

低氧对体外人软骨终板干细胞增殖、衰老、凋亡的影响

成楠 刘欢 姚远 李杰 周跃*

(第三军医大学新桥医院骨科, 重庆 400037)

摘要 该文应用原代培养的方法获得人软骨终板干细胞(cartilage endplate derived stem cells, CESC_s)。采用水溶性四唑盐(WST)-1法、Edu掺入法、 β -半乳糖苷酶染色法、流式细胞术检测低氧(1% O₂)刺激对CESC_s细胞增殖、衰老、凋亡以及细胞周期的影响。结果显示, 与常氧(21% O₂)组相比较, 低氧刺激对CESC_s增殖活性有显著的促进作用, 低氧处理72 h后, CESC_s的增殖活性增加最为显著, 低氧刺激能够极为显著的抑制CESC_s的衰老, 低氧对CESC_s的凋亡同样具有极为显著的抑制作用; 低氧影响CESC_s的细胞周期, 呈现出G₁期细胞比例先增加后减少和(S+G₂/M)期细胞比例先减少后增加的趋势。结果表明, 低氧刺激能够促进CESC_s增殖、抑制细胞衰老和凋亡。

关键词 低氧; 人软骨终板干细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡; 细胞衰老

Effects of Hypoxia on the Growth, Senescence and Apoptosis of Human Cartilage Endplate Derived Stem Cells *In Vitro*

Cheng Nan, Liu Huan, Yao Yuan, Li Jie, Zhou Yue*

(Department of Orthopaedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract In this study, we obtained human cartilage endplate derived stem cells (CESC_s) via primary culture. The effects of hypoxia (1% O₂) on growth, senescence, apoptosis and cell cycle of CESC_s were investigated by WST-1 cell proliferation and cytotoxicity assay kit, Edu cell proliferation assay kit, β -galactosidase staining, flow cytometry, respectively. The results showed that proliferation of CESC_s was significantly promoted, senescence and apoptosis of CESC_s were significantly inhibited cultured hypoxia for 72 h, compared with the normoxia (21% O₂) group. Hypoxia culture affected the cell cycle of CESC_s, cell proportion of G₁ phase was firstly increased then decreased, and the cell proportion of S and G₂/M phases were firstly decreased then increased. The results demonstrated that hypoxia could promote CESC_s proliferation and inhibit CESC_s senescence and apoptosis.

Keywords hypoxia; human cartilage endplate derived stem cell; cell proliferation; cell apoptosis; cell senescence

下腰痛(low back pain, LBP)已成为严重影响人类健康的疾病之一^[1-2]。椎间盘退行性疾病(degenerative disc disease, DDD)是引起下腰痛的主要原因^[3-4]。椎间盘绝大部分营养成分的摄取都需要通过软骨终板(cartilage endplate, CEP)以扩散的形

式完成, 软骨终板退变在椎间盘退行性疾病的发生和发展中起到十分重要的作用^[5-6]。目前, 椎间盘退行性疾病的治疗主要是通过手术方式, 然而椎间盘退变的使动因素软骨终板退变并未得到治疗, 基于细胞治疗的椎间盘结构和功能再生的研究成为近年

收稿日期: 2016-03-08 接受日期: 2016-06-12

国家自然科学基金(批准号: 81472076、81271982、81401801)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68774328, E-mail: happyzhou@vip.163.com

Received: March 8, 2016 Accepted: June 12, 2016

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81472076, 81271982, 81401801)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68774328, E-mail: happyzhou@vip.163.com

网络出版时间: 2016-08-10 11:08:22 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160810.1108.002.html>

来研究者们关注的热点。间充质干细胞具有扩增、自我更新和多系分化潜能等特性, 并且被大量应用于椎间盘修复和再生的研究中, 被认为是椎间盘细胞替代治疗的理想种子细胞来源。我们的研究团队从临床退变椎间盘手术标本中分离、筛选得到了人软骨终板干细胞(cartilage endplate derived stem cells, CESC_s), 并验证了CESC_s成软骨分化和成骨分化能力。我们的这一发现不仅证实了退变软骨终板中仍然有干细胞存在, 也为椎间盘退变的细胞替代治疗和组织工程提供了新的选择^[4]。

近年来, 我们的研究团队在体外常氧条件下就CESC_s的成软骨分化、成骨分化和细胞迁移等相关方面进行了研究^[7-10]。众所周知, 椎间盘是人体内最大的无血管结构^[11], 椎间盘细胞生存在低氧环境中。CESC_s是继间充质干细胞后椎间盘退变细胞替代治疗理想的种子细胞。我们以往的研究主要是在体外常氧条件下进行的, CESC_s作为种子细胞最终将应用于体内低氧环境。低氧能够促进间充质干细胞增殖、抑制衰老、维持干细胞特性^[12-13]。然而, 低氧环境对于CESC_s影响的研究尚未见报道, 本研究旨在初步探究低氧环境(1% O₂)对CESC_s细胞周期、增殖、衰老和凋亡的影响, 为深入探讨低氧环境影响CESC_s生物学功能的机制研究提供理论基础, 同时也为CESC_s体外培养扩增后体内移植前低氧预处理提供参考数据。

1 材料与方法

1.1 材料

依据Pfirrmann分级法(目前国际上被广泛接受的评价椎间盘退变程度的分级方法)先后收集分级相同的患者标本, 分别进行原代培养。本实验中收集的人软骨终板来源于3名接受了微创经椎间孔入路椎间植骨融合内固定术(MIS-TLIF)的患者。3名患者平均年龄54岁(年龄范围52岁至55岁), 男女比

例1:2(表1), 以上临床标本均经患者或家属签字同意, 并得到新桥医院伦理委员会批准。

1.2 试剂及仪器

DMEM/F12培养液购自Hyclone公司; II型胶原酶、胰蛋白酶-EDTA消化液购自Solarbio公司; 琼脂糖购自Invitrogen公司; 胎牛血清(foetal bovine serum, FBS)购自Biological Industries(BI)公司; 青霉素/链霉素双抗溶液购自Cyagen公司; CD73-FITC、CD90-FITC、CD14-FITC、CD19-FITC、CD34-FITC、CD45-FITC、CD105-PE和HLA-DR-PerCP购自eBioscience公司; WST-1细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒和细胞衰老β-半乳糖苷酶染色试剂盒购自碧云天生物技术有限公司; Edu细胞增殖检测试剂盒购自锐博生物科技有限公司。

解剖显微镜为德国Leica公司产品。常氧与低氧细胞培养箱均为美国Thermo Scientific 3111水套式CO₂细胞培养箱。全波长多功能酶标仪为美国Thermo Scientific产品。6孔和96孔细胞培养板购自美国Costar公司。流式细胞仪为美国Beckman Coulter公司产品。倒置荧光显微镜Olympus IX73购自日本Olympas公司。隔水式电热恒温培养箱购自上海跃进医疗器械有限公司。洁净工作台购自苏州苏净化设备有限公司。

1.3 细胞培养和琼脂糖筛选系统筛选CESC_s

手术中获得的患者软骨终板标本, 无菌条件下, 利用眼科器械在解剖显微镜下清除附着于软骨终板上的髓核、纤维环以及软骨下骨组织。无菌PBS反复冲洗软骨终板后, 将软骨终板剪碎成大小约1 mm³的颗粒, 并用含有1% FBS的DMEM/F12培养液配制成的浓度为2%的II型胶原酶消化液在37 °C下消化12 h。消化完成后, 细胞悬液经过70 μm细胞筛过滤使细胞团最小化。过滤后的细胞悬液转移至无菌离心管中, 1 000 r/min离心5 min。离心后, 弃上清, 细胞团用含有10% FBS和1%双抗(青霉素-链霉素)的

表1 患者详细信息
Table 1 Detail information of patients

序号 No.	诊断 Diagnosis	节段 Segment	手术方式 Operation method	性别 Gender	年龄(岁) Age (year)	Pfirrmann分级 Pfirrmann classification
1	Lumbar spondylolisthesis	L4/5	MIS-TLIF	Female	52	IV
2	Lumbar spinal stenosis	L4/5	MIS-TLIF	Male	55	IV
3	Protrusion of intervertebral disc	L5/S1	MIS-TLIF	Female	55	IV

DMEM/F12培养液重悬后转移到25 cm²细胞培养瓶中,置于37℃、5% CO₂条件下培养,每3 d换液1次。

当细胞融合达到约80%后,消化软骨终板细胞并转移至琼脂糖筛选系统进行CESCs筛选。按照Liu等^[4]采用的琼脂糖筛选系统方法,简言之,用2%低熔点琼脂糖和2×DMEM/F12培养液按照体积比1:1混合成1%低熔点琼脂糖包被培养皿底层,用0.5 mL DMEM/F12培养液、0.5 mL低熔点琼脂糖、1 mL软骨终板细胞密度为5×10⁴/mL的培养液配制成的混合液平铺于之前包被好培养皿中。4℃静置15 min,待混有细胞的琼脂糖凝固后,加入含有10% FBS的DMEM/F12培养液并将培养皿转移至37℃、5% CO₂细胞培养箱中培养,每周换液2次,培养6周。6周后,细胞集落转移至25 cm²培养瓶中继续培养,第3代细胞用于本研究。

1.4 CESC体外鉴定

CESC细胞汇合度达到80%时,PBS漂洗2次,胰蛋白酶消化后离心收集细胞。细胞计数并制成1×10⁶/mL细胞悬液,将细胞悬液分装于EP管中,每管200 μL,分别加入FITC、PE、PerCP标记的鼠抗人单克隆抗体CD73-FITC、CD90-FITC、CD14-FITC、CD19-FITC、CD34-FITC、CD45-FITC、CD105-PE、HLA-DR-PerCP各10 μL,同时设立同型对照组。37℃避光孵育30 min,离心后弃上清,PBS漂洗,再次离心弃上清,加入200 μL PBS,用流式细胞术对处理后的细胞进行检测分析。

1.5 水溶性四唑盐(WST)-1法检测低氧对CESCs增殖的影响

采用WST-1细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒检测CESCs细胞增殖。取对数生长期CESCs,以3 000/孔的细胞量接种于6板(12 h、24 h、72 h常氧和低氧)96孔板,并将每孔中培养基补足到200 μL,置于37℃、5% CO₂、21% O₂培养箱中培养24 h后施加处理。低氧处理组转移至37℃、5% CO₂、1% O₂培养箱中培养;常氧组继续于37℃、5% CO₂、21% O₂培养箱中培养。分别于12 h、24 h、72 h检测低氧组和常氧组细胞增殖情况。检测时,吸除孔内旧培养基,每孔中加入110 μL预先按照WST-1和培养基(1:10)预混好的混合液,并设置3个空白对照(即孔内无细胞仅有110 μL按照1:10预混好的WST-1和培养基的混合液),于培养箱中孵育2.5 h,用酶标仪检测每孔在450 nm波长的吸光度值。实验组和对照组均设3

个复孔。

1.6 Edu掺入法检测低氧对CESCs增殖的影响

取对数生长期CESCs,以每孔1×10⁴细胞接种于24孔板中,置于37℃、5% CO₂、21% O₂细胞培养箱中培养24 h后进行处理。低氧组置于37℃、5% CO₂、1% O₂低氧培养箱中培养,常氧组继续于37℃、5% CO₂、21% O₂细胞培养箱中培养。分别于12 h、24 h、72 h检测低氧组和常氧组细胞增殖情况。每孔加入200 μL 50 μmol/L Edu培养基孵育2 h,弃培养基,PBS清洗细胞2次,每次5 min。每孔加入50 μL细胞固定液(含4%多聚甲醛的PBS)室温固定30 min。加入Apollo荧光染料与掺入细胞中的Edu进行反应,加入Hoechst 33342荧光染料使细胞核可见。荧光显微镜下观察细胞增殖情况,红色荧光下掺入Edu的细胞核呈红色,蓝色荧光下全部细胞核呈蓝色。每个时间点观察3个孔,每孔5个视野。细胞增殖率=增殖细胞数(红色)/全部细胞数(蓝色)×100%。

1.7 β-半乳糖苷酶染色法检测低氧对CESCs衰老的影响

将CESCs以每孔1.5×10⁵细胞接种于6孔板中。待细胞汇合达到约80%后,低氧组置于37℃、5% CO₂、1% O₂培养箱中培养,常氧组置于37℃、5% CO₂、21% O₂培养箱中培养。分别于12 h、24 h、72 h吸除低氧组和常氧72 h组6孔板内的培养基,PBS洗涤1次,加入β-半乳糖苷酶染色固定液室温固定15 min,吸除固定液后,PBS洗涤3次,每次3 min,每孔加入1 mL β-半乳糖苷酶染色工作液,37℃孵育过夜,显微镜下观察计数,每个时间点观察3个孔,每个孔观察5个视野。细胞衰老比例=每组平均衰老个数/该组细胞数量×100%。

1.8 流式细胞术检测低氧对CESCs细胞周期及细胞凋亡的影响

流式细胞术检测细胞周期。将CESCs接种于6孔板,待细胞汇合达到约80%时,低氧组置于37℃、5% CO₂、1% O₂培养箱中培养,常氧组置于37℃、5% CO₂、21% O₂培养箱中培养。分别于12 h、24 h、72 h收集低氧组及常氧72 h组细胞,2 000 r/min离心5 min,PBS洗涤2次,缓慢加入70%乙醇,-20℃固定20 min以上。2 000 r/min离心5 min,去除乙醇,PBS水化15 min。2 000 r/min离心5 min,收集细胞,加入PI进行染色,避光30 min后流式细胞仪检测细胞周期。

流式细胞术检测细胞凋亡。将CESCs接种于6孔板,待细胞汇合达到约80%时,低氧组置于37℃、

5% CO₂、1% O₂培养箱中培养,常氧组置于37 °C、5% CO₂、21% O₂培养箱中培养。分别于12 h、24 h、72 h收集低氧组及常氧72 h组细胞, PBS洗涤细胞2次,离心后用1 µg/mL annexin V-FITC和PI标记溶液重悬细胞,37 °C避光孵育15 min。采用流式细胞仪annexin V和PI双染法检测细胞凋亡, CellQuest软件对结果进行分析。实验独立重复3次。

1.9 统计学处理

所有数据均采用SPSS 18.0软件进行统计分析,实验数据均以mean±S.D.的形式表示。 $P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果

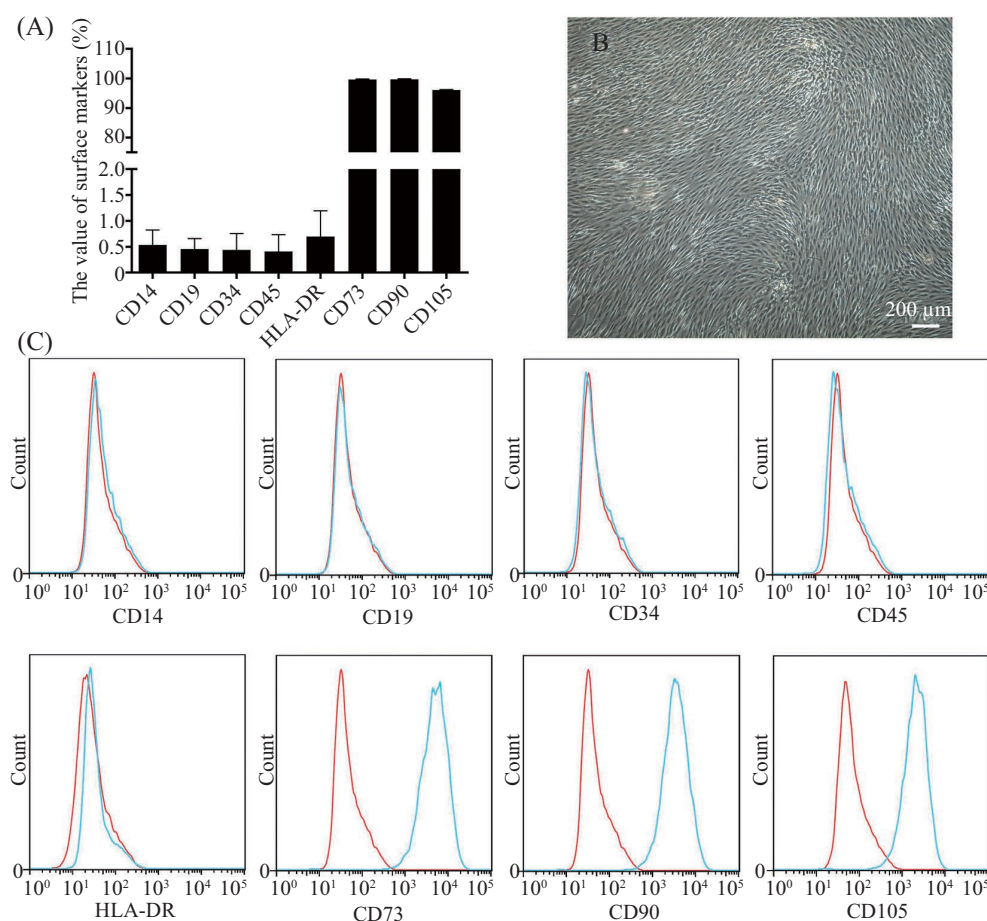
2.1 CESC体外鉴定及形态学观察

采用流式细胞术检测细胞表面标志物表达率,

蓝线表示被荧光标记抗体染色的阳性细胞,红色表示阴性对照细胞,结果显示,筛选后细胞的CD73、CD90表达率均高于99%, CD105表达率高于96%, CD14、CD19、CD34、CD45、HLA-DR的表达率均低于2%(图1A和图1C)。依据国际细胞治疗学会制定的干细胞表面标志物鉴定标准^[14], 经过琼脂糖筛选后的细胞具有干细胞特性。CESCs为贴壁生长细胞,细胞形态为长梭形,成旋涡状或放射状排列(图1B)。

2.2 低氧对CESCs细胞增殖的影响

常氧组与低氧组分别培养12 h、24 h、72 h后,采用WST-1法和Edu掺入法检测低氧对CESCs细胞增殖的影响(图2)。WST-1在450 nm吸光度值分别为:常氧组: $0.095 0 \pm 0.069 8$, 低氧组: $0.234 6 \pm 0.073 0$ (12 h); 常氧组: $0.126 9 \pm 0.533 7$, 低氧组: $0.278 5 \pm 0.050 5$ (24 h); 常氧



A: 流式细胞术检测CESCs表面标志物表达率; B: CESC细胞形态; C: 流式细胞术检测CESCs表面标志物(蓝线表示被荧光标记抗体染色的阳性细胞, 红色表示阴性对照细胞, 使用同行对照抗体染色)。

A: the value of surface markers; B: cell morphology of CESC; C: immunophenotypic profile of stem cells in CESC via flow cytometric analysis. The blue lines indicate the fluorescence intensity of cells stained with the corresponding antibodies, and the red lines represent isotype-matched negative control cells.

图1 CESC体外鉴定和细胞形态学表现
Fig.1 CESC identification *in vitro* and cell morphology

组: 0.2562 ± 0.1371 、低氧组: 0.5305 ± 0.0847 (72 h)。结果表明, 常氧组与低氧组细胞增殖活性均与处理时间成正相关; 与常氧组相比较, 低氧组24 h和72 h CESC细胞增殖活性升高且具有显著差异($P < 0.05$); 低氧组内比较, 不同时间点CESCs的增殖活性也存在显著差异($P < 0.05$) (图2A)。Edu掺入法细胞增殖率(%)结果分别为: 常氧组: 2.555 ± 0.540 , 低氧组: 16.804 ± 0.990 (12 h); 常氧组: 2.773 ± 0.810 , 低氧组: 19.451 ± 1.226 (24 h); 常氧组: 4.438 ± 0.614 , 低氧组: 25.892 ± 1.081 (72 h)。结果表明, 与常氧组相比较, 低氧组各时间点CESCs增殖率均升高且差异极显著($P < 0.01$); 低氧组内比较, 不同时间点CESCs的增殖率也存在显著差异($P < 0.05$) (图2B~图2D)。

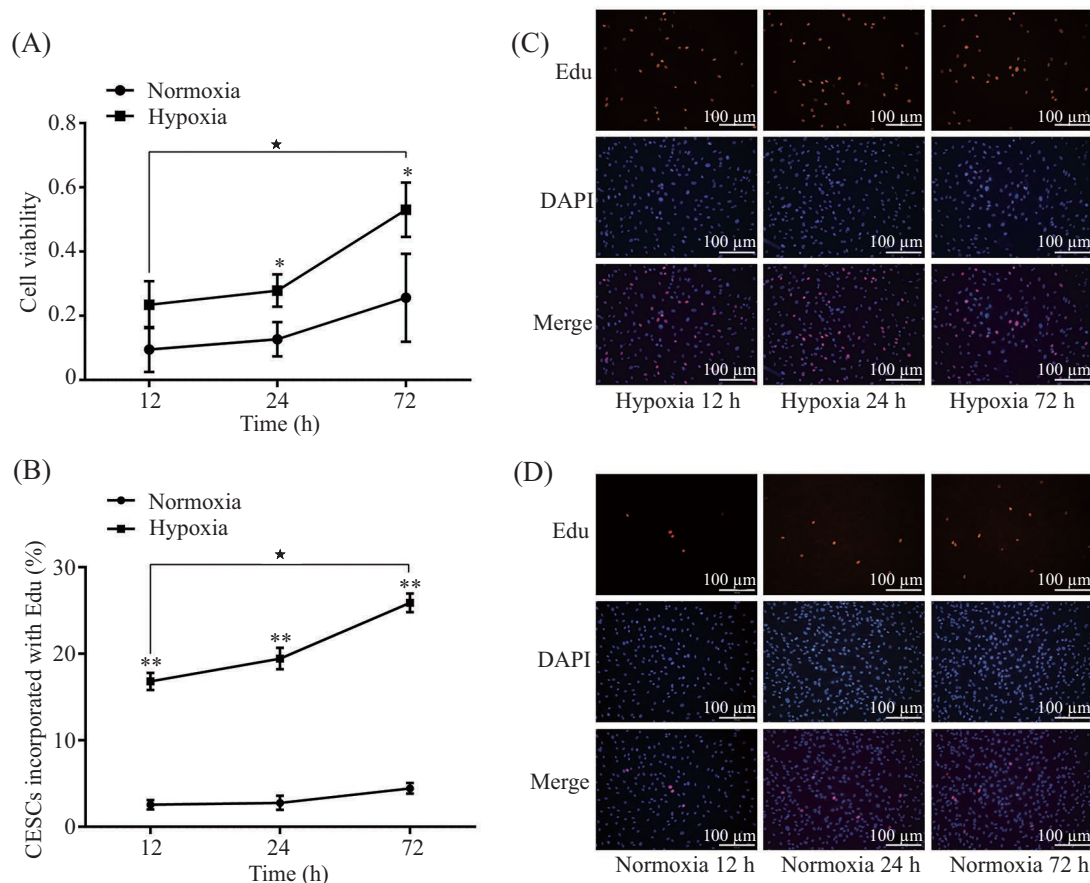
2.3 低氧对CESCs细胞衰老的影响

β -半乳糖苷酶染色法检测常氧和低氧两种不同培养环境对CESCs细胞衰老的影响(图3)。光镜下观察发现, 常氧组和低氧组均有不同程度染色, 但低氧

处理组染色细胞数明显少于常氧组, 经计数后统计各组衰老细胞比例。结果显示, 与常氧72 h组相比较, 低氧72 h组CESCs细胞衰老比例降低, 且差异极显著($P < 0.01$); 在低氧处理组内, 与低氧12 h相比较, 低氧24 h CESCs细胞衰老比例降低, 且差异显著($P < 0.05$), 低氧72 h CESCs细胞衰老比例降低, 且差异极显著($P < 0.01$)。结果表明, 低氧对CESCs细胞衰老具有抑制作用且随低氧处理时间增加该抑制作用逐步增强。

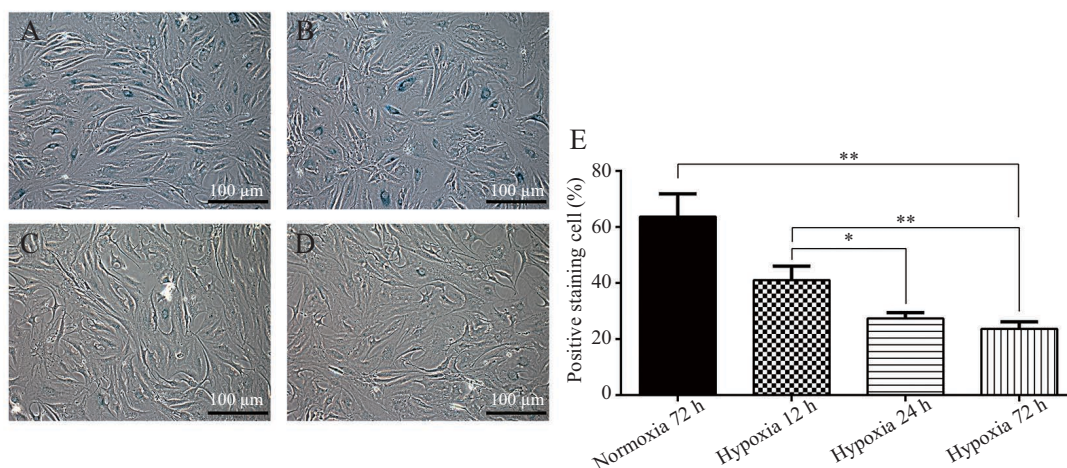
2.4 低氧对CESCs细胞凋亡的影响

采用流式细胞术检测常氧组和低氧组细胞凋亡的情况(图4)。细胞凋亡率为右上象限(Q2, 晚期凋亡细胞)和右下象限(Q3, 早期凋亡细胞)细胞凋亡比率之和。结果显示, 常氧72 h、低氧12 h、低氧24 h、低氧72 h, CESC细胞凋亡率分别为(12.0633 ± 1.6228)%、(5.3267 ± 0.4440)%、(6.0133 ± 1.2182)%、(3.3100 ± 0.5693)%。与常氧72 h相比较, 低氧72 h CESC细胞凋亡率降低且差异极为显著($P < 0.01$); 在低氧处理



A: WST-1法检测CESCs增殖活性; B: Edu掺入法检测CESCs增殖率; C、D: Edu掺入法荧光图片。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与常氧组比较。* $P < 0.05$ 。A: WST-1 cell proliferation assay; B: Edu cell proliferation assay; C,D: fluorescent images of Edu cell proliferation assay. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Normoxia group. * $P < 0.05$.

图2 低氧对CESCs细胞增殖的影响
Fig.2 Effects of hypoxia on the proliferation of CESC

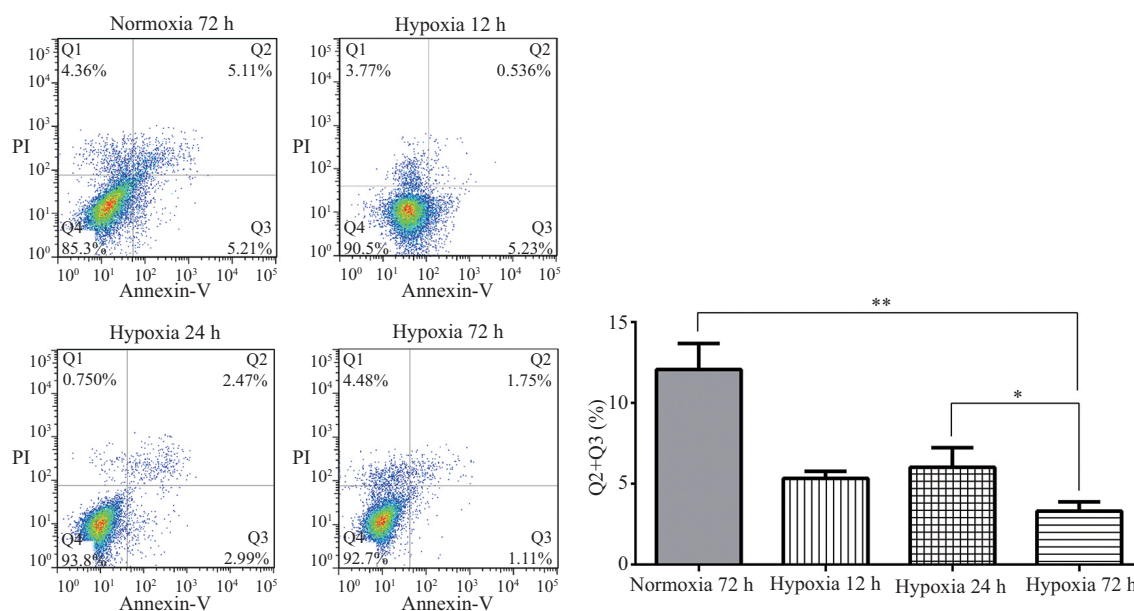


β-半乳糖苷酶细胞衰老染色, A: 常氧72 h; B: 低氧12 h; C: 低氧24 h; D: 低氧72 h; E: 各组衰老细胞比例统计。与常氧组相比, 低氧能够显著抑制 CESC 衰老。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

SA-β-gal staining, A: normoxia 72 h; B: hypoxia 12 h; C: hypoxia 24 h; D: hypoxia 72 h; E: senescent cells ratio statistics. Hypoxia inhibit CESC's senescence, the positive cells of SA-β-gal staining with hypoxia treatment were less than normoxia. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图3 低氧对CESCs衰老的影响

Fig.3 Effects of hypoxia on the senescence of CESC



* $P<0.05$, ** $P<0.01$.

图4 低氧对CESCs细胞凋亡的影响

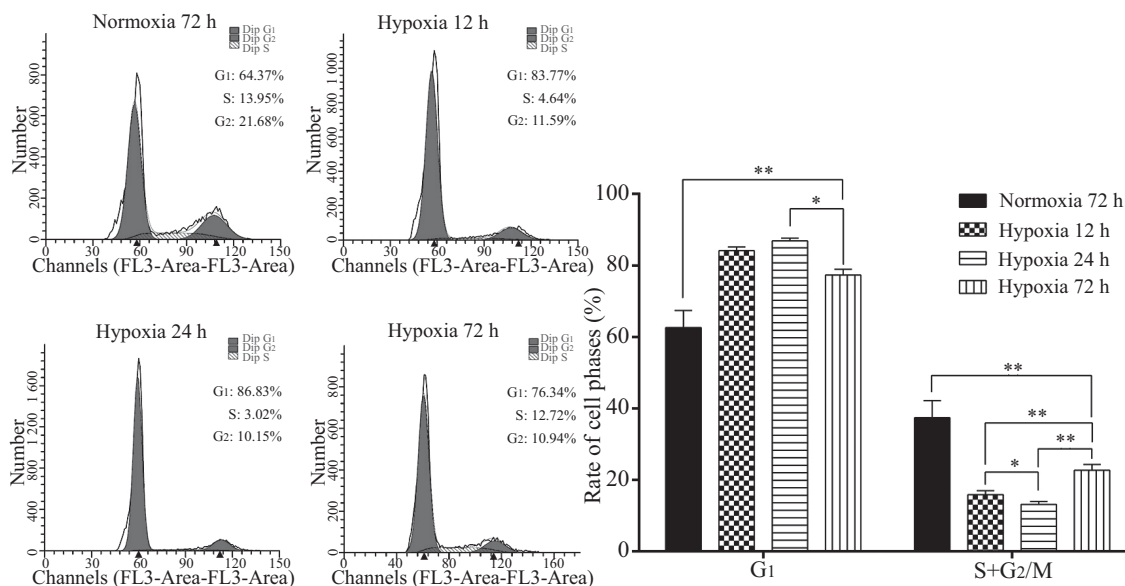
Fig.4 Effects of hypoxia on the apoptosis of CESC

组内, 低氧12 h与低氧24 h相比较, CESC 细胞凋亡率无显著差异, 与低氧24 h相比较, 低氧72 h CESC 细胞凋亡率降低且差异显著($P<0.05$)。

2.5 低氧对CESCs细胞周期的影响

采用流式细胞术检测常氧组与低氧组CESC 细胞周期分布情况(图5)。结果显示, 常氧72 h、低氧12 h、低氧24 h、低氧72 h后, G_1 期细胞比

率分别为(62.613±4.755)%、(84.097±1.078)%、(86.847±0.795)%、(77.290±1.654)%、(S+ G_2 /M)期细胞比例分别为(37.390±4.751)%、(15.903±1.078)%、(13.153±0.795)%、(22.707±1.651)%。与常氧组相比较, 低氧72 h CESC G_1 期细胞比率明显升高($P<0.01$), (S+ G_2 /M)期细胞比例明显降低且差异极显著($P<0.01$); 在低氧处理组内, 低氧12 h、24 h和72 h



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图5 低氧对CESCs细胞周期的影响

Fig.5 Effects of hypoxia on the cell cycle of CESC cells

呈现出G₁期细胞比例先升高后降低和(S+G₂/M)期细胞比例先降低后升高的趋势。

3 讨论

该研究应用原代培养方法获得CESCs, 研究证实, 与21% O₂常氧条件培养相比, 1% O₂低氧条件培养能够促进CESCs增殖并抑制细胞衰老和凋亡。以往的研究表明, 低氧能够促进间充质干细胞细胞增殖^[13]、降低细胞凋亡^[15]、抑制衰老^[12]。该研究与以往研究结果相同, 但所采用的CESCs与间充质干细胞的细胞来源不同。CESCs是椎间盘来源的干细胞, 对于CESCs的研究能够帮助我们更真实的了解椎间盘来源细胞的生物学特性。椎间盘是人体最大的无血管组织, 生理情况下, 椎间盘内处于1% O₂低氧状态^[16]。椎间盘突出和退变过程中伴随有血管侵入的发生, 椎间盘内的低氧环境发生改变^[17]。该研究结果将帮助我们推测椎间盘突出和退变后椎间盘内细胞增殖、衰老、凋亡的变化趋势。Zhang等^[13]、Bader等^[15]和Tsai等^[12]在研究中进一步证实, 经过低氧预处理后的间充质干细胞能够抵抗缺血缺氧环境造成的化学伤害, 提高间充质干细胞在缺血缺氧组织内的细胞生物治疗效果。本研究结果将为组织工程CESCs体内椎间盘低氧环境细胞生物治疗前低氧预处理提供理论基础。

该研究还发现, 体外常氧条件培养的CESCs进

入低氧环境12 h后, G₁期细胞比例开始增加, 24 h达到高峰, 72 h后开始减少, 与之相对应的(S+G₂/M)期细胞比例从进入低氧环境后12 h开始减少, 24 h达到最低点, 72 h后开始增加。结合以上细胞增殖实验的结果, 该研究发现了与Gardner等^[18]和Hubbi等^[19]研究中相似的现象。根据这种细胞比例G₁期先增加后减少、(S+G₂/M)期先减少后增加的趋势, 推测24 h很可能是CESCs适应低氧环境的时间节点。

该研究证实了1% O₂低氧条件能够促进CESCs增殖并抑制细胞衰老和凋亡, 但仍然存在不足之处。一方面, 该研究为体外实验, 还需要体内实验来进一步证实CESCs生物学行为的变化情况。另一方面, 该研究结果仍然处于现象层面, 对于现象当中的机制研究还有待于在后续研究中展开。低氧环境下, 我们首先考虑缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)对细胞的作用。以往研究发现, 低氧环境能够通过HIF-TWIST通路下调E2A-P21表达, 从而抑制间充质干细胞衰老^[12]。干细胞和癌细胞在基因表达、细胞生物学进程和信号传导等方面有很大程度的相似性, HIF-TWIST通路就是在癌细胞中发现后在间充质干细胞中又得到证实。人胃癌细胞经过1% O₂低氧处理后, 组蛋白去乙酰化酶1(histone deacetylase 1, HDAC1)的蛋白表达量上调, HDAC1与癌细胞的增殖、凋亡和细胞周期关系十分紧密^[20-21]。由于干细胞与癌细胞的相似性, 在CESCs中是否存在HIF-

TWIST通路, 低氧处理后CESCs中HDAC1的表达量是否发生变化, 这些还尚未得到证实。

下腰痛是一种典型的衰老相关疾病, 椎间盘退化是导致下腰痛的主要原因, 下腰痛正在不同程度地影响着70%以上的成年人, 使其生活质量急剧下降, 严重者将导致残疾。近年来, 椎间盘退化的细胞替代治疗和组织工程研究已成为研究的热点。继发现间充质干细胞这一理想的细胞替代治疗种子细胞之后, CESCs的发现为椎间盘退化细胞治疗的种子细胞提供了新的选择。该研究结果证实低氧环境更适合CESCs生长, 为低氧环境影响CESCs细胞生物学行为的机制研究提供了理论基础, 并将有助于我们对椎间盘退变机制的深入探究。

参考文献 (References)

- Huang YC, Leung VY, Lu WW, Luk KD. The effects of microenvironment in mesenchymal stem cell-based regeneration of intervertebral disc. *Spine J* 2013; 13(3): 352-62.
- Walker BF. The prevalence of low back pain: A systematic review of the literature from 1966 to 1998. *J Spinal Disord* 2000; 13(3): 205-17.
- Richardson SM, Kalamegam G, Pushparaj PN, Matta C, Memic A, Khademhosseini A, *et al.* Mesenchymal stem cells in regenerative medicine: Focus on articular cartilage and intervertebral disc regeneration. *Methods* 2016; 99: 69-80.
- Liu LT, Huang B, Li CQ, Zhuang Y, Wang J, Zhou Y. Characteristics of stem cells derived from the degenerated human intervertebral disc cartilage endplate. *PLoS One* 2011; 6(10): e26285.
- Boyd LM, Carter AJ. Injectable biomaterials and vertebral endplate treatment for repair and regeneration of the intervertebral disc. *Eur Spine J* 2006; 15 Suppl 3: S414-21.
- Rajasekaran S, Venkatadass K, Naresh BJ, Ganesh K, Shetty AP. Pharmacological enhancement of disc diffusion and differentiation of healthy, ageing and degenerated discs: Results from in-vivo serial post-contrast MRI studies in 365 human lumbar discs. *Eur Spine J* 2008; 17(5): 626-43.
- Shang J, Fan X, Shanguan L, Liu H, Zhou Y. Global gene expression profiling and alternative splicing events during the chondrogenic differentiation of human cartilage endplate-derived stem cells. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 604972.
- Yuan C, Wang J, Zhu X, Zheng Y, Huang B, Li C, *et al.* Stress regulating osteogenic differentiation of human intervertebral disc cartilage endplate-derived stem cells. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 2015; 29(3): 351-5.
- Feng C, Zhang Y, Yang M, Huang B, Zhou Y. Collagen-derived n-acetylated proline-glycine-proline in intervertebral discs modulates CXCR1/2 expression and activation in cartilage endplate stem cells to induce migration and differentiation toward a pro-inflammatory phenotype. *Stem Cells* 2015; 33(12): 3558-68.
- Xiong CJ, Huang B, Zhou Y, Cun YP, Liu LT, Wang J, *et al.* Macrophage migration inhibitory factor inhibits the migration of cartilage end plate-derived stem cells by reacting with CD74. *PLoS One* 2012; 7(8): e43984.
- Chen JW, Li B, Yang YH, Jiang SD, Jiang LS. Significance of hypoxia in the physiological function of intervertebral disc cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2014; 24(3): 193-204.
- Tsai CC, Chen YJ, Yew TL, Chen LL, Wang JY, Chiu CH, *et al.* Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST. *Blood* 2011; 117(2): 459-69.
- Zhang L, Yang J, Tian YM, Guo H, Zhang Y. Beneficial effects of hypoxic preconditioning on human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Chin J Physiol* 2015; 58(5): 343-53.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4): 315-7.
- Bader AM, Klose K, Bieback K, Korinth D, Schneider M, Seifert M, *et al.* Hypoxic preconditioning increases survival and pro-angiogenic capacity of human cord blood mesenchymal stromal cells *in vitro*. *PLoS One* 2015; 10(9): e138477.
- Lee DC, Adams CS, Albert TJ, Shapiro IM, Evans SM, Koch CJ. In situ oxygen utilization in the rat intervertebral disc. *J Anat* 2007; 210(3): 294-303.
- Kokubo Y, Uchida K, Kobayashi S, Yayama T, Sato R, Nakajima H, *et al.* Herniated and spondylotic intervertebral discs of the human cervical spine: Histological and immunohistological findings in 500 en bloc surgical samples. *Laboratory investigation. J Neurosurg Spine* 2008; 9(3): 285-95.
- Gardner LB, Li Q, Park MS, Flanagan WM, Semenza GL, Dang CV. Hypoxia inhibits G₁/S transition through regulation of p27 expression. *J Biol Chem* 2001; 276(11): 7919-26.
- Hubbi ME, Gilkes DM, Hu H, Kshitiz, Ahmed I, Semenza GL. Cyclin-dependent kinases regulate lysosomal degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha to promote cell-cycle progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(32): E3325-34.
- Lee SH, Kim J, Kim WH, Lee YM. Hypoxic silencing of tumor suppressor RUNX3 by histone modification in gastric cancer cells. *Oncogene* 2009; 28 (2): 184-94.
- Wang X, Guo H, Liu W, Yang C, Yang L, Wang D, *et al.* Effects of siRNA-mediated knockdown of HDAC1 on the biological behavior of esophageal carcinoma cell lines. *Med Sci Monit* 2016; 22: 1291-6.