

干细胞与髓核细胞相互作用及其机制研究进展

陈胜 邓享誉 马凯歌 赵磊 邵增务

摘要 近年来,以干细胞为核心的生物治疗技术成为修复椎间盘退行性变(IVDD)的主要手段,其主要通过干细胞与椎间盘内髓核细胞的相互作用修复 IVDD。髓核细胞通过影响干细胞形态,促进干细胞向椎间盘迁移和募集,并促进其向髓核细胞分化。干细胞可以增强髓核细胞的合成代谢,减少分解代谢,抑制炎症反应,并能促进髓核细胞增殖,减少细胞凋亡。干细胞与髓核细胞相互作用的机制主要为直接接触和旁分泌。该文对干细胞与髓核细胞相互作用及其机制的研究进展作一综述。

关键词 干细胞;髓核细胞;椎间盘退行性变;生物学治疗;作用机制

DOI: 10.3969/j.issn.1673-7083.2017.06.010

腰背部疼痛是常见的骨骼肌肉系统疾病,椎间盘退行性变(IVDD)是引起腰背部疼痛的重要原因^[1]。以干细胞为核心的生物学治疗因能从组织学上根本逆转 IVDD 而成为近年的研究热点^[2]。其主要思路是,通过补充外源性干细胞或调动内源性干细胞,使干细胞与椎间盘内髓核细胞相互作用,提高髓核细胞的生物活性及或使干细胞分化为髓核样细胞,从而修复 IVDD。因此,研究干细胞与髓核细胞的相互作用及其机制具有重要意义。

1 髓核细胞对干细胞生物学行为的影响

IVDD 生物学治疗使用的干细胞包括外源性间充质干细胞和原椎间盘内存在的干细胞^[3]。髓核细胞通过影响干细胞的形态,促进其向椎间盘迁移和募集,并促进其向髓核细胞分化。

1.1 对干细胞形态和分化的影响

干细胞因来源不同,细胞形态有所差别,但大致呈长梭形^[4],髓核细胞一般呈圆形或多角形。武海军等^[5]观察到,兔髓核细胞可以使骨髓间充质干细胞的形态由长梭形变为多角形或短梭形,其形态接近髓核细胞。除了对干细胞形态的影响,髓核细胞还可以促进干细胞向髓核细胞分化。通常,用Ⅱ型胶原(COL2)、聚集蛋白聚糖(ACAN)和 SOX9 的表达水平来评估干细胞是否向髓核细胞分化^[6]。

Allon 等^[7]利用双层细胞团体系将髓核细胞与间充质干细胞共培养,3 周后检测结果显示,与干细胞组相比,共培养组 COL2A1、ACAN 和 SOX9 的表达水平均增高。Dai 等^[8]将脂肪间充质干细胞与髓核细胞共培养 1 周后也得到相同的结果,且发现动态压力可以进一步增强该表达。由于其他细胞如软骨细胞也可以表达 COL2A1、ACAN 和 SOX9,所以近年来有研究^[6,9]筛选出髓核细胞表型特异性标志基因,如细胞角蛋白(KRT)19、叉头框蛋白(FOX)F1、碳酸酐酶(CA)12、缺氧诱导因子(HIF)-1 等,用来评估干细胞是否向髓核细胞分化。Han 等^[10]将黄韧带干细胞与髓核细胞共培养发现,不论在正常氧环境还是低氧环境下,KRT19、CA12 和 HIF-1 在干细胞中的表达均增加,但低氧环境下 FOXF1 表达不增加。尽管髓核表型可用于评估干细胞移植后是否向髓核细胞分化,但是目前尚缺乏全面和统一的认识^[11]。

1.2 对干细胞迁移和募集的影响

椎间盘干细胞巢内的干细胞沿相应路径迁移至椎间盘是椎间盘内源性修复的机制之一,也是当前研究的热点^[12]。趋化干细胞迁移的因子分为趋化因子、细胞因子和生长因子 3 类,包括基质细胞衍生因子(SDF)-1、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、转化生长因子(TGF)- β 和白细胞介素(IL)-1 β 等^[13]。这些因子与相应受体如(SDF-1)/CXCR4、(CXCL5)/CXCR2 等结合,对干细胞迁移起趋化作用^[14]。Liu 等^[15]将间充质干细胞与退变髓核细胞直接接触共培养,发现干细胞表达 SDF-1 升高。而 SDF-1 可以与

基金项目:国家重点研发计划重点专项(2016YFC1100100)、国家自然科学基金重大研究计划(91649204)

作者单位:430022 武汉, 华中科技大学同济医学院附属协和医院骨科

通信作者:邵增务 E-mail:SZWpro@163.com

CXCR-4 结合,趋化干细胞迁移和募集。Feng 等^[16]研究发现,随着 IVDD 进展,髓核细胞表达趋化因子 N-乙酰-脯氨酸-甘氨酸-脯氨酸 (N-Ac-PGP) 水平升高,而 N-Ac-PGP 可以上调其受体 CXCR1 和 CXCR2 在软骨终板干细胞中的表达,从而增强软骨终板干细胞的趋化性,促进其从软骨终板向髓核迁移和募集。

2 干细胞对髓核细胞生物学行为的影响

髓核细胞数量减少和功能减退是 IVDD 的病理生理基础之一。研究显示,干细胞与髓核细胞相互作用后,可以增强髓核细胞合成代谢,减少分解代谢,抑制炎症反应,并能促进髓核细胞增殖,减少细胞凋亡。

2.1 对髓核细胞代谢和炎症反应的影响

随着 IVDD 进展,髓核细胞功能减退。一方面髓核细胞 COL2、ACAN 等表达下降,致基质合成减少,另一方面基质金属蛋白酶 (MMP)、聚集蛋白聚糖酶等降解酶表达上升,致基质分解增多^[17]。此外,退变的髓核细胞还可产生一系列炎症因子如 IL-6、IL-8、IL-1 β 、IL-17 和 TNF- α ^[18],促进炎症反应发生。Ouyang 等^[19]将间充质干细胞与髓核细胞以细胞微球的形式共培养,发现在模拟椎间盘低氧、炎症条件下,共培养体系中合成代谢基因 COL2 及 ACAN 表达上调,分解代谢基因 MMP-13 和解聚蛋白样金属蛋白酶 (ADAMTS)-5 表达显著下降,髓核细胞的合成功能得到恢复,而分解代谢减少。Cao 等^[20]研究发现,间充质干细胞可以通过上调 TGF- β 抑制核因子 (NF)- κ B 信号转导通路,延缓髓核基质降解。Yang 等^[21]进一步研究发现,间充质干细胞可以分泌 TGF- β 1,与髓核细胞作用后促进 I κ B 磷酸化,抑制 NF- κ B 信号转导通路,不仅上调 COL2 和 ACAN 的表达,还起到抗炎性反应的作用。

2.2 对髓核细胞增殖和凋亡的影响

在退变椎间盘中,低氧、高渗、过度压力、低 pH 等不利微环境不仅会造成髓核细胞功能减退,还会使髓核细胞发生衰老、自噬和凋亡^[22-24]。Chen 等^[25]研究显示,过度压力可以诱导髓核细胞发生坏死性凋亡。这些因素都会导致髓核细胞数量减少。Song 等^[26]发现,脂肪间充质干细胞可促进退变髓核细胞基质产生及增殖。Hu 等^[27]将鼠骨髓间充质干细胞与髓核细胞分别进行间接接触共培养和直接接触共培养,发现在 IL-1 β 模拟椎间盘炎症环境条件下,干细胞可以分别通过旁分泌和隧道纳米管途

径抑制髓核细胞的凋亡。Sun 等^[28]发现,在压力条件下,脂肪间充质干细胞不仅降低了髓核细胞促炎因子 IL-1 β 、IL-6、TGF- β 1 和 TNF- α 的表达,还使髓核细胞半胱氨酸蛋白酶 (caspases)-3、caspases-8 和 caspases-9 表达下降,抑制髓核细胞的凋亡。然而,目前尚未见干细胞对髓核细胞衰老、自噬和坏死性凋亡影响的报道,这可能是今后研究的重要方向。

3 干细胞与髓核细胞相互作用的机制

干细胞与髓核细胞相互作用的研究主要采用体外共培养的方法,体内研究较少。研究显示,其作用机制主要为直接接触和旁分泌,直接接触又包括细胞融合、缝隙连接和膜物质交换等。

3.1 细胞融合

Richardson 等^[29]将人髓核细胞和骨髓间充质干细胞分别进行间接接触共培养和直接接触共培养,1 周后发现,直接接触组髓核细胞和干细胞的髓核标志基因均显著升高,而间接接触组则未见改变;认为直接接触是人髓核细胞与干细胞相互作用的机制。

细胞融合是干细胞可塑性和再生潜能的重要机制,属于直接接触机制之一^[30]。Niu 等^[31]用 PKH26 和 PKH67 分别标记间充质干细胞和髓核细胞,流式细胞学检测发现 42% 的细胞在共培养后同时表达 2 种 PKH,组织学染色显示细胞出现双核,这些结果均提示干细胞和髓核细胞发生了细胞融合。Vadalà 等^[32]则提出了否定性意见,他们采用 X 和 Y 染色体原位杂交技术分析共培养的干细胞和髓核细胞,发现所有细胞均含有正常的性染色体,因此认为细胞融合机制可能并非干细胞与髓核细胞相互作用的主要机制。

3.2 缝隙连接

缝隙连接是相邻细胞胞质间的大分子蛋白通道,由相邻的 2 个细胞各提供 1 个缝隙连接蛋白,端到端对接组成。这些通道允许细胞之间交换营养物质、代谢产物、水、离子和相对分子质量 < 1 000 的小分子物质。缝隙连接参与细胞的增殖、分化、代谢、免疫反应等多种生物过程,是细胞间相互交流的重要机制^[33]。Strassburg 等^[34]将人骨髓间充质干细胞和髓核细胞进行直接接触共培养,用透射电镜观察发现,两种细胞直接接触部位存在与缝隙连接相似的结构。但进行钙黄绿素转移实验并未发现钙黄绿素通过该结构转移,直接接触部位的缝隙连接蛋白-43 也显示免疫阴性。因此,缝隙连接在干细

胞与髓核细胞相互作用机制中可能不起主要作用。

3.3 膜物质交换

除了细胞融合和缝隙连接,双向膜物质交换也属于直接接触机制。Strassburg 等^[34]利用亲脂性染料 DiL 和非亲脂性荧光染料 CFDA 同时标记干细胞或髓核细胞,然后与非标记的髓核细胞或干细胞进行直接共培养,1 周后流式细胞学检测发现,原非标记的细胞上有 DiL,但无 CFDA,由此提出干细胞与髓核细胞可能通过膜物质交换进行交流,同时通过透射电镜在共培养的培养基中发现了 30 nm~1 μ m 大小类似微泡的圆状结构,这提示膜物质交换的媒介可能是一种细胞微泡。Lehmann 等^[35]用亲脂性荧光染料 DiD 和 DiO 分别标记干细胞和髓核细胞,共培养后流式细胞学检测发现,超过 50% 的细胞出现双染,共聚焦显微镜显示干细胞和髓核细胞间建立了类似隧道纳米管的结构,认为该结构是干细胞与髓核细胞间膜物质交换的通道。

3.4 旁分泌

Richardson 等^[29]认为,只有直接接触才能使干细胞与髓核细胞之间发生相互交流。但 Lu 等^[36]利用 Transwell 培养板将人脂肪间充质干细胞微团与髓核细胞微团间接接触共培养,发现干细胞向软骨方向分化,髓核基质合成基因表达上调,提出髓核细胞可通过旁分泌机制分泌可溶性因子,使非直接接触的干细胞向髓核方向分化。Stoyanov 等^[37]的研究持相同观点,并且发现低氧和生长分化因子(GDF)-5 可加强该作用。近年研究也证实,干细胞和髓核细胞可以通过旁分泌机制表达一系列细胞因子如促分化的 TGF- β 1、GDF-5、胰岛素样生长因子-1、成纤维细胞生长因子-2^[38],促迁移募集的 N-Ac-PGP、SDF-1^[15-16],抗炎的 TGF- β 1^[21],抗分解代谢的骨形态发生蛋白-7^[39],促炎因子 TNF- α 、IL-1、IL-2、前列腺素 E2^[40]等,这些因子会对两种细胞的各种生物学行为产生影响。以上研究显示,旁分泌是干细胞与髓核细胞相互作用的重要机制之一。

4 结语

在 IVDD 治疗上,以干细胞为核心的生物学治疗发展迅速,通过干细胞与髓核细胞生物学行为方面的相互作用来修复 IVDD 已取得一定进展。目前的问题主要在于较难模拟干细胞与髓核细胞相互作用的椎间盘微环境,体内研究较少,缺乏特异性髓核细胞表面分子标志,干细胞与髓核细胞相互作用的机制复杂,且尚未明确。随着对干细胞与髓核细胞

相互作用研究的深入,IVDD 的生物学治疗也将取得突破性进展。

参 考 文 献

- [1] Tong W, Lu Z, Qin L, et al. Cell therapy for the degenerating intervertebral disc[J]. Transl Res, 2017, 181: 49-58.
- [2] Sakai D, Andersson GB. Stem cell therapy for intervertebral disc regeneration: obstacles and solutions [J]. Nat Rev Rheumatol, 2015, 11(4):243-256.
- [3] Wang F, Shi R, Cai F, et al. Stem cell approaches to intervertebral disc regeneration: obstacles from the disc microenvironment[J]. Stem Cells Dev, 2015, 24(21):2479-2495.
- [4] 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.
- [5] 武海军,银和平,胡继平,等. 非接触共培养条件下骨髓间充质干细胞向类髓核细胞的诱导分化[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(45):6706-6713.
- [6] Choi H, Johnson ZI, Risbud MV. Understanding nucleus pulposus cell phenotype: a prerequisite for stem cell based therapies to treat intervertebral disc degeneration[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2015, 10(4):307-316.
- [7] Allon AA, Butcher K, Schneider RA, et al. Structured coculture of mesenchymal stem cells and disc cells enhances differentiation and proliferation[J]. Cells Tissues Organs, 2012, 196(2):99-106.
- [8] Dai J, Wang H, Liu G, et al. Dynamic compression and co-culture with nucleus pulposus cells promotes proliferation and differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells [J]. J Biomech, 2014, 47(5):966-972.
- [9] 孟祥超,王君,张兴凯. 低氧诱导因子-1 α 与椎间盘退变[J]. 国际骨科学杂志, 2015, 36(4):264-268.
- [10] Han XB, Zhang YL, Li HY, et al. Differentiation of human ligamentum flavum stem cells toward nucleus Pulposus-Like cells induced by coculture system and hypoxia[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2015, 40(12):E665-E674.
- [11] Thorpe AA, Binch AL, Creemers LB, et al. Nucleus pulposus phenotypic markers to determine stem cell differentiation:fact or fiction?[J]. Oncotarget, 2016, 7(3): 2189-2200.
- [12] Shi R, Wang F, Hong X, et al. The presence of stem cells in potential stem cell niches of the intervertebral disc region: an in vitro study on rats[J]. Eur Spine J, 2015, 24(11):2411-2424.
- [13] Nitzsche F, Müller C, Lukomska B, et al. Concise review: MSC adhesion cascade-insights into homing and transendothelial migration[J]. Stem Cells, 2017, 35(6):1446-1460.
- [14] Zhao Y, Zhang H. Update on the mechanisms of homing of

- adipose tissue-derived stem cells[J]. *Cytotherapy*, 2016, 18(7):816-827.
- [15] Liu MH, Bian BS, Cui X, et al. Mesenchymal stem cells regulate mechanical properties of human degenerated nucleus pulposus cells through SDF-1/CXCR4/AKT axis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1863(8):1961-1968.
- [16] Feng C, Zhang Y, Yang M, 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.
- [17] Priyadarshani P, Li Y, Yao L. Advances in biological therapy for nucleus pulposus regeneration[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016, 24(2):206-212.
- [18] Fontana G, See E, Pandit A. Current trends in biologics delivery to restore intervertebral disc anabolism [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, 84:146-158.
- [19] Ouyang A, Cerchiari AE, Tang X, et al. Effects of cell type and configuration on anabolic and catabolic activity in 3D co-culture of mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells[J]. *J Orthop Res*, 2017, 35(1):61-73.
- [20] Cao C, Zou J, Liu X, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells slow intervertebral disc degeneration through the NF- κ B pathway[J]. *Spine J*, 2015, 15(3):530-538.
- [21] Yang H, Cao C, Wu C, et al. TGF- β 1 suppresses inflammation in cell therapy for intervertebral disc degeneration[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:13254.
- [22] Liu J, Tao H, Wang H, et al. Biological behavior of human nucleus pulposus mesenchymal stem cells in response to changes in the acidic environment during intervertebral disc degeneration[J]. *Stem Cells Dev*, 2017, 26(12):901-911.
- [23] Wang F, Cai F, Shi R, et al. Aging and age related stresses; a senescence mechanism of intervertebral disc degeneration [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016, 24(3):398-408.
- [24] Shen J, Xu S, Zhou H, et al. IL-1 β induces apoptosis and autophagy via mitochondria pathway in human degenerative nucleus pulposus cells[J]. *Sci Rep*, 2017, 7:41067.
- [25] Chen S, Lv X, Hu B, et al. RIPK1/RIPK3/MLKL-mediated necroptosis contributes to compression-induced rat nucleus pulposus cells death[J]. *Apoptosis*, 2017, 22(5):626-638.
- [26] Song K, Gu T, Shuang F, et al. Adipose-derived stem cells improve the viability of nucleus pulposus cells in degenerated intervertebral discs[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(3):4664-4668.
- [27] Hu J, Deng G, Tian Y, et al. An in vitro investigation into the role of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the control of disc degeneration[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(4):5701-5708.
- [28] Sun Z, Luo B, Liu ZH, et al. Adipose-derived stromal cells protect intervertebral disc cells in compression: implications for stem cell regenerative disc therapy[J]. *Int J Biol Sci*, 2015, 11(2):133-143.
- [29] Richardson SM, Walker RV, Parker S, et al. Intervertebral disc cell-mediated mesenchymal stem cell differentiation[J]. *Stem Cells*, 2006, 24(3):707-716.
- [30] Willkomm L, Bloch W. State of the art in cell-cell fusion[J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1313:1-19.
- [31] Niu CC, Yuan LJ, Lin SS, et al. Mesenchymal stem cell and nucleus pulposus cell coculture modulates cell profile[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2009, 467(12):3263-3272.
- [32] Vadalà G, Studer RK, Sowa G, et al. Coculture of bone marrow mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells modulate gene expression profile without cell fusion [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2008, 33(8):870-876.
- [33] Villanelo F, Escalona Y, Pareja-Barrueto C, et al. Accessing gap-junction channel structure-function relationships through molecular modeling and simulations [J]. *BMC Cell Biol*, 2017, 18(Suppl 1):5.
- [34] Strassburg S, Hodson NW, Hill PI, et al. Bi-directional exchange of membrane components occurs during co-culture of mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3):e33739.
- [35] Lehmann TP, Filipiak K, Juzwa W, et al. Co-culture of human nucleus pulposus cells with multipotent mesenchymal stromal cells from human bone marrow reveals formation of tunnelling nanotubes[J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(2):574-582.
- [36] Lu ZF, Zandieh Doulabi B, Wuisman PI, et al. Differentiation of adipose stem cells by nucleus pulposus cells: configuration effect [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 359(4):991-996.
- [37] Stoyanov JV, Gantenbein-Ritter B, Bertolo A, et al. Role of hypoxia and growth and differentiation factor-5 on differentiation of human mesenchymal stem cells towards intervertebral nucleus pulposus-like cells[J]. *Eur Cell Mater*, 2011, 21:533-547.
- [38] Feng C, Liu H, Yang Y, et al. Growth and differentiation factor-5 contributes to the structural and functional maintenance of the intervertebral disc [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35(1):1-16.
- [39] Xu J, E XQ, Wang NX, et al. BMP7 enhances the effect of BMSCs on extracellular matrix remodeling in a rabbit model of intervertebral disc degeneration[J]. *FEBS J*, 2016, 283(9):1689-1700.
- [40] Cai F, Zhu L, Wang F, et al. The paracrine effect of degenerated disc cells on healthy human nucleus pulposus cells is mediated by MAPK and NF- κ B pathways and can be reduced by TGF- β 1[J]. *DNA Cell Biol*, 2017, 36(2):143-158.

(收稿:2017-06-14;修回:2017-10-20)

(本文编辑:杨晓娟)