

## 软骨终板干细胞及骨髓间充质干细胞对软骨终板细胞增殖分化的影响

高健明<sup>1,2</sup>, 汪靖<sup>1,2</sup>, 刘晨<sup>1</sup>, 肖良<sup>1</sup>, 彭江<sup>2</sup>, 汪爱媛<sup>2</sup>, 徐宏光<sup>1</sup>

<sup>1</sup>皖南医学院 脊柱研究中心, 皖南医学院第一附属医院弋矶山医院 脊柱外科, 安徽芜湖 241001; <sup>2</sup>解放军总医院 全军骨科战创伤重点实验室, 骨科再生医学北京市重点实验室, 北京 100853

**摘要:** **背景** 组织工程作为一项年轻的技术获得了越来越多脊柱医学研究者的关注。但组织工程种子细胞的选择仍无明确标准。**目的** 获取并鉴定软骨终板干细胞 (cartilage endplate stem cell, CESC) 和骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC), 通过对比证明 CESC 是否有作为组织工程种子细胞的潜在可能。**方法** 原代培养 SD 大鼠软骨终板细胞 (cartilage endplate cell, CEP), 甲苯胺蓝染色鉴定软骨细胞表型, 通过单克隆法筛选培养 CESC 和 BMSC; 三系诱导分化验证 CESC 和 MSC 干细胞特性; 取 P3 代 CEP、CESC 和 BMSC 进行非接触式共培养, 在 1 d、3 d、5 d、7 d, CCK-8 检测三组 Transwell 小室下层 CEP 增殖, 并绘制增殖曲线; 流式细胞仪检测共培养 7 d 后三组下层小室 CEP 凋亡变化, RT-qPCR 检测 CEP 表型基因 ACAN、COL II、Sox9 表达变化。**结果** 甲苯胺蓝染色显示原代培养的 CEP 能够分泌软骨相关的多糖物质, 如糖胺聚糖等, 且具有特征性多角形形态, 呈铺路石样分布; 通过单克隆法分离出的 CESC 和 BMSC 经三系诱导分化后, 茜素红染色能够观察到被染成红色的钙结节, 油红 O 染色观察到细胞周围出现大量类圆形红色脂滴形成, 番红染色观察到软骨细胞特异性分泌的聚集蛋白聚糖出现。CCK-8 检测表明 CESC 组和 BMSC 组增殖能力均强于 CEP 组, 且 CESC 组增殖能力强于 BMSC 组, 三组 CEP 凋亡水平无统计学差异; RT-qPCR 结果表明三组 CEP 共培养第 1~7 天 ACAN、COL2A1 和 Sox9 表达均呈波峰状改变, 第 3 天表达水平最高。第 1 天、第 7 天三组软骨表型基因表达 ACAN、COL2A1 和 Sox9 差异无统计学意义; 第 3 天、第 5 天 CESC 组表达高于 BMSC 组和 CEP 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。**结论** CESC 和 BMSC 通过非接触式共培养均能够增强 CEP 增殖和软骨表型的表达, 且前者作用明显更强。

**关键词:** 软骨终板细胞; 软骨终板干细胞; 骨髓间充质干细胞; Transwell 共培养; 细胞增殖

**中图分类号:** R 329.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-5227(2021)05-0548-07 **DOI:** 10.3969/j.issn.2095-5227.2021.05.013

**网络出版时间:** 2021-06-03 15:27

**网络出版地址:** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/10.1117.R.20210602.1607.004.html>

**引用本文:** 高健明, 汪靖, 刘晨, 等. 软骨终板干细胞及骨髓间充质干细胞对软骨终板细胞增殖分化的影响 [J]. 解放军医学院学报, 2021, 42 (5): 548-554.

### Effects of cartilage endplate stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells on proliferation and differentiation of cartilage endplate cells

GAO Jianming<sup>1,2</sup>, WANG Jing<sup>1,2</sup>, LIU Chen<sup>1</sup>, XIAO Liang<sup>1</sup>, PENG Jiang<sup>2</sup>, WANG Aiyuan<sup>2</sup>, XU Hongguang<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Spine Research Center of Wannan Medical College, Department of Spine Surgery, Yijishan Hospital, Wuhu 241001, Anhui Province, China; <sup>2</sup> Key Laboratory of Musculoskeletal Trauma & War Injuries PLA, Beijing Key Lab of Regenerative Medicine in Orthopedics, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: XU Hongguang. Email: [pumchxuhg@126.com](mailto:pumchxuhg@126.com)

**Abstract:** **Background** Tissue engineering, as a new technique, has attracted more and more attention from spinal medicine researchers. However, there is still no clear standard in the selection of seed cells in tissue engineering. **Objective** To obtain and identify cartilage end plate stem cells (CESC) and bone marrow mesenchymal stem cells (BMSC), and find out whether CESC has the potential as seed cells for tissue engineering by comparing with BMSC. **Methods** The phenotype of chondrocytes in primary cultured SD rats was identified by toluidine blue staining, and the characteristics of CESC and BMSC stem cells were identified by single clone screening. Then, the three lines cells were induced to verify the characteristics of CESC and BMSC stem cells; and the P3 generation of CEP, CESC and BMSC were taken for non-contact co-cultivation. At 1 d, 3 d, 5 d, and 7 d, CCK-8 was used to detect the proliferation of CEP in the lower layer of Transwell chamber in the three groups and the proliferation curve was drawn. Flow cytometry was used to detect the changes of CEP apoptosis in the middle and lower compartments of the three groups after 7 days of co-cultivation. Finally, RT-qPCR was used to detect the changes in the expression of CEP phenotype gene proteoglycan (ACAN), type II collagen (COL II), and sex determining region Y box protein 9 (Sox9). **Results** Toluidine blue staining showed

**收稿日期:** 2021-02-04

**基金项目:** 国家自然科学基金面上项目 (81972108)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81972108)

**作者简介:** 高健明, 男, 在读硕士。研究方向: 运动医学与组织工程, 脊柱外科与老年骨病。Email: [zgahczgm@163.com](mailto:zgahczgm@163.com)

**通信作者:** 徐宏光, 男, 博士, 主任医师。Email: [pumchxuhg@126.com](mailto:pumchxuhg@126.com)

that the primary cultured CEP secreted cartilage-related polysaccharides such as glycosaminoglycan (GAG), and had characteristics of polygonal shape and paving stone-like distribution. After the three-line induced differentiation of CESC and BMSC isolated by monoclonal method, red calcium nodules were observed by alizarin red staining, a large number of round red lipid droplets around the cells were observed by oil red O staining, and aggregate proteoglycans secreted specifically by chondrocytes were observed by fuchsin staining. CCK-8 assay showed that the proliferation ability of CESC group and BMSC group was stronger than that of CEP group, and the proliferation ability of CESC group was stronger than that of BMSC group, and there was no difference in the level of CEP apoptosis among the three groups. RT-qPCR results showed that the expression of ACAN, COL2A1 and Sox9 in the three groups of CEP co-culture increased from the 1st day to the 7th day, and the expression level peaked on the 3rd day. There was no significant difference in the expression of phenotypic genes ACAN, COL2A1 and Sox9 among the three groups on the 1st and 7th day. On the 3rd and 5th day, the expression of phenotypic genes in CESC group was significantly higher than that in BMSC group and CEP group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Both CESC and BMSC can enhance the proliferation of CEP and the expression of cartilage phenotype by non-contact co-culture, and the effect of CESC is better.

**Keywords:** cartilage endplate cell; cartilage endplate stem cell; bone marrow mesenchymal stem cell; transwell co-culture; cell proliferation

**Cited as:** Gao JM, Wang J, Liu CH, et al. Effects of cartilage endplate stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells on proliferation and differentiation of cartilage endplate cells [J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2021, 42 (5) : 548-554.

下腰痛是临床常见疾病, 目前认为椎间盘退变是导致下腰痛的主要原因<sup>[1]</sup>。椎间盘中, 软骨终板由透明软骨组成, 是供应成熟椎间盘营养物质的主要通道<sup>[2]</sup>。软骨终板细胞 (cartilage endplate cell, CEP) 功能异常和数量减少会导致软骨终板钙化或硬化进而减少椎间盘营养物质的供应, 最终导致椎间盘退变的发生。有研究表明软骨终板存在原位干细胞即软骨终板干细胞 (cartilage endplate stem cell, CESC), 具有较强的克隆形成能力和多向分化潜能<sup>[3-5]</sup>。骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC) 是一种骨髓来源的干细胞, 在一定条件下能够分化成为成骨细胞、成软骨细胞、成肌细胞、脂肪细胞、神经细胞等, 可用于多种组织缺损的修复<sup>[6]</sup>。随着组织工程学的发展, BMSC作为一种具有多种分化潜能的种子细胞越来越受到人们的关注。本实验获取了大鼠腰椎软骨终板组织, 分离出 CEP 和 CESC, 将 CEP 分别与 CESC、BMSC 进行体外非接触式共培养, 通过检测各共培养组的增殖与凋亡, 及软骨表型基因 ACAN、COL II 及 Sox9 的表达, 对比探讨 CESC、BMSC 对 CEP 的影响, 进而探讨 CESC 作为组织工程种子细胞的潜在可能。

## 材料和方法

**1 实验动物** SD 清洁级大鼠 20 只, 体质量 200 ~ 300 g, 雌雄不限, 由北京市科宇动物养殖中心提供。  
**2 主要试剂** 0.25% EDTA-胰酶 (Gibco); 0.2% II 型胶原酶 (Sigma); DMEM/F12 (Gibco); 干细胞培养用血清 (上海双伽生物科技有限公司); 干细胞成骨分化诱导培养基 (赛业生物科技有限公司); 干细胞成软骨分化诱导培养基 (赛业生物科技有限公

司); 干细胞成脂分化诱导培养基 (赛业生物科技有限公司); 甲苯胺蓝染色剂 (索莱宝生物科技有限公司); 茜素红染色液 (索莱宝生物科技有限公司); 油红 O 染色剂 (索莱宝生物科技有限公司); 番红染色液 (索莱宝生物科技有限公司)。

**3 大鼠腰椎 CEP 及 CESC 的分离和培养** 取 5 只清洁级 SD 大鼠, 麻醉后分离出软骨终板, 剪碎, 将软骨终板置于 DMEM/F12 配制 0.02% 的 II 型胶原酶中, 37℃ 下消化 4 h, 离心重悬后种植于培养瓶中, 在 37℃、5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 每 3 d 换液 1 次, 获得 CEP, 按时用倒置显微镜观察、拍照。待细胞融合至 90% 时, 进行甲苯胺蓝染色。同时将上述获得的部分原代细胞按照 100/cm<sup>2</sup> 的密度接种到底面积 25 mm<sup>2</sup> 培养瓶中<sup>[3,7]</sup>, 37℃、5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 每 3 d 换液 1 次, 培养 10 d, 获得 CESC。

**4 大鼠 BMSC 的分离和培养** 取 5 只清洁级 SD 大鼠, 以 3% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉, 无菌操作下取其四肢的长骨, 用注射器抽取长骨内骨髓, 加含 10% 胎牛血清的培养液吹打制成单细胞悬液, 分装于底面积为 25 mm<sup>2</sup> 培养瓶中。在 37℃、5% 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 每 3 d 换液 1 次, 待细胞融合至 90% 时, 用体积分数 0.25% 胰蛋白酶消化、传代。

**5 大鼠 CESC 及 BMSC 的三系诱导分化** 分别取 P3 代大鼠 CESC 及 BMSC, 接种于 6 孔板, 待细胞融合至 80% 时分别加入成脂细胞诱导液、成软骨诱导液及成骨诱导液。培养 21 d 后, 分别用油红染液、番红染液及茜素红染液染色, 倒置显微镜下观察拍照。

**6 Transwell 细胞共培养** 分别将 P3 代大鼠 CEP、

CESC 和 BMSC 用体积分数 0.25% 胰蛋白酶消化 3 min, 加入 DMEM/F12 培养基终止消化, 细胞悬液收集至离心管, 1 500 r/min 离心 5 min。收集细胞, 弃上清后, 细胞用含 15% 胎牛血清的培养液重悬, 进行细胞计数。根据 Transwell 小室上下室加入的不同细胞, 分为 CEP 组 (上室为 CEP, 下室为 CEP)、CESC 组 (上室为 CESC, 下室为 CEP)、BMSC 组 (上室为 BMSC, 下室为 CEP), 即分别将 CESC、BMSC 及 CEP 悬液接种于 Transwell 小室的上室, 孔中细胞数约  $5 \times 10^4$  个, 加入培养基 2 mL。而后分别将 CEP 的悬液接种于 Transwell 小室的下室, 孔中细胞数约  $5 \times 10^4$  个, 加入培养基 2 mL, 共培养 1 d、3 d、5 d 和 7 d, 培养期间每 2.5 d 换液 1 次 (图 1)。

**7 CCK-8 实验检测大鼠 CEP 增殖能力** 利用 Transwell 小室将大鼠 CEP 分别与 CESC 和 BMSC 进行非接触式共培养 1 d、3 d、5 d 及 7 d 后, 分别更换培养基, 加入 CCK-8 液后继续培养 2 h, 吸取上清液于 96 孔板, 每个孔设定 3 个复孔, 无细胞处理的 CCK-8 试剂作为空白对照, 用酶标仪测定吸光度值, 每天同一时间进行检测, 计算数据后, 绘制共培养前后 CEP 的生长曲线。

**8 流式细胞术检测 CEP 凋亡率** 待 CEP 组、CESC 组及 BMSC 组软骨终板细胞融合至 80% 左右时, 用体积分数 0.25% 胰蛋白酶消化 3 min, 加入含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基终止消化, 细胞悬液收集至离心管, 2 000 r/min 离心 5 min, PBS 洗涤 2 次, 收集  $3 \times 10^5$  个细胞, 加入 500  $\mu$ L 的 Binding Buffer 悬浮细胞, 再依次加入 5  $\mu$ L Annexin V-FITC、5  $\mu$ L Propidium Iodide 混匀, 室温避光条件下反应 10 min, 在流式细胞仪下检测细胞凋亡情况。

**9 RT-qPCR 检测三组 Transwell 小室 CEP 软骨表型基因 ACAN、COL II、Sox9 的表达情况** 分别在共培养 1 d、3 d、5 d 和 7 d 提取 CEP RNA, 反转录为 cDNA。COL2A1 上游引物 5' CCTGAAA CTCTGCCACCCAG 3', 下游引物 5' GTTCTT CCGAGGCACAGTCG 3', ACAN 上游引物 5' ACACCCCTACCCTTGCTTCT 3', 下游引物 5' AAAGTGT CCAAGGCATCCAC 3', Sox9 上游引



图 1 实验分组 Transwell 共培养示意图

Fig.1 Transwell co-cultivation diagram of experimental groups

物 5' CGTCAACGGCTCCAGCA 3', 下游引物 5' TGCGCCCACACCATGA 3'。扩增反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 重复 40 个循环。结果用  $-\Delta\Delta C_t$  表示。**10 统计学方法** 采用 SPSS 18.0 软件分析实验数据, 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 各组间差异用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结果

**1 大鼠 CESC、BMSC、CEP 分离及培养结果** 大鼠 CEP 接种到培养瓶, 在单克隆 3 d 后, 可见培养皿中有细胞集簇形成, 5 d 后集簇明显, 形态呈梭形, 细胞排列有序 (图 2); CEP 培养 10 d 后细胞接近融合, 在 DMEM/F12 培养基中呈多角形或梭形, 贴壁生长, 细胞遮光性良好。通过穿刺抽吸法获得 BMSC, 细胞以分散集落方式增长, 多呈纺锤形或短梭形, 部分细胞呈多边形 (图 3)。

**2 CEP 的细胞外基质分泌** CEP 通过甲苯胺蓝染色可见 CEP 能够分泌细胞外基质酸性黏多糖及胶原如 GAG, 具有特征性多角形形态、呈铺路石样分布 (图 4)。

**3 CESC、BMSC 三系诱导分化鉴定** 经过扩增后的 CESC 进行成脂诱导 20 d、21 d 后分别进行油红 O 染色, 显微镜下均可以观察到大量的红染脂滴空泡形成。CESC 经过 28 d 成软骨诱导, 番红染色显示 CESC 染色为红色; 经过扩增以后的 CESC 进行成骨诱导 28 d, 经过茜素红染色, 显微

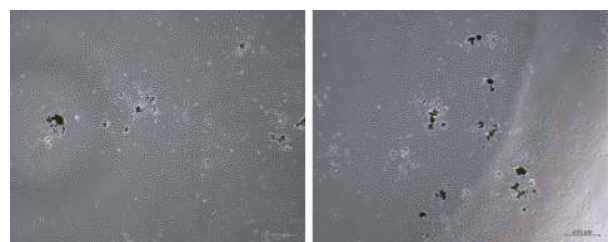


图 2 单克隆法培养后获得大鼠 CESC, 细胞集簇生长

Fig.2 CESC of rats was obtained after culturing by monoclonal method, and the cells grew in clusters



图 3 大鼠 BMSC 提取及培养, 细胞呈现集落生长

Fig.3 BMSC of rats was extracted and cultured, and the cells showed colony formation activity

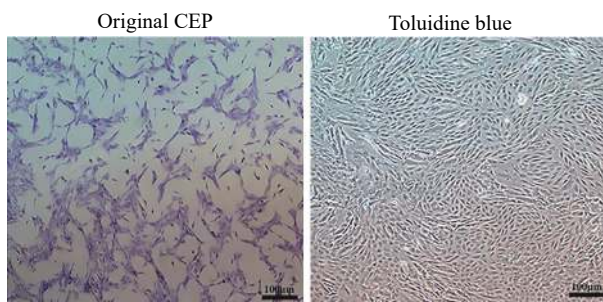


图4 大鼠 CEP 培养与甲苯胺蓝染色, CEP 呈多角形或梭形, 贴壁生长, 细胞遮光性良好

Fig.4 CEP of rats was cultured and stained with toluidine blue. The CEP was polygonal or fusiform, it grew adherently, and the cells had good shading properties

镜下均可以观察到有大量钙结节形成。BMSC 成脂诱导 3 周后脂滴数量增加并相互融合, 细胞由长梭形变为圆形或多边形, 油红 O 染色显示细胞含有丰富的脂肪颗粒; BMSC 成软骨诱导 4 周, 番红染色显示 BMSC 染色为红色; BMSC 经成骨诱导 28 d 后, 局部细胞呈重叠生长, 间充质逐渐堆积、间充质中矿盐沉积, 形成多个结节, 并逐渐融合, 茜素红染色可见红色钙结节 (图 5)。

4 三组细胞的增殖能力 CCK-8 实验结果显示, 在 3 d 时, CESC 组、BMSC 组及 CEP 组组间有统计学差异 ( $P < 0.05$ ), 提示与 CESC、BMSC、CEP 共培养后促进了 CEP 的增殖能力, 且 CESC 组增殖能力强于 BMSC 组 (图 6)。

5 共培养对 CEP 凋亡率的影响 流式结果提示, 共培养 7 d 后, 三组细胞的凋亡率无统计学差异 (图 7)。

6 共培养后各组 CEP 相关特异性基因的表达 RT-qPCR 结果表明三组 CEP 共培养 1~7 d, ACAN、COL II 和 Sox9 三种基因的表达均呈波峰状改变, 3 d 表达水平最高。1 d、7 d 三组软骨表型基因 ACAN、COL II 和 Sox9 表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 3 d、5 d 时 CESC 组 ACAN、COL II 和 Sox9 表达高于 BMSC 组和 CEP 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (图 8)。

## 讨论

目前, 以组织工程等为代表的治疗方法逐渐被人们所认知, 其利用干细胞组织工程等技术手段从根本上延缓软骨终板退变<sup>[8]</sup>。既往的组织工程技术, 大部分利用种子细胞的扩增和分化效应, 或以细胞本身作为元件以求修复缺损组织。早在 2004 年, Mizuno 等<sup>[9]</sup>采用髓核源性细胞作为种子细胞进行组织工程, 再附加支架材料, 实现了由

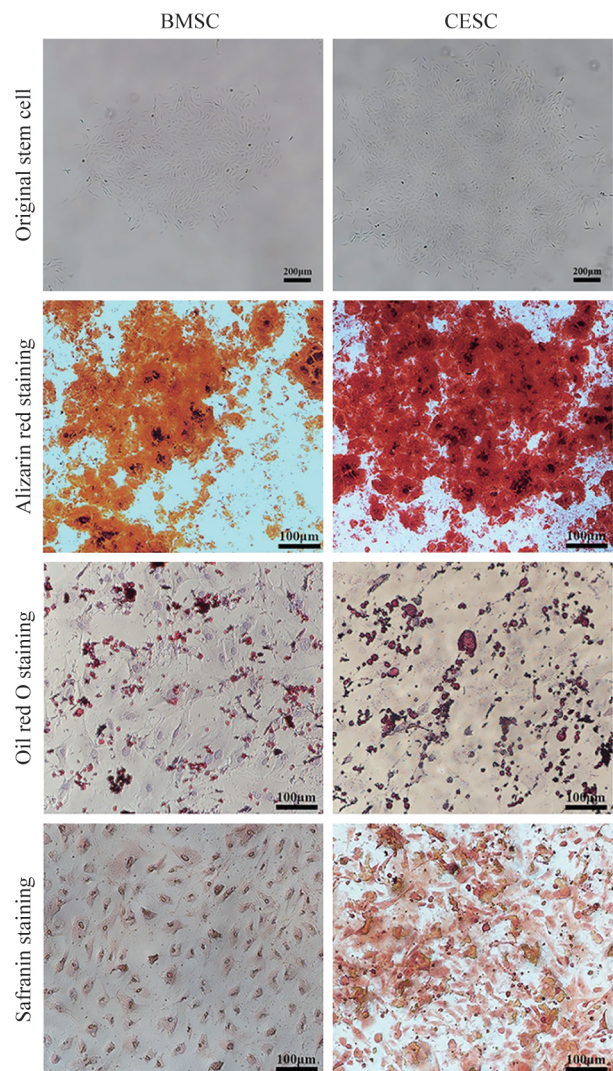


图5 CESC、BMSC 的三系诱导分化, CESC 成脂诱导后, 油红 O 染色可以观察到大量的红染脂滴空泡形成, 成软骨诱导番红染色呈红色, 成骨诱导茜素红染色观察到有大量钙结节形成; BMSC 成脂诱导后脂滴数量增加并相互融合, 细胞由长梭形变为圆形或多边形, 油红 O 染色显示细胞含有丰富的脂肪颗粒, 成软骨诱导番红染色显示 BMSC 染色为红色, 成骨诱导茜素红染色可见红色钙结节

Fig.5 The three lines of CESC and BMSC induced differentiation. After CESC was induced into adipogenesis, a large number of red-stained lipid droplets formation could be observed by oil red O staining, the cartilage-induced safranin staining was red, and osteogenic-induced alizarin red staining showed the formation of a large number of calcium nodules. The number of lipid droplets increased and merged with each other after BMSC adipogenesis. The cells changed from a long spindle shape to a round or polygonal shape. Oil red O staining showed that the cells were rich in fat particles. Cartilage induced safranin staining showed that BMSC was stained red, and osteogenic alizarin red staining showed red calcium nodules

修复单元新生组织与原生椎间盘组织结构类似的实验结果。在既往的椎间盘组织工程研究中, 关于种子细胞的选择一直没有定论, 包括髓核细胞、纤维环细胞和不同组织来源干细胞都是研究

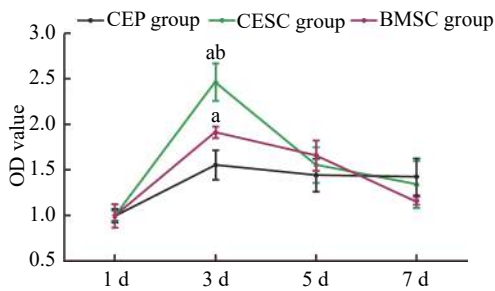


图 6 CCK-8 检测共培养结果,在 3 d 时,CEC 组和 BMSC 组增殖能力均强于 CEP 组,且 CESC 组增殖能力强于 BMSC ( $^aP<0.05$ , vs CEP;  $^bP<0.05$ , vs BMSC)

Fig.6 CCK-8 test co-culture results showed that on the 3rd day, the proliferation ability of the CESC group and the BMSC group was stronger than that of the CEP group, and the proliferation ability of the CESC group was stronger than that of the BMSC group ( $^aP<0.05$ , vs CEP;  $^bP<0.05$ , vs BMSC)

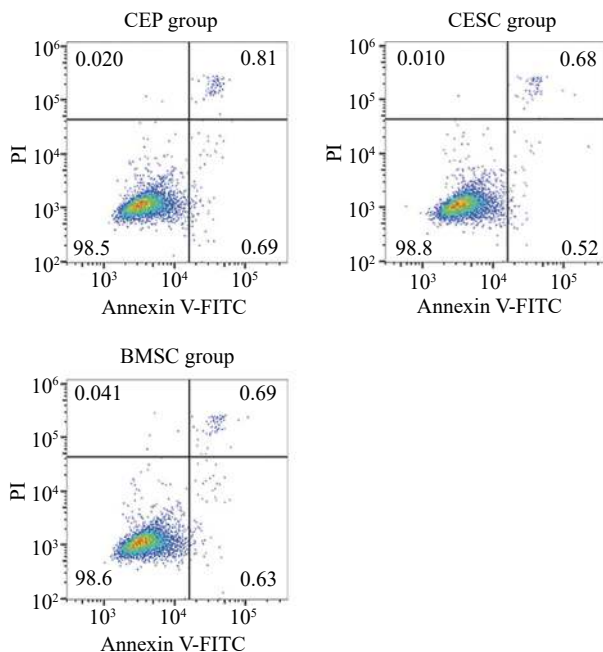


图 7 流式细胞术检测,CEC 及 BMSC 共培养对 CEP 凋亡无影响

Fig.7 Flow cytometry showed that the co-culture of CEP and BMSC had no effect on CEP apoptosis

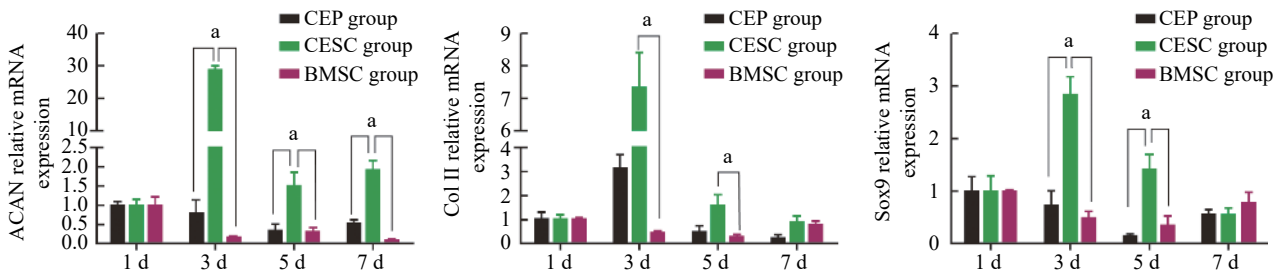


图 8 共培养后各组 CEP 相关特异性基因的表达情况,三组间差异有统计学意义 ( $^aP<0.05$ ); 1~7 d CESC 组三种基因 ACAN、Col II 和 Sox9 表达均呈波峰状改变,3 d CESC 组三种基因 ACAN、Col II 和 Sox9 表达水平最高,差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )

Fig.8 After co-cultivation, the expression of CEP-related specific genes in each group was detected, and the difference between the three groups was statistically significant ( $^aP<0.05$ ); the expressions of the three genes ACAN, Col II and Sox9 in the CESC group from 1 d to 7 d all showed peak-like changes. The expression levels of the three genes ACAN, Col II and Sox9 were the highest in the CESC group at the 3 d, and the difference was statistically significant ( $P<0.05$ )

者们的研究目标<sup>[10-13]</sup>。

椎间盘终板软骨干细胞的获取,又提供了一种干细胞来源,且方法简单,能够快速大量得到种子细胞。在现阶段,对于软骨终板干细胞的研究还处于初级阶段,常献等<sup>[14]</sup>同样分离了人 CESC,通过 Transwell 的方式与退变的髓核细胞进行非接触式体外共培养,证实了 CESC 向髓核细胞分化的功能,从一定程度上证明了 CESC 作为种子细胞的潜质。早期, Liu 等<sup>[15]</sup>通过对比 CESC 与 BMSC 的增殖能力,证实了两者具备相同的增殖潜力。而最新的研究报道了 CESC 对于髓核细胞存在调控作用,从一定程度上证明了 CESC 作为种子细胞可对其他椎间盘组织部分产生积极作用<sup>[16-17]</sup>。但在目前的椎间盘组织工程技术领域中,应用较为广泛的仍是 BMSC<sup>[18-20]</sup>。虽然 BMSC 的获得方法也较为简单,但不同来源的干细胞分化趋向不同。早期的研究报道了 CESC 具备与 BMSC、髓核源性干细胞、纤维环源性干细胞相似的增殖能力和分化能力<sup>[21-22]</sup>。但并没有报道将 CESC 作为种子细胞作用于 CEP 的实验。因为 CESC 具备较强的成骨分化能力而不是成软骨分化能力<sup>[23]</sup>。所以研究者们在对 CESC 成软骨分化调控方面做出大量的研究<sup>[24]</sup>。我们认为在探究 CESC 作为种子细胞潜质的同时,需同时考虑 CESC 对 CEP 的影响。为了更好地研究 CESC 对 CEP 的表型影响,同时对比 BMSC 对 CEP 的影响效果,本实验分离鉴定了 CESC 和 BMSC。

提取 CESC 的方法包括差速贴壁法<sup>[21]</sup>、Fibronectin 差别筛选法<sup>[17]</sup>、琼脂糖凝胶法和单克隆法<sup>[25-26]</sup>。本实验通过单克隆法的低密度培养,从软骨终板中分离出 CESC,同时按照公认的软骨细胞提取方法提取出 CEP<sup>[27-29]</sup>。在获取 CESC 过程中,我们发现细胞接种密度达 100/cm<sup>2</sup> 时,获取效

率最高。骨细胞分泌的含钙基质能够被茜素红染成红色,脂肪细胞内部形成的脂肪滴能够特异性地与油红O染色液结合而被染成鲜红色,软骨细胞所分泌的软骨基质能够被番红染成红色。利用以上的染色原理,我们对CESC及BMSC的多向分化能力进行了初步鉴定与比较,发现CESC的成骨及成软骨方向分化能力要强于BMSC,而BMSC的成脂肪分化能力要强于CESC,这也证明了CESC良好的分化能力和应用在椎间盘组织工程中的潜力。在进行多向分化诱导后,未检测成骨、成脂肪及成软骨方向的基因变化情况,是本实验的不足之处,也是我们未来的研究方向之一。

目前的共培养体系主要包括非接触共培养及接触共培养两种。非接触式共培养的优点在于能更好地了解细胞共培养时的效应,以及能够排除其他因素的干扰。本实验采用Tanswell小室,将不同的干细胞种在上室内,由于聚碳酸酯膜有通透性,上层培养液中的成分可以影响到下室内的细胞,从而可以研究上层培养液中的成分对细胞生长、运动等的影响<sup>[30]</sup>。这种在培养时使目标细胞间不直接接触的培养模式,可以更加清晰地分辨两种细胞之间的互相作用,也有利于探究其机制。但两种不同干细胞分别与软骨终板细胞非接触式共培养后,未进一步检测具体相关分子机制和信号通路,是本实验的不足之处,之后将对此进一步深化研究。

本实验发现,将CESC、BMSC与CEP进行非接触共培养后,CESC可以促进CEP软骨表型基因ACAN、COL II、Sox9表达,并且强于BMSC对CEP的影响。这表明经过共培养的CESC可增强CEP特异性相关分子的表达,有延缓甚至逆转软骨终板退变的潜质。细胞增殖及凋亡实验发现,与CESC及BMSC共培养的CEP增殖能力均增强,且CESC对CEP的增殖能力强于BMSC,CESC和BMSC对CEP的凋亡没有影响。CESC作为椎间盘内源性干细胞,对椎间盘内环境具有天然的适应力,且CESC在椎间盘术中容易获取,但目前无法满足自体应用的条件。因此,CESC无法作为组织工程传统意义上的种子细胞应用于临床进行组织的退变、缺损修复,而需要与原生组织的CEP进行共同作用<sup>[31]</sup>。

综上所述,我们发现CESC对软骨终板原生的软骨细胞有促增殖和分化作用,在后续的研究和实验中,可以采取体内募集CESC或诱导增强CESC功能的方式进行椎间盘组织工程的修复,来

实现我们再生修复软骨终板的最终目的,且相关的支架材料也是我们未来的重要研究方向<sup>[32-33]</sup>。鉴于此,我们认为CESC满足作为种子细胞的必备条件,在组织工程技术修复椎间盘退变方面具有相当的潜力。

#### 参考文献

- 1 Paesold G, Nerlich AG, Boos N. Biological treatment strategies for disc degeneration: potentials and shortcomings [J]. *Eur Spine J*, 2007, 16 (4): 447-468.
- 2 Harmon MD, Ramos DM, Nithyadevi D, et al. Growing a backbone - functional biomaterials and structures for intervertebral disc (IVD) repair and regeneration: challenges, innovations, and future directions [J]. *Biomater Sci*, 2020, 8 (5): 1216-1239.
- 3 王效,徐宏光,肖良,等.大鼠腰椎终板软骨干细胞的分离及分化[J].*中国组织工程研究*, 2018, 22 (13): 2093-2097.
- 4 Shen Q, Zhang L, Chai B, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem-like cells from human nucleus pulposus tissue [J]. *Sci China Life Sci*, 2015, 58 (5): 509-511.
- 5 Blanco JF, Graciani IF, Sanchez-Guijo FM, et al. Isolation and characterization of mesenchymal stromal cells from human degenerated nucleus pulposus: comparison with bone marrow mesenchymal stromal cells from the same subjects [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2010, 35 (26): 2259-2265.
- 6 Prasadam I, Akiuen A, Friis TE, et al. Mixed cell therapy of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and articular cartilage chondrocytes ameliorates osteoarthritis development [J]. *Lab Invest*, 2018, 98 (1): 106-116.
- 7 Sekiya I, Larson BL, Smith JR, et al. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality [J]. *Stem Cells*, 2002, 20 (6): 530-541.
- 8 Peroglio M, Douma LS, Caprez TS, et al. Intervertebral disc response to stem cell treatment is conditioned by disc state and cell carrier: an ex vivo study [J]. *J Orthop Transl*, 2017, 9: 43-51.
- 9 Mizuno H, Roy AK, Vacanti CA, et al. Tissue-engineered composites of annulus fibrosus and nucleus pulposus for intervertebral disc replacement [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2004, 29 (12): 1290-1297; discussion1297-1298.
- 10 Ashraf S, Chatoor K, Chong J, et al. Transforming growth factor  $\beta$  enhances tissue formation by passaged nucleus pulposus cells in vitro [J]. *J Orthop Res*, 2020, 38 (2): 438-449.
- 11 Shamsah A, Cartmell S, Richardson S, et al. Mimicking the annulus fibrosus using electrospun polyester blended scaffolds [J]. *Nanomaterials*, 2019, 9 (4): 537.
- 12 Liu C, Jin Z, Ge X, et al. Decellularized annulus fibrosus matrix/chitosan hybrid hydrogels with basic fibroblast growth factor for annulus fibrosus tissue engineering [J]. *Tissue Eng Part A*, 2019, 25 (23/24): 1605-1613.
- 13 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/OL]. <https://doi.org/10.1155/2019/8496025>.
- 14 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.
- 15 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.
- 16 Luo LW, Jian XY, Sun H, et al. Cartilage endplate stem cells

- inhibit intervertebral disc degeneration by releasing exosomes to nucleus pulposus cells to activate Akt/autophagy [J]. *Stem Cells*, 2021, 39 (4): 467-481.
- 17 He ZL, Jia M, Yu YJ, 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.
  - 18 Lin XF, Fang XQ, Wang Q, et al. Decellularized allogeneic intervertebral disc: natural biomaterials for regenerating disc degeneration [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (11): 12121-12136.
  - 19 Daly CD, Ghosh P, Zannettino ACW, et al. Mesenchymal progenitor cells primed with pentosan polysulfate promote lumbar intervertebral disc regeneration in an ovine model of microdiscectomy [J]. *Spine J*, 2018, 18 (3): 491-506.
  - 20 Gan Y, Li S, Li P, et al. A Controlled Release Codelivery System of MSCs Encapsulated in Dextran/Gelatin Hydrogel with TGF- $\beta$ 3-Loaded Nanoparticles for Nucleus Pulposus Regeneration [J/OL]. <https://doi.org/10.1155/2016/9042019>.
  - 21 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.
  - 22 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.
  - 23 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.
  - 24 浦路桥, 刘杰, 袁超, 等. 缺氧和营养缺乏对软骨终板干细胞凋亡的影响及相关机制 [J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2017, 27 (5): 449-455.
  - 25 Feng CC, Zhang Y, Yang MH, et al. 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 [J]. *Stem Cells*, 2015, 33 (12): 3558-3568.
  - 26 王效, 徐宏光, 肖良, 等. 两种不同单克隆法筛选大鼠腰椎终板软骨干细胞能力的比较 [J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2018, 39 (3): 306-308.
  - 27 姚军, 卢世璧, 彭江, 等. 取向性关节软骨细胞外基质源性支架对负载软骨细胞生物学行为的影响 [J]. *军医进修学院学报*, 2009, 30 (3): 375-377.
  - 28 张文涛, 卢世璧. 软骨细胞培养及其调控因素 [J]. *军医进修学院学报*, 1998, 19 (2): 156-157.
  - 29 张莉, 许文静, 郭全义, 等. 快速扩增羊软骨细胞的生物学特性观察 [J]. *军医进修学院学报*, 2006, 27 (6): 443-444.
  - 30 Noro D, Kurashige Y, Shudo K, et al. Effect of epithelial cells derived from periodontal ligament on osteoblast-like cells in a Transwell membrane coculture system [J]. *Arch Oral Biol*, 2015, 60 (7): 1007-1012.
  - 31 刘兰涛, 朱瑜洁, 黄博, 等. 软骨终板干细胞动物体内成骨/软骨的初步研究 [J]. *局解手术学杂志*, 2016, 25 (4): 235-239.
  - 32 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.
  - 33 Sun C, Lan WR, 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.

(上接 547 页)

- 12 赵贵芳. 脐带间充质干细胞及其来源外泌体修复皮肤损伤的机制研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- 13 Hu Y, Xu R, Chen CY, et al. Extracellular vesicles from human umbilical cord blood ameliorate bone loss in senile osteoporotic mice [J]. *Metabolism*, 2019, 95: 93-101.
- 14 Zhao M, Dai W, Wang H, et al. Periodontal ligament fibroblasts regulate osteoblasts by exosome secretion induced by inflammatory stimuli [J]. *Arch Oral Biol*, 2019, 105: 27-34.
- 15 高秦, 刘宏伟, 金岩, 等. 人牙周膜干细胞的体外分离、纯化及初步鉴定 [J]. *实用口腔医学杂志*, 2006, 22 (1): 34-37.
- 16 Li WY, Liu YS, Zhang P, et al. Tissue-engineered bone immobilized with human adipose stem cells-derived exosomes promotes bone regeneration [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2018, 10 (6): 5240-5254.
- 17 Wang MH, Li J, Ye YY, et al. SHED-derived conditioned exosomes enhance the osteogenic differentiation of PDLSCs via Wnt and BMP signaling in vitro [J]. *Differentiation*, 2020, 111: 1-11.
- 18 Zhao B, Zhang YJ, Han SC, et al. Exosomes derived from human amniotic epithelial cells accelerate wound healing and inhibit scar formation [J]. *J Mol Histol*, 2017, 48 (2): 121-132.
- 19 杨俊辉, 罗金莉, 袁小平. 人生长激素对人牙周膜干细胞增殖及成骨分化的影响 [J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25 (25): 3956-3961.
- 20 Zhang SP, Chuah SJ, Lai RC, et al. MSC exosomes mediate cartilage repair by enhancing proliferation, attenuating apoptosis and modulating immune reactivity [J]. *Biomaterials*, 2018, 156: 16-27.
- 21 Lv CX, Duan H, Wang S, et al. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells promote proliferation of allogeneic endometrial stromal cells [J]. *Reprod Sci*, 2020, 27 (6): 1372-1381.
- 22 Ngora H, Galli UM, Miyazaki K, et al. Membrane-bound and exosomal metastasis-associated C4.4A promotes migration by associating with the  $\alpha$  (6)  $\beta$  (4) integrin and MT1-MMP [J]. *Neoplasia*, 2012, 14 (2): 95-107.
- 23 Zhang J, Guan J, Niu X, et al. Exosomes released from human induced pluripotent stem cells-derived MSCs facilitate cutaneous wound healing by promoting collagen synthesis and angiogenesis [J]. *J Transl Med*, 2015, 13: 49.