doi:10.11659/jjssx.10E015172

·基础研究·

软骨终板干细胞动物体内成骨/软骨的初步研究

刘兰涛[1,2],朱瑜洁[3],黄 博[1],李长青[1],周 跃[1] (1.第三军医大学新桥医院骨科,重庆 400037;2.海军92635部队,山东 青岛 266000;3.四川航空股份有限公司航卫中心重庆航医室,重庆 400000)

[摘 要] **目的** 观察软骨终板干细胞在动物体内成骨/软骨的能力。**方法** 临床获取腰椎退变椎间盘软骨终板,采用琼脂糖筛选软骨终板干细胞后进行传代扩增,扩增后的软骨终板干细胞与羟基磷灰石复合后植入裸鼠皮下,7周后处死裸鼠取出复合物,分别进行特殊染色和免疫组化染色分析。同时,将扩增的干细胞注入兔子退变椎间盘中,16周后行MRI检测,观察退变椎间盘修复情况。**结果** 软骨终板干细胞羟基磷灰石复合物切片经甲苯胺蓝染色后有异染性,提示有软骨基质形成;同时Mallory染色显示羟基磷灰石空隙中有蓝染存在,说明有成熟的骨基质形成。免疫组织化学结果提示,所形成的基质主要为Ⅰ型和Ⅹ型胶原,同时有少量Ⅱ型胶原表达。MRI结果提示植入退变椎间盘的终板干细胞在动物体内可以分化为类软骨样细胞,从而修复退变椎间盘。**结论** 软骨终板干细胞可以在动物体内向成骨/软骨方向分化。

[关键词] 椎间盘;干细胞;软骨终板;诱导

[中图分类号] R681.53 [文献标识码] A [收稿日期] 2015-11-25

Study on osteogenic/chondrogenic differentiation potential of cartilage endplate derived stem cells in vivo

LIU Lan-tao[1,2], ZHU Yu-jie[3], HUANG Bo[1], LI Chang-qing[1], ZHOU Yue[1] (1. Department of Orthopedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China; 2. the Navy Army 92635 of PLA, Qingdao Shandong 266000, China; 3. Chongqing Aviation Room of Aviation Health Center of Sichuan airlines Co., LTD., Chongqing 400000, China)

Abstract: Objective To observe the osteogenic and/or chondrogenic differentiation potential of cartilage endplate derived stem cells (CESCs). **Methods** The cartilage endplate (CEP) was obtained from 5 patients who underwent posterior discectomy procedure for the lumber degenerative disease. The agarose culture was used to select CESCs. The expanded CESCs were injected into the hydroxyapatite ceramic(HA) and incubated for 7 days. After that, the HA contained CESCs were implanted into the subcutaneous of nude mouse for 7 weeks. Then the HA was obtained and sliced for the specific stain and immunohistochemisty. The expanded CESCs were injected into the degenerated intervertebral disk of the rabbit for 16 weeks. Then MRI was used to detect the repair of the degenerated disc. **Results** The metachromasia of toluidin blue indicated that cartilage matrix was formed in the vacant space of HA. Mallory stain indicated that there was bone matrix was formed. The results of immunohistochemistry indicated that there was more collage Ⅰ and collage Ⅹ, and a small quantity of collage Ⅱ. MRI results indicated that the CESCs could be induced into the chondrocyte-like cells in the rabbit intervertebral disk. **Conclusion** The CESCs could be induced into the bone/cartilage in vivo.

Keywords: intervertebral disc; stem cells; cartilage endplate; induce

随着经济社会的发展以及人的预期寿命的延长,慢性腰痛(chronic low back pain,CLBP)导致患者的生活质量下降甚至工作能力丧失而成为当今社会医疗花费的重要原因,在美国因治疗慢性腰痛每年花费数十亿美元。在众多导致慢性腰痛的原因中,最为常见的病因就是腰椎间盘退变性疾病(degenerative disc disease,DDD)[1]。当前DDD的主要治疗方式包括保守治疗和手术治疗,但是这2种治疗方式主要是减轻症状,并没有从根本上治愈该疾病。为了从根本上治疗该病,最为理想的方法就是恢复退变椎间盘的组织结构和生理功能[2]。随着对间充质干细胞的研究越来越深入,尤其是干细胞在血液等系统疾病上的应用显示出来的良好疗效,以干细胞为基础的疗法(包括组织工程椎间盘)有可能成为治疗DDD的最理想方案之一[1,3]。近期我们课题组在退变的软骨终板中发现了具有多向分化潜能的干细胞,并命名为软骨终板干细胞(cartilage endplate stem cells,CESCs),体外研究表明CESCs具有良好的成骨和成软骨特点,并且能力优于骨髓间充质干细胞[4-5]。但是,软骨终板干细胞在体内是否可以分化为骨或者软骨性质的细胞还不明确。本文重点对软骨终板干细胞在动物体内成骨/软骨的分化进行研究。

[基金项目] 国家自然科学基金(81271982;81071498)

[通信作者] 周 跃,E-mail:happyzhou@vip.163.com

1 材料与方法

1.1 临床标本

本实验所用的5例标本均是在得到患者和医院伦理委员会的同意并签订知情同意书后进行收集。所收集标本的5例患者均因腰椎椎间盘退行性病变需要做后路椎间盘切除并进行融合手术,见表1。

表1 临床标本资料详细情况

序号	诊断	节段	Modic	性别	年龄(岁)
1	腰椎滑脱	$L_4 \sim L_5$	Ⅱ	女	50
2	椎管狭窄	$L_3 \sim S_4$	Ⅰ	男	46
3	椎体不稳	$L_4 \sim L_5$	Ⅱ	男	43
4	盘源性腰痛	$L_4 \sim L_5$	Ⅰ	女	47
5	盘源性腰痛	$L_5 \sim S_1$	Ⅱ	女	56

1.2 退变软骨终板细胞的分离和培养

使用无菌眼科剪等器械在解剖显微镜(×4倍)下清理软骨终板。将去除髓核、纤维环以及软骨下终板的软骨终板PBS清洗3遍后,剪成1 mm×1 mm×1 mm大小的碎块消化12 h(37 ℃条件下用0.15% Ⅱ型胶原酶消化)。12 h后吹打细胞悬液并用200目的筛网进行过滤。滤液离心管离心10 min(1 000 r/min),弃上清液,用含有10%胎牛血清的DMEM/F12培养基重新悬浮细胞,并在含有5% CO_2,37 ℃温箱中培养。第一代后,进行琼脂糖筛选培养。

1.3 琼脂糖筛选系统

琼脂糖筛选系统采用文献[6]报道的方法进行。等体积的高压灭菌的2%低熔点琼脂糖和2×DMEM/F12(不含胎牛血清)进行混合配成1%的低熔点琼脂糖。混合好的琼脂糖包被培养皿(直径60 mm)。将0.75 mL DMEM/F12、0.75 mL 2%低熔点琼脂糖和1.5 mL的DMEM/F12培养液(含有5×10^4细胞的20%胎牛血清)均匀混合平铺到上述培养皿中。待凝固后加入含有10%胎牛血清的DMEM/F12培养液,温箱(5% CO_2,37 ℃)中培养6周。定期更换培养液(每3 d换1次)。6周以后,用巴斯德吸管吸取直径大于50 μm的细胞克隆放于6孔板中进行体外扩增培养。P3代干细胞用于以下实验。

1.4 软骨终板干细胞与羟基磷灰石的复合

调整P3的CESCs细胞浓度并计数到2×10^7/mL。取50 μl细胞悬液滴于羟基磷灰石(直径200 μm,孔隙率85%,体积为3 mm×3 mm×3 mm)中,并置于细胞培养箱中放置2 h后加入10% FBS DMEM/F12培养液培养1周。1周后,将细胞支架复合物植入裸鼠(第三军医大学新桥医院动物实验中心提供)皮下并饲养7周。

1.5 细胞支架复合物植入裸鼠体内

实验用裸鼠(雄性,20 g)麻醉(1%的戊巴比妥钠溶液,0.12 mL)消毒背部皮肤后,在皮下植入细胞支架复合物。饲养7周。7周后,颈椎脱臼法处死裸鼠,将细胞支架复合物取出并用4%多聚甲醛溶液固定3 d。

1.6 支架复合物的脱钙及切片

10% EDTA脱钙液(3 d更换1次)室温脱钙2~3周,以大头针能刺进为完成脱钙标准。组织脱钙成功以后,分别进行HE、甲苯胺蓝染色、Mallory染色及免疫组织化学染色。

1.7 免疫组织化学染色

处理好的切片(柠檬酸盐溶液中热处理10 min)用4%的多聚甲醛固定、5%山羊血清进行阻断后分别与以下单克隆抗体室温下孵育1 h:Ⅰ型胶原(COLⅠ,mouse,1∶100,Sigma,USA),Ⅱ型胶原(COLⅡ,mouse,1∶100,Sigma,USA),Ⅹ型胶原抗体(COLⅩ,mouse,1∶100,Sigma,USA)。PBS冲洗后,与生物素化抗小鼠IgG抗体(1∶100,Sigma,USA)室温下共孵育30 min。最后用二氨基联苯胺显色,采图。

1.8 椎间盘退变动物模型的制备及实验动物分组

4月龄新西兰白兔15只(新桥医院动物实验中心提供),均为雄性,体质量2.0~2.5 kg。采用纤维环针刺椎间盘退变模型,腹膜外入路显露兔椎间盘(图1)和针刺$L_2 \sim L_3$,$L_3 \sim L_4$椎间盘,具体制作和验证方法参照文献[7]。造模成功后的新西兰白兔随机分为3组,每组5只,分别为假手术组(只显露椎间盘)、退变组和软骨终板干细胞注入组(干细胞注入组)。将20 μl含有10^7/mL的细胞悬液采用微量注射器注射到退变椎间盘的部位。大白兔术后再饲养16周,在麻醉状态下进行MRI检测。

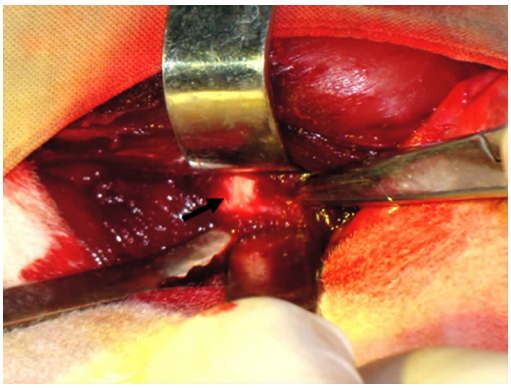


图1 兔腹膜外入路显露椎间盘(黑色箭头所指为椎间盘)

1.9 MRI检测

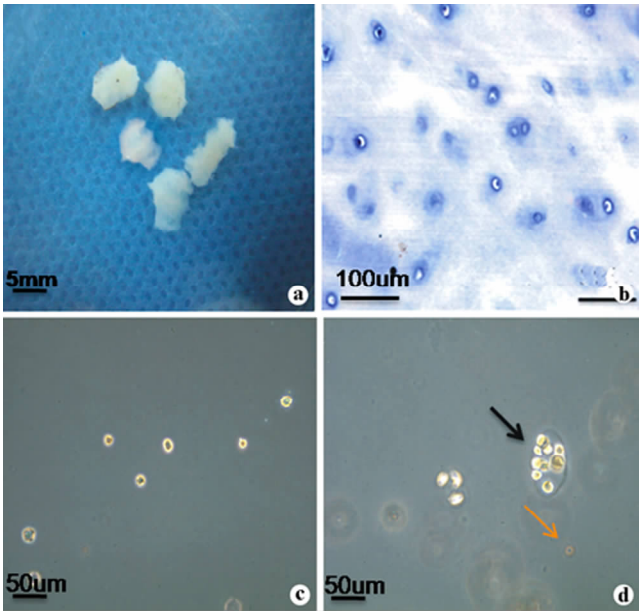
术后16周,手术动物称质量,以3%戊巴比妥钠溶液30 mg/kg耳缘静脉麻醉后,行腰椎MRI磁共振

检查。应用 GE 公司 1.5T 磁共振机。动物仰卧于正交表面线圈内,获取平行于脊柱腰段的矢状位 T2 加权自旋回波图像。参数设置:重复时间(TR):3 200 ms;回波时间:130 ms;激发次数:20;视野:17 cm;层厚:3 mm;层间距:1 mm。分别观察 3 组椎间盘髓核部位的 T2 信号。所有结果均以图片展示。

2 结果

2.1 退变软骨终板的形态及软骨终板干细胞的筛选

退变椎间盘的软骨终板为白色、半透明状(图 2a)。HE 染色可见在透明均一的细胞基质中沉积着少量的圆形软骨细胞,镜下并无其他成分(纤维样细胞、脂肪、血液和血管组织)存在,从而排除了其他组织来源以外的干细胞的可能(图 2b)。提取的软骨细胞在琼脂糖筛选系统中呈单细胞、球形分布,镜下并未见气泡以及细胞聚集(图 2c)。经过 6 周培养,可见琼脂糖中的部分单细胞增殖形成克隆团,部分克隆团的直径大于 50 μm(图 2d,黑色箭头),部分细胞仍保持单细胞状态,而这些单细胞与 6 周前刚接种于琼脂糖的细胞比较,形态和大小未见明显变化(图 2d,棕色箭头)。

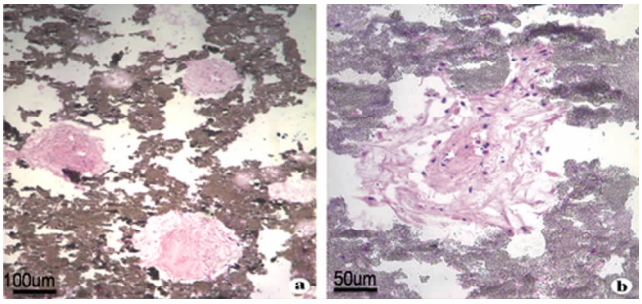


a:清理好的软骨终板的大体形态;b:软骨终板 HE 染色,圆形的软骨细胞沉积在透明均一的细胞外基质中;c:琼脂糖筛选系统,软骨细胞在琼脂糖中保持单细胞状态;d:琼脂糖系统培养 6 周后的细胞形态,克隆团(黑色箭头),单细胞状态(棕色箭头)

图 2 退变软骨终板的形态及琼脂糖筛选系统

2.2 HE 染色

HE 染色可见在羟基磷灰石孔隙中有大量的粉红色、均质的细胞外基质沉积(图 3a)。在基质中可见蓝染的细胞核沉积其中(图 3b)。这一染色结果说明软骨终板干细胞与羟基磷灰石复合后在动物体内可以存活,并且分泌未成熟的软骨样细胞外基质。

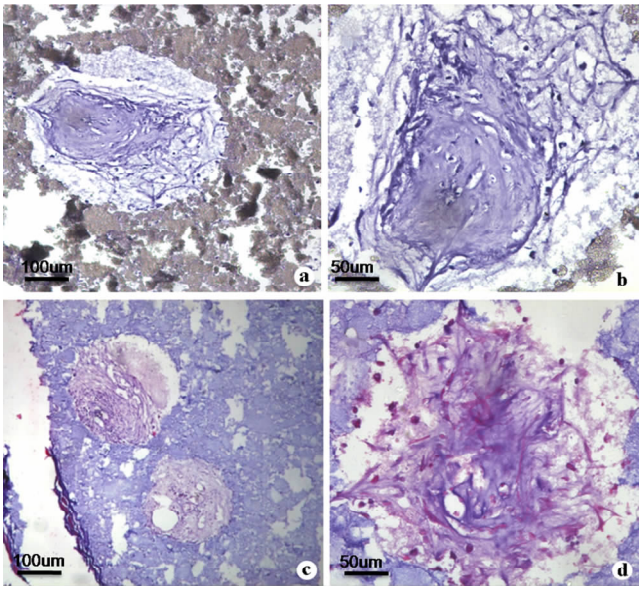


a:空隙中的细胞外基质形成情况;b:蓝染的细胞核分布在其中

图 3 羟基磷灰石细胞复合材料在裸鼠体内诱导 7 周(HE 染色)

2.3 特殊染色

甲苯胺蓝染色提示在羟基磷灰石孔隙中的细胞外基质呈紫红色异染性(图 4a、b)。Mallory 染色提示未完全成熟的软骨基质被染成红色,成熟的基质可以染成蓝色(图 4c、d)。特殊染色结果提示软骨终板干细胞在体内可以分泌软骨和骨样细胞外基质成分,具有向骨和或软骨发展的趋势。



a、c:空隙中的细胞外基质染色情况;b、d:空隙中的细胞外基质染色情况;a、b:甲苯胺蓝;c、d:Mallory 染色

图 4 羟基磷灰石细胞复合材料在裸鼠体内诱导 7 周(特殊染色)

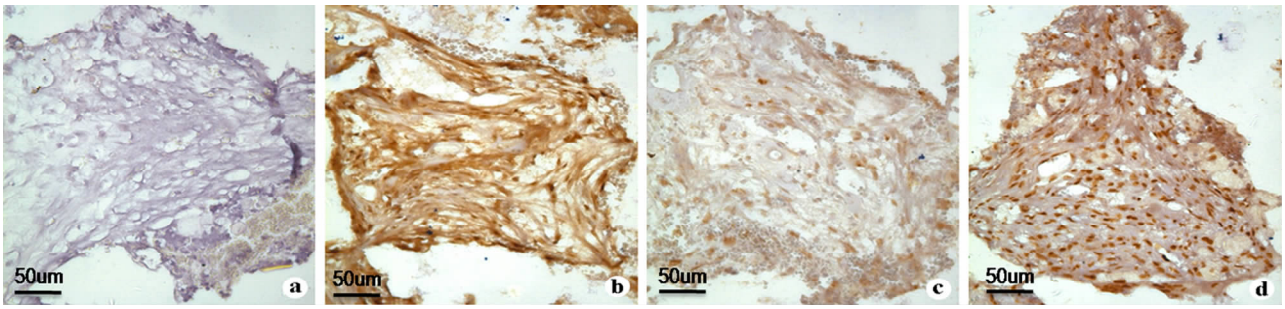
2.4 免疫组织化学染色

将切片分别进行Ⅰ、Ⅱ、Ⅹ型胶原免疫组织化学染色。结果显示,软骨终板干细胞在裸鼠体内诱导 7 周后,空隙间的Ⅰ、Ⅹ型胶原表达丰富,染色较深,而Ⅱ型胶原在组织中表达量较少(图 5),表明沉积在空隙中的细胞外基质逐渐成熟并向骨基质方向发展。

2.5 MRI

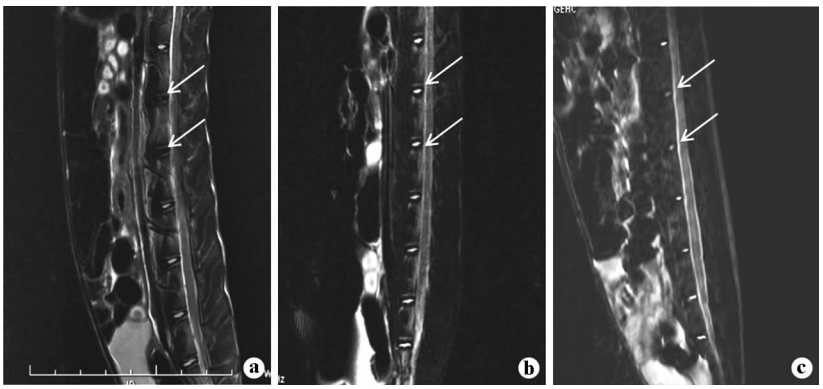
采用针刺兔正常椎间盘经过 16 周后成功建立了退变椎间盘模型。经 MRI 检测提示,退变组椎间盘在 T2 上显示低信号(图 6a),而正常对照组椎间盘在 T2

上显示高信号(图 6b)。软骨终板干细胞通过微量注射器植入到退变椎间盘 16 周后,MRI 提示在 T2 上退变部的椎间盘有部分高信号出现(图 6c),说明植入体内的干细胞在退变椎间盘环境下可能经过增殖以及分化为椎间盘髓核细胞从而分泌细胞外基质来修复退变椎间盘。



a:同型对照组;b:Ⅹ型胶原免疫组织化学染色;c:Ⅱ型胶原免疫组织化学染色;d:Ⅰ型胶原免疫组织化学染色

图 5 羟基磷灰石细胞复合材料在裸鼠体内诱导 7 周(免疫组织化学染色)



a:退变椎间盘,MRI 提示低信号;b:正常对照组椎间盘信号,MRI 显示高信号;c:软骨终板干细胞植入兔退变椎间盘 16 周,MRI 提示退变椎间盘有部分高信号出现的作用

图 6 软骨终板干细胞植入兔子退变椎间盘 16 周后 MRI 检测 T2 信号情况

3 讨论

本研究通过对羟基磷灰石孔隙中形成的细胞外基质进行染色分析,证实 CESCs 在裸鼠体内诱导后,可以向骨/软骨方向发展,从而为 CESCs 在临床上应用提供了理论支撑。

适当直径和孔隙率的支架材料不仅为细胞提供结构支撑作用,而且起到诱导组织再生和控制组织结构的作用。孔径在 100 ~ 400 μm 可以为细胞提供适当的压力和张力,并作用于细胞的感受器刺激细胞长入。而直径小于 100 μm 的支架材料只是在细胞代谢过程中起作用,再者孔隙率值高于 80% 时有利于细胞的生长和保持其生理活性[8]。我们采用的羟基磷灰石(孔径大约 200 μm,空隙率 85%)完全适合进行细胞体内的研究。

甲苯胺蓝可以特异性地与蛋白聚糖等多阴离子的高分子物质耦合成多聚体而显紫红色,即异染性。软骨细胞分泌的细胞外基质主要是蛋白聚糖等阴性大分子[9],因此甲苯胺蓝染色若有异染性则提示有软骨基质形成。本研究结果提示体内诱导 7 周后,均匀的细胞基质中有紫红色的异染性存在,说明在羟基磷灰石孔隙中具有少量的软骨特异性基质的形成。

免疫组织化学结果提示孔隙中的细胞外基质主要为Ⅰ型和Ⅹ型胶原,而Ⅱ型胶原比较低。Ⅰ型胶原是间充质干细胞向成骨方向诱导分化中重要的分子,能够维持和促进间充质干细胞向成骨方向分化[10-11]。免疫组织化学结果提示亦有少量Ⅱ型胶原表达。文献报道在椎间盘退变钙化过程中伴随着Ⅱ型胶原的减少[12]。Ⅹ型胶原的高表达也是钙化的重要原因之一。研究认为Ⅹ型胶原是肥大软骨细胞的特异性标志,参与钙化的过程,同时Ⅹ型胶原也是骨软骨内成骨通路激活的重要因子[13-14]。在这种成骨方式中,软骨基质的沉积、软骨细胞肥大和基质矿化是间充质干细胞进一步分化的重要标志[15]。因此,免疫组织化学结果中Ⅰ、Ⅹ型胶原表达的增加和Ⅱ型胶原表达的减少进一步证实软骨终板干细胞在动物体内可以成骨。

人在 20 岁以前,髓核主要成分是脊索细胞;20 岁以后,脊索细胞逐渐消失或者逐渐转化成纤维软骨样

的细胞[16]。但是,成年以后髓核当中纤维软骨样的细胞真正的起源还是有争议的。有学者认为脊索细胞直接合成髓核细胞外基质并分化为细胞外基质[17];而有学者认为髓核细胞是在脊索细胞引导下由周围的终板或纤维环细胞迁移过来的,然后脊索细胞凋亡或者死亡[16,18-19]。尽管髓核细胞的起源有争议,但是髓核细胞的主要表型还是软骨样细胞,分泌合成Ⅱ型胶原和蛋白聚糖等细胞外基质。因此,植入退变椎间盘的干细胞只有分化为类软骨样的细胞才能分泌足够的蛋白和Ⅱ型胶原。在兔子动物实验中,我们植入软骨终板干细胞16周后,MRI检测T2信号提示退变椎间盘有高信号表现,与对照组信号强度基本一致;而退变的椎间盘则为低信号。这一结果足以说明我们植入的终板干细胞在一定程度上分化为类软骨样细胞外基质。因此,实验结果证明软骨终板干细胞可以在动物体内分化为软骨样细胞。综上所述,软骨终板干细胞在动物体内可以向成软骨/骨方向发展。

[参考文献]

[1] O'Connell GD, Leach JK, Klineberg EO. Tissue engineering a biological repair strategy for lumbar disc herniation[J]. Biores Open Access, 2015,4(1):431-445. doi:10.1089/biores.2015.0034.

[2] Urban JP, Roberts S. Degeneration of the intervertebral disc[J]. Arthritis Res Ther,2003,5(3):120-130.

[3] Richardson SM, Kalamegam G, Pushparaj PN, et al. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine:focus on articular cartilage and intervertebral disc regeneration[J]. Methods, 2015. doi: 10.1016/j.ymeth.2015.09.015.

[4] 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. doi:10.1371/journal.pone.0026285.

[5] Huang B, Liu LT, Li CQ, et al. Study to determine the presence of progenitor cells in degenerated human cartilage endplates[J]. Eur Spine J, 2012,21(4):613-622. doi:10.1007/s00586-011-2039-4.

[6] 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(3):141-150.

[7] Masuda K, Aota Y, Muehleman C, et al. A novel rabbit model of mild, reproducible disc degeneration by an anulus needle puncture:correlation between the degree of disc injury and radiological and histological appearances of disc degeneration[J]. Spine,2005,30(1):5-14.

[8] Rodríguez-Vázquez M, Vega-Ruiz B, Ramos-Zúñiga R. Chitosan and its potential use as a scaffold for tissue engineering in regenerative medicine[J]. Biomed Res Int,2015. doi:10.1155/2015/821279.

[9] Wang SZ, Rui YF, Lu J. 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.

[10] Kaneto CM, Lima PS, Zanette DL, et al. COL1A1 and miR-29b show lower expression levels during osteoblast differentiation of bone marrow stromal cells from Osteogenesis Imperfecta patients[J]. BMC Med Genet,2014,15:45. doi:10.1186/1471-2350-15-45.

[11] Kihara T, Hirose M, Oshima A, et al. Exogenous type I collagen facilitates osteogenic differentiation and acts as a substrate for mineralization of rat marrow mesenchymal stem cells in vitro[J]. Biochem Biophys Res Commun,2006,341(4):1029-1035.

[12] Sahlman J, Inkinen R, Hirvonen T, et al. Premature vertebral endplate ossification and mild disc degeneration in mice after inactivation of one allele belonging to the Col2a1 gene for type Ⅱ collagen[J]. Spine, 2001,26(23):2558-2565.

[13] Hristova GI, Jarzem P, Ouellet JA, et al. Calcification in human intervertebral disc degeneration and scoliosis[J]. J Orthop Res, 2011, 29(12):1888-1895. doi:10.1002/jor.21456.

[14] Tallheden T, Dennis JE, Lennon DP, et al. Phenotypic plasticity of human articular chondrocytes[J]. J Bone Joint Surg Am,2003,85(Suppl 2):93-100.

[15] Sweeney E, Roberts D, Lin A, et al. Defective endochondral ossification-derived matrix and bone cells alter the lymphopoietic niche in collagen X mouse models[J]. Stem Cells Dev, 2013,22(19):2581-2595. doi:10.1002/jor.21456.

[16] Kim KW, Lim TH, Kim JG, et al. The origin of chondrocytes in the nucleus pulposus and hist type X collagen expression ologic findings associated with the transition of a notochordal nucleus pulposus to a fibrocartilaginous nucleus pulposus in intact rabbit intervertebral discs[J]. Spine,2003,28(10):982-990.

[17] Potier E, Ito K. Can notochordal cells promote bone marrow stromal cell potential for nucleus pulposus enrichment? A simplified in vitro system[J]. Tissue Eng Part A,2014,20(23-24):3241-3251. doi:10.1089/ten.TEA.2013.0703.

[18] Aguiar DJ, Johnson SL, Oegema TR. Notochordal cells interact with nucleus pulposus cells:regulation of proteoglycan synthesis[J]. Exp Cell Res,1999,246(1):129-137.

[19] Cappello R, Bird JL, Pfeiffer D, et al. Notochordal cell produce and assemble extracellular matrix in a distinct manner, which may be responsible for the maintenance of healthy nucleus pulposus[J]. Spine (PhilaPa 1976),2006,31(8):873-882.

(编辑:杨 颖)