

· 论 著 ·

骨髓间充质干细胞对大鼠退变椎间盘的修复作用

余英剑¹, 邱丽纯², 廖丛娟³, 陈奕芝¹, 李桂涛¹, 曹瑞治¹, 张坤尧¹1. 深圳市龙岗中心医院骨科, 广东 深圳 518116; 2. 深圳市龙岗区第二人民医院, 广东 深圳 518165;
3. 深圳市龙岗区人民医院, 广东 深圳 518172

摘要: **目的** 研究骨髓间充质干细胞(MSCs)对大鼠退变椎间盘的修复作用。**方法** 采用随机数字表法将 2015 年 10 月至 2016 年 12 月利用腰椎间盘可控轴向加压装置构建出来的 40 只退变椎间盘大鼠分为对照组(未接受任何治疗)、Sox9 转染 MSCs 组(制备 Sox9 基因慢病毒载体转染 MSCs 用于注射)、RADA-16 + MSCs 组(制备荷载多肽粉末 RADA-16 的 MSCs 用于注射)、RADA-16 + Sox9 转染 MSCs 组(制备荷载 RADA-16 和 Sox9 转染的 MSCs 用于注射)各 10 只,分别向 L_{3/4}、L_{4/5}、L_{5/6} 椎间隙注射制备的上述 MSCs 混合溶液。处死大鼠,取椎间盘制备病理切片,采用免疫组化染色法检测髓核组织中 II 型胶原的表达水平(灰度值分级)。对治疗前后不同时间段影像学指标(MRI、X 线)、II 型胶原表达水平结果进行比较和分析。**结果** 术前四组髓核矢状径指数、根袖直径、神经根袖和硬膜囊的夹角、病变间隙、邻近节段椎间隙高度变化、II 型胶原灰度值分级比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);术后 1、2、3 个月各指标比较表明,疗效由高至低分别为 RADA-16 + Sox9 转染 MSCs 组、RADA-16 + MSCs 组、Sox9 转染 MSCs 组、对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** RADA-16 + Sox9 转染 MSCs 修复退变椎间盘效果理想。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 退变; 椎间盘; Sox9 基因; RADA-16 多肽; 慢病毒载体; 修复作用

中图分类号: R 681.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2017)11-1473-04

Effect of bone marrow mesenchymal stem cells on the repair of degenerative intervertebral disc in rats

YU Ying-jian*, QIU Li-chun, LIAO Cong-juan, CHEN Yi-zhi, LI Gui-tao, CAO Rui-zhi, ZHANG Kun-yao

* Department of Orthopedics, Shenzhen Longgang Central Hospital, Shenzhen, Guangdong 518116, China

Abstract: Objective To study the repair effect of bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) on degenerative intervertebral disc in rats. **Methods** Forty rats were selected to construct degenerative intervertebral disc model by pressurized device for lumbar intervertebral disc and were divided into four groups (n = 10 each): control group (no treatment was given), MSCs transfected by Sox9 group (MSCs transfected by Sox9 gene lentiviral vector), RADA-16 + MSCs group (MSCs loaded peptide powder RADA-16) and RADA-16 + MSCs transfected by Sox9 group (MSCs loaded peptide powder RADA-16 and transfected by Sox9 gene lentiviral vector). After modeling, no treatment was given in control group, and the MSCs mixed solutions prepared by the above method were respectively injected into L_{3/4}, L_{4/5}, L_{5/6} intervertebral spaces in the remaining three groups. After being killed, the rats intervertebral disks were taken out to prepare pathological section, and immunohistochemical staining method was used to detect type II collagen expression level (gray value grading) in nucleus pulposus tissues. The imaging index (MRI, X-ray) and the type II collagen expression level before injection and at different time periods after injection were compared and analyzed. **Results** There were no significant differences in indexes of MRI (sagittal diameter index of nucleus pulposus, the included angle of dural sac and sleeve of nerve root sheath, root sleeve diameter), X-ray (lesion space, vertebral space height of adjacent segments) and the gray value grading of type II collagen before treatment of MSCs mixed solutions in four groups (all $P > 0.05$). The comparisons of aforementioned indexes at 1-, 3-, 5- months after surgery showed that the efficacies in the order from high to low were RADA-16 + MSCs transfected by Sox9 group, RADA-16 + MSCs group, MSCs transfected by Sox9 group and control group ($P < 0.05$). **Conclusion** MSCs loaded RADA-16 and transfected by Sox9 have a ideal efficacy for the repair of degenerative intervertebral disc.

Key words: Bone marrow mesenchymal stem cells; Degeneration; Intervertebral disc; Sox9 gene; RADA-16;

Lentiviral vector; Repairing effect

椎间盘退变是目前骨科较为常见的病症类型,患病人群多以中老年为主,且近年来发病率呈逐年攀升态势,退变性椎间盘病正在成为严重影响患者生活质量及加剧医疗成本上升的主要疾病之一^[1]。现有医疗技术条件下无法从根本上逆转椎间盘的退变,只能暂时缓解症状^[2]。近年来随着细胞移植、基因治疗、纳米限位支架水凝胶的陆续涌现,将三者结合应用于椎间盘退变的临床治疗工作中成为一个全新的课题^[3]。鉴于此,本研究分别采用 Sox9 基因慢病毒载体转染的骨髓间充质干细胞(MSCs)、载荷 RADA-16 多肽纳米纤维支架水凝胶的 MSCs、既有 Sox9 基因慢病毒载体转染又载荷 RADA-16 多肽的 MSCs,移植于大鼠的退变椎间盘间隙,比较并探讨其在退变椎间盘修复中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 采用随机数字表法将 2015 年 10 月至 2016 年 12 月利用腰椎间盘可控轴向加压装置构建出来的 40 只退变椎间盘大鼠分为对照组(未接受任何治疗)、Sox9 转染 MSCs 组(SM 组)、RADA-16 + MSCs 组(RM 组)、RADA-16 + Sox9 转染 MSCs 组(RSM 组),每组 10 只。体质量对照组为 0.30 ~ 0.50 (0.42 ± 0.11) kg, SM 组为 0.32 ~ 0.50 (0.41 ± 0.10) kg, RM 组为 0.32 ~ 0.50 (0.41 ± 0.10) kg, RSM 组为 0.33 ~ 0.50 (0.40 ± 0.12) kg。四组大鼠体质量均衡 ($P > 0.05$)。

1.2 研究方法

1.2.1 模型构建 利用腰椎间盘加压装置向横穿腰椎椎体的 1.5 mm 克氏针施加轴向压力并对其压力进行动态调整^[4]。

1.2.2 大鼠 MSCs 的分离和原代培养 常规消毒铺巾后将 5 只大鼠麻醉,于股骨粗隆处抽取 5 ml 骨髓并迅速进行离心以分离 MSCs 层,加入培养液后于培养箱之中进行培养^[5]。

1.2.3 Sox9 基因慢病毒载体转染大鼠 MSCs 取第 3 代生长状态理想的 MSCs 并加入 Sox9 慢病毒载体,于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下进行培养^[6]。

1.2.4 RADA-16 溶液的配制 取 10 mg 多肽粉末 RADA-16 溶于 1 ml 无菌双蒸水中形成 1% 无色澄清液体,加入培养基后促使二者充分混匀,配置成为浓度 0.5% 的溶液。

1.2.5 载荷 RADA 复合材料混合溶液制备 (1) 制备 Sox9 基因慢病毒载体转染的 MSCs (Sox9 转染的

MSCs) 复合材料;(2) 将 BMSCs 于室温下按照 1:1 比例与 RADA-16 溶液混匀,制备出载荷多肽粉末 RADA-16 的 MSCs (BMSCs + RADA-16) 复合材料;(3) 将转染 Sox9 的 BMSCs 悬液按同比例与 RADA-16 溶液混匀制备出载荷 RADA-16 和 Sox-9 转染的 MSCs (RADA-16 + MSCs + Sox9) 复合材料^[7]。

1.2.6 治疗 分组后对照组不实施任何治疗,分别向 SM 组、RM 组、RSM 组大鼠 L_{3/4}、L_{4/5}、L_{5/6} 椎间隙注射预先制备的上述 Sox9 转染的 MSCs、BMSCs + RADA-16 和 RADA-16 + MSCs + Sox9。

1.3 观察指标 (1) 影像学指标:包括髓核矢状径指数、根袖直径、神经根鞘袖和硬膜囊的夹角、病变间隙、邻近节段椎间隙高度变化,其中髓核矢状径指数、根袖直径、神经根鞘袖和硬膜囊的夹角采用瑞士布鲁克拜厄斯宾生产的 AVANCE 核磁共振波谱仪测定,病变间隙、邻近节段椎间隙高度变化采用德国西门子生产的 AXIOM Aristos VX 全数字化 X 线机测量。(2) II 型胶原检测:处死大鼠后,取出各组大鼠椎间盘制备病理切片,采用免疫组化染色法测定(试剂盒为上海樊克生物科技有限公司生产的大鼠 II 型胶原酶联免疫试剂盒)髓核组织中 II 型胶原表达。II 型胶原在基质和细胞浆中表达,呈现黄色或棕黄色。应用图像分析软件评价分析免疫组化染色的 II 型胶原在相应区域的表达情况,自动计算出其灰度值查看表达的强弱。灰度分级 0 ~ 255 级,0 级最深,255 级最浅,其值越小,表达就越强。测定结果为观察视野内棕黄色平均灰度^[8]。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件处理数据。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用多因素重复测量资料的方差分析。检验水准取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 四组 MRI 指标比较 术前四组 MRI 指标相近 (P 均 > 0.05)。术后 1、2、3 个月髓核矢状径指数、神经根鞘袖和硬膜囊的夹角相比较,RSM 组 $<$ RM 组 $<$ SM 组 $<$ 对照组 (P 均 < 0.05);根袖直径相比较,RSM 组 $>$ RM 组 $>$ SM 组 $>$ 对照组 (P 均 < 0.05)。见表 1。

2.2 四组 X 线指标及 II 型胶原灰度值比较 术前四组 X 线指标及 II 型胶原灰度值比较均无统计学差异 (P 均 > 0.05)。术后 1、2、3 个月病变间隙、邻近节段椎间隙高度变化相比较,RSM 组 $<$ RM 组 $<$ SM 组 $<$ 对照组 (P 均 < 0.05); II 型胶原灰度值相比较,RSM 组 $>$ RM 组 $>$ SM 组 $>$ 对照组 (P 均 < 0.05),即

表 1 四组 MRI 指标比较 (n = 10, $\bar{x} \pm s$)

组别	髓核矢状径指数				根袖直径 (cm)				神经根鞘袖和硬膜囊的夹角 (°)			
	术前	术后 1 个月	术后 2 个月	术后 3 个月	术前	术后 1 个月	术后 2 个月	术后 3 个月	术前	术后 1 个月	术后 2 个月	术后 3 个月
对照组	0.45 ± 0.11	0.43 ± 0.08	0.40 ± 0.10	0.36 ± 0.09	0.05 ± 0.02	0.10 ± 0.05	0.17 ± 0.04	0.23 ± 0.06	27.45 ± 0.35	27.23 ± 0.27	27.10 ± 0.29	26.88 ± 0.32
SM 组	0.44 ± 0.10	0.41 ± 0.09	0.38 ± 0.10	0.34 ± 0.07	0.06 ± 0.03	0.19 ± 0.07	0.27 ± 0.09	0.33 ± 0.10	27.44 ± 0.36	27.04 ± 0.38	26.84 ± 0.36	26.10 ± 0.30
RM 组	0.46 ± 0.12	0.39 ± 0.07	0.36 ± 0.04	0.32 ± 0.07	0.05 ± 0.01	0.23 ± 0.11	0.33 ± 0.12	0.38 ± 0.15	27.46 ± 0.34	26.80 ± 0.35	26.44 ± 0.36	25.77 ± 0.33
RSM 组	0.45 ± 0.10	0.37 ± 0.08	0.34 ± 0.06	0.30 ± 0.07	0.06 ± 0.01	0.28 ± 0.12	0.37 ± 0.13	0.43 ± 0.11	27.45 ± 0.33	26.55 ± 0.35	25.88 ± 0.32	25.30 ± 0.40
P 值	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05

表 2 四组 X 线指标及 II 型胶原灰度值比较 (n = 10, $\bar{x} \pm s$)

组别	病变间隙 (mm)				邻近节段椎间隙高度变化 (mm)				II 型胶原灰度值 (级)			
	术前	术后 1 个月	术后 2 个月	术后 3 个月	术前	术后 1 个月	术后 2 个月	术后 3 个月	术前	术后 1 个月	术后 2 个月	术后 3 个月
对照组	35.35 ± 0.35	32.10 ± 0.30	30.40 ± 0.32	27.66 ± 0.34	2.38 ± 0.12	2.02 ± 0.14	1.89 ± 0.13	1.66 ± 0.11	155.34 ± 5.36	166.34 ± 4.36	177.95 ± 3.55	191.20 ± 3.20
SM 组	35.36 ± 0.34	30.10 ± 0.30	27.43 ± 0.37	25.33 ± 0.33	2.40 ± 0.10	1.90 ± 0.12	1.69 ± 0.10	1.48 ± 0.16	155.40 ± 5.40	172.49 ± 4.31	189.65 ± 3.62	209.78 ± 3.32
RM 组	35.37 ± 0.33	28.31 ± 0.39	24.42 ± 0.38	20.88 ± 0.32	2.39 ± 0.11	1.71 ± 0.11	1.57 ± 0.13	1.31 ± 0.22	155.38 ± 4.32	185.64 ± 4.36	200.41 ± 3.39	220.90 ± 3.41
RSM 组	35.36 ± 0.35	26.33 ± 0.37	21.29 ± 0.31	15.70 ± 0.30	2.38 ± 0.14	1.54 ± 0.16	1.35 ± 0.15	1.02 ± 0.11	155.60 ± 5.28	199.71 ± 4.29	220.44 ± 3.36	241.88 ± 3.42
P 值	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05	<0.05	<0.05	<0.05

疗效由高到低为 RSM 组、RM 组、SM 组、对照组。见表 2。

3 讨论

椎间盘退变难以从根本上被逆转,成为困扰临床治疗的一个棘手问题。然而,随着临床研究的深入开展,已经证实将细胞移植与基因治疗相结合有助于增加椎间盘内髓核细胞数量及细胞外基质分泌量,促使椎间盘原有的生物活性得到恢复,逐渐成为治疗该病症的关键之路^[9-10]。

本研究结果显示,术前四组大鼠髓核矢状径指数、根袖直径、神经根鞘袖和硬膜囊的夹角、病变间隙、邻近节段椎间隙高度变化、II 型胶原灰度值比较无统计学差异,术后 1、2、3 个月根袖直径、II 型胶原灰度值相比较,RSM 组 > RM 组 > SM 组 > 对照组;髓核矢状径指数、神经根鞘袖和硬膜囊的夹角、病变间隙、邻近节段椎间隙高度变化相比较,RSM 组 < RM 组 < SM 组 < 对照组,表明 RADA-16 + Sox9 转染 MSCs 治疗椎间盘退变取得的效果更为理想。原因在于 MSCs 来源十分广泛,且具有较强的生物活性,具有多向分化的能力,在诱导之下可提高向中胚层组织细胞分化的效果及能力^[11]。Sox9 基因为 II 型胶原和软骨形成的关键转录因子,与椎间盘退变存在着密切的关联性^[12-13]。RADA-16 多肽形成的纳米纤维支架水凝胶则有助于为 MSCs 生长提供纳米级微环境,营造出一个良好的发育条件^[14]。将三者结合可明显提高椎间盘修复效果。

综上所述,RADA-16 + Sox9 转染 MSCs 修复退变椎间盘效果理想,可为未来临床治疗工作提供新的思路。

参考文献

- [1] 胡津铨,袁文,曹鹏,等. 大鼠骨髓间充质干细胞与髓核细胞共培养对白介素 1β 致髓核细胞退变的影响[J]. 中国脊柱脊髓杂志,2015,25(4):361-366.
- [2] 韦继南,蔡峰,吴小涛,等. CXCR4 基因转染间充质干细胞防治椎间盘退变的疗效观察[J]. 东南大学学报(医学版),2015,34(4):541-546.
- [3] Silva F, Elabd C, Vargas V, et al. Effect of human hypoxic cultured bone marrow derived stem cells on a rabbit intervertebral disc degeneration model: a pre-clinical study [J]. Cytotherapy, 2016, 18(6):S131.
- [4] McCann MR, Veras MA, Yeung C, et al. Whole-body vibration of mice induces progressive degeneration of intervertebral discs associated with increased expression of Il-1β and multiple matrix degrading enzymes[J]. Osteoarthr Cartil, 2017, 25(5):779-789.
- [5] 钟慧霖,陈文明,李翠莹,等. 移植 BDNF 和 GDNF 基因修饰的 hMSCs 对大鼠大脑中动脉阻塞的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2014,30(1):102-109.
- [6] 张燕,陶晖,顾韬,等. 脐带华通胶间充质干细胞移植对退变椎间盘影响的实验研究[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2015, 25(8):750.
- [7] 李俊辉,俞兴,穆晓红,等. 人工颈椎间盘不同涂层影响骨髓间充质干细胞的黏附及分化[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(12):1938-1943.
- [8] 胡伟涛,赵建江,孙翔,等. 人骨髓间充质干细胞成骨分化早期相关的长链非编码 RNA 的初步研究[J]. 中山大学学报(医学科学版),2016,37(3):384-389.
- [9] 夏秋瑞,韩成龙,贾燕龙,等. 椎间盘微环境对干细胞疗法修复椎间盘的影响的研究概况[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(4):793-796,780.
- [10] 刘汝银,岳宗进,彭晓艳,等. 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[J]. 第三军医大学学报,2016,38(15):1755-1761.

而对于已活化的 T 细胞, B7-H1 则通过 B7-H1/PD-1 信号通道发挥抑制 T 细胞作用。因此, 根据本实验结果我们可以推测, OLP 患者与健康成人的外周血淋巴细胞表面的 B7-H1 分子很可能通过不同的受体通道, 发挥不同的细胞调节作用。而其具体作用过程及机制则需进一步实验来证明。OLP 虽然是一种发生于口腔黏膜局部的疾病, 但是许多研究表明, OLP 患者全身的免疫状态存在异常^[12-13]。外周血液标本的采取更加安全、方便, 对患者的创伤较小, 因此本实验立足于从全身角度来探讨 B7-H1/PD-1 信号通道在 OLP 发病中的作用。

综上所述, 本文研究发现 B7-H1/PD-1 参与负性调控 OLP 中 T-T 细胞介导的免疫反应; OLP 外周血 T 细胞上 B7-H1 的表达水平可作为监测 OLP 疾病严重程度的指标; 针对 B7-H1/PD-1 的激动剂可为 OLP 提供新的分子治疗手段。

参考文献

[1] 宋韦智, 张达, 颜世果, 等. CXC 类趋化因子 12 及其受体在口腔扁平苔藓中的表达 [J]. 临床口腔医学杂志, 2015, 31 (2): 67-70.

[2] 杜观环, 唐国瑶. SCF/c-Kit 蛋白在 OLP 中的表达及作用探讨 [J]. 临床口腔医学杂志, 2014, 30 (7): 387-390.

[3] Zhou G, Zhang J, Ren XW, et al. Increased B7-H1 expression on pe-

ripheral blood T cells in oral lichen planus correlated with disease severity [J]. J Clin Immunol, 2012, 32 (4): 794-801.

- [4] 孙国全, 张子宁, 刘静, 等. HIV/AIDS 患者 B7-H1 的表达特点及与疾病进展关系研究 [J]. 中华检验医学杂志, 2011, 34 (7): 623-627.
- [5] 张特. 不同细胞角蛋白与人口腔扁平苔藓的相关性及对免疫功能的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2013, 33 (8): 1918-1919.
- [6] 姜梦雨. 口腔扁平苔藓发病机制中 T 淋巴细胞作用及分布变化的研究进展 [J]. 临床口腔医学杂志, 2013, 29 (3): 189-191.
- [7] 袁月. 口腔扁平苔藓的致病因素及药物治疗研究 [J]. 现代养生, 2015 (6): 35-36.
- [8] 樊晓瑜, 杨建堂, 王凯. IL-18 与口腔扁平苔藓的相关性研究进展 [J]. 中国医药指南, 2016, 14 (11): 37-38.
- [9] 李相如, 李爱霞. TNF- α 、IFN- γ 对口腔扁平苔藓 CD4⁺、CD8⁺ T 细胞表达的影响 [J]. 广东医学, 2015, 36 (18): 2835-2837.
- [10] 王一敏, 傅升, 周冰, 等. 口腔黏膜扁平苔藓患者应用激素治疗时 Th1/Th2 的应答模式及 T 细胞平衡相关性分析 [J]. 中国医学前沿杂志 (电子版), 2014, 6 (11): 30-33.
- [11] 陈琼, 蔡扬, 丰秋婧. 口腔扁平苔藓患者外周血 IFN- γ 、IL-4 和 IL-17 的表达及意义 [J]. 实用口腔医学杂志, 2014, 30 (5): 698-700.
- [12] 付伟, 蔡扬, 潘玉霞, 等. 口腔扁平苔藓病损区细胞间黏附分子 1、干扰素 γ 表达及意义 [J]. 实用口腔医学杂志, 2010, 26 (4): 519-522.
- [13] 何娟, 蔡扬. 口腔扁平苔藓病损区 STAT1 和 IFN- γ 的表达 [J]. 四川大学学报 (医学版), 2014, 45 (1): 70-73.

收稿日期: 2017-05-08 修回日期: 2017-06-05 编辑: 王国品

(上接第 1475 页)

[11] 路康, 杨匡, 李海音, 等. 髓核细胞来源外泌体对骨髓间充质干细胞向髓核样细胞分化的作用 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2016, 26 (10): 933-938.

[12] 张伟, 朱肖奇, 张德才. 过表达 Shootin1 的骨髓间充质干细胞移植治疗脊髓损伤 [J]. 中国组织工程研究, 2016, 20 (50): 7507.

[13] 胡浪, 李大鹏, 张志坚, 等. 骨髓间充质干细胞对退变髓核细胞

功能的逆转作用 [J]. 中国医学科学院学报, 2014, 36 (1): 25.

- [14] 胡浪, 李大鹏, 黄永辉. 正常及退变髓核细胞诱导骨髓间充质干细胞向髓核方向分化效果比较 [J]. 南京医科大学学报 (自然科学版), 2014, 34 (5): 621-626.

收稿日期: 2017-05-05 修回日期: 2017-06-15 编辑: 周永彬