

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.04.013

人退变椎间盘软骨终板干细胞多向分化的研究*

苏志德¹ 周海燕² 赵雪³ 刘加法⁴ 裴美艳⁵

(1 潍坊市人民医院药剂科 山东 潍坊 261041; 2 潍坊市人民医院保健体检中心 山东 潍坊 261041; 3 潍坊市人民医院检验科 山东 潍坊 261041; 4 潍坊市人民医院输血科 山东 潍坊 261041; 5 潍坊市人民医院滨海分院药剂科 山东 滨海 262737)

摘要 目的: 为了分离和鉴定人退变椎间盘软骨终板干细胞。**方法:** 收集因腰椎间盘突出性疾病行腰椎间盘摘除术并植骨融合的标本。在解剖显微镜下清理软骨终板组织,并消化软骨终板,提取软骨终板细胞。获得的软骨终板细胞经过琼脂糖三维筛选系统培养后,选取细胞克隆团并进行体外扩增,扩增后的细胞行流式细胞术检测干细胞标志物证实退变软骨终板中存在干细胞。**结果:** 共聚焦免疫荧光提示退变椎间盘软骨终板组织中存在干细胞标志物 STRO1、CD105、CD73、CD90 阳性的细胞。经琼脂糖三维培养基筛选的 CESC 在免疫表型上符合干细胞标准。**结论:** 在人退变椎间盘的软骨终板中存在具有多向分化潜能的干细胞。

关键词: 退变椎间盘; 软骨终板; 干细胞

中图分类号: R681.53 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2014)04-650-06

Identity of Chondrogenic Stem Cells in the Degenerated Human Cartilage Endplate*

SU Zhi-de¹, ZHOU Hai-yan², ZHAO Xue³, LIU Jia-fa⁴, PEI Mei-yan⁵

(1 Pharmacy department, Weifang people's hospital, Weifang, Shandong, 261041, China;

2 Health care medical center, Weifang people's hospital, Weifang, Shandong, 261041, China;

3 Clinical laboratory, Weifang people's hospital, Weifang, Shandong, 261041, China;

4 Blood transfusion department, Weifang people's hospital, Weifang, Shandong, 261041, China; 5 Pharmacy department, Weifang people's hospital (Binhai branch), Binhai, Shandong, 262737, China)

ABSTRACT Objective: To isolate and investigate chondrogenic stem cells in the degenerated human cartilage endplate. **Methods:** The CEP used in this study was obtained from seven patients who underwent posterior discectomy and fusion for lumbar degenerative disease. Surgically explanted CEP was cleaned from any adherent extraneous tissue under a sterilized dissecting microscope. The nucleus pulposus, annulus fibrosus, and subchondral bone tissues around blocks of CEP were removed. The cells were subcultured in the agarose culture, and the cell clones were selected and expanded *in vitro* for the assays of stem cell markers to confirm the existence of stem cells in the cartilage endplate. **Results:** There are cells in the degenerated cartilage endplate which are positive for stem cell markers such as STRO-1, CD105, CD73, CD90 by the confocal scan microscope. By agarose culture separation, CESC were proved to belong to stem cells in Immunophenotyping. **Conclusion:** All the results in this study indicated that the CESC existed in the degenerated cartilage endplate.

Key words: Degenerative disc disease; Cartilage endplate; Stem cells

Chinese Library Classification(CLC): R681.53 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)04-650-06

前言

下腰痛是如今社会常见的和多发的疾病,已成为造成劳动力丧失的常见原因^[1],而椎间盘退行性疾病(degenerative disc disease, DDD)被认为是最常见的导致下腰痛的因素^[2]。据统计,80%的人群在一生之中都要经历下腰痛的症状,其中 40%的是由 DDD 导致的^[3]。因此,椎间盘退变的治疗和预防具有很好的市场前景。在椎间盘(intervertebral disk, IVD)退变过程中,其组织的组成、结构和功能逐渐发生变化,细微变化:蛋白多糖

成分及含水量的髓核逐渐丢失,无序排列的纤维环结构和软骨终板钙化等^[4]。但是,到目前为止,引起这些变化的具体机制还不是很明了。

椎间盘干细胞成为最近研究的热点,软骨终板在干细胞的存在问题上引起科学家的注意。一些学者报告,在变性的椎间盘髓核组织中存在向软骨方向分化的干细胞^[5]。Blanco 等对一个人的髓核的干细胞和骨髓间充质干细胞进行了详细的比较,结果表明,来源于髓核的干细胞形态、表面标记和分化能力和骨髓间充质干细胞非常相似,但从髓核来源的干细胞缺乏成

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(30872464)

作者简介: 苏志德(1975-),男,主管药师,主要从事医院药学工作, E-mail: 13583623456@163.com

(收稿日期: 2013-03-11 接受日期: 2013-04-14)

脂分化的能力^[6]。造成干细胞的这些不同性质可能与它的来源有关。Feng G 等报道, 正常的纤维环中存在向成软骨细胞、骨细胞、皮肤细胞和神经细胞分化潜能的干细胞^[7]。故有人认为,

髓核干细胞迁移于纤维环^[8]。本文主要关注人类变性椎间盘软骨终板干细胞识别,旨在探索性质的干细胞软骨终板。

表 1 采集标本详细情况

Table 1 Details of samples

Number	Diagnosis	Segment	Modic	Sex	Age
1	Lumbar spondylolisthesis	L4-L5	II	M	40
2	Lumbar spondylolisthesis	L4-L5	I	F	39
3	Lumbar spondylolisthesis	L5-S1	II	M	36
4	Spinal stenosis	L5-S1	II	F	50
5	Vertebral instability	L4-L5	II	F	43
6	Disc source sex lumbago	L5-S1	II	M	46
7	Disc source sex lumbago	L4-L5	I	F	41

1 对象与方法

1.1 实验对象

手术标本 7 组于临床获得,信息详见表格 1。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 软骨终板组织的获取及处理 于解剖显微镜($\times 4$ 倍)下,获取的软骨终板组织,剔除除周围的纤维环、髓核和软骨等组织,清理干净后, PBS 冲洗。后将部分组织放入液氮进行保存,部分组织置入无菌玻璃皿中,加入透明质酸酶和 0.15% II 型胶原酶的消化液,于 5%CO₂ 的孵箱中 37℃ 过夜孵育。

1.2.2 软骨细胞的提取 经消化后的组织加入含有 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养液,终止消化。于 79 μ m 的筛网过滤,收集细胞悬液,200 g 离心 10 分钟。弃去上清,加入改良的 eagle 培养基,重悬细胞,于培养瓶中孵育,每 3 天换液一次。

1.2.3 CESC 的琼脂糖筛选系统 高压灭菌 2%低熔点琼脂糖 (Invitrogen, USA), 置于 37℃。将 2%低熔点琼脂糖与 2 $\times$ DMEM/F12 培养液以 1:1 的体积比混合配制成 1%的底层琼脂,铺于带有 60-mm 网格的培养皿。将 5 $\times 10^4$ 个 P1 细胞重悬,并加入到已铺有底层琼脂的培养皿中,置于 4℃ 放置 15 min,带其凝固后,置于 37℃、含 5%CO₂ 的细胞培养箱中培养,3 天

换液一次。6 周后,将来源于同一标本的细胞集落分别以无菌巴斯德吸管转移到 12 孔板中,单层扩增,将获得的细胞进行体外实验。

1.2.4 CESC 的克隆形成实验 于直径为 10 厘米的细胞培养皿中加入 100 个细胞,在 37℃ 温箱中培养 2 周。结晶紫染色,于显微镜下观察细胞克隆形成情况。

1.2.5 激光共聚焦检测软骨组织中干细胞情况 软骨终板组织行冰冻切片,厚度为 7 μ m。室温下放置 30 min,于冰敷的丙酮中固定 10 min, 风干。石蜡包埋。0.1%胰蛋白酶消化 30 min, PBS 洗后分别滴加一抗 (稀释浓度请见主要试剂), 于 4℃, 过夜。荧光标记的二抗 (FITC) 孵育 1 小时,室温下二胺基苯基吡啶 (4,6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 复染 30 分钟。盖玻片封片,4℃ 避光保存,备共聚焦观察。

1.2.6 细胞免疫表型检测 常规收集生长的 P3CESCs 细胞于培养液中,1000 r/min 离心 5 min, 弃上清。加入 BSA 重悬,于 37℃ 孵育 5 min。避光条件下加入异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 直接标记的单克隆抗体 CD105, CD90, CD73, CD45, D34, CD19, CD14; 37℃ 温箱孵育 1 h。4℃ 避光保存,备流式细胞术检测。

1.3 统计学分析

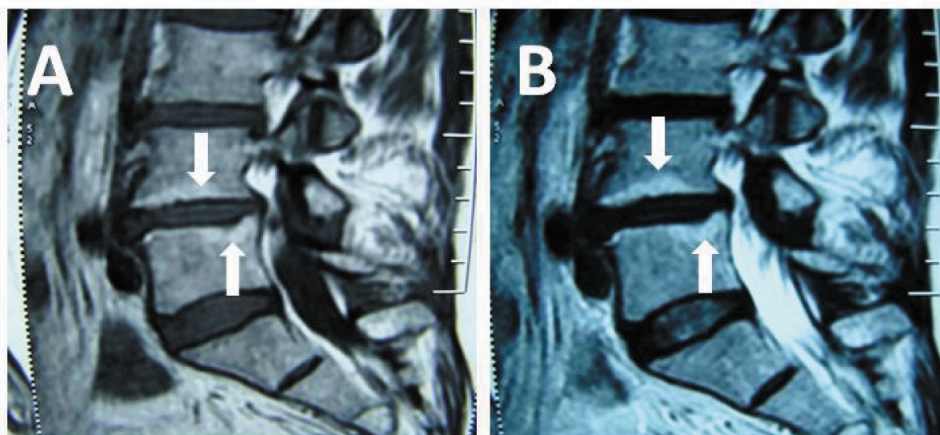


图 1 变性椎间盘软骨终板在 Modic II 型 MRI 表现。A, T1 序列呈现为高信号; B, T2 序列呈现为高信号

Fig.1 Cartilage endplate characteristics of Disc degeneration Modic type II on MRI. A, for the high signal on T1 sequence; B, as well as high signal on T2 sequence

各分组所得计量数据采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{X} \pm S$) 表示,用 SPSS10.0 软件处理数据,两组间均数比较用 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 退变椎间盘软骨终板的特点

退变椎间盘软骨在终板 Modic II 型磁共振(magnetic resonance imaging, MRI)上表现为 T1、T2 序列上高信号 (图 1)。软骨终板组织经过清理后为白色、半透明状。经 HE 染色后,可见均一的细胞外基质中存在类圆形的软骨细胞,且于不同层面分布

(图 2)。

变性椎间盘软骨终板在 Modic II 型 MRI 表现为 T1、T2 序列高信号(图 1)。软骨终板组织清洁后呈白色,半透明的。在 HE 染色后,可见类圆形软骨细胞存在于细胞外基质,分布在不同的层面(图 2)。

2.2 退变椎间盘软骨终板免疫荧光共聚焦检测

软骨终板组织经切片后,干细胞标记 CD73、STRO1、CD105、CD90 部分表达,并且表达这种干细胞标志物的细胞极少,同时我们也可以发现未表达干细胞标志物的细胞存在(图 3)。

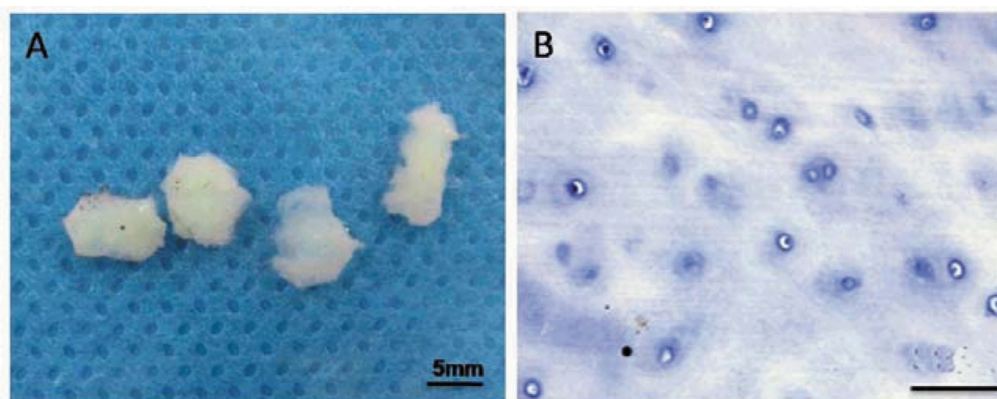


图 2 软骨终板大体及组织学特点。A, 软骨终板大体特点: 半透明状, 呈乳白色; B, HE 染色: 软骨基质均一透明, 在基质中广泛分布着圆形的软骨细胞。标尺 = 50 μ m

Fig.2 Cartilage endplate gross and histological features. A, Under dissecting microscope after clean up the general characteristics, A milky white, translucent; B, HE dyeing hint of uniform transparent cartilage matrix, circular deposition in the matrix and cartilage cells distributed in different levels, and fat tissue exist among them. Scale = 50 μ m

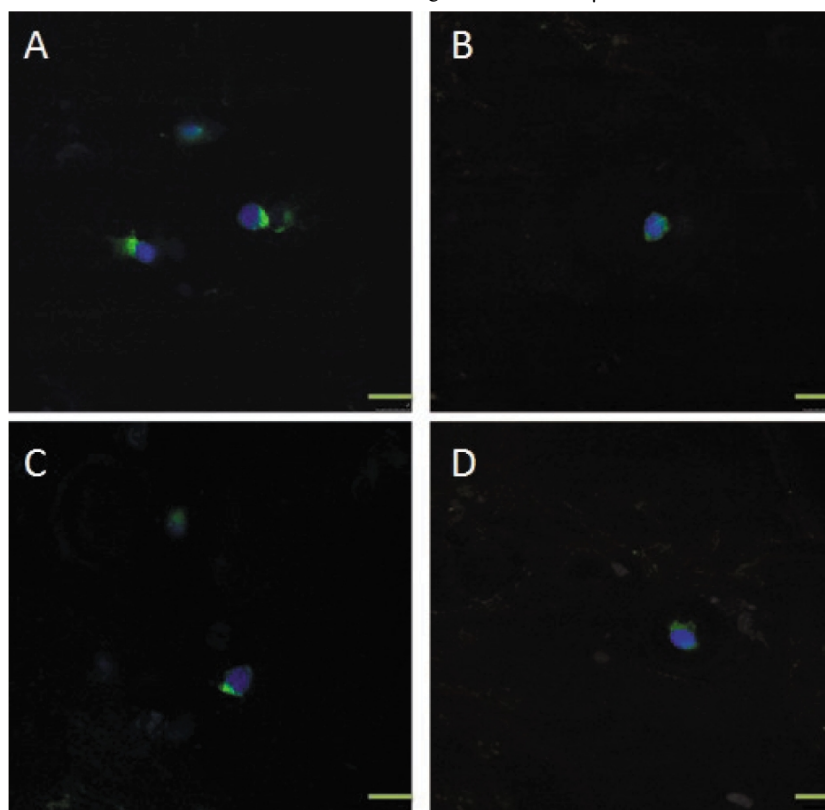


图 3 变性椎间盘软骨终板中部分细胞表达了干细胞抗体。A. 单抗 STRO1 标记; B. 单抗 CD105 标记; C. 单抗 CD73 标记; D. 单抗 CD90 标记。标尺 = 10 μ m

Fig.3 In confocal cartilage endplate, visible cells expressed the stem cell antibodies. A. monoclonal antibody STRO1 tag; B. monoclonal antibody CD105 tag; C. monoclonal antibody CD73 tag; D. monoclonal antibody CD90 tag. Scale = 10 μ m

2.3 琼脂糖三维培养基筛选 CESC_s

用琼脂糖三维培养基筛选可以增殖的细胞克隆团块。软骨终板细胞与琼脂糖均匀混合后,可见软骨细胞以单细胞状态均

匀分布于琼脂糖中(图 4A)。6 周后,可发现部分细胞增殖并形成了直径大于 50 μm 细胞克隆团。但也可发现,部分细胞仍然保持单细胞状态,并还没有发生增殖形成细胞克隆团(图 4B)。

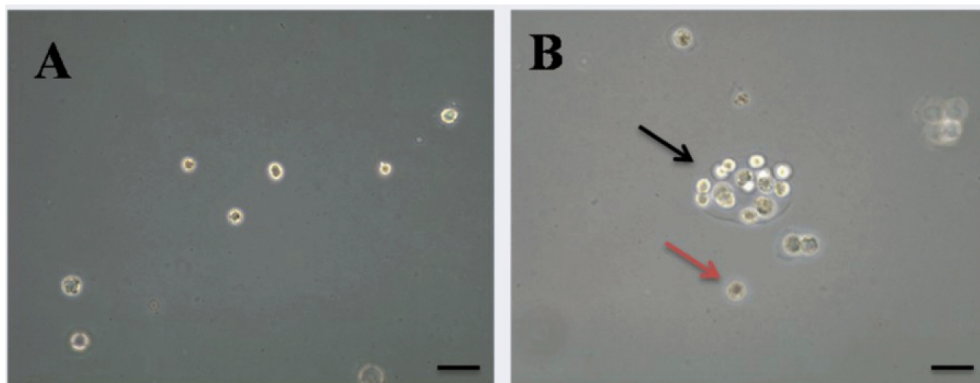


图 4 琼脂糖三维培养基筛选 CESC_s。A, 软骨细胞呈分散单细胞存在于琼脂糖之中。B, 软骨终板细胞在琼脂糖培养基培养 6 周后可见部分细胞增殖并开始形成克隆团(黑色箭头),而部分细胞仍保持单细胞状态,未见明显的增殖特点(棕色箭头)。标尺 = 50 μm

Fig.4 Three-dimensional screening culture medium CESC_s agarose. A, cartilage cells scattered with single-celled exists in agarose. B, cartilage endplate cells cultured in agarose medium 6 weeks after the visible part of the cell proliferation and begin to form clones (black arrow), and a part of the cell remain single, cannot see obvious proliferation characteristics at arrows (brown). Scale = 50 μm

2.4 体外扩增 CESC_s 形态及细胞克隆形成特点

提取出来的细胞克隆团在孔板中培养扩增,可见细胞呈现纤维母细胞样生长,具有为间充质干细胞的特点,并且细胞具

有贴壁性(图 5A)。2 周后发现,部分细胞可以形成细胞克隆团,具有增殖能力(图 5B)。

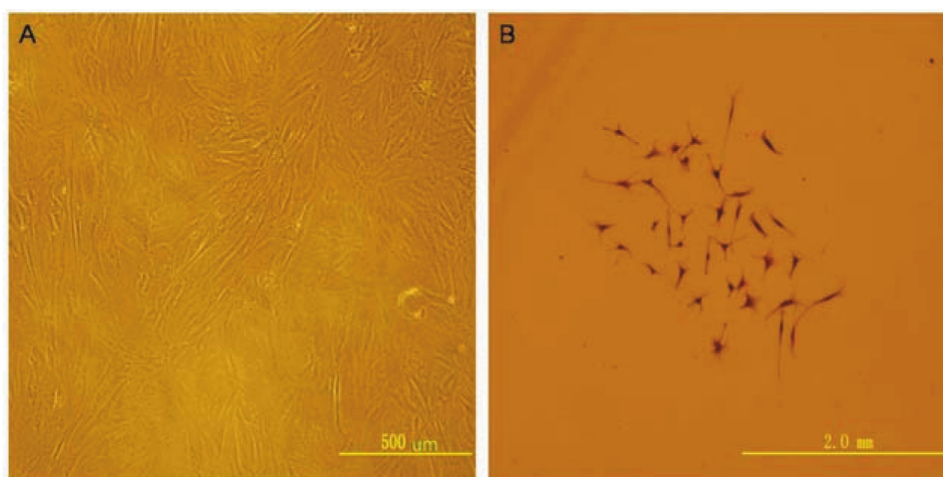


图 5 细胞在体外进行扩增后形态和克隆形成的特点。A, CESC_s 在体外可以贴壁生长具有为间充质干细胞的特点; B, CESC_s 在培养皿中增殖扩增,能形成细胞克隆单位

Fig.5 The cell morphology after amplification, and characteristics during cloning formation *in vitro*. A, CESC_s adherent growth *in vitro*, and the cells are arranged parallel loading A swirl shape, and showed the characteristics of mesenchymal stem cells; B, CESC_s in cells in a petri dish can proliferate amplification and form cell clones

2.5 流式细胞术分析 CESC_s 免疫表型

流式细胞术分析提示 CESC_s 细胞表面 STRO1、CD73、CD90、CD105 为阳性,CD34、CD19、CD14、CD45 和 HLA-DR 为阴性,CD73、CD90、STRO1、CD105 细胞表型表达量分别是 96.10%, 98.01%, 98.04% 和 82.02%,CD105 的表达量比 CD73、CD90、STRO1 表达量低(图 6)。CESC_s 细胞免疫表型的表达量分析详见图 7。

3 讨论

本研究的结果表明,在人类软骨终板变性的椎间盘存在有

多向分化能力的干细胞。而软骨终板中无血管和脂肪组织存在也除外了干细胞其他来源的可能。另外,干细胞表面标志物 STRO-1、CD73、CD105 和 CD90 阳性细胞也来源于终板组织细胞。

琼脂糖三维悬浮培养基特点如下:只有肿瘤和软骨细胞才能在培养基中生存,其他类型细胞在此培养基中均不能存活^[9]。所以,只有真正的干细胞才能被琼脂糖筛选出来的^[10]。在以前的研究中,Thornemo 采用琼脂糖悬浮培养基筛选出关节软骨细胞,后培养了 6 周,得到了具有多向分化能力直径大于 50 μm 的细胞克隆团。同样,我们使用这种培养基,也获得了类似的细

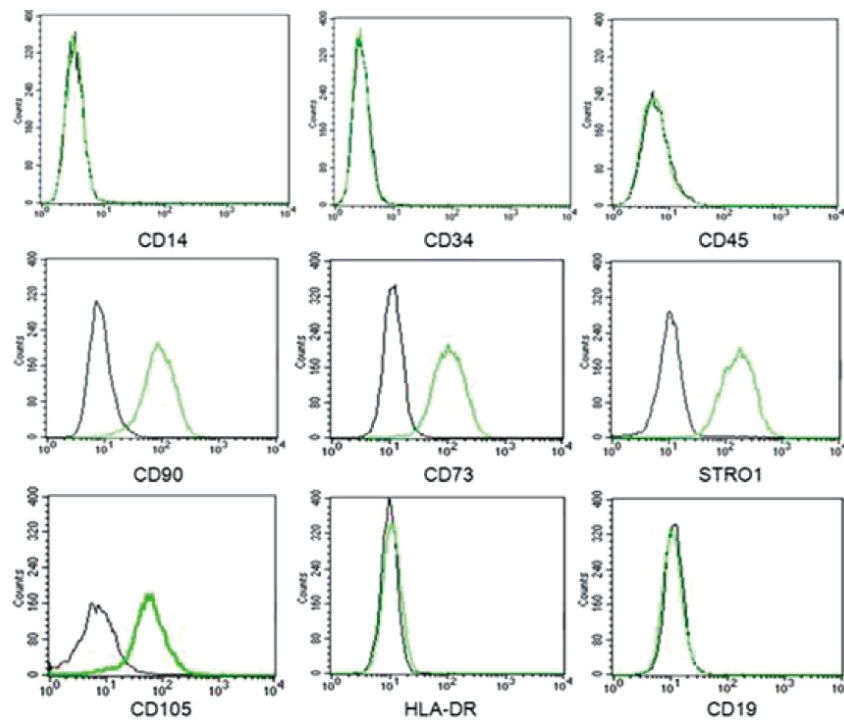


图 6 流式细胞术分析细胞表面干细胞标志物的表达量。可以明显的看出, CESC_s 细胞表面的 CD90、CD73、STRO1、CD105 表达为阳性, 而 CD14、CD19、CD34、CD45 和 HLA-DR 表达量为阴性(<2%)。黑线代表同型对照; 绿色代表阳性细胞。每组包含 7 个样本, n=7

Fig.6 The expression of stem cell surface marker by flow cytometry analysis. As can be seen obviously, CD90, CD73, STRO1 and CD105 on the surface of the CESC_s cells was positive, and CD14, CD19, CD34, CD45 and HLA - DR had negative expression (< 2%). The black thread was the same type control; Green represented positive cells. Each group contained 7 samples, n = 7

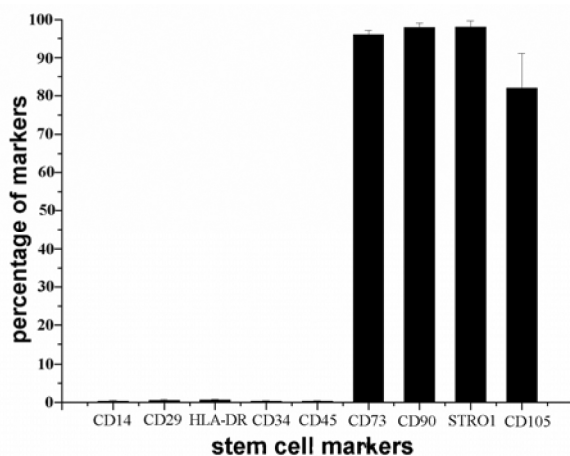


图 7 流式细胞术分析细胞表面干细胞标志物表达量。CD90、CD73、STRO1 的表达量均达到 95% 以上, CD105 表达量略低于 90%, 而 CD14、CD19、CD34、CD45 和 HLA-DR 表达量为阴性(<2%)。n=7

Fig.7 The flow cytometry analysis of Stem cell surface markers. expression levels of CD90, CD73, STRO1 were more than 95%, that of CD105 was slightly lower than 90%, and CD14, CD19, CD34, CD45 and HLA - DR had negative expression (< 2%). N = 7

胞团块^[10]。而我们运用这些分离出来的克隆细胞团进行扩增后进行了克隆形成、流式细胞术等方面的检测。

Sekiya 等报道, 在低细胞密度(<50 cells/cm²)条件下, 只有具有干细胞性质的细胞才能存活, 而其他细胞由于细胞间接触机会减少、细胞增殖速率降低而不能存活^[11]。因此, 我们运用低细胞密度进行克隆形成分析来达到干细胞筛选的目的。实验结

果提示, CESC_s 在这种低密度下可以形成细胞克隆。这说明 CESC_s 具有很强的细胞增殖能力, 其干细胞的特点得到证实。

通过流式细胞术对 CESC_s 细胞免疫表型进行分析。结果提示: STRO-1、CD73 和 CD90 高表达, 而造血干细胞标志物 CD34、单核细胞抗原 CD14、血细胞标志物 CD45、B 细胞标志物 CD19、人类 2 型组织相容性抗原 HLA-DR 表达均为阴性(<2.0%)。值得关注的是, CESC_s 中粘附分子 CD105 表达量较低(82.02%)。其他研究也有表明髓核起源的干细胞的 CD105 表达量也比较低^[12]。同样, CESC_s 也满足国际细胞治疗学会制定的干细胞的标准: 如体外贴壁性、免疫表型等^[13, 14]。

以上结论的得出是与临床密切相关的。该项研究中使用的细胞标记物, 虽适用于标记干细胞的表型, 但此样本群体数量仍然不够。此外, 软骨终板源性干细胞是从退变椎间盘中提取的, 这中可能含有大量炎症因子与细胞因子。这些介质对受损软骨终板中的干细胞的作用尚未不清楚。因此, 正常的人软骨终板中是否存在干细胞, 仍需要在未来的研究中得到阐明。不管如何, 我们成功鉴定出在人变性的椎间盘的软骨终板中存在具有多向分化潜能的干细胞, 但我们仍需通过进一步的研究来理解软骨终板源性干细胞的特性, 并确定它们是否与骨髓间充质干细胞是否相关。

参考文献(References)

- [1] Andersson GB. Epidemiological features of chronic low-back pain[J]. Lancet, 1999, 354: 581-585
- [2] Freemont AJ. The cellular pathobiology of the degenerate intervertebral disc and discogenic back pain[J]. Rheumatology, 2009, 48: 5-10
- [3] Freemont AJ, Watkins A, Le Maitre C, et al. Current understanding of

- cellular and molecular events in intervertebral disc degeneration: implications for therapy[J]. *J Pathol*, 2002, 196: 374-379
- [4] Yasuma T, Koh S, Okamura T, et al. Histological changes in aging lumbar intervertebral discs. Their role in protrusions and prolapses [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 1990, 72(2): 220-229
- [5] Risbud MV, Guttapalli A, Tsai TT. Evidence for skeletal progenitor cells in the degenerate human intervertebral disc [J]. *Spine*, 2007, 32(23): 2537-2544
- [6] 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*, 2010, 35(26): 2259-2265
- [7] Feng G, Yang X, Shang H, et al. Multipotential differentiation of human annulus fibrosus cells: an in vitro study[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2010, 92(3): 675-685
- [8] Henriksson HB, Thornemo 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: 2278-2287
- [9] Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels[J]. *Cell*, 1982, 30: 215-224
- [10] Thornemo M, Tallheden T, Sjogren JE, et al. Clonal populations of chondrocytes with progenitor properties identified within human articular cartilage[J]. *Cells Tissues Organs*, 2005, 180: 141-150
- [11] 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: 530-541
- [12] 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*, 2010, 35: 2259-2265
- [13] Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation[J]. *Arthritis Res Ther*, 2007, 9: 204-214
- [14] Dominici M, Le BK, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. *Cytotherapy*, 2006, 8: 315-317

(上接第 623 页)

- [11] Welz PS, Wullaert A, Vlantis K, et al. FADD prevents RIP3-mediated epithelial cell necrosis and chronic intestinal inflammation [J]. *Nature*, 2011, 477(7364): 330-334
- [12] Shen S N, Wang L F, Jia Y F, et al. Upregulation of microRNA-224 is associated with aggressive progression and poor prognosis in human cervical cancer[J]. *Diagn Pathol*, 2013, 8: 69
- [13] Zhang Y, Takahashi S, Tasaka A, et al. Involvement of microRNA-224 in cell proliferation, migration, invasion, and anti-apoptosis in hepatocellular carcinoma [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2013, 28(3): 565-575
- [14] Wang Y, Lee C G. Role of miR-224 in hepatocellular carcinoma: a tool for possible therapeutic intervention?[J]. *Epigenomics*, 2011, 3(2): 235-243
- [15] Santhekadur PK, Das SK, Gredler R, et al. Multifunction protein Staphylococcal Nuclease Domain Containing-1 (SND1) promotes tumor angiogenesis in human hepatocellular carcinoma through a novel pathway that involves Nuclear Factor κ B and miR-221[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(17): 13952-13958
- [16] Ray S S, Pal J K, Pal S K. Computational approaches for identifying cancer miRNA expressions[J]. *Gene Expr*, 2012, 15(5-6): 243-253
- [17] Shih TC, Tien YJ, Wen CJ, et al. MicroRNA-214 down regulation contributes to tumor angiogenesis by inducing secretion of the hepatoma-derived growth factor in human hepatoma [J]. *J Hepatol*, 2012, 57(3): 584-591
- [18] Wang R, Zhao N, Li S, et al. MicroRNA-195 suppresses angiogenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma by inhibiting the expression of VEGF, VAV2 and CDC42[J]. *Hepatology*, 2013, 58(2): 642-653
- [19] Li D, Liu X, Lin L, et al. MicroRNA-99a inhibits hepatocellular carcinoma growth and correlates with prognosis of patients with hepatocellular carcinoma[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(42): 36677-36685
- [20] He XX, Chang Y, Meng FY, et al. microRNA-375 targets AEG-1 in hepatocellular carcinoma and suppresses liver cancer cell growth in vitro and in vivo[J]. *Oncogene*, 2012, 31(28): 3357-3369