

间充质干细胞移植治疗椎间盘退变疾病的研究进展

梁涛 刘浩

【摘要】 目的 综述间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)移植治疗椎间盘退变疾病的研究现状。方法 查阅近年来有关MSCs移植治疗椎间盘退变疾病的国内外相关文献,进行回顾及综合分析。结果 椎间盘移植MSCs在一定的条件下能表达类软骨细胞表型,增加基质合成,缓解椎间盘退变。结论 MSCs移植治疗椎间盘退变疾病是一种很有前途的方法。

【关键词】 间充质干细胞 椎间盘 退变

中图分类号: R 681.5 Q 813 文献标识码: A

ADVANCES OF MESENCHYMAL STEM CELLS TRANSPLANTATION FOR TREATING INTERVERTEBRAL DISC DEGENERATION / LIANG Tao, LIU Hao Department of Orthopedics, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu Sichuan, 610041, P. R. China. Email: L. liangTao1234@sina.com

Corresponding author: LIU Hao, Email: liuhao640812@163.com

【Abstract】 **Objective** To introduce the research of mesenchymal stem cells(MSCs) transplantation for treating intervertebral disc degeneration. **Methods** The recent original articles about the MSCs transplantation for treating intervertebral disc degeneration were extensively reviewed. **Results** Transplanted MSCs in intervertebral disc can express chondrocyte-like phenotype in certain conditions, increase matrix synthesis and release intervertebral disc degeneration. **Conclusion** MSCs transplantation for treating intervertebral disc degeneration may be a future approach.

【Key words】 Mesenchymal stem cells Intervertebral disc Degeneration

Foundation item: National Natural Science Foundation of China(30572163)

椎间盘退变疾病是指由椎间盘退变引起的以颈肩腰背痛为主要表现的临床症候群,已逐渐成为当前脊柱疼痛的主要病因,也是导致45岁以上人群劳动能力丧失的主要原因。椎间盘退变导致脊柱的生物力学功能紊乱,从而影响脊柱的功能。目前对该疾病的治疗尚无很好的手段。传统的治疗方法有保守治疗和手术治疗,可以在一定程度上缓解部分临床症状,但同时也会产生较多的并发症,从根本上并未解决椎间盘本身的病变问题。自20世纪90年代提出间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)概念,利用其修复组织损伤和促进功能恢复的治疗方法成为目前医学领域中最引人关注的热点之一。已有的研究结果显示,移植MSCs可能成为治疗椎间盘退变疾病的一种新的治疗方法^[1]。

1 椎间盘的解剖和营养供应特点

1.1 解剖特点

椎间盘为椎体间连接组织,是人体脊柱吸收震荡

减缓冲击,提供脊柱稳定性,并保持脊柱一定活动范围的重要结构。椎间盘由骨性终板、软骨终板、外层纤维环和内层髓核组成。后两种结构在组织学上可分为四个不同区域,包括外层纤维环、内层纤维环、移行区和髓核。髓核富含蛋白多糖,为一种半流体样团块,而纤维环富含胶原,为薄片分层纤维组成^[2]。椎间盘的细胞有脊索细胞、类软骨细胞和成纤维细胞。纤维环的外层主要为成纤维细胞,内层为类软骨细胞。脊索细胞主要存在于胚胎期的髓核内,正常人10岁后消失。压力对椎间盘纤维环细胞和髓核的形成起重要作用。椎间盘细胞处于三维环境中,周围是丰富的细胞外基质,主要为胶原和蛋白聚糖。胶原提供椎间盘的可拉伸性,而蛋白多糖提供椎间盘的硬度、抗压性和黏弹性。椎间盘细胞的形态、表型、增殖及胶原和蛋白多糖等基质的合成在脊柱长期负重过程中会不断发生变化,若椎间盘出现退变,就可能导致腰背疼痛^[3,4]。

1.2 营养供应特点

椎间盘是体内最大的无血管组织,中间区域无直接血管供应,离最近的血管也有6~8mm。椎间盘主要依靠软骨终板通路和纤维环外周通路供应,如:氧、葡萄糖、氨基酸和硫酸盐等基本营养^[5]。Bydder等^[6]通过数学模型和精细成像方法证实,人椎间盘营养通

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30572163)

作者单位:四川大学华西医院骨科(成都,610041)

通讯作者:刘浩,教授,博士生导师,研究方向:脊柱外科,Email:

liuhao640812@163.com

路主要由弥散作用控制。软骨终板作为弥散的一道屏障,仅允许小的不带电的分子进出椎间盘。营养成分从椎间盘周边的毛细血管经细胞外基质,到达位于髓核中心的细胞,而代谢废物通过逆向通路移出组织。椎间盘细胞需营养来保持活性和功能。细胞主要能量供应来自糖分解,大量消耗葡萄糖和生成乳酸。代谢生成的乳酸使椎间盘内的 pH 值保持在 6.9~7.2。如 pH 值降至 6.4 以下,可损害细胞活力;当葡萄糖浓度降至 0.5 mmol/L 以下,并持续数天后细胞开始死亡。低氧环境下,细胞失活,基质合成大量减少,加剧椎间盘进一步退变^[7]。Bibby 等^[8]发现酸性环境中牛髓核细胞活力下降,当伴有葡萄糖含量降低,细胞活力下降更多。

1.3 细胞表型特征

椎间盘的细胞外基质主要为胶原和蛋白聚糖。成纤维细胞表达 I 型胶原,耐受张力及应力;成人的髓核细胞多为类软骨细胞,主要表达具有软骨表型特征的蛋白多糖和 II 型胶原,在椎间盘承受压力方面起关键作用;III 型胶原含量很少,分布于纤维环 I、II 型胶原移行区^[9]。蛋白聚糖在椎间盘中主要以聚合蛋白聚糖的形式存在,髓核中含量较多。

2 椎间盘退变的特点

2.1 分子生物学基础

椎间盘退变的分子生物学基础包括髓核细胞退变、髓核细胞外基质退变、软骨终板和纤维环退变。椎间盘退变是一个复杂的过程,起源于髓核,由于细胞因子的减少和致炎因子的增多,导致基质金属蛋白酶活性增加,椎间盘软骨样细胞分泌蛋白多糖和 I、II 型胶原能力下降,降解加速,进而使椎间盘软骨样细胞赖以生存的细胞外环境被破坏,髓核内水分丧失,不能维持椎间盘内应有的张力,加剧细胞退变。细胞渗透功能的减退和细胞过度凋亡是髓核细胞退变的主要因素。椎间盘细胞分泌的基质合成与分解代谢不平衡是椎间盘退变的主要特征之一。这种决定性的生物合成平衡被打断,导致椎间盘基质蛋白合成减少,增加分解代谢的酶类及炎性介质的表达。Benneker 等^[10]研究发现椎间盘骨性终板内通道的大小、密度与椎间盘退变密切相关,通道阻塞可能是细胞营养不足、基质合成下降而导致髓核退变的原因。当退变发生后,椎间盘细胞凋亡,蛋白多糖丢失和胶原表达改变。特别是 II 型胶原表达减少,并出现 I 型胶原的表达。在椎间盘退变区 III、VI 型胶原明显增加而 X 型胶原明显减少。蛋白多糖中二聚糖和核心蛋白多糖增加^[11]。

2.2 组织病理学特征

椎间盘退变表现为椎间盘高度的丢失,以及纤维环及髓核大体形态学特征模糊。由于椎间盘组织细胞数量减少,生理活性降低,细胞外基质(尤其是胶原构成成分的变化)改变,髓核出现退变,在压力的作用下,纤维环也出现退变,失去层状结构,并产生放射状的小裂痕,胶原纤维断裂、钙化、玻璃样变,甚至瘢痕化,髓核通过裂痕区带可以向外突出。椎间盘内的组织可突破软骨终板,进入椎体内形成结节,肉芽组织生长进入裂痕,纤维组织增生呈团块状、分支状和带状。软骨下骨或终板逐渐出现钙化,软骨终板消失^[12]。椎间盘的营养主要靠软骨终板的渗透作用,因而极易发生退变;且髓核和纤维环细胞的体内分裂增殖能力差,椎间盘组织再生和修复能力有限,这些特点决定了椎间盘组织移植修复的必要性。

3 用于修复退变椎间盘的 MSCs 来源及特性

3.1 干细胞的定义

干细胞是人体及各种组织细胞的最初来源,具有高度自我更新、增殖、多向分化潜能、可植入性和重建能力等特征。这些细胞可通过细胞分裂维持自身细胞群的大小,同时又可进一步分化为各种不同的组织细胞,从而构成机体复杂的组织器官。干细胞取材较方便,来源较广泛,且自体干细胞不存在免疫排斥问题,是组织工程学理想的种子细胞之一^[13]。

3.2 MSCs 名称的由来

Fridenstein (1968) 在全骨髓培养中发现少量克隆化、非吞噬性和呈纺锤形纤维细胞样生长的贴壁细胞,称为成纤维细胞集落形成单位。而最引人注目的是这些细胞在体外可分化为骨和软骨组织。Pierana 等 (1985) 用 Fridenstein 相同的分离方法对其进行研究,发现这些细胞可分化为骨、软骨、脂肪,甚至肌肉组织等各种间充质组织。Owen (1985) 认为骨髓基质细胞系统是伴随造血干细胞系统生长的,可以自我更新并分化为各种间充质组织的细胞群,由此提出骨髓基质干细胞的概念。Pittenger 等^[14]利用梯度离心法,在骨髓中分离出成纤维样贴壁细胞,并且可以重复出 Fridenstein 等所进行的成纤维细胞集落形成单位细胞特性的实验,鉴于它们可以分化为 MSCs,所以定义为间充质干细胞,而将骨髓来源的干细胞群,命名为骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSCs)。

3.3 MSCs 的特性

MSCs 存在于少数骨髓和骨髓中未分化细胞,有间向叶来源的连接组织细胞分化的独特能力,在一定

条件下能分化为骨细胞、脂肪细胞、软骨细胞及肌细胞,并释放多种细胞因子和生长因子。它易分离和培养,可用于骨、软骨或肌腱的再生,在活体内具有高扩张潜力,使这类细胞成为一种能在临床广泛应用的细胞和基因治疗的工具^[15]。MSCs来源较广,Li等^[16]用成年新西兰白兔腹股沟区皮下脂肪组织在不同的条件下在试管中复合培养分化出脂肪细胞、骨细胞、软骨细胞和肌肉细胞,其中与髓核复合培养,与单独藻酸盐和细胞纤维环复合培养相比,II型胶原和聚集蛋白多糖表达增加。可以用脂肪作为其大量易得的来源。Steck等^[17]从分子表型上对MSCs与关节软骨细胞进行比较,指出它与自然的椎间盘组织较关节软骨细胞有更相似的一种基因表达,这些细胞可以成为一种有吸引力的资源来获得类椎间盘细胞。由于MSCs能表达类软骨细胞表型,因此在用于椎间盘疾病的治疗上越来越受到关注,一些实验表明MSCs在椎间盘疾病的治疗上有广阔的前景。

4 MSCs的体外培养研究

4.1 体外分离和培养系统

目前用于分离MSCs的方法主要有三种,即密度梯度离心法、流式细胞仪分离法和贴壁筛选法。贴壁筛选法操作简便,细胞易于成活,为一种较好的方法。MSCs培养方式有三维支架培养、细胞团培养、微载体培养、微囊化培养等。三维支架培养是组织工程中最典型的培养方式。将细胞通过各种方法接种于三维支架材料,形成细胞-支架结构体,然后在培养系统中以适当的条件培养,使细胞增殖分化并分泌特异性细胞外基质,最终形成工程组织。用于MSCs构建工程组织的培养系统大致有四种:孔板和培养皿、转瓶、旋转壁式生物反应器及灌注生物反应器系统。其中旋转壁式生物反应器有水平放置的内外两个同心圆柱组成,内柱由可进行气体交换的半透膜构成,外柱由非通透性材料制成,内外柱间充以培养介质。根据培养介质的量调节转速,使细胞-支架结构体或微载体受到的离心力与重力达到平衡,可产生微重力培养环境,既强化了传递,又降低了剪切力,已广泛用于组织工程^[18,19]。此外,灌注生物反应器系统也被广泛应用于MSCs组织工程研究中^[20]。

4.2 体外培养

MSCs在组织工程三维培养中需经历细胞增殖、细胞分化和组织形成三阶段。在培养中加入生化因素不仅维持细胞增殖,也促进细胞分化。血清在MSCs的体外生长中十分重要,有助于其贴壁、扩增以及多向分化潜能的维持。Kobayashi等^[21]认为在促进MSCs生

长和保持较高的活力上用自体人血清较胎牛血清更好。另外多种激素、细胞因子和细胞外基质蛋白均对诱导结果产生影响。Li等^[22]取14例手术患者的椎间盘组织在试管中进行培养48~96h后检测18种细胞因子,有12种阳性,认为在条件培养基中培养椎间盘组织,可以刺激MSCs增殖。Richardson等^[23]采用复合培养实验在有或无细胞接触状况下,观察人髓核细胞是否能引起MSCs分化。细胞-细胞接触复合培养实验后荧光标记细胞群和高速细胞分拣允许检查单一的细胞群。当在接触后的第7天即时定量PCR显示,髓核-标记基因在干细胞有显著增加,并受调于细胞比例。无接触的培养显示不论细胞比例如何,在髓核细胞或干细胞中髓核-标记基因表达均无明显增加。人髓核和MSCs接触复合培养是一种有效的方法,能为退变椎间盘的再生提供一大群分化细胞,并能被用于以细胞为基础的组织工程治疗。Yamamoto等^[24]将MSCs与髓核细胞共同培养,结果显示可促进髓核细胞增殖和基质合成。Sobajima等^[1]将MSCs与髓核细胞共同培养,通过检测发现MSCs在椎间盘环境中有良好的增殖能力,并可以将治疗基因带入椎间盘。LeVisage等^[25]用MSCs与取自退变椎间盘的纤维环细胞混合培养14d后,观察到蛋白多糖显著增加,认为用取自退变椎间盘的细胞与MSCs混合培养,可能会诱导其表达椎间盘细胞表型。

4.3 细胞定向诱导分化和控制

在体内条件下,影响MSCs分化的因素很多,除了局部微环境及其他相邻细胞的影响外,细胞因子的刺激也是一个重要的因素。其中转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β)不仅可以调控MSCs增殖和向类软骨定向分化,而且可以抑制多种炎性介质的生物学活性,同时还是一种强烈的免疫抑制剂,使同种异体细胞移植更为安全。利用转基因技术将外源性目的基因转入种子细胞,通过转基因细胞在局部持续高效表达高生物活性的内源性生长因子,可能使基因强化组织工程中生长因子目的蛋白的表达应能达到持久、稳定^[26]。Risbud等^[27]用MSCs在适当的微环境(低氧、生长因子、三维立体培养)中可以分化出类髓核细胞。此后他们实验在三维藻酸盐水凝胶剂中放入含有TGF- β 的培养基,分别在低氧(2%)和正常含氧(20%)下培养。在低氧和TGF- β 驱动下间充质干细胞向与髓核表型一致的细胞分化,低氧环境可以促进MSCs向髓核细胞的特异标志分化,而TGF- β 则可以升高细胞内促分裂原活化蛋白激酶活性以及SOX-9蛋白聚糖和II胶原的表达。得出MSCs可以用于损害的或退变的椎间盘修复^[28]。

5 MSCs 的体内植入研究

MSCs 体内植入的方式目前多采用直接注射方式。采用外科手术暴露椎间盘后,用针头插入椎间盘中央髓核区,然后注射 MSCs 悬液。注射的椎间盘作标记后缝合切口。

5.1 单纯 MSCs 注射研究

Sakai 等^[29]用绿色荧光蛋白标记的自体 MSCs 移植入成熟的家兔,在移植后的 48 周,在移植区域连续计数,分化的移植细胞进行免疫组织化学分析。结果显示 MSCs 移植到退变的家兔椎间盘后,增殖和分化细胞表达出一些主要髓核细胞的表型特征。Zhang 等^[30]用兔同种异体 MSCs 注射入兔的椎间盘,与未注射组和注射盐水组在 1、3 和 6 个月时分别检测 mRNA,蛋白多糖和 II 型胶原含量,结果显示注射 MSCs 组均明显增加。注射 MSCs 可能是一种治疗退变椎间盘的方法。Sakai 等^[31]将 MSCs 在家兔退变椎间盘模型制成 2 周后,分别移植入 L_{2/3}、L_{3/4} 及 L_{4/5} 椎间盘,24 周后检查正常椎间盘、模拟手术椎间盘和移植后椎间盘的 X 线片椎间盘高度、MRI T₂ 信号的改变,组织学、免疫组织化学和基质关联的基因表达。结果显示移植 MSCs 组椎间盘的高度为正常对照组的 91%、T₂ 信号强度为正常对照组 81%,免疫组织化学和基因表达分析有蛋白多糖积聚。认为 MSCs 移植对退变的家兔椎间盘的再生是有效的,对于退变的椎间盘疾病是一个有价值的治疗方法。

5.2 组织工程移植研究

将 MSCs 移植到支架上,加入细胞因子等,在一定的条件下体外培养后移植入椎间盘从而改善椎间盘退变。Sakai 等^[32]将自体 MSCs 植入 A telocollagen 支架后再植入兔退变的髓核内,结果移植后细胞存活并成功繁殖。他们认为通过 MSCs-A telocollagen 支架复合物可以填充空的髓核,移植的 MSCs 转化细胞产生的蛋白多糖,阻止了蛋白多糖含量的下降,其可缓解椎间盘退变。Crevensten 等^[33]用 MSCs 注射入鼠尾骨的椎间盘,使用 15% 的透明质烷凝胶作为载体,分有或无 MSCs 的凝胶注射,在注射椎间盘区域观察到荧光标记的干细胞,在第 7、14、28 天分别进行观察,显示 MSCs 能在鼠椎间盘中维持生存力和增殖。Dang 等^[34]认为用热敏的壳聚糖凝胶作为载体,可以用于递送干细胞以促进一个生物学上相关的退变椎间盘重建。

5.3 营养途径

椎间盘的外层有纤维环保护,能将 MSCs 很好的包被在椎间盘中,并向髓核细胞表型分化。植入的 MSCs 种植于支架上,理论上能提高细胞的黏性,并能

够让细胞开始产生新的细胞外基质。TGF- β 能诱导多种细胞合成和分泌细胞外基质蛋白,刺激胶原和其他基质成分沉积,阻断纤维蛋白酶原抑制剂,促进血管生成^[35],可能为植入的 MSCs 提供了营养途径。

6 展望

从理论上讲,用 MSCs 移植入椎间盘,使椎间盘再生可能是治疗椎间盘疾病较好的方法,但椎间盘研究只是处于动物实验阶段。目前禁止在人体内进行试验。椎间盘退变的确切机制尚待进一步研究,在退变椎间盘中移植的细胞的类型、细胞移植是否用支架,以及细胞移植后的营养途径等问题需深入研究,确定细胞表型的特征,诱导和控制 MSCs 分化成髓核或纤维环细胞的因子为下一步研究重点。随着组织工程学的发展,及人们对脊柱基础研究的深入,应用组织工程技术完全有望培育出具有生物活性和功能的人工生物椎间盘组织,为脊柱退变性疾病的治疗带来新的观念和模式。

7 参考文献

- 1 Sobajima S, Shiner A, Kim J, *et al* Feasibility of stem cell therapy for intervertebral disc degeneration. *Spine J*, 2004, 4: 117-186
- 2 Gruber HE, Hanley EN Jr. Ultrastructure of the human intervertebral disc during aging and degeneration: comparison of surgical and control specimens. *Spine*, 2002, 27(8): 798-805
- 3 Matsumoto T, Kawakami M, Kuribayashi K, *et al* Cyclic mechanical stretch stress increases the growth rate and collagen synthesis of nucleus pulposus cells *in vitro*. *Spine*, 1999, 24(4): 315-319
- 4 Rannou F, Poiraudou S, Foltz V, *et al* Monolayer annulus fibrosus cell cultures in a mechanically active environment: local culture condition adaptations and cell phenotype study. *J Lab Clin Med*, 2000, 136(5): 412-421
- 5 Buckwalter JA, Mow VC, Boden SD, *et al* Intervertebral disk structure, composition, and mechanical function. *American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 2000, p: 548-555
- 6 Bydder GM. New approaches to magnetic resonance imaging of intervertebral discs, tendons, ligaments, and menisci. *Spine*, 2002, 27(12): 1264-1268
- 7 Bibby SR, Jones DA, Ripley RM, *et al* Metabolism of the intervertebral disc: effects of low levels of oxygen, glucose, and pH on rates of energy metabolism of bovine nucleus pulposus cells. *Spine*, 2005, 30(5): 487-496
- 8 Bibby SR, Urban JP. Effect of nutrient deprivation on the viability of intervertebral disc cells. *Eur Spine J*, 2004, 13(8): 695-701
- 9 陈岩, 胡有谷, 齐宗化, 等. 转化生长因子 β 与椎间盘细胞 I 型胶原基因调控的关系. *中国矫形外科杂志*, 2000, 7(2): 151-153
- 10 Benneker LM, Heini PF, Alini M, *et al* 2004 Young Investigator

- Award Winner: vertebral endplate marrow contact channel occlusions and intervertebral disc degeneration. *Spine*, 2005, 30(2): 167-173
- 11 Inkinen RI, Lammi MJ, Lehmönen S, *et al* Relative increase of biglycan and decorin and the altered chondroitin sulfate epitopes in the degenerating human intervertebral disc. *J Rheumatol*, 1998, 25(3): 506-514
 - 12 尚铁松, 王云钊. 腰椎间盘突出症的X线MRI表现与病理对照. *中华放射学杂志*, 2002, 36(9): 828-832
 - 13 Petersen BE, Terada N. Stem cells: a journey into a new frontier. *J Am Soc Nephrol*, 2001, 12(8): 1773-1780
 - 14 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, *et al* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284(5411): 143-147.
 - 15 Minquell JJ, Erices A, Conqet P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2001, 226(6): 507-520
 - 16 Li X, Lee JP, Balian G, *et al* Modulation of chondrocytic properties of fat-derived mesenchymal cells in co-cultures with nucleus pulposus. *Connect Tissue Res*, 2005, 46(2): 75-82
 - 17 Steck E, Bertram H, Abel R, *et al* Induction of intervertebral disc-like cells from adult mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2005, 23(3): 403-411.
 - 18 Sikavitsas VI, Bancroft GN, Mikos AG. Formation of three-dimensional cell/polymer constructs for bone tissue engineering in a spinner flask and a rotating wall vessel bioreactor. *J Biomed Mater Res*, 2002, 62(1): 136-148
 - 19 Lappa M. Organic tissues in rotating bioreactors: fluid-mechanical aspects, dynamic growth models, and morphological evolution. *Biotechnol Bioeng*, 2003, 84(5): 518-532
 - 20 Bancroft GN, Sikavitsas VI, Mikos AG. Design of a flow perfusion bioreactor system for bone tissue-engineering applications. *Tissue Eng*, 2003, 9(3): 549-554
 - 21 Kobayashi T, Watanabe H, Yanagawa T, *et al* Motility and growth of human bone marrow mesenchymal stem cells during *ex vivo* expansion in autologous serum. *J Bone Joint Surg (Br)*, 2005, 87(10), 1426-1433
 - 22 Li H, Zou X, Baatrup A, *et al* Cytokine profiles in conditioned media from cultured human intervertebral disc tissue. Implications of their effect on bone marrow stem cell metabolism. *Acta Orthop*, 2005, 76(1): 115-121.
 - 23 Richardson SM, Walker RV, Parker S, *et al* Intervertebral disc cell-mediated mesenchymal stem cell differentiation. *Stem Cells*, 2005, 24(3): 707-716
 - 24 Yamamoto Y, Mochida J, Sakai D, *et al* Reinsertion of nucleus pulposus cells activated by mesenchymal stem cells using coculture method decelerated intervertebral disc degeneration. *Spine J*, 2003, 3: 101-102
 - 25 Le Visage C, Kim SW, Tateno K, *et al* Interaction of human mesenchymal stem cells with disc cells: changes in extracellular matrix biosynthesis. *Spine*, 2002, 31(18): 2036-2042
 - 26 Seto H, Tanaka S, Seto H, *et al* Relationship between gene transfer and cartilage tissue engineering. *Clin Calcium*, 2004, 14(7): 72-75
 - 27 Risbud MV, Shapiro M, Vaccaro AR, *et al* Stem cell regeneration of the nucleus pulposus. *Spine J*, 2004, 4(6 Suppl): 348-353
 - 28 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. *Spine*, 2004, 29(23): 2627-2632
 - 29 Sakai D, Mochida J, Washina T, *et al* Differentiation of mesenchymal stem cells transplanted to a rabbit degenerative disc model: potential and limitations for stem cell therapy in disc regeneration. *Spine*, 2005, 30(21): 2379-2387.
 - 30 Zhang YG, Guo X, Xu P, *et al* Bone mesenchymal stem cells transplanted into rabbit intervertebral discs can increase proteoglycans. *Clin Orthop Relat Res*, 2005, (430): 219-226
 - 31 Sakai D, Mochida J, Washina T, *et al* Regenerative effects of transplanting mesenchymal stem cells embedded in atelocollagen to the degenerated intervertebral disc. *Biomaterials*, 2006, 27(3): 335-345
 - 32 Sakai D, Mochida J, Yamamoto Y, *et al* Transplantation of mesenchymal stem cells embedded in atelocollagen gel to the intervertebral disc: a potential therapeutic model for disc degeneration. *Biomaterials*, 2003, 24(20): 3531-3541
 - 33 Crevensten G, Walsh AJ, Ananthakrishnan D, *et al* Intervertebral disc cell therapy for regeneration: mesenchymal stem cell implantation in rat intervertebral discs. *Ann Biomed Eng*, 2004, 32(3): 430-434
 - 34 Dang JM, Sun DD, Shin-Ya Y, *et al* Temperature-responsive hydroxybutyl chitosan for the culture of mesenchymal stem cells and intervertebral disc cells. *Biomaterials*, 2006, 27(3): 406-418
 - 35 郭晓东, 郑启新, 杜靖远, 等. TGF- β 基因转染对间充质干细胞生物学行为的影响. *中华骨科杂志*, 2003, 23(7): 427-433

(收稿: 2006-05-17 修回: 2006-09-19)

(本文编辑: 俞军 董奇男)

· 致读者 ·

本刊投稿须知

按照《涉及人的生物医学研究伦理审查办法(试行)》, 在学术期刊发表涉及人的生物医学研究成果时, 研究人员须出具该项目经过伦理委员会审查同意的证明材料。作者向我刊投递相关内容文稿时, 请务必附审查证明材料, 否则我刊不予受理。