

# 人髓核细胞诱导人尿源性干细胞向髓核样细胞分化作用的研究

苏炜良<sup>1</sup>, 郭柱<sup>1</sup>, 吴晓淋<sup>1</sup>, 周荣耀<sup>1</sup>, 邱晨生<sup>1</sup>, 王岩<sup>1</sup>, 徐瑞祥<sup>1</sup>, 张国庆<sup>1</sup>, 陈五军<sup>2</sup>,  
邢东明<sup>2</sup>, 相宏飞<sup>1</sup>, 陈伯华<sup>1</sup>

(1 青岛大学附属医院脊柱外科 266000 青岛市; 2 青岛大学肿瘤研究所 266000 青岛市)

**【摘要】目的:**探讨人髓核细胞(NPCs)诱导对人尿源性干细胞(USCs)向髓核样细胞分化的作用。**方法:**手术时获取腰椎间盘突出症患者 L4/5 的髓核组织, 并采用贴壁法体外分离培养 NPCs; 从健康成年人尿液中获取 USCs 并进行体外培养, 通过倒置显微镜观察细胞形态, 并采用成骨、成脂、成软骨三系诱导分化及蛋白免疫印迹技术(Western blot, WB)对所获取的 USCs 进行形态、分化潜能及细胞表面标志蛋白鉴定。使用 Transwell 小室将 P3 代 NPCs 与 USCs 培养以建立共培养体系, 设实验组、对照组及 NPCs 组, 实验组为 NPCs 与 USCs 共培养组, 对照组为单独 USCs 培养, NPCs 组为单独 NPCs 培养; 培养 14d 后应用倒置显微镜观察细胞形态; 应用定量实时聚合酶链反应(qRT-PCR)及 WB 分别检测实验组 USCs、对照组 USCs 与 NPCs 组 NPCs 中蛋白多糖(ACAN)、SOX-9(SRY-related high mobility group box gene 9)、II 型胶原(COL2)及缺氧诱导因子 1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )的 mRNA 及蛋白的表达情况; 免疫荧光染色观察 3 组 COL2A1 及 ACAN 荧光表达。**结果:**培养的 USCs 成骨、成脂、成软骨三系分化实验结果均为阳性; USCs 中干细胞阳性标志物 CD29、CD44、CD73 和 CD90 呈高表达, 未检出干细胞阴性标志物 CD34 和 CD45。培养 14d 后倒置显微镜下对照组及 NPCs 组细胞形态无变化, 实验组 USCs 向髓核样细胞分化, 形态变化明显。经共培养诱导 14d 后实验组及 NPCs 组中的 ACAN、SOX-9、COL2A1 及 HIF-1 $\alpha$  基因 mRNA 及蛋白表达均显著高于对照组( $P < 0.05$ ), ACAN 及 COL2A1 荧光强度明显高于对照组; 实验组上述各种 mRNA 及蛋白表达与 NPCs 组比较均无统计学差异( $P > 0.05$ ), 实验组荧光强度与 NPCs 组比较无明显差异。**结论:**在体外实验中, 人 NPCs 可通过共培养的方式诱导人 USCs 分化为髓核样细胞, 可为椎间盘组织工程研究提供 NPCs 来源。

**【关键词】**尿源性干细胞; 髓核细胞; 共培养; 分化

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2020.11.09

中图分类号: R681.5, Q813 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2020)-11-1027-10

**Studies on the differentiation of urine-derived stem cells into nucleus pulposus cells induced by nucleus pulposus cells/SU Weiliang, GUO Zhu, WU Xiaolin, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2020, 30(11): 1027-1036**

**【Abstract】Objectives:** To investigate the role of human nucleus pulposus cells(NPCs) in inducing the differentiation of human urine-derived stem cells(USCs) into nucleus pulposus cells. **Methods:** The nucleus pulposus tissue of L4/5 from patients with lumbar disc herniation was obtained during surgery, and NPCs were isolated and cultured in vitro by adherent method. The USCs were obtained from the urine of healthy adults and cultured in vitro. Cell morphology was observed by inverted microscope. Morphology, differentiation potential and cell surface marker proteins of USCs obtained were identified by osteogenic, lipogenic and chondrogenic differentiation induction and Western blot (WB). The Transwell chamber was used to culture P3 NPCs with USCs to establish a co-culture system. The experimental group, control group and NPCs group were set up. The experimental group was the co-culture group of NPCs and USCs, while the control group was of single

基金项目: 国家自然科学基金(81802190, 81772412); 国家重点研发计划(2019YFC0121404); 泰山学者青年专家工程资助(tsqn201909190)

第一作者简介: 男(1994-), 在读硕士研究生, 研究方向: 腰椎退行性疾病治疗的基础与临床

电话: (0532)82913562 E-mail: 910761981@qq.com

通讯作者: 相宏飞 E-mail: ymdx2004@vip.qq.com; 陈伯华 E-mail: bhchen@hotmail.com

USCs and the NPCs group was of single myeloid nucleus cells. After 14 days of culture, the morphology of the cells was observed by inverted microscope. The mRNA and protein expressions of aggrecan (ACAN), SOX-9 (SRY-related high mobility group box gene 9), collagen type II (COL2) and hypoxia-inducing factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) were detected by fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) and WB, respectively. Immunofluorescence staining was used to observe the fluorescence expressions of COL2A1 and ACAN in the 3 groups.

**Results:** The results of osteogenic, lipogenic, and chondrogenic differentiation of USCs were all positive. The CD29, CD44, CD73 and CD90 were highly expressed in USCs, while CD34 and CD45 were not detected. After 14 days of culture, the morphology of USCs group and NPCs group remained unchanged under inverted microscope, while the morphology of USCs cells in the experimental group differentiated into nucleus pulposus cells, and the morphological changes were obvious. The mRNA and protein expressions of ACAN, SOX-9, COL2A1 and HIF-1 $\alpha$  genes in NPCs group and experimental group of USCs cells were significantly higher than those in the control group after 14 days of coculture induction ( $P < 0.05$ ). Immunofluorescence showed that the fluorescence intensity of ACAN and COL2A1 was significantly higher in the NPCs group and the experimental group than in the control group. There was no statistical difference between the experimental group and the NPCs group in terms of mRNA, protein expression and fluorescence intensity. **Conclusions:** In vitro experiments, human NPCs can induce human USCs to differentiate into nucleus pulposus cells by co-culture, which can provide a source of NPCs for disc tissue engineering research.

**【Key words】** Urine-derived stem cells; Nucleus pulposus cells; Co-culture; Differentiation

**【Author's address】** Department of Orthopedics, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao, 266000, China

椎间盘退变是人体的一种自然衰老过程,可引起腰椎间盘突出症、退行性腰椎管狭窄症、退行性腰椎滑脱症、腰椎不稳和退变性腰椎侧凸等一系列病症<sup>[1]</sup>。随着社会的发展,椎间盘退变性疾病(degenerative disc disease, DDD)越来越引起人们的关注,目前 DDD 的治疗方式主要有保守治疗及手术治疗。近年来,因干细胞移植疗法有望延缓或逆转椎间盘退变而受到研究人员的关注,已成为研究的热点之一。在以前的体外研究中,通过直接接触、间接接触或非接触等方法将间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)与髓核细胞(nucleus pulposus cells, NPCs)共培养,可诱导 MSC 向 NPCs 分化,表现出 NPCs 表型<sup>[2-4]</sup>。然而 MSC 来源有限,且获取时会对机体造成一定的创伤,使其应用受到限制。人尿源性干细胞(urine-derived stem cells, USCs)是一种从人尿液中获得的具有多向分化潜能的干细胞,其来源广泛、便于取材、安全无创、不违反伦理道德,使其临床应用前景广阔<sup>[5-7]</sup>。目前对人 USCs 诱导分化为 NPCs 的相关报道较少,本研究将人 NPCs 与人 USCs 进行非接触式共培养,旨在探讨人 USCs 向人 NPCs 分化的可能性,为椎间盘组织工程研究提供一种可靠的 NPCs 来源。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂与仪器

主要试剂:去胎牛血清(Gibco,美国)、肾脏上皮细胞基础培养基(renal epithelial cell basal medium, REBM)(Lonza, 瑞士)、REGM SingleQuot 生长因子添加剂(Lonza, 瑞士)、重组人血小板衍生生长因子 BB (platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB)(Peprotech, 美国)、重组人碱性成纤维细胞生长因子 b (fibroblast growth factor-b, FGF-b)(Peprotech, 美国)、重组人表皮细胞生长因子(epidermal growth factor, EGF)(Peprotech, 美国)、100 $\times$ GlutaMAX(Gibco, 美国)、100 $\times$ NEAA(Gibco, 美国)、人 USCs 成骨诱导分化培养基试剂盒(Cyagen, 美国)、人 USCs 成脂诱导分化培养基试剂盒(Cyagen, 美国)、人 USCs 成软骨诱导分化培养基试剂盒(Cyagen, 美国)、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(碧云天, 中国)、二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒(碧云天, 中国)、鼠抗人蛋白聚糖(aggrecan, ACAN)抗体(Santa, 美国)、鼠抗人 II 型胶原(collagen type II, COL2)A1 抗体(Santa, 美国)、鼠抗人  $\beta$ -actin 抗体(Santa, 美国)、HRP 标记的抗鼠 IgG(Santa, 美国)、ECL 发光试剂盒(Thermo, 美

国)、Transwell™ 小室(BD,美国)等。主要设备:低温超速离心机(Hitachi CP80WX/转子 P70A-980,日本)、激光共聚焦显微镜、PCR 仪 (ABI 7500) 等。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 人 NPCs 的体外培养** 选择 6 例本院 L4/5 节段椎间盘突出症患者,术前均进行 MRI 检查,根据 T2WI 系列图像且经两位主诊及一位影像主检医师共同判定椎间盘分级为 Pfirrmann 分级 IV 级,征得患者及家属同意并签署相关知情同意后,于腰椎后路椎间孔镜下腰椎间盘切除术中获得髓核组织。将手术中获得的髓核组织置于无菌器皿中,在 4℃条件下于 30min 内运送至实验室,于超净台中使用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)冲洗 3 遍,将髓核组织用无菌眼科剪剪碎,使其约 1mm<sup>3</sup> 大小,再将其移至 15ml 离心管中,使用离心机于 800r/min 离心 5min,弃上清。加入含有 0.2% II 型胶原酶的 DMEM/F12 培养基 10ml,于 37℃恒温箱中消化 4h,再于超净台中用 150 目无菌细胞滤网对消化的组织进行过滤。将滤液在离心机中于 800r/min 离心 5min,弃上清。使用含有 15%胎牛血清(FBS)和 1%青霉素/链霉素的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基(DMEM/F-12)将沉淀的细胞尽量吹打均匀,接种于 25cm<sup>2</sup> 的培养瓶中,加入培养基至约 3ml,在 37℃、5%CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养。分别于接种后 3d 及 10d 时于倒置显微镜下观察 NPCs 形态。3d 左右更换一次培养基,当细胞密度达 80% 时按 1:3 传代,选取 P0~P3 NPCs 进行实验。该研究方案通过医院伦理委员会的审批。

**1.2.2 USCs 的提取及体外培养** 使用无菌容器取 3 名健康成年人清洁中段尿液约 200ml,在超净台中平均分装于 4 支 50ml 离心管,400g 离心 10min 后弃上清液至 1ml,各管加入 10ml PBS 重悬,200g 离心 10min,弃上清,加入 3ml 由 10% FBS,1%青-链霉素,含 REGM SingleQuot 生长因子添加剂的 DMEM/F-12 培养基组成的 USCs 原代培养基重悬,接种于 12 孔板的 3 个孔中。在 37℃、5%CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中进行培养,第 3d 时更换培养基为含 10% FBS,1%青-链霉素,1% GlutaMAX,1% NEAA,PDGF-BB 5ng/ml、FGF-b 5ng/ml、EGF 5ng/ml,1:1 比例混合的 DMEM/F-12 与 REBM 的 USCs 扩增培养基。分别于接种后 3d

及 10d 时于倒置显微镜下观察 USCs 形态。每 3d 左右更换一次培养基,当细胞密度达到约 80% 左右时进行传代,取 P2~4 代细胞进行后续的细胞鉴定及共培养等实验。

**1.2.3 USCs 的三系分化实验** 将 P3 代 USCs 接种到六孔板中,按成骨、成脂、成软骨诱导分化试剂盒说明书配制诱导培养基;待 USCs 融合达 80%左右后进行相关实验。成骨诱导组细胞每孔加入 2ml 由人 USCs 成骨诱导分化基础培养基、人 USCs 成骨诱导分化培养基专用血清、双抗、谷氨酰胺、抗坏血酸、β-甘油磷酸钠、地塞米松配制成人 USCs 成骨诱导分化完全培养基,每 3d 换液一次,于 21d 后加入 4%多聚甲醛固定,用茜素红染色后观察。成脂诱导组细胞先加入由人 USCs 成脂诱导分化培养基 A 液基础培养基、人 USCs 成脂诱导分化专用胎牛血清、双抗、谷氨酰胺、胰岛素、3-异丁基-1-甲基黄嘌呤、罗格列酮、地塞米松配制成人 USCs 成脂诱导分化培养基 A 液,于 3d 后再换为由人 USCs 成脂诱导分化培养基 B 液基础培养基、人 USCs 成脂诱导分化专用胎牛血清、双抗、谷氨酰胺、胰岛素配成人 USCs 成脂诱导分化培养基 B 液,24h 后重新换成 A 液,如此交替更换 3 次培养基后用 4%多聚甲醛固定,油红 O 染色后观察。成软骨诱导组取约 4×10<sup>5</sup> 个 USCs,于 15ml 离心管中 150g 离心 5min 后弃上清,加入 0.5ml 由人 USCs 成软骨诱导分化基础培养基、地塞米松、抗坏血酸、ITS 添加物、丙酮酸钠、脯氨酸、转化生长因子-β3(transforming growth factor-β3,TGF-β3) 配制而成的人 USCs 成软骨诱导分化完全培养基,每 3d 更换一次培养基,在 21d 后用 4%多聚甲醛固定,石蜡包埋后切片,最后用阿利辛蓝染色后进行观察。

**1.2.4 USCs 标志蛋白检测** 采用 WB 法,将 P3 代 USCs 胰酶消化后离心,弃上清后加入含有 1% PMSF 的 RIPA 细胞裂解液提取细胞总蛋白;使用 BCA 法测蛋白浓度后,将蛋白和蛋白上样缓冲液混均后进行变性,然后用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)分离样品,再转移到 PVDF 膜上。5%的脱脂奶粉封闭液中封闭后,加入阳性标志物 CD29、CD44、CD73 和 CD90 和阴性标志物 CD34 和 CD45 的一抗 4℃孵育过夜,洗膜后,加入辣根过氧化物酶

(horseradish peroxidase, HRP) 标记的二抗室温孵育 1h, 再使用 ECL 方法显影。在 WB 显影设备中观察干细胞阳性标志物 CD29、CD44、CD73、CD90 和干细胞阴性标志物 CD34、CD45 的表达情况。

**1.2.5** NPCs 与 USCs 共培养体系的建立与分组 使用孔径为 0.4 $\mu$ m 的 Transwell 小室建立细胞共培养体系, NPCs 培养于下层的 Transwell 小室内, USCs 培养于上层的 Transwell 小室内, 共培养组细胞设为实验组, 单独培养的 USCs 作为对照组, 单独培养的 NPCs 为 NPCs 组。加入含有 10% FBS、1% 青-链霉素的 DMEM/F12 培养基于 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中进行培养, 每 3d 换液一次, 倒置显微镜下观察细胞生长及形态变化, 分别收集对照组及共培养 14d 的 USCs 与 NPCs 组的 NPCs 进行后续实验。

**1.2.6** 定量实时聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测相关基因 mRNA 表达量 使用 Trizo 法提取 NPCs 组的 NPCs 与实验组及对照组的 USCs 的总 RNA, 然后按照逆转录试剂盒说明书, 在 qRT-PCR 仪上进行 Real-time PCR 反应合成各组 cDNA; 设置 GAPDH 为内参, 未加处理的 USCs 为对照, 检测实验组中 USCs 和 NPCs 组中 NPCs 的 ACAN、性别决定区 Y 方框 9 (SRY-related high mobility group box gene 9, SOX-9)、COL2 及缺氧诱导因子 1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor-1, HIF-1 $\alpha$ ) 的 mRNA 表达量。每个样品设置三个副孔, 引物序列见表 1, 采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 算法得到各组基因 mRNA 的相对表达量。

**1.2.7** WB 法检测相关蛋白表达 分别将实验组

及对照组的 USCs 与 NPCs 组的 NPCs 使用胰酶消化后离心, 弃上清后加入含有 1% 苯甲基磺酰氟 (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) 的 RIPA 细胞裂解液提取细胞总蛋白; 使用 BCA 法测蛋白浓度后, 将蛋白和蛋白上样缓冲液混均后进行变性, 然后用 SDS-PAGE 分离样品, 再转移到 PVDF 膜上。5% 的脱脂奶粉封闭液中封闭后, 加入 ACAN、SOX-9、COL2A1 及 HIF-1 $\alpha$  的一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 洗膜后, 加入 HRP 标记的二抗室温孵育 1h, 再使用 ECL 方法显影, 显影后使用图像软件观察实验组及对照组的 USCs 与 NPCs 组的 NPCs 的 ACAN、SOX-9、COL2A1 及 HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达情况; 并使用 IPP6 软件测定其灰度值, 分析其表达差异情况。

**1.2.8** 免疫荧光染色检测 ACAN、COL2A1 表达 在 24 孔板中制作细胞爬片, 与 ACAN、COL2A1 单克隆抗体预混液孵育后, 将其与免疫荧光二抗结合, DAPI 染核, 在激光共聚焦显微镜下观察 3 组 ACAN、COL2A1 的免疫荧光情况。

### 1.3 统计学分析

所有数据均使用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 每组实验重复 3 次。计量数据使用平均值 $\pm$ 标准差的形式表示。使用单因素方差分析 (ANOVA) 检测总体是否存在差异, 使用 *t* 检验对 3 组进行两两比较, *P*<0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

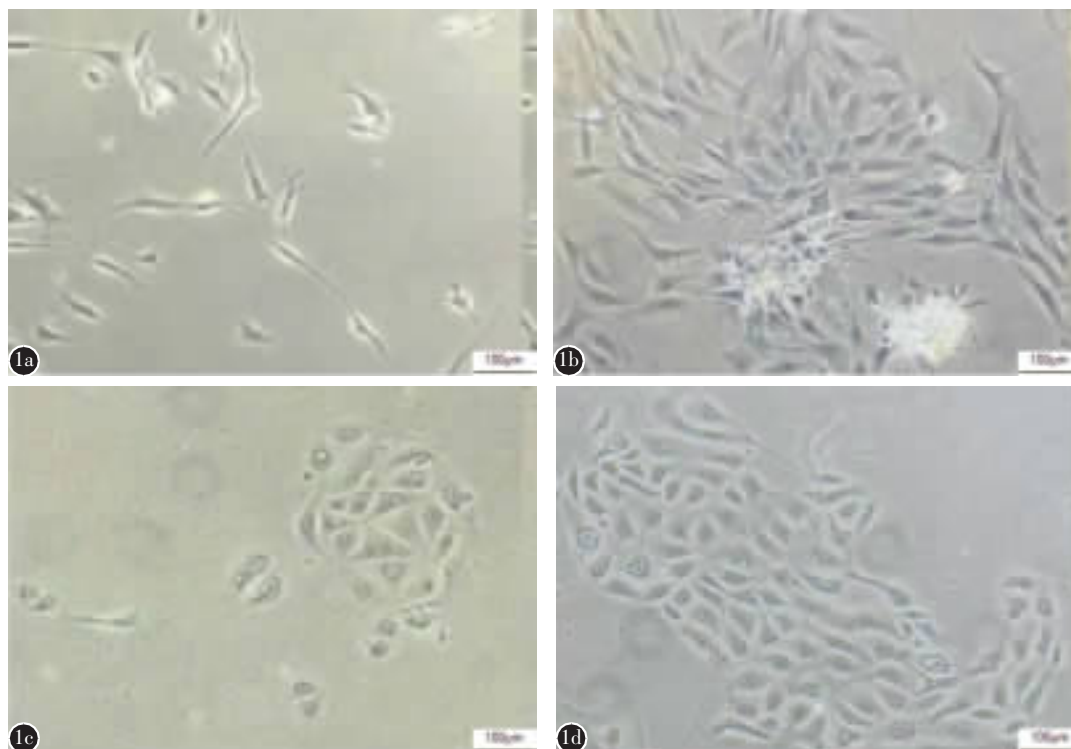
### 2.1 NPCs 培养与 USCs 的分离、培养及鉴定结果

消化后的髓核组织接种第 3d 在倒置显微镜下可观察到少量贴壁细胞 (图 1a), 继续培养至第 10d 可观察到大量细胞, 并围绕组织块增殖 (图 1b)。将健康成人尿液的样本接种后第 3d, 即可观察到少量类圆形贴壁细胞 (图 1c), 培养至第 10d 左右可达 80%~90% 融合 (图 1d)。WB 检测显示尿液中提取的细胞可表达干细胞阳性标志物 CD29、CD44、CD73 和 CD90, 未表达干细胞阴性标志物 CD34 和 CD45 (图 2), 这与既往文献<sup>[8]</sup>中记载的标志物相符合。经成骨分化诱导 21d 后使用茜素红染色, 可见钙结节形成 (图 3a); 成软骨分化诱导 21d 后使用阿利辛蓝染色, 可见糖胺聚糖的积累 (图 3b); 成脂肪细胞分化诱导 14d 后使用油红 O 染色, 可见红染的脂滴形成 (图 3c)。成骨、成软骨、成脂分化及 WB 鉴定确定从尿液中分

表 1 基因引物序列表

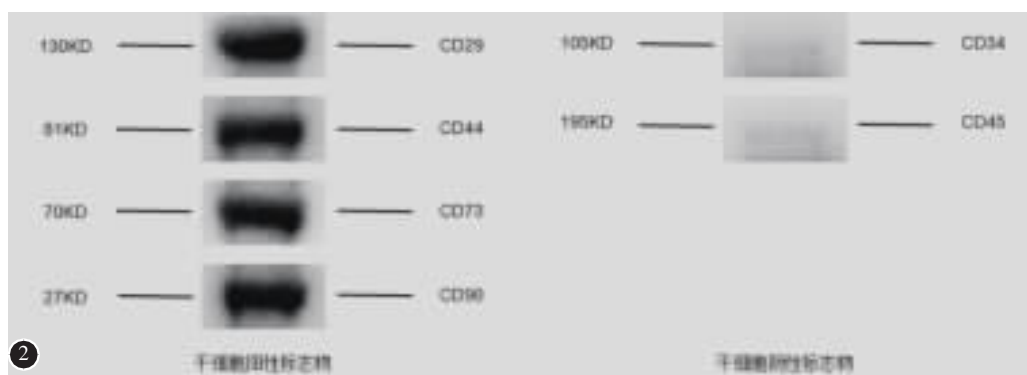
Table 1 The primer sequence of genes

基因名称 Gene name	引物序列 (5'-3') Primer sequences (5'-3')
GADPH	正向 (Forward, F) 5'-AGTGCCAGCCTCGTCTCATAGA-3'
	反向 (Reverse, R) 5'-GCCTTGACTGTGCCGTTGAACT-3'
COL2A1	正向 (Forward, F) 5'-CGCTCAAGTCGCTGAACAACCA-3'
	反向 (Reverse, R) 5'-ACCAGTCTTCCGAGGCACAGT-3'
ACAN	正向 (Forward, F) 5'-TGGCCTGCCTGACTTTAGTG-3'
	反向 (Reverse, R) 5'-CCTGAACCACTGACGCTGAT-3'
SOX-9	正向 (Forward, F) 5'-ACCATCAGCGCTCGCAGT-3'
	反向 (Reverse, R) 5'-TCGCGTGGGTTTCATGTAGGT-3'
HIF-1 $\alpha$	正向 (Forward, F) 5'-GCCAGACGATCATGCAGCTA-3'
	反向 (Reverse, R) 5'-ATCCATTGATTGCCCCAGCA-3'



**图 1** 髓核细胞(NPCs)及尿源性干细胞(USCs)倒置显微镜下( $\times 100$ ) **a** 接种第 3d 可在倒置显微镜下观察到少量贴壁 NPCs **b** 培养至第 10d 可观察到大量 NPCs, 并围绕组织块增殖 **c** 接种后 3d 可见少量类圆形 USCs 贴壁生长 **d** 接种后 10d, USCs 生长增殖形成集落, 可达 80%~90% 融合

**Figure 1** Nucleus pulposus cells(NPCs) and round urine-derived stem cells(USCs) under inverted microscope ( $\times 100$ ) **a** A small number of adherent NPCs were observed under inverted microscope on the third day of inoculation **b** A large number of NPCs were observed and proliferated around the tissue mass after culture to day 10 **c** 3 days after inoculation, a small number of USCs could be seen adherent growth **d** Ten days after inoculation, USCs grew and proliferated to form colonies, which can fuse up to 80%~90%



**图 2** 尿源性干细胞标志物 WB 检测条带, 阳性标志物 CD29、CD44、CD73 和 CD90 呈高表达, 未检出干细胞阴性标志物 CD34 和 CD45

**Figure 2** Urine-derived stem cell marker WB detection strip positive markers CD29, CD44, CD73 and CD90 were highly expressed, while negative markers CD34 and CD45 were not detected

离提取的细胞为 USCs。

## 2.2 倒置相差显微镜下 NPCs 形态及 USCs 形态变化情况

培养 14d 后, 倒置相差显微镜下 NPCs 组中 NPCs 呈短梭形或多角形, 轮廓清楚, 细胞核明显 (图 4a); 对照组中 P3 代 USCs 紧密排列, 形态均

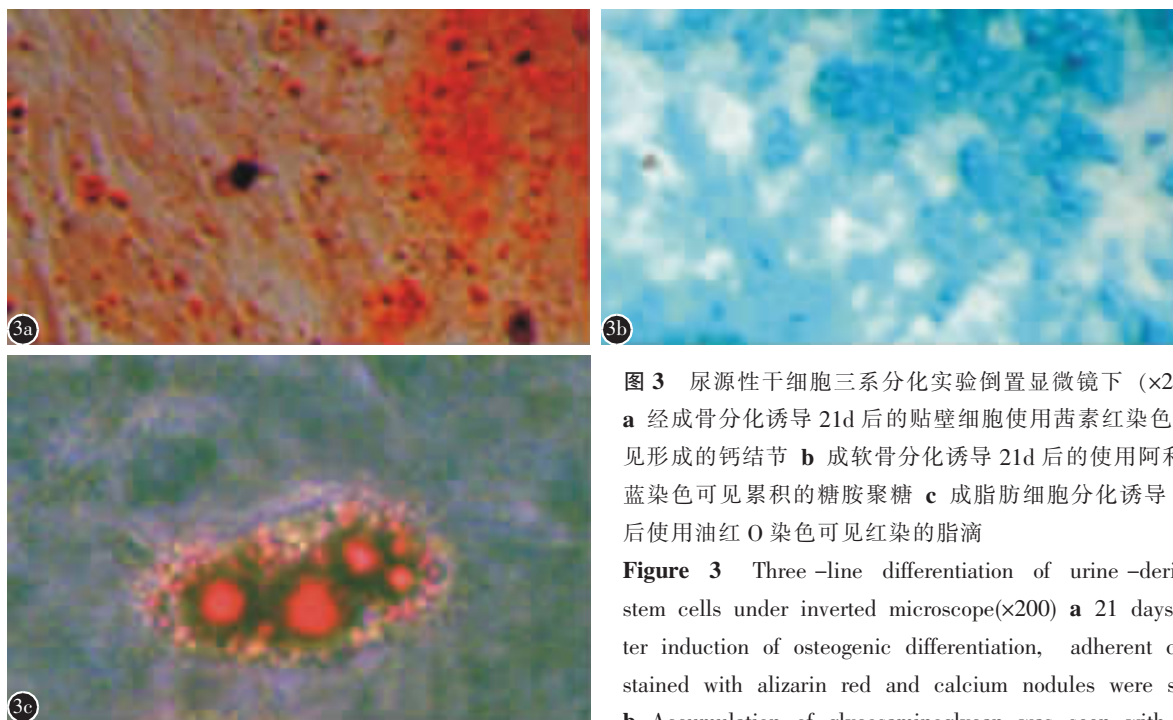
一,呈短梭形或米粒样,细胞胞浆丰富,胞核大,核仁清晰(图 4b);实验组中细胞排列逐渐变紊乱,大量多角形、短梭形细胞出现,肉眼已无法分辨出 USCs 与 NPCs(图 4c)。

### 2.3 相关基因的 mRNA 表达量

在培养 14d 时,NPCs 组与对照组 ACAN、SOX-9、COL2A1 及 HIF-1 $\alpha$  基因 mRNA 相对表

达量存在明显差异,差异有统计学意义( $P<0.05$ );经共培养 14d 后实验组 USCs 的 ACAN、SOX-9、COL2A1 及 HIF-1 $\alpha$  基因 mRNA 相对表达量较对照组显著增高,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),而 NPCs 组与实验组 USCs 的 mRNA 的相对表达量无统计学意义( $P>0.05$ )(表 2)。

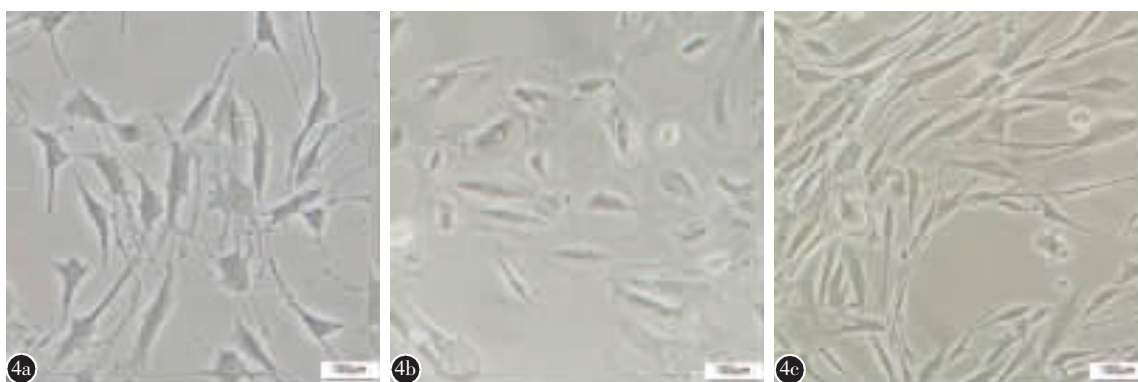
### 2.4 相关基因的蛋白表达



**图 3** 尿源性干细胞三系分化实验倒置显微镜下 ( $\times 200$ ) **a** 经成骨分化诱导 21d 后的贴壁细胞使用茜素红染色,可见形成的钙结节 **b** 成软骨分化诱导 21d 后的使用阿利辛蓝染色可见累积的糖胺聚糖 **c** 成脂肪细胞分化诱导 14d 后使用油红 O 染色可见红染的脂滴

**Figure 3** Three-line differentiation of urine-derived stem cells under inverted microscope( $\times 200$ ) **a** 21 days after induction of osteogenic differentiation, adherent cells stained with alizarin red and calcium nodules were seen **b** Accumulation of glycosaminoglycan was seen with al-

cian blue staining 21 days after induction of chondroblast differentiation **c** Red lipid droplets were seen with oil red O staining 14 days after adipocyte differentiation induction



**图 4** NPCs 组、对照组及实验组倒置显微镜下 ( $\times 100$ ) **a** NPCs 组 NPCs 呈短梭形或多角形,轮廓清楚,细胞核明显 **b** 对照组 USCs 形态未出现明显变化 **c** 实验组 USCs 出现大量多角形、短梭形细胞,细胞形态变化明显

**Figure 4** NPCs group, control group and experimental group under inverted microscope ( $\times 100$ ) **a** NPCs were fusiform or polygonal, with clear outlines and obvious nuclei **b** There was no significant change in the morphology of USCs in the control group **c** There were a large number of polygonal and spindle spindle cells in urine stem cells in experimental group

**表 2** 在培养 14d 时对照组、实验组及 NPCs 组 ACAN、COL2A1、SOX-9、HIF-1 $\alpha$  的 mRNA 和蛋白相对表达量  
**Table 2** At 14d, the relative mRNA and protein expressions levels of ACAN, COL2A1, SOX-9 and HIF-1 $\alpha$  in the control group, experimental group and nucleus pulposus cell group

	mRNA 相对表达量 The relative mRNA expression			蛋白相对表达量 The relative protein expression		
	对照组 Control group	实验组 Experimental group	NPCs 组 NPCs group	对照组 Control group	实验组 Experimental group	NPCs 组 NPCs group
ACAN	1.00 $\pm$ 0.00	5.48 $\pm$ 0.26 <sup>①</sup>	6.17 $\pm$ 0.51 <sup>①</sup>	1.00 $\pm$ 0.00	5.41 $\pm$ 0.64 <sup>①</sup>	5.28 $\pm$ 0.56 <sup>①</sup>
COL2A1	1.00 $\pm$ 0.00	7.13 $\pm$ 0.54 <sup>①</sup>	7.96 $\pm$ 0.42 <sup>①</sup>	1.00 $\pm$ 0.00	6.62 $\pm$ 0.52 <sup>①</sup>	7.92 $\pm$ 0.45 <sup>①</sup>
SOX-9	1.00 $\pm$ 0.00	3.22 $\pm$ 0.48 <sup>①</sup>	3.40 $\pm$ 0.74 <sup>①</sup>	1.00 $\pm$ 0.00	3.05 $\pm$ 0.09 <sup>①</sup>	2.94 $\pm$ 0.76 <sup>①</sup>
HIF-1 $\alpha$	1.00 $\pm$ 0.00	4.27 $\pm$ 0.51 <sup>①</sup>	4.81 $\pm$ 0.45 <sup>①</sup>	1.00 $\pm$ 0.00	5.04 $\pm$ 0.55 <sup>①</sup>	5.34 $\pm$ 0.69 <sup>①</sup>

注:①与对照组比较  $P < 0.05$

Note: ①Comparison with control group,  $P < 0.05$

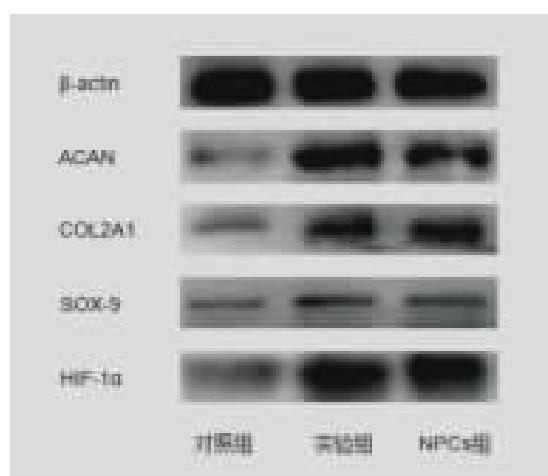
经共培养 14d 后实验组 USCs 的 ACAN、SOX-9、COL2A1 及 HIF-1 $\alpha$  的蛋白表达量较对照组显著增高, WB 图像中可观察到较为明显的变化; 同时, NPCs 组与对照组的蛋白表达量也可观察到存在明显差异(图 5)。通过灰度值测量软件, NPCs 组及实验组 ACAN、SOX-9、COL2A1 及 HIF-1 $\alpha$  的蛋白表达的灰度值明显高于对照组, 灰度值相对表达量变化明显(表 2), 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与 mRNA 的相对表达量相似, NPCs 组与实验组 USCs 的蛋白表达的灰度值差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 2.5 免疫荧光染色检测 ACAN、COL2A1 表达情况

在激光共聚焦显微镜下观察对照组与实验组 USCs 以及 NPCs 组细胞, 可见胞质内荧光呈点状分布或弥散分布; 其中细胞核 DAPI 染色在 358nm 波长激发光下呈现蓝色荧光; ACAN 在 488nm 波长激发光下呈现绿色荧光; COL2A1 在 647nm 波长激发光下呈现红色荧光, Merge 图片中细胞形态较为饱满, NPCs 组和实验组荧光强度明显高于对照组, 但 NPCs 组与实验组荧光强度无明显差异(图 6)。

### 3 讨论

DDD 是腰腿痛的最常见病因之一, 发生在腰椎间盘退变的基础上<sup>[1]</sup>。目前 DDD 的治疗主要是保守治疗或通过手术方法来稳定脊柱或去除退变椎间盘组织, 包括椎间盘切除术以及脊柱融合术等<sup>[9]</sup>。但是, 包括保守疗法和各种外科手术在内的治疗主要集中于缓解症状, 而不是恢复或逆转椎间盘的退变<sup>[10]</sup>。这些方法无法修复退变的椎间盘, 反而与改变脊柱生物力学和加速相邻椎间盘退变



**图 5** 培养 14d 后, 对照组、实验组及 NPCs 组 ACAN、COL2A1、SOX-9、HIF-1 $\alpha$  基因对应蛋白质的表达情况

**Figure 5** After 14 days of culture, the expression of ACAN, COL2A1, SOX-9 and HIF-1 $\alpha$  genes corresponding to proteins in the control group, experimental group, and nucleus pulposus cell group

有关<sup>[11-13]</sup>。近年来, 修复椎间盘退变的科学技术发展为椎间盘退变的治疗提供了新的思路和研究方向。以干细胞移植作为治疗方法的新思路旨在开发一种生物学治疗策略, 为椎间盘组织工程的种子细胞来源提供新思路。这种方法关注的是细胞外基质合成、体内细胞功能的稳定性和存活细胞的重塑能力<sup>[14]</sup>。通过干细胞移植疗法, 使人体中产生再生细胞, 以恢复或逆转椎间盘组织的退变并减轻患者症状。因此, 大量优质的种子细胞的制备是其成功的关键及前提。

有研究证明 MSC 可分化为髓核样细胞<sup>[15, 16]</sup>。但 MSC 来源有限, 获取 MSC 会对机体造成一定的创伤, 且存储条件要求较高, 费用也昂贵, 使其应用受到一定限制<sup>[17, 18]</sup>。人 USCs 是从人尿液中获

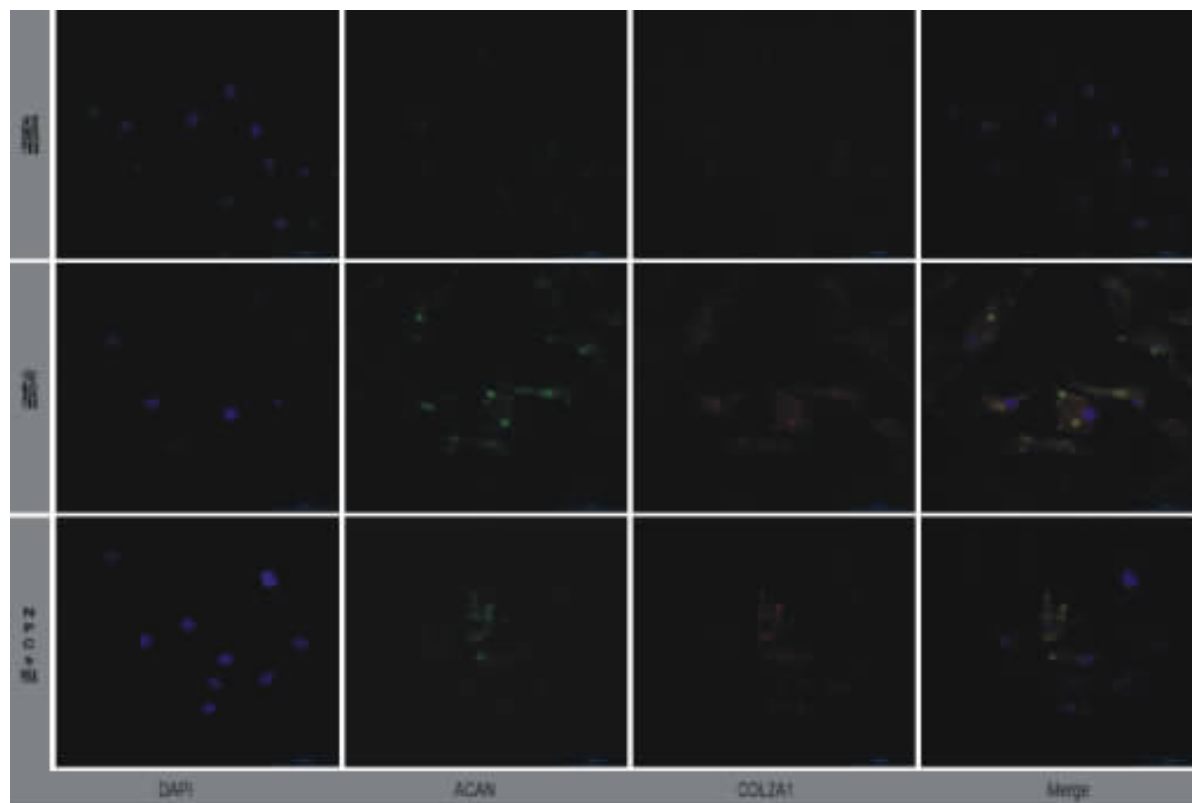


图6 激光共聚焦显微镜下( $\times 400$ )对照组、实验组USCs及NPCs组细胞的细胞核DAPI染色为蓝色荧光,ACAN为绿色荧光,COL2A1为红色荧光,以及Merge图像;实验组和NPCs组ACAN及COL2A1荧光强度显著高于对照组

**Figure 6** Under laser confocal microscope ( $\times 400$ ). The DAPI staining of USC's nucleus of the control group and the experimental group and NPC's group was blue fluorescence, green fluorescence of ACAN, red fluorescence of COL2A1, and the Merge image formed. The fluorescence intensities of ACAN and COL2A1 in experimental group and NPC's group were significantly higher than that in control group

得的一种具有多向分化潜能的干细胞,其具有MSC的多种生物学特性,包括克隆形成性、特异性细胞表面标志物的表达和多向分化能力<sup>[5,19-21]</sup>。USCs可以在短时间内可靠、无创地获得,并且培养成本低,来源广泛,无伦理争议。基于以上特征和优势,人USCs引起了众多研究人员的关注,近几年已有诱导人USCs分化为各种类型的组织细胞,例如成骨细胞、肝细胞、尿路上皮细胞、平滑肌细胞和神经细胞<sup>[22-26]</sup>。因此,具有广阔的应用前景,有望成为组织工程和再生医学较为理想的细胞来源,为细胞替代疗法提供新的途径。

诱导干细胞分化为髓核样细胞来进行移植以期延缓或逆转椎间盘退变的研究是目前研究的热点,目前最常用三个指标来鉴定分化的细胞,即COL2A1、SOX-9和ACAN<sup>[27]</sup>。ACAN是由一条或多条糖胺多糖(glycosaminoglycan,GAG)链以共价键的方式连接在一条核心蛋白上而形成的生物大

分子,是椎间盘的主要非胶原成分。ACAN所含有的糖胺多糖主要是硫酸软骨素和硫酸角质素,正是由于它独特的分子特征,才使椎间盘拥有渗透和承受压力的能力。椎间盘功能损害和退变的原因之一正是ACAN的降解和丢失。COL2A1是椎间盘中最主要的胶原成分之一。COL2A1原是软骨中的主要胶原,占软骨细胞外基质的50%以上。COL2A1主要由软骨细胞表达,在髓核中大量存在<sup>[1,28,29]</sup>。SOX-9比COL2A1作为软骨样细胞分化指标更为灵敏可靠,因为SOX-9可以调控COL2A1的表达,软骨样细胞分化的晚期才出现COL2A1的表达<sup>[30]</sup>。但COL2A1、ACAN和SOX-9在髓核细胞和关节软骨细胞均有表达,只用其作为鉴定指标不足以证明分化的细胞为髓核样细胞。因此,本实验增加了HIF-1 $\alpha$ 作为其分化的指标。研究发现<sup>[31,32]</sup>,NPCs在正常氧分压的条件下特征性地表达功能活性HIF-1 $\alpha$ ,其在低氧的环境下



适当地增加 HIF-1 $\alpha$  的转录活性。Risbud 等<sup>[33]</sup>的研究也已证实 HIF-1 $\alpha$  可以用于区分 NPCs 和关节软骨细胞。而这些在 USCs 中是不表达或少表达的,因此,本实验通过检测 COL2A1、SOX-9、ACAN 和 HIF-1 $\alpha$  来确定 USCs 是否能够分化为髓核样细胞是比较准确的。

在本研究中,对从人尿液中所提取的短梭形或米粒样细胞进行了细胞形态观察、干细胞表面标志物检测及三系分化实验对其进行鉴定,确定从尿液中所提取的细胞为 USCs,这与 Zhang 等<sup>[5]</sup>的实验结果相符。本研究采用 Transwell 共培养小室将 USCs 与 NPCs 进行非接触式共培养,小室允许培养液及细胞因子在上、下两层之间进行交换,并且能够防止相对分子质量超过 70000 的大分子物质通过,可方便观察 USCs 的生长状态及检测相关功能性蛋白的表达情况。本研究发现,在与 NPCs 共培养后,USCs 的细胞形态和基因表达水平均出现明显改变,表现出类髓核分化效应,细胞由短梭形或米粒样逐渐转变为多角形及不规则形细胞。为了评估细胞在直接共培养过程中的分化,本实验检测了 ACAN、SOX-9、COL2A1 及 HIF-1 $\alpha$  等 NPCs 表达的特征性标记,它们在 NP 组织中是能够大量表达的。在本研究中,qRT-PCR 结果表明,共培养 14d,ACAN、SOX-9、COL2A1 及 HIF-1 $\alpha$  的 mRNA 表达明显高于对照组 ( $P<0.05$ );WB 检测显示,共培养后 USCs 可以分泌 ACAN、SOX-9、COL2A1 及 HIF-1 $\alpha$  蛋白;激光共聚焦显微镜下可观察到共培养 14d 的 USCs 表达 ACAN、COL2A1,产生相应的荧光。表明 USCs 与 NPCs 共培养 14d 后,USCs 表达 NPCs 特异性标记物,表现出向 NPCs 分化的趋势。说明通过共培养,USCs 可向 NPCs 分化,可能成为椎间盘组织工程研究所需要的 NPCs 的来源。

本研究探讨了在共培养条件下人 NPCs 对人 USCs 向髓核样细胞分化的诱导作用,并证明通过共培养可将 USCs 诱导为髓核样细胞,这可能为椎间盘组织工程研究提供一种简单有效的 NPCs 来源。但是参与诱导分化过程的具体机制尚不明确,我们推测外泌体在其中发挥了不可或缺的作用,其机制及信号传导途径有待进一步研究。

#### 4 参考文献

1. 胡有谷. 腰椎间盘突出症[M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版

社, 2011. 96-128.

2. Strassburg S, Richardson SM, Freemont AJ, et al. Co-culture induces mesenchymal stem cell differentiation and modulation of the degenerate human nucleus pulposus cell phenotype [J]. *Regen Med*, 2010, 5(5): 701-711.
3. 陈雷, 胡秀年, 傅冷西, 等. 非接触性共培养 BMSCs 和髓核细胞时间差异性的实验研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2012, 26(11): 1369-1374.
4. Lu K, Li HY, Yang K, et al. Exosomes as potential alternatives to stem cell therapy for intervertebral disc degeneration: in-vitro study on exosomes in interaction of nucleus pulposus cells and bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 1-11.
5. Zhang Y, McNeill E, Tian H, et al. Urine derived cells are a potential source for urological tissue reconstruction[J]. *J Urol*, 2008, 180(5): 2226-2233.
6. Ji X, Wang M, Chen F, et al. Urine-Derived Stem Cells: The Present and the Future [J]. *Stem Cells Int*, 2017, 2017: 4378947.
7. Pavathuparambil AMN, Al-Hawwas M, Bobrovskaya L, et al. Urine-derived cells for human cell therapy[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 189.
8. 周荣耀, 郭柱, 苏炜良, 等. 人尿源干细胞外泌体对退变髓核细胞生物学功能的影响[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2020, 30(5): 427-436.
9. Le Maitre CL, Binch AL, Thorpe AA, et al. Degeneration of the intervertebral disc with new approaches for treating low back pain[J]. *J Neurosurg Sci*, 2015, 59(1): 47-61.
10. Bydon M, De la Garza-Ramos R, Macki M, et al. Lumbar fusion versus nonoperative management for treatment of discogenic low back pain: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *J Spinal Disord Tech*, 2014, 27(5): 297-304.
11. Li XC, Tang Y, Wu JH, et al. Characteristics and potentials of stem cells derived from human degenerated nucleus pulposus: potential for regeneration of the intervertebral disc[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2017, 18(1): 242.
12. Eck JC, Humphreys SC, Lim TH, et al. Biomechanical study on the effect of cervical spine fusion on adjacent-level intradiscal pressure and segmental motion [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2002, 27(22): 2431-2434.
13. Lund T, Oxland TR. Adjacent level disk disease: is it really a fusion disease[J]. *Orthop Clin North Am*, 2011, 42(4): 529-541.
14. Thorpe A, Sammon C, Le Maitre C. 'Cell or not to cell' that is the question: for intervertebral disc regeneration[J]. *J Stem Cell Res Dev Ther*, 2015, 2: 003.
15. Arkesteijn IT, Smolders LA, Spillekom S, et al. Effect of coculturing canine notochordal, nucleus pulposus and mesenchymal stromal cells for intervertebral disc regeneration[J]. *Arthritis Res Ther*, 2015, 17(1): 60.

16. Potier E, de Vries S, van Doeselaar M, et al. Potential application of notochordal cells for intervertebral disc regeneration: an in vitro assessment[J]. *Eur Cell Mater*, 2014, 28: 68–81.
17. Javaid MA. Mesenchymal stem cell-based bone tissue engineering[J]. *International Dental Journal of Students Research*, 2012, 1(3): 24–35.
18. Sakai D, Andersson GB. Stem cell therapy for intervertebral disc regeneration: obstacles and solutions [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2015, 11(4): 243–256.
19. Benda C, Zhou T, Wang X, et al. Urine as a source of stem cells[J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2013, 129: 19–32.
20. Tayhan SE, Keles GT, Topcu I, et al. Isolation and in vitro cultivation of human urine-derived cells: an alternative stem cell source[J]. *Turk J Urol*, 2017, 43(3): 345–349.
21. Zhang D, Wei G, Li P, et al. Urine-derived stem cells: a novel and versatile progenitor source for cell-based therapy and regenerative medicine[J]. *Genes Dis*, 2014, 1(1): 8–17.
22. Guan J, Zhang J, Li H, et al. Human urine derived stem cells in combination with beta-TCP can be applied for bone regeneration[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e125253.
23. Zhou M, Shen L, Qiao Y, et al. Inducing differentiation of human urine-derived stem cells into hepatocyte-like cells by coculturing with human hepatocyte L02 cells [J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(1): 566–573.
24. Bharadwaj S, Liu G, Shi Y, et al. Characterization of urine-derived stem cells obtained from upper urinary tract for use in cell-based urological tissue engineering [J]. *Tissue Eng Part A*, 2011, 17(15–16): 2123–2132.
25. Bharadwaj S, Liu G, Shi Y, et al. Multipotential differentiation of human urine-derived stem cells: potential for therapeutic applications in urology[J]. *Stem Cells*, 2013, 31(9): 1840–1856.
26. Guan JJ, Niu X, Gong FX, et al. Biological characteristics of human-urine-derived stem cells: potential for cell-based therapy in neurology[J]. *Tissue Eng Part A*, 2014, 20(13–14): 1794–1806.
27. 董俊文, 李浩鹏. 髓核细胞鉴定方法的相关研究进展[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2012, 22(9): 850–853.
28. Zhang B, Guo W, Sun C, et al. Dysregulated MiR-3150a-3p promotes lumbar intervertebral disc degeneration by targeting aggrecan[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45(6): 2506–2515.
29. Kepler CK, Ponnappan RK, Tannoury CA, et al. The molecular basis of intervertebral disc degeneration [J]. *Spine J*, 2013, 13(3): 318–330.
30. Gorenssek M, Jaksimovic C, Kregar-Velikonja N, et al. Nucleus pulposus repair with cultured autologous elastic cartilage derived chondrocytes[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2004, 9(2): 363–373.
31. Rajpurohit R, Risbud MV, Ducheyne P, et al. Phenotypic characteristics of the nucleus pulposus: expression of hypoxia inducing factor-1, glucose transporter-1 and MMP-2[J]. *Cell Tissue Res*, 2002, 308(3): 401–407.
32. Semenza GL, Agani F, Booth G, et al. Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1[J]. *Kidney Int*, 1997, 51(2): 553–555.
33. Risbud MV, Guttapalli A, Stokes DG, et al. Nucleus pulposus cells express HIF-1 alpha under normoxic culture conditions: a metabolic adaptation to the intervertebral disc microenvironment[J]. *J Cell Biochem*, 2006, 98(1): 152–159.

(收稿日期:2020-05-21 末次修回日期:2020-10-05)

(英文编审 谭 啸)

(本文编辑 李伟霞)