DOI:10.16016/j.1000-5404.201511117

血管内皮生长因子与转化生长因子的协同作用诱导兔骨髓间充质干细胞分化

刘汝银[1*],岳宗进[1*],彭晓艳[2],王新立[1],冯仲锴[1] (450002 郑州,河南省中医院:脊柱科[1],护理部[2])

[摘要] **目的** 研究血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)和转化生长因子(transforming growth factor-β1,TGF-β1)的协同作用对兔骨髓间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cells,BMSCs)成骨分化的影响及其可能机制。**方法** 将细胞分为4组:对照组、腺相关病毒(adeno-associated virus,AAV)-VEGF组、AAV-TGF-β1组和VEGF+TGF-β1组。穿刺法抽取兔骨髓液,分离培养原代BMSCs,分别构建AAV-VEGF和AAV-TGF-β1腺病毒载体转染BMSCs,Western blot检测各组细胞中VEGF、TGF-β1的蛋白表达。流式细胞术检测细胞凋亡情况,CCK8法检测细胞增殖能力,Western blot检测髓核细胞标志SOX-9、Ⅱ型胶原和蛋白聚糖的表达,以及P38MAPK信号通路相关蛋白P38、MAPKAPK2和HSP27的表达。加入P38MAPK的特异阻滞剂SB203580预处理BMSCs,检测VEGF和TGF-β1对BMSCs增殖、凋亡、分化及相关蛋白表达的影响。**结果** VEGF和TGF-β1可通过调节P38MAPK信号通路抑制BMSCs凋亡,促进BMSCs增殖,并向类髓核细胞分化,且在其协同作用下效果显著。抑制P38MAPK信号通路可反转VEGF和TGF-β1对BMSCs增殖分化能力的促进作用。**结论** VEGF和TGF-β1的协同作用能增强BMSCs增殖和分化的能力,提高胶原蛋白和蛋白聚糖等细胞外基质的表达,从而促进退变椎间盘的修复和再生。

[关键词] 血管内皮生长因子;转化生长因子;骨髓间充质干细胞;椎间盘退变

[中图法分类号] R329.24; R331.22; R341 [文献标志码] A

Synergistic effect of VEGF and TGF-β1 in osteogenic differentiation of rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells

Liu Ruyin[1], Yue Zongjin[1], Peng Xiaoyan[2], Wang Xinli[1], Feng Zhongkai[1] ([1]Department of Spine, [2]Department of Nursing, Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan Province, 450002, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the synergistic effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) and transforming growth factor-β1 (TGF-β1) on osteogenic differentiation of rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) and its possible mechanisms. **Methods** Cells were divided into 4 groups, i.e. control, adeno-associated virus (AAV)-VEGF group, AAV-TGF-β1 group and VEGF+TGF-β1 group. The bone marrow was extracted from rabbit femoral trochanter by puncturing and BMSCs were isolated. Primary-cultured BMSCs were transfected with AAV-VEGF and AAV-TGF-β1 adenoviral vectors, respectively. The protein levels of VEGF and TGF-β1 were measured by Western blotting. Cell apoptosis was detected by flow cytometry and cell proliferation was measured by CCK-8 assay. The expression of nucleus pulposus cell marker proteins (SOX-9, Collagen Ⅱ and Aggrecan) and P38MAPK signaling pathway-related proteins (P38, MAPKAPK and HSP27) were measured by Western blotting. BMSCs were pretreated with SB203580, a specific P38MAPK inhibitor. The effects of VEGF and TGF-β1 on the proliferation, apoptosis,

* 同等贡献者

[通信作者] 岳宗进, E-mail: s_yanbing@126.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160322.1459.009.html(2016-03-22)

differentiation of treated BMSCs and associated protein expressions were measured. **Results** VEGF or TGF-β1 inhibited BMSCs apoptosis, increased BMSCs proliferation and promoted their differentiation to nucleus pulposus-like cells through P38MAPK signaling pathway. Moreover, these effects were reinforced by synergistic action of VEGF and TGF-β1. Inhibiting P38MAPK pathway reversed the accelerating effect of VEGF and TGF-β1 on the proliferation and differentiation of BMSCs. **Conclusion** VEGF and TGF-β1 synergistically enhance BMSCs proliferation and differentiation, elevate the expression of extracellular matrix including collagen and proteoglycan, and thus promote the repair and regeneration of degenerative intervertebral discs.

[**Key words**] vascular endothelial growth factor; transforming growth factor-β1; bone marrow-derived mesenchymal stem cells; degeneration of intervertebral disc

Corresponding author: Yue ZongJin, E-mail: s_yanbing@126.com

椎间盘退变疾病与椎间盘结构崩塌和功能失调有关。近年研究报道全球有超过6亿人患有椎间盘退变疾病,严重影响患者的工作和生活[1],但其发病机制尚不完全明确。一般认为椎间盘退变疾病起自椎间盘内层髓核中的细胞外基质(extracellular matrix,ECM)的合成与降解失衡,主要表现为ECM含量降低、活细胞减少和促炎因子分泌增多[2-3]。目前,活性物质注射、基因治疗和细胞移植是椎间盘退变疾病治疗最有前景的三个领域[4-5]。研究报道骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem,BMSCs)能被诱导向中胚层细胞分化,发挥抗凋亡和抗炎的作用[6],添加外源性细胞因子或基因能诱导其分化为类髓核细胞(nucleus pulposus cells,NPCs),并发挥髓核细胞的生物功能[7]。人血管内皮素生长因子(humanvascular endothelial growth factor,hVEGF)和转化生长因子(transforming growth factor-β1,TGF-β1)具有协同作用,可增加退行性椎间盘中纤维环细胞Ⅰ型胶原的表达。在模拟微重力环境下,TGF-β1能提高BMSCs合成蛋白聚糖和Ⅱ型胶原的能力,诱导BMSCs向NPCs分化[8]。细胞内的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)能通过转录因子的调节控制BMSCs的分化[9]。但目前关于VEGF和TGF-β1的协同作用对BMSCs分化的影响尚少见报道。本研究以兔BMSCs为细胞载体,转染腺相关病毒(adeno-associated virus,AAV)-VEGF和AAV-TGF-β1腺病毒载体,探讨VEGF和TGF-β1的协同作用对BMSCs增殖、分化的影响及其可能的机制,以期为椎间盘退变性疾病的细胞移植治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及材料

3周龄健康清洁级新西兰大白兔,雄性,体质量1.2~1.8 kg,购于浙江大学医学实验动物中心。胎牛血清购于杭州四季青公司,DMEM/F12培养基购于HyClone公司,腺病毒载体AAV-pSNAV购自上海生工公司,pcDNA3(+)-VEGF和pcDNA3(+)-TGF-β1原核表达质粒由本实验室保存,CCK8试剂盒购于Sigma公司,鼠抗人VEGF、TGF-β1、SOX-9、Collagen Ⅱ、Aggrecan、P38、MAPKAPK2、HSP27和β-actin一抗及HRP标记的羊抗鼠二抗购于北京博奥生物技术有限公司,SB203580购于广州威佳科技有限公司,荧光倒置显微镜购于英国Andor公司,CO_2培养箱购于美国Thermo公司,凝胶成像仪购于美国Bio-rad公司。

1.2 BMSCs的分离培养

大白兔麻醉后于双侧股骨转子部位脱毛,16号骨髓穿刺针在股骨转子处抽取5 mL左右的骨髓液,1 000 r/min离心5 min后收集沉淀,PBS溶液清洗2次,用含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基稀释细胞至1×10^6/mL,并立即接入细胞培养瓶,于37℃,5% CO_2饱和湿度的条件下培养。48 h后半量换液,待细胞长至90%左右按1∶3的比例传代,以后每3天进行1次全量换液,倒置显微镜观察各组细胞形态,第3代细胞用于对照和转染实验。

1.3 AAV-VEGF和AAV-TGF-β1腺病毒载体的构建和转染及分组处理

AAV-VEGF腺病毒载体的构建:以包含VEGF全序列的pcDNA3(+)-VEGF质粒为模板扩增,上游引物:5′-ATCGGAATTCATGAACTTTCGCTG-3′,下游引物:5′-ATCTGTCGACTCACCGCCTCGGCTT-3′,PCR扩增得到带有*Eco*RⅠ和*Sal*Ⅰ酶切位点的DNA片段,用*Eco*RⅠ和*Sal*Ⅰ同步双酶切PCR产物和腺病毒载体AAV-pSNAV,连T载转化感受态细胞DH5α,单克隆测序得到的含VEGF基因的腺病毒表达载体AAV-

VEGF。AAV-TGF-β1 腺病毒载体的构建按照与 AAV-VEGF 相同的方法进行。取第 3 代生长良好的 BMSCs,5×10^4/孔铺 96 孔板,镜检细胞铺满 70% 左右时,将细胞分为 4 组:对照组:单独转染腺病毒空载体;AAV-VEGF 组:单独转染 AAV-VEGF 腺病毒表达载体;AAV-TGF-β1 组:单独转染 AAV-TGF-β1 腺病毒表达载体;VEGF + TGF-β1 组:同时转染 AAV-VEGF 和 AAV-TGF-β1 腺病毒表达载体。转染腺病毒载体后的各组细胞,培养 72 h 后,倒置显微镜观察细胞形态。

1.4 Western blot 检测蛋白表达

收集各组 BMSCs,加入 0.25% 胰蛋白酶消化后,用 PBS 缓冲液清洗细胞 3 次。加入 65 μL RIPA 细胞蛋白裂解液,SDS-PAGE 电泳分离蛋白。电泳结束后转膜,再用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入稀释 1 000 倍的鼠抗人 VEGF、TGF-β1、SOX-9、Collagen Ⅱ、Aggrecan、SOX-9、Collagen Ⅱ、Aggrecan、P38、MAPKAPK2、HSP27 和 β-actin 一抗,4 ℃轻摇过夜,加入稀释 5 000 倍的 HRP 标记的羊抗鼠二抗,室温孵育 1 h。X 线片曝光分析,结果用 Image-Pro Plus 处理,以目的蛋白与内参 β-actin 的灰度值比值表示蛋白的相对表达量。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡

取培养 48 h 后的各组 BMSCs,用 4 ℃预冷的 PBS 洗涤 2 次,加入 0.25% 胰酶消化,收集后迅速加入 0.5 mL 1 × Annexin V 结合缓冲液,低速离心后弃上清,另加结合缓冲液 10 μL 和 PI 5 μL 并混匀,于 37 ℃避光孵育 30 min。在流式细胞仪上设置激发波长 488 nm 和发射波长 530 nm,检测细胞凋亡率。

1.6 CCK8 检测细胞增殖

转染腺病毒 48 h 后,收集细胞,1×10^4/孔铺 96 孔板,置于细胞培养箱培养 0、24、48、72、96、120 h 后,分别加入 10 μL CCK8 试剂,37 ℃继续孵育 2 h,用酶标仪检测 450 nm 处光密度值[$D(450)$],每组设 3 个复孔,重复 3 次测量,计算细胞增殖倍数,做增殖曲线。

1.7 SB203580 处理 BMSCs

用 P38MAPK 的特异阻滞剂 SB203580 处理第 3 代生长良好的 BMSCs 细胞,分为 4 组:对照组:单独转染腺病毒空载体;VEGF + TGF-β1 组:同时转染 AAV-VEGF 和 AAV-TGF-β1 质粒;SB203580 组:抑制剂 SB203580 用 DMSO 溶解后,加入培养基稀释至 10 μmol/L 预干预细胞 1 h 后,在 DMEM/F12 培养基中培养;VEGF + TGF-β1 + SB 组:用 10 μmol/LSB203580 干预细胞 1 h 后,转染 AAV-VEGF 和 AAV-TGF-β1 腺病毒载体到抑制剂干预后的细胞中。每组设置 3 个复孔,每 3 天换 1 次液,收集各组细胞按照前面的方法研究各组细胞的增殖,凋亡及蛋白表达情况。

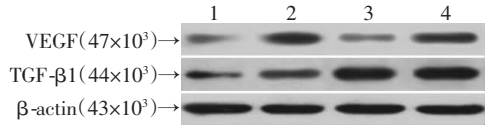
1.8 统计学分析

采用 SPSS13.0 统计软件,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,行单因素方差分析,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 腺病毒载体 AAV-VEGF 和 AAV-TGF-β1 的转染情况

第 3 代 BMSCs 细胞被腺病毒载体 AAV-VEGF 和 AAV-TGF-β1 分别单独转染和共转染后,继续培养 48 h,分别提取总蛋白。Western blot 分析显示,与对照组相比,VEGF 在 AAV-VEGF 组和 VEGF + TGF-β1 组的表达显著升高($P<0.05$),在 AAV-TGF-β1 组中无显著变化,TGF-β1 的表达在 AAV-TGF-β1 组和 VEGF + TGF-β1 组中显著升高($P<0.05$),在 AAV-VEGF 组中无明显变化(图 1)。



1:对照组;2:AAV-VEGF 组;3:AAV-TGF-β1 组;4:VEGF + TGF-β1 组

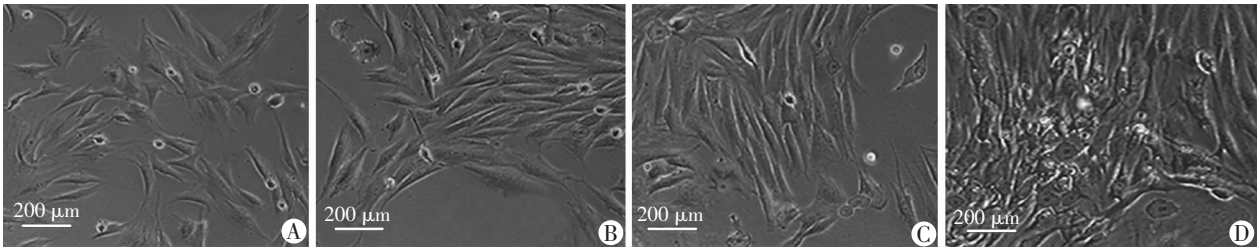
图 1 Western blot 检测 BMSCs 中 VEGF 和 TGF-β1 的蛋白表达水平比较

2.2 AAV-VEGF 和 AAV-TGF-β1 诱导分化后对 BMSCs 细胞形态的影响

在倒置显微镜下观察各组细胞形态,未转染腺病毒表达载体的兔骨髓间充质干细胞多为长梭形,少数为多角形。单独转染 AAV-VEGF 和 AAV-TGF-β1 的 BMSCs 细胞密度增加,且少部分细胞由长梭形回缩成类圆形、圆形及不规则形态,在细胞内的中央位置可观察到清晰的细胞核。这种现象在 AAV-VEGF 和 AAV-TGF-β1 共转染的 BMSCs 细胞中更加明显,细胞密集生长并能观察到大量的圆形或类圆形细胞聚集。从对照组到单独转染、共转染 VEGF + TGF-β1 组,细胞质颜色逐渐加深,分化细胞显著增加(图 2)。

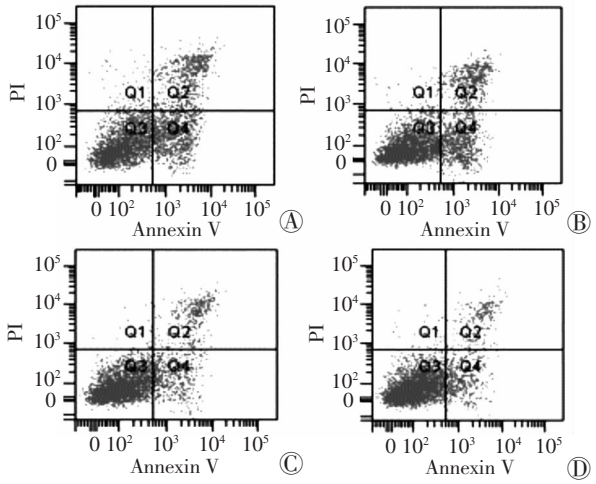
2.3 AAV-VEGF 和 AAV-TGF-β1 对 BMSCs 细胞凋亡的影响

流式细胞术检测 BMSCs 细胞凋亡情况,与对照组比较,单独转染 AAV-VEGF 和 AAV-TGF-β1 的 BMSCs 细胞凋亡减少($P<0.05$),VEGF + TGF-β1 组的 BMSCs 细胞凋亡较单独转染组显著降低($P<0.01$,图 3)。



A:对照组;B:AAV-VEGF 组;C:AAV-TGF-β1 组;D:VEGF + TGF-β1 组

图 2 倒置显微镜观察各组 BMSCs 细胞形态

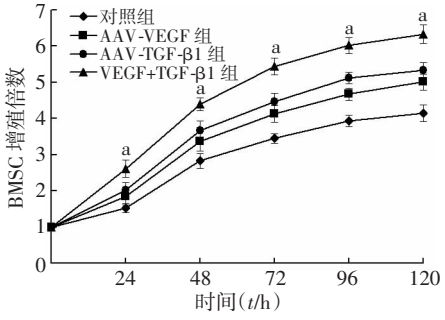


A:对照组;B:AAV-VEGF 组;C:AAV-TGF-β1 组;4:VEGF + TGF-β1 组

图 3 流式细胞术检测 AAV-VEGF 和 AAV-TGF-β1 对 BMSCs 细胞凋亡的影响

2.4 AAV-VEGF 和 AAV-TGF-β1 对 BMSCs 细胞增殖的影响

CCK8 检测细胞增殖情况显示,与对照组相比,AAV-VEGF 组、AAV-TGF-β1 组和 VEGF + TGF-β1 组细胞增殖能力均显著升高($P<0.05$);共转染 AAV-VEGF 和 AAV-TGF-β1 质粒的细胞比单独转染 AAV-VEGF 和 AAV-TGF-β1 的细胞增殖能力明显提高($P<0.05$,图 4)。

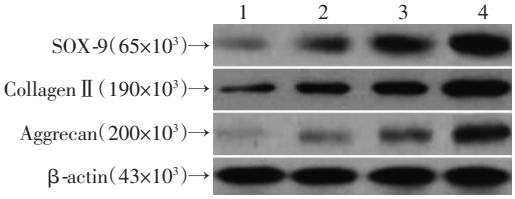


a:$P<0.05$,与其余 3 组比较

图 4 AAV-VEGF 和 AAV-TGF-β1 对 BMSCs 细胞增殖的影响

2.5 AAV-VEGF 和 AAV-TGF-β1 对 BMSCs 细胞成骨分化的影响

Western blot 结果表明,与对照组相比,SOX-9、Ⅱ型胶原和蛋白聚糖的表达在 AAV-VEGF 组和 AAV-TGF-β1 组有所增加,VEGF + TGF-β1 组表达显著升高($P<0.01$),VEGF + TGF-β1 组表达明显高于 AAV-VEGF 组和 AAV-TGF-β1 组($P<0.05$,图 5)。

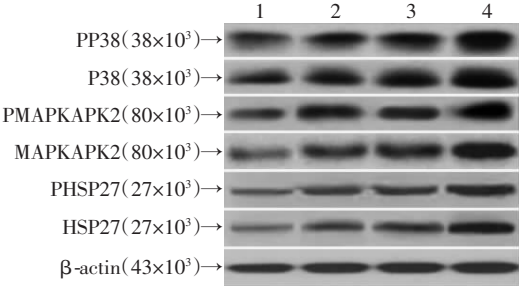


1:对照组;2:AAV-VEGF 组;3:AAV-TGF-β1 组;4:VEGF + TGF-β1 组

图 5 Western blot 检测 AAV-VEGF 和 AAV-TGF-β1 对 BMSCs 细胞成骨分化的影响

2.6 AAV-VEGF 和 AAV-TGF-β1 对 BMSCs 细胞 P38 MAPK 信号通路的调节

Western blot 检测结果表明,与对照组相比,P38、MAPKAPK2 和 HSP27 蛋白在 AAV-VEGF 组和 AAV-TGF-β1 组表达有所增加,VEGF + TGF-β1 组表达明显提高($P<0.01$),且明显高于 AAV-VEGF 组和 AAV-TGF-β1 组($P<0.05$,图 6)。

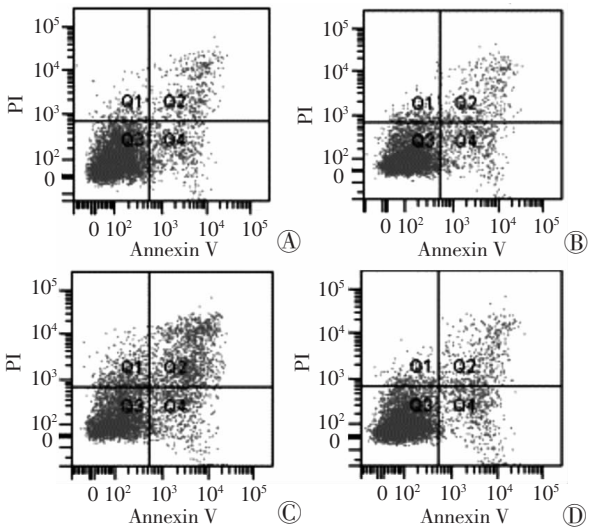


1:对照组;2:AAV-VEGF 组;3:AAV-TGF-β1 组;4:VEGF + TGF-β1 组

图 6 Western blot 检测 AAV-VEGF 和 AAV-TGF-β1 对 BMSCs 细胞 P38 MAPK 信号通路的调节

2.7　SB203580 干扰 AAV-VEGF 和 AAV-TGF-β1 对 BMSCs 细胞凋亡的影响

流式细胞术检测显示,与 VEGF + TGF-β1 + SB 组相比,VEGF + TGF-β1 组细胞凋亡明显降低($P<0.05$),而 SB203580 组细胞凋亡显著增加($P<0.05$)(图 7)。

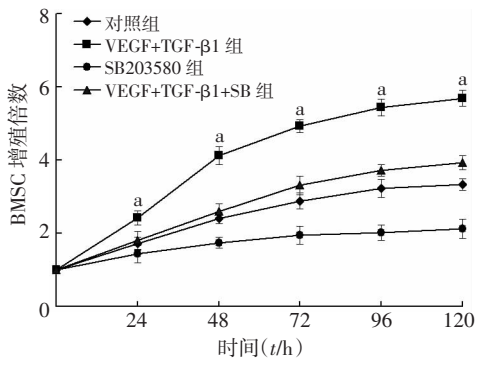


A:对照组;B:VEGF + TGF-β1 组;C:SB203580 组;D:VEGF + TGF-β1 + SB 组

图 7　流式细胞术检测 SB203580 干扰 AAV-VEGF 和 AAV-TGF-β1 转染对 BMSCs 细胞的影响

2.8　SB203580 干扰 AAV-VEGF 和 AAV-TGF-β1 对 BMSCs 细胞增殖的影响

CCK8 检测 BMSCs 细胞的增殖情况发现,与 VEGF + TGF-β1 + SB 组相比,VEGF + TGF-β1 组细胞增殖增加($P<0.05$),而 SB203580 组细胞增殖降低($P<0.05$)(图 8)。

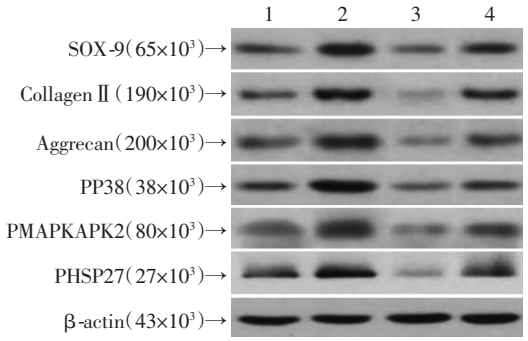


a:$P<0.05$,与 VEGF + TGF-β1 + SB 组比较

图 8　SB203580 干扰 AAV-VEGF 和 AAV-TGF-β1 转染对 BMSCs 细胞增殖的影响

2.9　SB203580 干扰 AAV-VEGF 和 AAV-TGF-β1 对软骨形成标志物及通路蛋白表达的影响

Western blot 检测软骨形成标志物 SOX-9、Ⅱ型胶原和蛋白聚糖的表达,以及 PP38、PMAPKAPK2 和 PHSP27 的表达显示,与 VEGF + TGF-β1 + SB 组相比,VEGF + TGF-β1 组蛋白表达明显提高($P<0.05$),而 SB203580 组蛋白表达显著降低($P<0.05$,图 9)。



1:对照组;2:VEGF + TGF-β1 组;3:SB203580 组;4:VEGF + TGF-β1 + SB 组

图 9　Western blot 检测 SB203580 干扰 AAV-VEGF 和 AAV-TGF-β1 对软骨形成标志物及通路蛋白表达的影响

3　讨论

椎间盘退变是一种伴随着下腰痛的慢性且复杂的病理过程[4]。据报道,椎间盘退变从髓核开始并以髓核细胞减少为典型特征[10],因此恢复椎间盘细胞的数量和功能成为治疗椎间盘退变疾病的关键[11]。BMSCs 具有多向分化的潜能,能增殖分化为类髓核细胞,并具有合成 ECM 的功能,可促进椎间盘的修复和再生[12],因此促进 BMSCs 向髓核细胞分化已成为治疗脊柱退变疾病的研究热点。

TGF-β1 是椎间盘维持和退化过程中的关键因子,该蛋白由一系列多肽组成,被认为是与胶原代谢关系最密切的蛋白之一[13]。TGF-β1 不仅调节胶原蛋白和蛋白聚糖的合成,也影响椎间盘细胞的新陈代谢[14]。VEGF 被报道能引起椎间盘组织中新血管的生成,在椎间盘突出的重吸收中发挥作用[15]。本实验结果表明,AAV-VEGF 和 AAV-TGF-β1 能促进 BMSCs 增殖且促进其分化为类髓核细胞,并且,在 AAV-VEGF 和 AAV-TGF-β1 的共转染组中效果更显著,说明 VEGF 与 TGF-β1 可能参与椎间盘退变的修复和再生。

Ⅱ型胶原和蛋白聚糖是 ECM 的主要组成部分,也是椎间盘退变的典型标志物[16]。Ⅱ型胶原主要位于纤维环和髓核细胞内层,维持含水量和承受压力[17]。蛋白聚糖能保持椎间盘的渗透性、高度和抗压缩能力[18]。研究表明,SOX-9 在椎间盘再生中起着关键作用。在软骨形成中,SOX-9 是Ⅱ型胶原的增强子。腺

病毒介导的 SOX-9 转染椎间盘细胞后,细胞增殖增加,Ⅱ型胶原和蛋白聚糖的合成也随之上调[19]。且添加生长因子,如 LMP1[20]、IGF-1[21]、GDF-5[22]等能刺激 SOX-9、Ⅱ型胶原和蛋白聚糖的过表达从而修复椎间盘。本研究中,转染腺病毒包装的 VEGF 和 TGF-β1 能上调 SOX-9、Ⅱ型胶原和蛋白聚糖的表达,与前述研究结果相同,且 VEGF 和 TGF-β1 的协同作用能显著提高 3 种标志蛋白的表达,提示该协同作用可能在退变的椎间盘修复和再生中发挥重要作用。

据报道,P38MAPK 信号通路通过改变椎间盘中合成代谢基因和抗分解代谢基因的表达,影响蛋白多糖的降解,在调节椎间盘中基质的合成与降解起着关键作用[23-24]。P38MAPK 信号通路的激活依赖于 TGF-β 诱导的蛋白聚糖的表达[25]。本实验发现 VEGF 和 TGF-β1 的协同作用能显著上调 P38MAPK 信号通路中 P38、MAPKAPK2 和 HSP27 的表达,提示 VEGF 和 TGF-β1 的协同作用可能通过调节 P38MAPK 信号通路从而对退变的椎间盘进行修复和再生。进一步用 P38MAPK 的特异阻滞剂 SB203580 处理 BMSCs,能反转 VEGF 和 TGF-β1 的协同作用对 BMSCs 增殖、分化及相关蛋白表达的调节,反向证实了 VEGF 和 TGF-β1 是通过增加 P38MAPK 通路蛋白的表达影响 BMSCs 的增殖和分化。

综上所述,本研究证实 VEGF 和 TGF-β1 可通过调节 P38MAPK 信号通路诱导 BMSCs 的增殖并向髓核细胞分化,且 VEGF 和 TGF-β1 的协同作用可以更显著增强 BMSCs 增殖和分化的能力,促进胶原蛋白和蛋白聚糖等 ECM 的表达,从而促进退行性脊柱的修复和再生。本研究仅在细胞水平探讨了 VEGF 和 TGF-β1 的协同作用促进 BMSCs 向髓核细胞分化的作用,仍需在体内试验中进一步验证 VEGF 和 TGF-β1 的协同效果。下一步研究计划建立椎间盘退变的动物模型,先预实验探索最适的包装载体和转染方法,以减少对动物的毒性伤害和副作用,再检测各项指标,分析共转染 VEGF 和 TGF-β1 对椎间盘退变动物模型的修复效果。

参考文献:

[1] Sakai D, Grad S. Advancing the cellular and molecular therapy for intervertebral disc disease[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2015, 84:159-171. DOI: 10.1016/j.addr.2014.06.009

[2] Smith L J, Nerurkar N L, Choi K S, *et al*. Degeneration and regeneration of the intervertebral disc: lessons from development[J]. Dis Model Mech, 2011, 4(1): 31-41. DOI: 10.1016/dmm.006403

[3] Seki S, Tsumaki N, Motomura H, *et al*. Cartilage intermediate layer protein promotes lumbar disc degeneration[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 446(4): 876-881. DOI: 10.1242/j.bbrc.2014.03.025

[4] Wang S Z, Rui Y F, Lu J, *et al*. Cell and molecular biology of intervertebral disc degeneration: current understanding and implications for potential therapeutic strategies[J]. Cell Prolif, 2014, 47(5): 381-390. DOI: 10.1111/cpr.12121

[5] 周栩, 权正学, 罗小辑, 等. Id1 基因在 BMP-2 维持椎间盘细胞软骨特性中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(20):2011-2016. DOI:10.16016/j.1000-5404.201502101

[6] Dasari V R, Veeravalli K K, Dinh D H. Mesenchymal stem cells in the treatment of spinal cord injuries: A review[J]. World J Stem Cells, 2014, 6(2): 120-133. DOI: 10.4252/wjsc.v6.i2.120

[7] Cao C, Zou J, Liu X, *et al*. Bone marrow mesenchymal stem cells slow intervertebral disc degeneration through the NF-κB pathway[J]. Spine J, 2015, 15(3): 530-538. DOI: 10.1016/j.spinee.2014.11.021

[8] Yang H, Cao C, Wu C, *et al*. TGF-βl Suppresses Inflammation in Cell Therapy for Intervertebral Disc Degeneration[J]. Sci Rep, 2015, 5:13254. DOI: 10.1038/srep13254

[9] Liu Y, Berendsen A D, Jia S, *et al*. Intracellular VEGF regulates the balance between osteoblast and adipocyte differentiation[J]. J Clin Invest, 2012, 122(9): 3101-3113. DOI: 10.1172/JCI61209

[10] Smith L J, Gorth D J, Showalter B L, *et al*. In vitro characterization of a stem-cell-seeded triple-interpenetrating-network hydrogel for functional regeneration of the nucleus pulposus[J]. Tissue Eng Part A, 2014, 20(13/14): 1841-1849. DOI: 10.1089/ten.TEA.2013.0516

[11] Freemont A, 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(4): 374-379. DOI: 10.1002/path.1050

[12] Skovrlj B, Qureshi S, Singh K. Mesenchymal stem cells for intervertebral disc repair and regeneration[J]. Seminars in Spine Surgery, 2015, 27(2):76-81. DOI:10.1053/j.semss.2015.03.002

[13] 李锐冬, 邓忠良, 张亚梅, 等. 不同剂量 TGF-β1 在 BMP9 诱导间充质干细胞成骨分化中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(2): 98-104. DOI: 10.16016/j.1000-5404.2014.02.002

[14] Setton L A, Chen J. Mechanobiology of the intervertebral disc and relevance to disc degeneration[J]. J Bone Joint Surg Am, 2006, 88(Suppl 2): 52-57. DOI:10.2106/JBJS.F.00001

[15] Haro H, Kato T, Komori H, *et al*. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced angiogenesis in herniated disc resorption[J]. J Orthop Res, 2002, 20(3): 409 – 415. DOI:10.1016/S0736-0266(01)00150-4

[16] Qing C, Wei-ding C, Wei-min F. Co-culture of chondrocytes and bone marrow mesenchymal stem cells in vitro enhances the expression of cartilaginous extracellular matrix components[J]. Braz J Med Biol Res, 2011, 44(4): 303 – 310. DOI: 10.1590/S0100-879X2011007500026

[17] Ahsan R, Tajima N, Chosa E, *et al*. Biochemical and morphological changes in herniated human intervertebral disc [J]. J Orthop Sci, 2001, 6(6): 510 – 518. DOI: 10.1007/s007760100006

[18] Sivan S S, Wachtel E, Roughley P. Structure, function, aging and turnover of aggrecan in the intervertebral disc[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1840(10): 3181 – 3189. DOI:10.1016/j.bbagen.2014.07.013

[19] Ciapetti G, Granchi D, Devescovi V, *et al*. Ex vivo observation of human intervertebral disc tissue and cells isolated from degenerated intervertebral discs[J]. Eur Spine J, 2012, 21(Suppl 1):S10 – S19. DOI: 10.1007/s00586-012-2234-y

[20] Liu H, Pan H, Yang H, *et al*. LIM mineralization protein-1 suppresses TNF-α induced intervertebral disc degeneration by maintaining nucleus pulposus extracellular matrix production and inhibiting matrix metalloproteinases expression[J]. J Orthop Res, 2015, 33(3): 294 – 303. DOI:10.1002/jor.22732

[21] Tao Y, Zhou X, Liang C, *et al*. TGF-β3 and IGF-1 synergy ameliorates nucleus pulposus mesenchymal stem cell differentiation towards the nucleus pulposus cell type through MAPK/ERK signaling[J]. Growth Factors, 2015, 33(5/6):326 – 336. DOI: 10.3109/08977194.2015.1088532

[22] Gruber H E, Hoelscher G L, Ingram J A, *et al*. Growth and differentiation factor-5 (GDF-5) in the human intervertebral annulus cells and its modulation by IL-1β and TNF-α in vitro[J]. Exp Mol Pathol, 2014, 96(2):225 – 229. DOI: 10.1016/j.yexmp.2014.02.005

[23] Wuertz K, Vo N, Kletsas D, *et al*. Inflammatory and catabolic signalling in intervertebral discs: the roles of NF-kappaB and MAP kinases [J]. Eur Cell Mater, 2012, 23:103 – 119. DOI:10.5167/uzh – 61998

[24] Cheng X, Ni B, Zhang Z, *et al*. Polyol pathway mediates enhanced degradation of extracellular matrix via p38 MAPK activation in intervertebral disc of diabetic rats[J]. Connect Tissue Res, 2013, 54(2): 118 – 122. DOI: 10.3109/03008207.2012.754886

[25] Li J, Zhao Z, Liu J, *et al*. MEK/ERK and p38 MAPK regulate chondrogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells through delicate interaction with TGF-β1/Smads pathway[J]. Cell Prolif, 2010, 43(4):333 – 343. DOI: 10.1111/j.1365-2184.2010.00682.x

(收稿:2015-11-27;修回:2016-01-13)

(编辑 龙 亮)