemical staining of ADSCs after co-culture

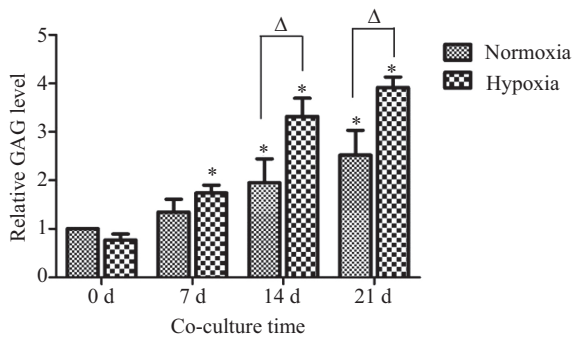


A,E: 常氧对照、低氧对照组I型胶原免疫组化; B,F: 7 d常氧组、低氧组I型胶原免疫组化; C,G: 14 d常氧组、低氧组I型胶原免疫组化; D,H: 21 d常氧组、低氧组I型胶原免疫组化。

A,E: COL I immunohistochemical staining of normoxia control and hypoxia control; B,F: COL I immunohistochemical staining of normoxia group and hypoxia group for 7 d; C,G: COL I immunohistochemical staining of normoxia group and hypoxia group for 14 d; D,H: COL I immunohistochemical staining of normoxia group and hypoxia group for 21 d.

图4 共培养后ADSCs COL I免疫组化结果

Fig.4 COL I immunohistochemical staining of ADSCs after co-culture



* $P < 0.05$, 与对照组相比; $^{\Delta}P < 0.05$, 与常氧组相比。

* $P < 0.05$ vs control group; $^{\Delta}P < 0.05$ vs normoxia group.

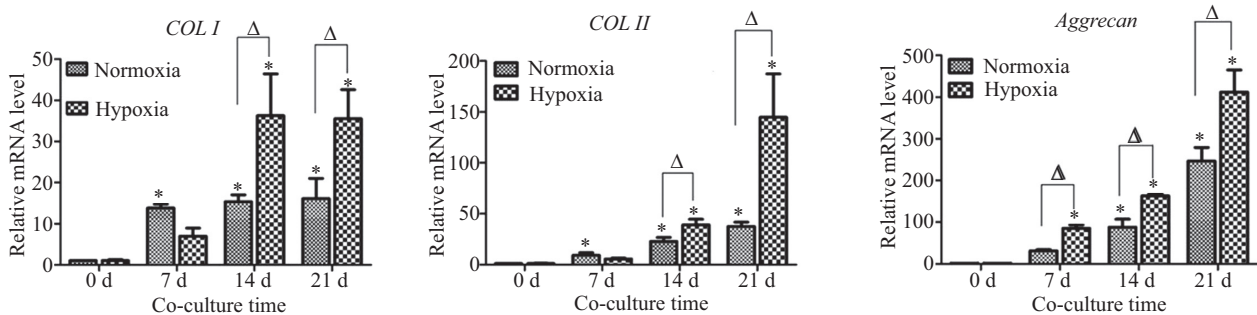
图5 共培养后ADSCs GAG相对分泌量 (其中常氧对照组ADSCs GAG分泌量设为1)

Fig.5 GAG production of ADSCs after co-culture (expression of normalized to normoxia control group as 1)

加($P < 0.05$)。而常氧组ADSCs诱导14 d及21 d后与对照组ADSCs相比GAG含量增加($P < 0.05$), 但共培养14 d及21 d的ADSCs GAG分泌量无明显差异($P > 0.05$)。另外, 检测结果表明共培养14 d及21 d后低氧组ADSCs较常氧组ADSCs分泌GAG含量明显增多($P < 0.05$)。

2.5 共培养对ADSCs COL I、COL II及Aggrecan基因表达的影响

共培养后常氧组及低氧组ADSCs COL I、COL II及Aggrecan mRNA的相对表达量(其中常氧对照组ADSCs mRNA表达量设为1, 图6)。与对照组相比, 共培养14 d及21 d后常氧组及低氧组ADSCs COL I、COL II及Aggrecan mRNA表达均明显增强($P < 0.05$),



* $P < 0.05$, 与对照组相比; $^{\Delta}P < 0.05$, 与常氧组相比。

* $P < 0.05$ vs control group; $^{\Delta}P < 0.05$ vs normoxia group.

图6 共培养后ADSCs COL I、COL II及Aggrecan基因相对表达(其中常氧对照组mRNA表达量设为1)

Fig.6 COL I, COL II and Aggrecan expression after co-culture(data normalized to normoxia control group as 1)

且低氧组ADSCs表达量高于常氧组($P<0.05$)。而共培养7 d后低氧组ADSCs *COL I*、*COL II* mRNA及常氧组*Aggrecan* mRNA表达量与对照组无明显差异($P>0.05$), 其中常氧组ADSCs *COL I*、*COL II* mRNA低于常氧组, 但差异无统计意义($P>0.05$)。

3 讨论

椎间盘退变是一个椎间盘细胞介导的病理过程^[12-13]: 无论纤维环细胞或是髓核细胞分泌的细胞外基质减少或分泌异常都将导致椎间盘功能失调^[14]。Videman等^[15]发现, 超过50%的年轻DDD患者存在纤维环撕裂而对于老年DDD患者纤维环撕裂的发生率近100%。退变的髓核可通过这些裂口突出到椎间盘外形成疝, 继而压迫神经引起剧烈疼痛^[16]。由此, 从临床治疗的角度来讲对纤维环的修复是治疗椎间盘退变的第一步, 能够重建纤维环的完整性和功能是对退变髓核的治疗前提^[16-18]。

目前, 共培养诱导分化的机制尚未明确, 主要通过两种途径: (1)细胞旁分泌作用。Yamamoto等^[19]证实骨髓间充质干细胞与髓核细胞直接接触共培养时上清液中的转化生长因子 $\beta 1$ 等生长因子含量明显增加, 促进骨髓间充质干细胞向类髓核细胞分化; (2)细胞直接接触作用, 包括: 细胞融合^[20]、缝隙连接交流^[21]、通过微管发生的物质交换^[22]。笔者认为, 无论是细胞旁分泌还是细胞直接接触, 两者都是密不可分的生理现象。当干细胞移植入椎间盘后与移植部位的椎间盘细胞通过上述方式传递可溶性的因子或者胞质、胞核内的物质(包括各种功能基因), 最终导致干细胞表型发生变化。因此, 与传统的间接接触共培养或通过含各种生长因子的特定培养基诱导分化相比, 直接接触共培养诱导分化更能有效模拟干细胞移植入椎间盘后的微环境。本实验所用Transwell透明膜的孔径为 $0.4 \mu\text{m}$, 各种细胞因子可自由通过半透膜, 共培养一周后扫描电镜证实纤维环细胞及脂肪干细胞伸出伪足通过透明膜上 $0.4 \mu\text{m}$ 的小孔两种细胞间发生直接接触, 本研究主要通过上述两种方式共同促使了脂肪干细胞向类纤维环细胞分化。

纤维环细胞主要分泌胶原蛋白及氨基多糖等组成细胞外基质维持纤维环功能, 其中外层纤维环主要分泌COL I而内层纤维环主要分泌COL II^[23]。椎间盘内几乎无血管^[24], 因此椎间盘细胞所在微环

境氧含量较低(1%~8%)^[25]。Stoyanov等^[26]研究发现, 利用近似椎间盘细胞所在的低氧环境(2%)可以促进骨髓干细胞向类髓核细胞分化。纤维环细胞尤其是内层纤维环细胞同样处于低氧的环境, 氧浓度对于干细胞向类纤维环细胞分化是否存在影响? 因此, 笔者在本实验中进一步研究了低氧(2%)条件下ADSCs的类纤维环分化效应。

将AFCs与ADSCs直接接触共培养后DMMB检测显示, 低氧组7 d开始GAG含量显著增加, 而常氧组14 d开始GAG含量显著增加($P<0.05$)。常氧组与低氧组相比, 共培养14 d及21 d低氧组ADSCs分泌GAG含量明显高于常氧组($P<0.05$)。qRT-PCR检测共培养后ADSCs *Aggrecan* mRNA表达及阿利辛染色皆取得类似结果。共培养14 d及21 d qRT-PCR检测ADSCs *COL I*、*COL II* mRNA表达量明显增强($P<0.05$), 且低氧组ADSCs与常氧组ADSCs相比*COL I*、*COL II* mRNA表达量更高, 差异有统计学意义($P<0.05$)。同时, 免疫组化证实共培养14 d及21 d后ADSCs表达COL I及COL II明显强于对照组。共培养诱导7 d低氧组ADSCs *COL I*、*COL II* mRNA表达不及常氧组(差异无统计学意义), 这可能由于干细胞对这种低氧环境存在一定适应时间。以上结果证实直接接触共培养可以诱导ADSCs向类纤维环细胞分化, 且低氧(2%)条件可促进这种分化。Kanichai等^[27]利用AKT抑制剂及siRNA干扰技术研究发现低氧(2%)微环境可诱发蛋白激酶B(AKT)和p38丝裂原活化蛋白激酶的磷酸化增加进一步上调低氧诱导因子 1α (HIF- 1α)表达, 从而维持软骨细胞特性。笔者认为, 纤维环细胞具备一定类软骨细胞特性(如分泌II型胶原、氨基多糖), 低氧条件可能同样通过上述途径促进干细胞向类纤维环细胞分化。

本次研究中诱导后的ADSCs为类纤维环细胞, 能分泌纤维环细胞的功能蛋白即COL I、COL II、*Aggrecan*作为治疗DDD的基础。但由于目前纤维环细胞缺乏特异性的表型特征, 这类类纤维环细胞仍需进一步鉴定。因此, 亟需通过微阵列(microarray)、qRT-PCR等实验技术筛选出纤维环细胞相对于软骨细胞及髓核细胞的特异性表型以进一步提高通过干细胞移植修复纤维环的安全性及有效性。另外, 本次研究初步证实了低氧(2%)可以促进干细胞向类纤维环细胞分化, 下一步研究将比较梯度低氧浓度条件下干细胞的类纤维环分化效果, 从而进一步优化

干细胞向纤维环细胞的分化条件, 为干细胞移植修复退变纤维环提供更准确的理论依据。

参考文献 (References)

- 1 Luoma K, Riihimaki H, Luukkonen R, Raininko R, Viikari-Juntura E, Lamminen A. Low back pain in relation to lumbar disc degeneration. *Spine* 2000; 25(4): 487-92.
- 2 Cheung KM, Karppinen J, Chan D, Ho DW, Song YQ, Sham P, *et al.* Prevalence and pattern of lumbar magnetic resonance imaging changes in a population study of one thousand forty-three individuals. *Spine* 2009; 34(9): 934-40.
- 3 Livshits G, Popham M, Malkin I, Sambrook PN, MacGregor AJ, Spector T, *et al.* Lumbar disc degeneration and genetic factors are the main risk factors for low back pain in women: the UK Twin Spine Study. *Ann Rheum Dis* 2011; 70(10): 1740-5.
- 4 Chen S, Emery SE, Pei M. Coculture of synovium-derived stem cells and nucleus pulposus cells in serum-free defined medium with supplementation of transforming growth factor-beta1: A potential application of tissue-specific stem cells in disc regeneration. *Spine* 2009; 34(12): 1272-80.
- 5 Risbud MV, Albert TJ, Guttapalli A, Vresilovic EJ, Hillibrand AS, Vaccaro AR, *et al.* Differentiation of mesenchymal stem cells towards a nucleus pulposus-like phenotype *in vitro*: Implications for cell-based transplantation therapy. *Spine* 2004; 29(23): 2627-32.
- 6 Cheng YH, Yang SH, Su WY, Chen YC, Yang KC, Cheng WTK, *et al.* Thermosensitive chitosan-gelatin-glycerol phosphate hydrogels as a cell carrier for nucleus pulposus regeneration: An *in vitro* study. *Tissue Eng Part A* 2010; 16(2): 695-703.
- 7 Gaetani P, Torre ML, Klinger M, Faustini M, Crovato F, Bucco M, *et al.* Adipose-derived stem cell therapy for intervertebral disc regeneration: An *in vitro* reconstructed tissue in alginate capsules. *Tissue Eng Part A* 2008; 14(8): 1415-23.
- 8 Huang JI, Zuk PA, Jones NF, Zhu M, Lorenz HP, Hedrick MH, *et al.* Chondrogenic potential of multipotential cells from human adipose tissue. *Plast Reconstr Surg* 2004; 113(2): 585-94.
- 9 Awad HA, Wickham MQ, Leddy HA, Gimble JM, Guilak F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials* 2004; 25(16): 3211-22.
- 10 Choi EH, Park H, Park KS, Kim BS, Han IB, Shin DA, *et al.* Effect of nucleus pulposus cells having different phenotypes on chondrogenic differentiation of adipose-derived stromal cells in a coculture system using porous membranes. *Tissue Eng Part A* 2011; 17(19/20): 2445-51.
- 11 Yoon ST, Kim KS, Li J, Park JS, Akamaru T, Elmer WA, *et al.* The effect of bone morphogenetic protein-2 on rat intervertebral disc cells *in vitro*. *Spine* 2003; 28(16): 1773-80.
- 12 Adams MA, Roughley PJ. What is intervertebral disc degeneration, and what causes it? *Spine* 2006; 31(18): 2151-61.
- 13 Zhao CQ, Wang LM, Jiang LS, Dai LY. The cell biology of intervertebral disc aging and degeneration. *Ageing Res Rev* 2007; 6(3): 247-61.
- 14 Antoniou J, Steffen T, Nelson F, Winterbottom N, Hollander AP, Poole RA, *et al.* The human lumbar intervertebral disc-evidence for changes in the biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, ageing, and degeneration. *J Clin Invest* 1996; 98(4): 996-1003.
- 15 Videman T, Nurminen M. The occurrence of annular tears and their relation to lifetime back pain history: A cadaveric study using barium sulfate discography. *Spine* 2004; 29(23): 2668-76.
- 16 Gruber HE, Deepe R, Hoelscher GL, Ingram JA, Norton HJ, Scannell B, *et al.* Human adipose-derived mesenchymal stem cells: Direction to a phenotype sharing similarities with the disc, gene expression profiling, and coculture with human annulus cells. *Tissue Eng Part A* 2010; 16(9): 2843-60.
- 17 An HS, Thonar E, Masuda K. Biological repair of intervertebral disc. *Spine* 2003; 28(15): S86-S92.
- 18 Bron JL, Helder MN, Meisel HJ, van Royen BJ, Smit TH. Repair, regenerative and supportive therapies of the annulus fibrosus: Achievements and challenges. *Eur Spine J* 2009; 18(3): 301-13.
- 19 Yamamoto Y, Mochida J, Sakai D, Nakai T, Nishimura K, Kawada H, *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. *Spine* 2004; 29(14): 1508-14.
- 20 Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, *et al.* Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002; 416(6880): 542-5.
- 21 Yoon J, Shim WJ, Ro YM, Lim DS. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes by direct cell-to-cell contact with neonatal cardiomyocyte but not adult cardiomyocytes. *Ann Hematol* 2005; 84(11): 715-21.
- 22 Lai RC, Arslan F, Lee MM, Sze SK, Choo A, Chen TS, *et al.* Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury (vol 4, pg 214, 2010). *Stem Cell Res* 2010; 5(2): 170-1.
- 23 Smith LJ, Nerurkar NL, Choi KS, Harfe BD, Elliott DM. Degeneration and regeneration of the intervertebral disc: Lessons from development. *Dis Model Mech* 2011; 4(1): 31-41.
- 24 Grunhagen T, Wilde G, Soukane DN, Shirazi-Adi SA, Urban JPG. Nutrient supply and intervertebral disc metabolism. *J Bone Joint Surg Am* 2006; 88Suppl: 30-5.
- 25 Bartels EM, Fairbank JCT, Winlove CP, Urban JPG. Oxygen and lactate concentrations measured *in vivo* in the intervertebral discs of patients with scoliosis and back pain. *Spine* 1998; 23(1): 1-7.
- 26 Stoyanov JV, Gantenbein-Ritter B, Bertolo A, Aebli N, Baur M, Alini M, *et al.* Role of hypoxia and growth and differentiation factor-5 on differentiation of human mesenchymal stem cells towards intervertebral nucleus pulposus-like cells. *Eur Cell Mater* 2011; 21: 533-47.
- 27 Kanichai M, Ferguson D, Prendergast PJ, Campbell VA. Hypoxia promotes chondrogenesis in rat mesenchymal stem cells: A role for AKT and hypoxia-inducible factor (HIF)-1 alpha. *J Cell Physiol* 2008; 216(3): 708-15.