

骨髓间充质干细胞治疗椎间盘退变的研究进展

赵泽 张洋 王娟 陈长青

【摘要】 **目的** 总结骨髓间充质干细胞(BMSCs)治疗椎间盘退变(IDD)的相关研究成果,为 BMSCs 治疗 IDD 的临床应用提供理论基础。**方法** 计算机检索 CNKI 数据库和 ISI Web of Knowledge 数据库,限定时间为 2000—2014 年,中英文检索词分别为“骨髓间充质干细胞、细胞治疗、椎间盘退变”和“bone marrow mesenchymal stem cells, cell therapy, intervertebral disc degeneration”。从检索所得的论文中选择近期刊杂志上发表的与 BMSCs 治疗 IDD 密切相关的实验研究或临床研究,排除重复性研究、Meta 分析以及综述类文章,主要从 BMSCs 的分离培养和生物学特性、BMSCs 向椎间盘细胞分化的影响因素、BMSCs 体内移植治疗 IDD 的研究等方面对所纳入的文章进行分析总结。**结果** BMSCs 能取得足够量的细胞,具有较低的免疫原性和良好的分化潜能,以其作为 IDD 基因治疗靶细胞具有显著的优越性。在改善退变椎间盘内的微环境、一定的支架材料的培养体系、细胞因子的刺激诱导、与椎间盘细胞共培养等条件下,BMSCs 可以向髓核细胞分化,表达蛋白多糖和 II 型胶原。无论是自体还是同种异体,甚至是异种 BMSCs 移植均可以在退变椎间盘内长期存活、增殖,促进椎间盘细胞基质分泌,从而有效缓解 IDD 进程。**结论** 随着对 BMSCs 和细胞治疗的研究,目前对 BMSCs 移植治疗 IDD 已经进行了大量研究并取得了一定的成果,但是真正将其应用到临床上,仍然存在很多问题,需要进一步研究解决。

【关键词】 骨髓祖代细胞; 间质干细胞; 细胞治疗; 椎间盘退变

Treatment of intervertebral disc degeneration by bone marrow mesenchymal stem cell transplantation Zhao Ze, Zhang Yang, Wang Juan, Chen Changqing. Department of Orthopedics, the Second People's Hospital of Jiaozuo, Jiaozuo 454001, China
Corresponding author: Chen Changqing, Email: chenchangqing369@126.com

【Abstract】 **Objective** To review the research and progress of treating intervertebral disc degeneration (IDD) by using BMSCs transplantation, and provide theoretical basis for further basic researches. **Methods** CNKI database and ISI Web of Knowledge database from 2000 to 2014 were retrieved by the first author with the key words of "bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs), cell therapy, intervertebral disc degeneration (IDD)" in Chinese and in English, respectively. The biological characteristics and cultivation of BMSCs, the influence factors of BMSCs differentiate into intervertebral disc cells and cell therapy for IDD by BMSCs transplantation in vivo were summarized. **Results** We can obtain enough amount of BMSCs. BMSCs has low immunogenicity and good differentiation potential, and these make BMSCs a very good seed cell source for cell therapy of IDD. Under the condition of improving the micro environment of IDD, or a special support material system for cell cultivation, or the induction of cytokines, or co-cultured with intervertebral disc cell, BMSCs can differentiate into nucleus pulposus cells, express proteoglycan and collagen-Ⅱ. Whether autograft or allograft, even heterogeneous, BMSCs can survive and propagate in degenerative intervertebral disc for long-term, promote the secretion of intervertebral disc cells matrix. **Conclusions** As the study of BMSCs and cellular therapy, a lot of work has been done on treating IDD by using BMSCs transplantation and we have made some achievements. Although using BMSCs transplantation in the treatment of IDD also shows huge application prospect, there are still many problems need to be solved before applying it in clinical treatment.

【Key words】 Myeloid progenitor cells; Mesenchymal stem cells; Cell therapy; Intervertebral disc degeneration

下腰痛是一种多见的临床症状,严重影响许多患者的生活质量,病因有很多,其中最重要的原因是椎间盘退变

(intervertebral disk degeneration, IDD)^[1]。至今,临床上对 IDD 仍无有效的预防措施和理想的治疗方法。传统保守治疗方法虽然可在一定程度上缓解由 IDD 引起的临床症状,但只是对症治疗,并不能解决根本问题;而手术治疗有可能在术后发生诸多并发症。由于传统治疗方法的局限性,IDD 的细胞治疗现在得到了越来越广泛的研究,而且已经被证明为治疗 IDD 的一种很有前途的方法。

1 椎间盘结构及其退变机制

椎间盘由 3 部分组成:中间的髓核,上下的软骨终板以及周围的纤维环。髓核是水凝胶样的组织,位于两个软骨终板之间,髓核的主要成分是蛋白聚糖,其他的成分还有 II 型、VI 型胶原蛋白和一些纤维成分。软骨终板类似于关节软骨,起到把椎体血管所输送的营养物质传递到椎间盘的功能。纤维环包绕在髓核的周围,由 15~25 层同心圆状的致密的胶原纤维构成,主要成分有 I 型、II 型和 III 型胶原蛋白。

IDD 是一个多因素参与的慢性过程,退变椎间盘共同表现为髓核细胞数量减少和功能降低,II 型胶原蛋白、蛋白聚糖等基质大分子降解,随即椎间盘内营养、渗透压下降和生物力学功能障碍,最终进一步恶化和加速退变。IDD 的机制目前尚无定论,有椎间盘营养供应减少、椎间盘细胞凋亡失衡、基质酶活性改变、生物力学机制、生物学机制等学说。

2 骨髓间充质干细胞

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是存在于骨髓中的非造血干细胞,具有在体外培养容易贴壁生长、形成集落、分化成定向祖细胞的特点。由于 BMSCs 具有多向分化潜能,条件适宜的情况下可以诱导分化成多种细胞。近年来,以 BMSCs 为种子细胞进行的组织修复工程的研究十分广泛,并取得了极大进展,甚至已经用于相关疾病的临床治疗^[2-3]。BMSCs 能取得足量的细胞,具有较低的免疫原性和良好的分化潜能,可以作为细胞 IDD 治疗的种子细胞。

2.1 BMSCs 的分离、培养

常用的 BMSCs 有人、兔、鼠和犬 BMSCs。相对于其他种子细胞,BMSCs 具有取材方便的优势。在符合医学伦理学或者实验动物伦理学的规定下,常规骨髓穿刺术即可取得人的骨髓,用于分离培养 BMSCs,整个取材过程对人体的伤害非常小。目前,获取动物骨髓常用方法是将动物处死后,去双侧胫骨和股骨,并从骨髓腔中取得骨髓,或者直接将骨头研碎,再用缓冲液冲洗,以获得骨髓成分。

分离 BMSCs 常用的方法有全骨髓培养法和密度梯度离心法。全骨髓培养法即将全部骨髓成分提取后,与培养基置于培养器皿中,利用 BMSCs 自身的贴壁特性,定期换液除去不贴壁细胞,以得到纯化的 BMSCs。密度梯度离心法即根据骨髓中细胞成分比重的不同,将获得的骨髓细胞悬液按一定比例加入分离液后进行密度梯度离心,提取单核细胞进行贴壁培养。获得纯化的 BMSCs 后,按常规的细胞培养和传代方法进行传代培养,即可获得大量表型稳定的 BMSCs。

2.2 BMSCs 的多向分化潜能

在体外干预因素下,BMSCs 不仅可向中胚层组织细胞如骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、心肌细胞、内皮细胞分化,也可跨中胚层向内、外胚层细胞如肝、肾、肌肉、皮肤、神经和心脏细胞分化。IDD 的一个重要原因就是椎间盘内有活力的细胞数目减少,因此要修复退变椎间盘,需要增加椎间盘内细胞密度。Richardson 等^[4]报道将 BMSCs 与髓核细胞直接接触共同培养,可以使 BMSCs 向髓核细胞分化,转录因子 SOX-9 和基质分子,尤其是 II 型胶原蛋白和蛋白聚糖的表达均增

加。Steck 等^[5]采用 3D 培养 BMSCs,并用转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 刺激 BMSCs,结果发现,分化后的 BMSCs 基因表达特征更接近椎间盘细胞,证明体外实验中在一定的条件下,BMSCs 可以向椎间盘细胞表型分化,这也使 BMSCs 作为种子细胞治疗 IDD 成为可能。

2.3 BMSCs 的免疫原性

BMSCs 具有很低的免疫原性,未分化的 BMSCs 低表达主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)-I,不表达 MHC-II;即使经干扰素(interferon, IFN)- γ 刺激可上调 MHC-I 和 MHC-II 表达,但由于缺乏共刺激分子,BMSCs 不能激活 T 淋巴细胞,可以逃避细胞毒性 T 细胞和 NK 细胞的杀伤,不会诱发同种异体排斥反应,也不会导致移植物抗宿主病的发生。因此,不仅自体 BMSCs 可以移植,同种异体 BMSCs 移植也成为可能。

治疗 IDD 种子细胞的要求:(1)获取容易,对机体损伤小,在体外能大量培养(稳定扩增和传代且细胞表型稳定);(2)具有较低的免疫原性;(3)定向分化能力强。BMSCs 完全符合这些要求,因此,BMSCs 是细胞移植治疗 IDD 非常理想的种子细胞。

3 BMSCs 向椎间盘细胞分化的影响因素

3.1 椎间盘微环境对 BMSCs 的影响

椎间盘髓核内基质含量丰富,主要包括水、蛋白多糖、胶原和非胶原蛋白。退变椎间盘中蛋白聚糖、糖胺聚糖含量明显下降,纤维环中 I、II 型胶原蛋白比例增高,而且椎间盘内呈现出低氧、低糖、低 pH 值和低渗透压的微环境。

研究表明,低氧分压较正常氧分压更有利于 BMSCs 向类髓核细胞分化^[6];低糖可以促进聚集蛋白多糖和 I 型胶原蛋白表达,而高渗透压和低 pH 值抑制细胞扩增和基质蛋白的表达^[7];高渗透压仅对个别受体来源的人 BMSCs 向软骨样细胞分化有抑制作用^[8];pH 值是限制 BMSCs 对椎间盘修复的主要原因,且这种抑制作用与 pH 值负相关^[9]。Felka 等^[10]研究发现,炎症介质白细胞介素-1 β 能使 BMSCs 扩增能力下降且细胞外基质蛋白分泌减少,表明炎症介质对干细胞的修复亦起到抑制作用。因此,如何改善椎间盘内 pH 值和炎症环境以提高干细胞治疗作用效果是亟待解决的问题。

3.2 支架材料对 BMSCs 的影响

目前,组织工程研究中,体外诱导 BMSCs 向髓核细胞分化最典型的培养方式是 3D 培养,3D 培养可模拟髓核的生理环境,从而诱导 BMSCs 向髓核细胞分化。理想的 3D 培养支架材料应该与椎间盘基质成分类似,能够体现体内椎间盘 3D 环境,具有生物降解性、生物相容性和力学特性等特点。目前,研究较多的支架材料有透明质酸、壳聚糖和多聚左旋乳酸支架。Collin 等^[11]利用透明质酸和 II 型胶原蛋白作为可注射型支架材料,实验组细胞增殖水平明显高于对照组,并且两者比例在 9.0:4.5 时,干细胞的增殖效果最佳。Richardson 等^[12]研究发现,BMSCs 在壳聚糖/甘油磷酸钠基质中表达软骨细胞表型并产生软骨细胞外基质。Richardson 等^[13]还在多聚左旋乳酸支架上用腺病毒-SOX-9 基因来诱导 BMSCs,结果 BMSCs 分化后有蛋白多糖和 II 型胶原蛋白的表达,证明了人 BMSCs 在多聚左旋乳酸支架上可以向髓核细

胞方向分化。

3.3 细胞因子对 BMSCs 的影响

细胞因子在 BMSCs 向椎间盘细胞分化、增殖以及细胞基质代谢等方面有着重要作用,常见的细胞因子包括 TGF- β 、骨形态发生蛋白、胰岛素样生长因子等。Ronziere 等^[14]利用 BMP-2/TGF- β 3 共同刺激 BMSCs 的定向分化,结果表明无论是在分化速度、数量上都有着显著的优势,且与单一细胞因子诱导研究相比较,更符合体内多因素联合调控的作用,使 BMSCs 更有利于向髓核细胞分化。胰岛素样生长因子是一种很强的合成代谢刺激因子,不仅促进 BMSCs 向软骨细胞分化,还能够抑制因为 TGF- β 引起的细胞外焦磷酸盐的过多聚集,防止形成焦磷酸盐结晶。

3.4 体外共培养研究

将 BMSCs 与髓核细胞共培养是常用的促进 BMSCs 向髓核细胞分化的方法。Richardson 等^[4]用人 NP 细胞与 BMSCs 接触共培养,培养 7 d 后发现 BMSCs 蛋白多糖和胶原的基因表达类似髓核细胞,认为髓核细胞可以诱导 BMSCs 向髓核细胞分化。

研究发现,将髓核细胞与 BMSCs 共培养均可以明显促进髓核细胞的细胞外基质蛋白和基因的表达,并且这种作用受细胞比例和培养方式的影响。将人髓核细胞和 BMSCs 按不同比例进行共培养,发现在旁分泌刺激的相互作用下,少量 BMSCs 即可显著提高髓核细胞作用,但 BMSCs 必须在大量 NP 细胞的条件下才能显著提高聚集蛋白多糖和 II 型胶原蛋白的表达^[15]。进一步研究发现,髓核细胞与干细胞共培养的比例为 75:25 和 50:50 时最佳^[16]。将兔 BMSCs 与髓核细胞分别进行细胞间的直接接触培养和非接触培养,结果表明,直接接触培养组细胞增殖及基质合成均增加,而非接触培养组则没有变化^[17]。

尽管 BMSCs 与髓核细胞共同培养能增加细胞增殖和蛋白聚糖合成,是髓核细胞诱导 BMSCs 分化为髓核细胞,还是 BMSCs 刺激髓核细胞增殖的同时促进基质合成尚未明确,但是大量研究结果证明,可以将未分化的 BMSCs 移植到退变椎间盘,通过与椎间盘内源性髓核细胞发生作用后,起到治疗 IDD 的效果^[18-25]。

4 体内移植研究

4.1 动物实验

Sakai 等^[18-19]首次将兔自体 BMSCs 用重组腺病毒 AD-LacZ 标记后,移植入退变的椎间盘内,4 周后组织切片的 X-gal 染色证实移植的 BMSCs 仍具活力,总蛋白聚糖与基质相关基因在移植细胞的椎间盘内得到显著的再生;24 周后相对于正常组,实验组兔椎间盘高度约为 91%、MRI 信号强度约为 81%,假手术组椎间盘高度约为 67%、MRI 信号强度约为 60%,实验组的椎间盘保留了髓核的环状结构,而假手术组的椎间盘结构却辨识不清;而且免疫组化及基因表达分析表明,实验组椎间盘中蛋白聚糖的积聚得到恢复;进一步利用绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 标记自体 BMSCs 观察体内存活和分化情况,发现 2 周后可在髓核区域观察到大量 GFP 阳性细胞,48 周时细胞数量明显增加,与对照组比较,蛋白多糖的含量显著恢复,细胞外基质的基因明

显高表达,并且一些 GFP 阳性细胞表达软骨细胞和髓核细胞相关分子表型。Serigano 等^[26]通过比较不同数量级 (10^5 、 10^6 和 10^7) 自体 BMSCs 对犬 IDD 的作用,发现细胞量为 1×10^6 时最佳。

Crevensten 等^[20]首次将荧光标记的同种异体 BMSCs 注射到大鼠的尾椎间盘内,在注射后第 7、14 天后 BMSCs 依然存在椎间盘内,但数量明显下降;28 天后 BMSCs 数量恢复到原来数量,其存活率是 100%;相对于对照组来说,实验组的椎间盘高度有上升趋势,且未出现免疫反应,说明同种异体 BMSCs 能在大鼠椎间盘内存活并增殖且不会引起免疫反应。之后,有研究人员分别观察了异体 BMSC 对兔、犬和猪 IDD 的作用,也得到了类似的结果^[21-22]。

Jeong 等^[23]将人 BMSCs 移植入鼠尾 IDD 模型中,发现干细胞至少可以存活 2 周,且 6 周后蛋白多糖及 II 型胶原蛋白的表达增加,椎间盘高度和信号强度均得到明显改善,内层纤维环结构也得到修复,且均未发现免疫反应。

上述研究表明,无论是自体还是同种异体,甚至是异种 BMSCs 移植均可以在退变椎间盘内长期存活、增殖,促进椎间盘细胞基质分泌,从而有效缓解 IDD 进程。

4.2 临床研究

近年来,有学者将 BMSCs 移植治疗 IDD 应用到临床上,并取得了一定成果。

Yoshikawa 等^[24]首次将自体 BMSCs 移植用于人体椎间盘再生的治疗。在为 2 名 IDD 患者进行手术前,先取自体髂骨骨髓,将其用含自体血清的培养基培养,制成 BMSCs 备用;手术中给予患者椎板开窗减压,然后经皮将含 BMSCs 的胶原海绵移植到退变椎间盘内;术后患者腰腿疼痛缓解,2 年后影像学发现髓核内真空现象消失、信号增强,而且无明显不良反应。有研究表明^[27],这种疼痛缓解的机制可能与 BMSCs 能够减少 IgG 和肿瘤坏死因子 α 的表达,并增加抗炎因子 TGF- β 1 的表达有关,但同时也无法排除是否由开窗减压和髓核摘除引起。尽管如此,该研究中发现了髓核内信号的增强,表明髓核内可能出现了髓核细胞的再生和/或细胞外基质分泌增加,这可能与 BMSCs 密切相关。

最近,Orozco 等^[25]系统观察了 10 例自体 BMSCs 直接注射植入髓核内治疗腰椎 IDD(纤维环完整)伴慢性腰腿痛的短期疗效和安全性;随访 1 年,9 例腰腿痛迅速缓解,1 例无效,疼痛评分、Oswestry 功能障碍指数均得到明显改善,并与时间呈正相关性,且改善主要发生在前 3 个月;MRI 显示退变椎间盘的高度虽然没有得到恢复,但其液体含量明显增加,且未见明显不良反应。这进一步证实了自体 BMSCs 移植治疗的疗效和安全性。虽然 BMSCs 在体内生存情况和发挥作用的机制尚不清楚,且该研究缺乏有效实验对照,病例数较少,随访时间较短,评价指标过于主观且结论被夸大,但该研究还是为使用自体 BMSCs 移植治疗 IDD 带来了希望。

虽然目前对 BMSCs 移植治疗 IDD 已经进行了大量研究并取得了一定的成果,也展现出了巨大的临床应用前景,但是距离真正将 BMSCs 移植治疗 IDD 应用于临床,仍然有很多问题需要解决:(1)IDD 形成发展的机制尚未明确;(2)动物 IDD 模型与人类椎间盘在结构和退变机制不同,寻求与人类高度相似的模型还需深入研究;(3)髓核细胞的表型目前

不确定;(4)如何避免 BMSCs 移植后可能出现的并发症,如椎体后方或位置不确定的骨赘形成;(5)远期疗效和安全性;(6)临床研究病例极少,尚不能充分证明 BMSCs 应用于治疗 IDD 的可行性等。上述问题限制 BMSCs 移植治疗 IDD 在临床的应用;但是,相信在不久的将来,随着相关研究的不断深入,BMSCs 移植可望成为临床治疗 IDD 的有效方法。

参 考 文 献

- [1] Samartzis D, Karppinen J, Mok F, et al. A population-based study of juvenile disc degeneration and its association with overweight and obesity, low back pain, and diminished functional status[J]. *J Bone Joint Surg*, 2011, 93(7): 662-670.
- [2] Si YL, Zhao YL, Hao HJ, et al. MSCs: biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns[J]. *Ageing Res Rev*, 2011, 10(1): 93-103.
- [3] 黎叶飞, 盛祖龙, 姚玉宇, 等. 两种骨髓间充质干细胞移植途径治疗急性心肌梗死的比较研究[J]. *东南大学学报: 医学版*, 2011, 30(5): 687-691.
- [4] Richardson SM, Walker RV, Parker S, et al. Intervertebral disc cell-mediated mesenchymal stem cell differentiation[J]. *Stem cells*, 2006, 24(3): 707-716.
- [5] Steck E, Bertram H, Abel R, et al. Induction of intervertebral disc-like cells from adult mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cells*, 2005, 23(3): 403-411.
- [6] 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.
- [7] Wuertz K, Godburn K, Neidlinger-Wilke C, et al. Behavior of mesenchymal stem cells in the chemical microenvironment of the intervertebral disc[J]. *Spine(Phila Pa 1976)*, 2008, 33(17): 1843.
- [8] Mietsch A, Neidlinger-Wilke C, Schrezenmeier H, et al. Evaluation of platelet-rich plasma and hydrostatic pressure regarding cell differentiation in nucleus pulposus tissue engineering[J]. *J Tissue Eng Regen M*, 2013, 7(3): 244-252.
- [9] Wuertz K, Godburn K, Iatridis JC. MSC response to pH levels found in degenerating intervertebral discs[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 379(4): 824-829.
- [10] Felka T, Schäfer R, Schewe B, et al. Hypoxia reduces the inhibitory effect of IL-1 β on chondrogenic differentiation of FCS-free expanded MSC[J]. *Osteoarthr Cartilage*, 2009, 17(10): 1368-1376.
- [11] Collin EC, Grad S, Zeugolis DI, et al. An injectable vehicle for nucleus pulposus cell-based therapy[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(11): 2862-2870.
- [12] Richardson SM, Hughes N, Hunt JA, et al. Human mesenchymal stem cell differentiation to NP-like cells in chitosan-glycerophosphate hydrogels[J]. *Biomaterials*, 2008, 29(1): 85-93.
- [13] Richardson SM, Curran JM, Chen R, et al. The differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into chondrocyte-like cells on poly-L-lactic acid (PLLA) scaffolds[J]. *Biomaterials*, 2006, 27(22): 4069-4078.
- [14] Ronzière MC, Perrier E, Mallein-Gerin F, et al. Chondrogenic potential of bone marrow-and adipose tissue-derived adult human mesenchymal stem cells[J]. *Bio med Mater Eng*, 2010, 20(3): 145-158.
- [15] Yang SH, Wu CC, Shih TT F, et al. In vitro study on interaction between human nucleus pulposus cells and mesenchymal stem cells through paracrine stimulation[J]. *Spine*, 2008, 33(18): 1951-1957.
- [16] Ruan D, Zhang Y, Wang DL, et al. Differentiation of human Wharton's jelly cells toward nucleus pulposus-like cells after coculture with nucleus pulposus cells in vitro[J]. *Tissue Eng Part A*, 2011, 18(1-2): 167-175.
- [17] Yamamoto Y, Mochida J, Sakai D, et al. Upregulation of the viability of nucleus pulposus cells by bone marrow - derived stromal cells: significance of direct cell-to-cell contact in coculture system[J]. *Spine(Phila Pa 1976)*, 2004, 29(14): 1508-1514.
- [18] Sakai D, Mochida J, Yamamoto Y, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells embedded in Atelocollagen gel to the intervertebral disc: a potential therapeutic model for disc degeneration[J]. *Biomaterials*, 2003, 24(20): 3531-3541.
- [19] Sakai D, Mochida J, Iwashina T, et al. Regenerative effects of transplanting mesenchymal stem cells embedded in atelocollagen to the degenerated intervertebral disc[J]. *Biomaterials*, 2006, 27(3): 335-345.
- [20] Crevensten G, Walsh AJ, Ananthakrishnan D, et al. Intervertebral disc cell therapy for regeneration: mesenchymal stem cell implantation in rat intervertebral discs[J]. *Ann Biomed Eng*, 2004, 32(3): 430-434.
- [21] Sobajima S, Vadala G, Shimer A, et al. Feasibility of a stem cell therapy for intervertebral disc degeneration[J]. *Spine J*, 2008, 8(6): 888-896.
- [22] Hiyama A, Mochida J, Iwashina T, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells in a canine disc degeneration model[J]. *J Orthop Res*, 2008, 26(5): 589-600.
- [23] Jeong JH, Jin ES, Min JK, et al. Human mesenchymal stem cells implantation into the degenerated coccygeal disc of the rat[J]. *Cytotechnology*, 2009, 59(1): 55-64.
- [24] Yoshikawa T, Ueda Y, Miyazaki K, et al. Disc regeneration therapy using marrow mesenchymal cell transplantation: a report of two case studies[J]. *Spine(Phila Pa 1976)*, 2010, 35(11): E475-E480.
- [25] Orozco L, Soler R, Morera C, et al. Intervertebral disc repair by autologous mesenchymal bone marrow cells: a pilot study[J]. *Transplantation*, 2011, 92(7): 822-828.
- [26] Serigano K, Sakai D, Hiyama A, et al. Effect of cell number on mesenchymal stem cell transplantation in a canine disc degeneration model[J]. *J Orthop Res*, 2010, 28(10): 1267-1275.
- [27] Bertolo A, Thiede T, Aebli N, et al. Human mesenchymal stem cell co-culture modulates the immunological properties of human intervertebral disc tissue fragments in vitro[J]. *Eur Spine J*, 2011, 20(4): 592-603.

(收稿日期:2014-03-30)

(本文编辑:张萍)