

· 论 著 ·

SOX9 基因修饰骨髓间充质干细胞并诱导其向髓核样细胞分化的实验研究

许运¹, 陈亮², 史勇¹, 顾勇², 邹俊², 唐天驹²

(1. 苏州市相城人民医院骨科, 江苏苏州 215131; 2. 苏州大学附属第一医院骨科, 江苏苏州 215006)

摘要:目的 探讨 SOX9 慢病毒载体感染兔骨髓间充质干细胞(MSC)并诱导其向髓核样细胞的分化。方法 构建 SOX9 基因慢病毒载体并感染 MSC, 将 MSC 分为未转导组、空转导组及 SOX9 转导组。采用流式细胞仪检测 MSC 的感染率及凋亡率, MTT 检测 MSC 的增殖情况, RT-PCR、Western blot 及免疫荧光染色检测 MSC 中 SOX9、II 型胶原及 Aggrecan 在 mRNA 及蛋白水平的表达情况。结果 成功构建 SOX9 基因慢病毒载体并感染 MSC, 感染率为 100%。慢病毒载体感染对 3 组 MSC 的增殖及凋亡无明显影响; 感染 2 周后, SOX9 转导组 MSC 中 SOX9 及 II 型胶原在 mRNA 及蛋白水平的表达均明显高于未转导组与空转导组($P < 0.01$), Aggrecan mRNA 及蛋白仅在 SOX9 转导组 MSC 中表达; SOX9 转导组 MSC 中 II 型胶原及 Aggrecan 荧光染色呈阳性, 而空转导组及未转导组 MSC 均呈阴性。结论 SOX9 慢病毒载体感染的 MSC 可被诱导向髓核细胞分化。

关键词: 间质干细胞; 慢病毒感染; 细胞分化; 胶原 II 型; 基因, SOX9

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.01.003

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)01-0008-05

Experimental research of SOX9 gene in modifying marrow mesenchymal stem cells and inducing their differentiation toward nucleus pulposus-like cells

Xu Yun¹, Chen Liang², Shi Yong¹, Gu Yong², Zou Jun², Tang Tiansi²

(1. Department of Osteology, the People's Hospital of Xiangcheng District, Suzhou, Jiangsu 215131, China;

2. Department of Osteology, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215006, China)

Abstract: Objective To investigate lentivirus vector containing SOX9 gene infecting rabbit marrow mesenchymal stem cells (MSC) and inducing their differentiation toward nucleus pulposus-like cells. Methods Lentivirus vectors containing SOX9 gene were constructed and were used to infect MSC. MSC were divided into none transduction group, blank transduction group and SOX9 transduction group. Flow cytometry was employed to detect the infection rate and apoptotic rate of MSC, MTT was adopted to measure the MSC proliferation. RT-PCR, Western blot and immunofluorescent staining were applied to detect the mRNA or protein expression of SOX9, Collagen type II and Aggrecan in MSC. Results Lentivirus vector containing SOX9 gene was successfully constructed and infected MSC with infection rate of 100%. There was no significant impact of lentivirus vector infection on proliferation and apoptosis of MSC. After 2 weeks infection, mRNA and protein expression levels of SOX9 and Collagen type II in MSC in SOX9 transduction group were markedly higher than those in none transduction group and blank transduction group ($P < 0.01$), while mRNA or protein expression of Aggrecan only existed in MSC in SOX9 transduction group. Collagen type II- and Aggrecan-positive fluorescent staining were found in MSC in SOX9 transduction group, while those in none transduction group and blank transduction group showed negative. Conclusion SOX9 lentiviral vector infected MSC can be induced to differentiate into nucleus pulposus-like cells.

Key words: mesenchymal stem cells; lentivirus infections; cell differentiation; collagen type II; gene, SOX9

骨髓间充质干细胞(marrow mesenchymal stem cells, MSC)具有多向分化潜能以及自我更新能力,是细胞移植治疗椎间盘退变中最有前景的种子细胞。但是,如何诱导 MSC 向髓核样细胞分化而发挥其修复作用还存在一定的争议。SOX9 基因是调控 MSC 向软骨类细胞分化的一个关键因子^[1-3], SOX9 基因不仅能维持软骨细胞表型,还能增加 II 型胶原及聚集蛋白聚糖(Aggrecan)基因的表达水平^[4-5]。本研究通过构建 SOX9 慢病毒载体并感染兔 MSC,旨在诱导其向髓核样细胞分化,为探索椎间盘退变的生物学治疗奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 主要试剂与仪器 主要试剂:限制性内切酶 BamH I、EcoR I 购自日本 TaKaRa 公司;包装细胞 T₄ 连接酶、KOD-Plus 高保真酶购自日本 TOYOBO 公司;RNA 抽提试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购自美国 Axygen 公司;高效克隆 E. coli DH5 感受态细胞购自北京博大泰克生物技术有限责任公司;Trizol、胎牛血清、胰蛋白酶购自上海生工生物工程有限公

司;抗 CD44、CD29 抗体购自美国 Millipore 公司;抗 CD45、CD34 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;抗 SOX9、II 型胶原、Aggrecan 抗体和异硫氰酸荧光素山羊抗兔 IgG 购自 Abcam 公司。慢病毒载体由苏州大学附属第一医院骨科实验室构建。慢病毒载体系统是由质粒 pRsv-REV、pMDlg-pRRE、pMD2G 及 Pwpxl-MOD2 组成的第 3 代慢病毒载体,其中载体质粒 Pwpxl-MOD2 能表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)。主要仪器:倒置显微镜(日本 Olympus 公司)、电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)、垂直板电泳装置(美国 Bio-Rad 公司)、Chemidox 化学发光成像仪(美国 Bio-Rad 公司)、荧光显微镜(日本 Olympus 公司)、PCR 仪(美国 PE 公司)、凝胶成像系统(美国 Alpha Innotech 公司)。

1.2 SOX9 基因慢病毒载体的构建及鉴定^[6]

1.2.1 目的基因片段的获取 以人 HepG2 肝癌细胞的 cDNA 为模板,加入带酶切位点的 SOX9 基因的上、下游引物,采用 RT-PCR 扩增出目的基因,经琼脂糖凝胶电泳分离、回

收,获得 SOX9 基因片段。

1.2.2 慢病毒载体 Pwpxl-MOD2/SOX9 的构建及鉴定 慢病毒空载体 Pwpxl-MOD2 与 PCR 的回收产物分别用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 进行双酶切,再用 T₄ 连接酶将双酶切载体和目的基因片段进行连接反应。取 5 μL 连接产物感染 DH5 感受态细胞,在含氨苄西林的琼脂平板上于 37 °C 培养过夜。经 PCR 及 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切鉴定后筛选出正确的阳性克隆,大量提取质粒,用于测序及后续试验。

1.2.3 重组慢病毒的包装及滴度检测 制备慢病毒包装系统中的 4 种质粒 DNA 溶液,用磷酸钙法感染 293T 细胞。收集感染 72 h 的 293T 细胞上清液,4 °C,4 000 × g 离心 10 min;再将上清液以 0.45 μm 滤器过滤,于 4 °C,72 000 × g 离心 120 min;以 500 μL PBS 重悬病毒沉淀制成浓缩液,4 °C 溶解过夜,-70 °C 储存。将高滴度的慢病毒浓缩液感染 293T 细胞后,采用流式细胞仪检测病毒滴度。用相同的方法包装空慢病毒载体。

1.3 MSC 的培养与鉴定 取 1 只 2 月龄新西兰大白兔,体重 1.5~2.0 kg,麻醉后,在无菌操作下抽取骨髓 4~6 mL(针管内含 3 000 U/mL 肝素 0.2 mL)与 5 mL DMEM 培养基充分混合。采用 Percoll 法分离骨髓单个核细胞,用 0.01 mol/L PBS 洗涤细胞 2 次,加入 5 mL 内含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素的 DMEM 培养基,以 2.0 × 10⁵/cm² 的细胞密度接种于 40 mL 培养瓶内。当原代培养细胞融合达 70%~80%,按 1:3 比例进行传代培养,倒置显微镜观察细胞的形态和生长状态并拍照。取第 3 代 MSC 制成单细胞悬液,采用流式细胞仪行 CD29、CD34、CD44 和 CD45 鉴定。

1.4 分组与转导 取第 3 代生长状态良好的 MSC,分为未转导组、空慢病毒载体转导组(空转导组)及 SOX9 慢病毒载体转导组(SOX9 转导组)。当细胞达到 70%~80% 融合时(此时细胞密度约为 5 × 10⁵/cm²),更换细胞培养液,过夜。SOX9 转导组及空转导组加入 SOX9 慢病毒载体及空的慢病毒载体,感染复数(multiplicity of infection,MOI)为 30,轻轻混匀,置于 5% CO₂、95% 空气、37 °C、饱和湿度的培养箱,48 h 后荧光显微镜观察 GFP 的表达。更换培养液后并继续在单层条件下培养,每 2 天换液 1 次,2 周后检测指标。未转导组作为空白对照。

1.5 检测方法

1.5.1 MTT 检测 分别收获对数生长中期生长状态良好的 3 组 MSC,用细胞培养基制成单细胞悬液,每孔接种 7.0 × 10³ 个细胞。每组设 8 个平行孔。分别在第 2~6 天采用 MTT 检测细胞生长情况。每天取出 1 块培养板,向每孔加入新鲜配制的 MTT 液(5 mg/mL)20 μL,继续培养 4 h,小心吸弃孔内培养基,每孔加入二甲基亚砷 150 μL,振荡 10 min,待结晶物充分溶解后,在酶联免疫检测仪上于 570 nm 波长处检测光密度(optical density,OD)值。以时间为横轴,OD 值为纵轴绘制生长曲线。

1.5.2 流式细胞仪检测 分别收集 3 组悬浮细胞于 10 mL 离心管中,将每组细胞密度调为 5.0 × 10⁶/mL,离心、洗涤。用 100 μL 标记溶液重悬细胞,室温下避光孵育 10~15 min,再离心、洗涤。加入荧光(SA-FLOUS)溶液于 4 °C 下避光振动孵育 20 min。流式细胞仪检测时激发光波长为 488 nm,用波长为 515 nm 的通带滤器检测异硫氰酸荧光素,波长大于 560 nm 的滤器检测碘化丙啶。

1.5.3 RT-PCR 检测 感染 48 h 后收集细胞,检测 3 组细胞 SOX9 目的基因的表达情况。细胞培养到 2 周后分别检测 SOX9、II 型胶原、Aggrecan mRNA 的表达。利用引物设计软件 Primer 5.0 设计引物(表 1),委托上海生工生物技术有限公

司合成。提取 3 组细胞总 RNA,行 RT-PCR,*βactin* 为内参。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。实验均重复 3 次。凝胶成像系统成像拍照,灰度扫描进行结果分析。

表 1 RT-PCR 引物

基因	引物序列	片段大小(bp)
SOX9	5'-TTCATGAAGATGACCGACGAGCAG-3'	502
	5'-ACTTGTAAATCCGGTGGTCTCT-3'	
II型胶原	5'-TCTGAACAGCCAAAGGACCCAAGT-3'	297
	5'-GTGTTTGACACGGAGTAGCACCAT-3'	
Aggrecan	5'-TCTGTGGAATTCAGTGGCTTCCT-3'	227
	5'-AGTCCACTGCTGTCAAACACTCT-3'	
<i>βactin</i>	5'-AGATGTGGATCAGCAAGCAGGAGT-3'	133
	5'-TCTCGTTTCTGCGCCGTTAGGTTT-3'	

1.5.4 Western blot 检测 取感染 48 h 后的 MSC 细胞,检测 SOX9 蛋白的表达水平。细胞用 PBS 重悬后加入蛋白裂解液提取总蛋白。蛋白样品 95 °C 水浴变性后,10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后将凝胶中的蛋白电转移至聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride,PVDF)膜,脱脂奶粉封闭,加入第一抗体,4 °C 过夜,用含吐温-20 的 Tris 缓冲液(Tris-buffered saline with Tween-20,TBST)洗膜,加入第二抗体,室温孵育 1 h,TBST 再次洗膜。PVDF 膜在 Odyssey Infrared Imaging System 中扫描。然后用 Image-Pro Plus 5.1 分析灰度值,计算灰度系数比。感染 2 周后检测 SOX9、II 型胶原、Aggrecan 的表达水平,操作步骤同前。

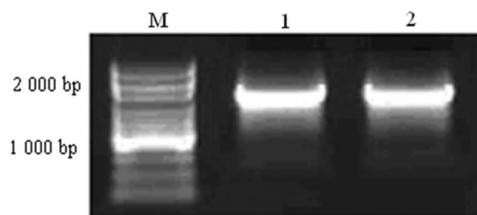
1.5.5 免疫荧光染色检测 3 组 MSC 培养 2 周后行常规切片,4% 多聚甲醛固定、0.5% TritonX-100 透化处理、10% 的羊血清封闭,行 II 型胶原、Aggrecan 免疫荧光染色,荧光显微镜下观察结果。

1.6 统计学处理 应用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SOX9 基因慢病毒载体的构建及鉴定

2.1.1 目的基因片段的获取 从 RT-PCR 产物中取 5 μL 进行琼脂糖凝胶电泳,结果显示电泳条带大小约为 1 560 bp,与理论预期值一致,见图 1。



M: Marker; 1、2: SOX9 基因片段。

图 1 SOX9 基因的琼脂糖凝胶电泳

2.1.2 慢病毒载体 Pwpxl-MOD2/SOX9 的构建及鉴定 将构建的慢病毒载体 Pwpxl-MOD2/SOX9 用 *Bam*H I/*Eco*R I 双酶切,取 10 μL 酶切产物进行鉴定。测序结果进一步证实克隆的序列完全正确。

2.1.3 重组慢病毒的包装及滴度检测 慢病毒载体感染 293T 细胞 12 h 后,在倒置显微镜下见细胞明显增大,呈球形;细胞核变大、变圆;细胞贴壁能力下降,易脱落。高滴度慢病毒浓缩液感染 293T 细胞后,流式细胞仪检测其病毒滴度为 6.0 × 10⁷ TU/mL。感染 48 h 后,在倒置荧光显微镜下观察,SOX9 慢病毒载体感染的 293T 细胞可见 GFP 的表达。

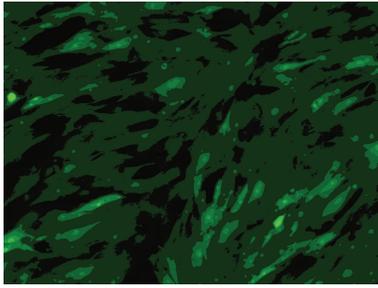


图 2 慢病毒空载体感染的 MSC(荧光显微镜 ×50)

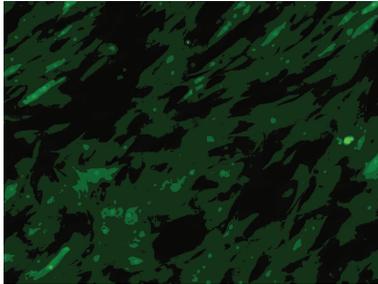


图 3 SOX9 慢病毒载体感染的 MSC(荧光显微镜 ×50)

2.2 MSC 的分离、培养及鉴定 原代细胞培养 2 d 后,部分细胞贴壁,细胞形态逐渐变成短梭形,细胞核较大,呈扁圆形;7 d 后,贴壁细胞数目明显增多,细胞形态多为长梭形,排列呈漩涡状或栅栏状;此后,细胞集落迅速增多,融合成片;12~14 d 单层细胞长满瓶底。传代 MSC 在 1 d 内贴壁,呈纺锤形,散在

均匀分布,10 d 左右长满瓶底。流式细胞仪检测细胞 CD44、CD29 表达阳性,而 CD45、CD34 表达阴性(数据未显示)。

2.3 经慢病毒载体感染的 MSC 形态 转染后 48 h,在倒置显微镜下 MSC 呈梭形、多角形,细胞质呈伪足样伸展,相互交错;在荧光显微镜下 MSC 呈多角形,细胞体增大、细胞质伸展相互交错,细胞质内充满绿色荧光物质,见图 2、3。感染 48 h 后,流式细胞仪测定转导组细胞的 GFP 阳性率为 100%。

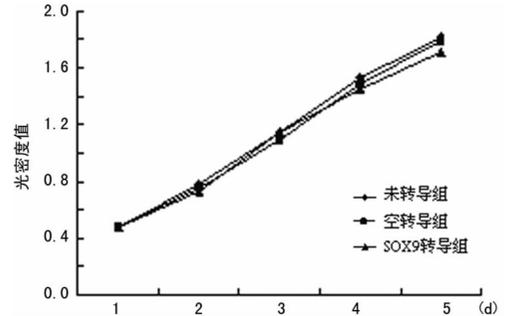


图 4 未转导组、空转导组及 SOX9 转导组 MSC 的生长曲线 (MTT)

2.4 慢病毒载体感染对 MSC 增殖与凋亡的影响 MTT 结果显示,未转导组、空转导组及 SOX9 转导组细胞的生长曲线基本一致,见图 4。统计分析表明 3 组细胞增殖的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。流式细胞仪检测 3 组 MSC 的凋亡率分别为 2.3%、3.4% 及 3.1%,3 组 MSC 凋亡率两两比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 5。

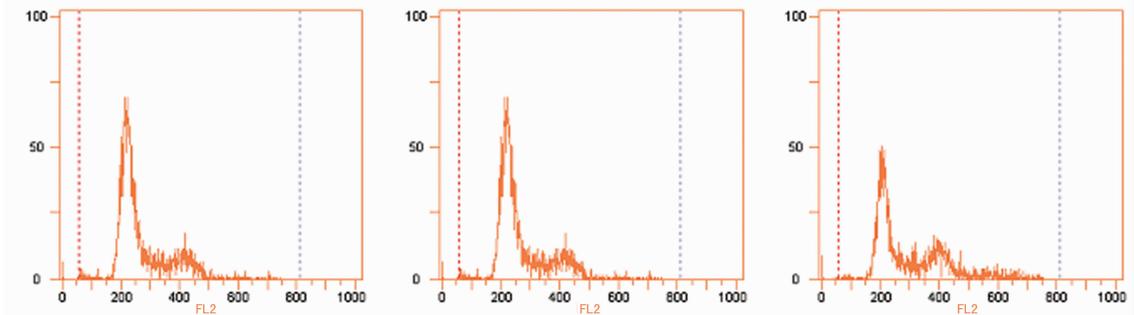
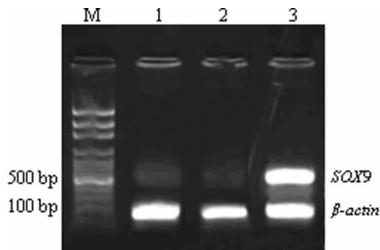


图 5 未转导组(左)、空转导组(中)及 SOX9 转导组(右) MSC 的凋亡率(流式细胞仪)

2.5 慢病毒载体感染后 MSC 中 SOX9、II 型胶原、Aggrecan mRNA 的表达情况 RT-PCR 检测显示,转染后 48 h,与空转导组、未转导组 MSC 相比,SOX9 转导组 MSC 的 SOX9 表达显著增强,见图 6;2 周后,3 组细胞中 SOX9 转导组 II 型胶原 mRNA 明显增强,而 Aggrecan 仅在 SOX9 转导组有条带出现,在未转导组和空转导组中均未见表达,见图 7。



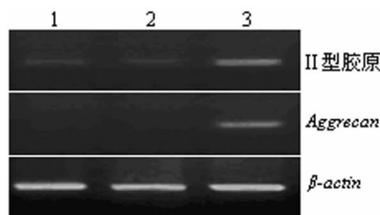
M:Marker;1:未转导组;2:空转导组;3:SOX9 转导组。

图 6 慢病毒载体感染 MSC 中 SOX9 的表达(RT-PCR)

2.6 慢病毒载体感染后 MSC 中 SOX9、II 型胶原、Aggrecan 蛋白的表达情况 Western blot 检测显示,慢病毒载体感染 48 h 后,未转导组、空转导组、SOX9 转导组细胞 SOX9 蛋白的

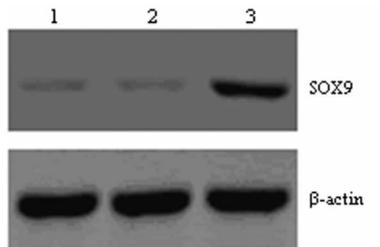
相对表达量分别为 0.156 ± 0.019 、 0.161 ± 0.023 及 0.361 ± 0.023 ;2 周后,上述 3 组细胞 SOX9 蛋白的相对表达量分别为 0.166 ± 0.014 、 0.173 ± 0.019 及 0.418 ± 0.033 。在上述 2 个时间点,SOX9 转导组细胞 SOX9 蛋白的表达均明显高于未转导组与空转导组 ($P < 0.01$);与 48 h 相比,2 周后 SOX9 转导组细胞 SOX9 蛋白的相对表达量明显升高 ($P < 0.05$)。慢病毒载体感染 2 周后,未转导组、空转导组、SOX9 转导组细胞 II 型胶原的相对表达量分别为 0.154 ± 0.022 、 0.166 ± 0.019 及 0.420 ± 0.038 ,SOX9 转导组细胞 II 型胶原的表达明显高于未转导组与空转导组 ($P < 0.01$);Aggrecan 蛋白仅在 SOX9 转导组细胞中表达,而在未转导组及空转导组细胞中均无表达。未转导组与空转导组 MSC 比较,在 SOX9、II 型胶原及 Aggrecan 蛋白表达方面的差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 8、9。

2.7 慢病毒载体感染后 MSC 中 II 型胶原、Aggrecan 的荧光染色情况 感染 2 周后,SOX9 转导组 MSC 中 II 型胶原及 Aggrecan 荧光染色呈阳性,见图 10,而空转导组及未转导组 MSC 均呈阴性(资料未显示)。



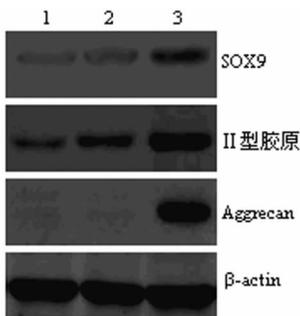
1: 未转导组; 2: 空转导组; 3: SOX9 转导组。

图 7 慢病毒载体感染 MSC 中 II 型胶原、Aggrecan mRNA 的表达 (RT-PCR)



1: 未转导组; 2: 空转导组; 3: SOX9 转导组。

图 8 MSC 中 SOX9 的表达 (Western blot, 感染 48 h)



1: 未转导组; 2: 空转导组; 3: SOX9 转导组。

图 9 MSC 中 SOX9、II 型胶原及 Aggrecan 的表达 (Western blot, 感染 2 周)

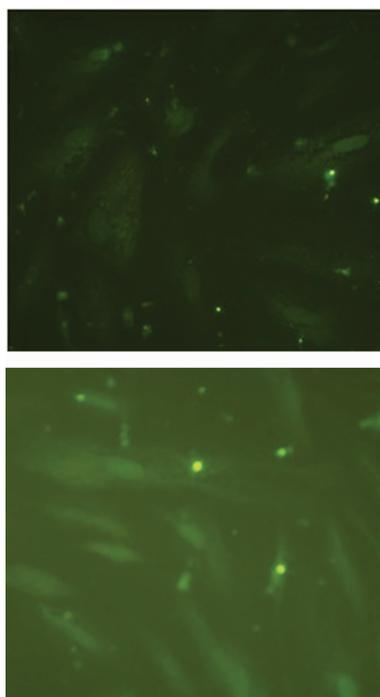


图 10 MSC 中 II 型胶原 (上)、Aggrecan (下) 的表达情况 (荧光显微镜 ×200)

3 讨论

MSC 是一类存在于骨髓中, 具有多向分化潜能的细胞。在一定诱导条件下, MSC 能够分化为不同的细胞类型, 包括椎间盘中类软骨细胞及髓核样细胞^[7-9], 而且具有自我更新能力, 是目前椎间盘生物学治疗中应用较为广泛的种子细胞。采用 MSC 治疗椎间盘退变的关键问题是如何将 MSC 诱导分化为髓核样细胞而发挥其修复作用。体外诱导 MSC 向髓核细胞分化的方法主要有: 共培养技术、细胞因子刺激、基因修饰及三维条件下培养^[10]。Risbud 等^[11]运用三维水凝胶培养体系, 在低氧状态下结合转化生长因子 β 成功地将大鼠 MSC 向髓核样细胞诱导。Richardson 等^[8]发现, 将人的 MSC 与髓核细胞共培养, 培养的 MSC 可表达软骨特异性基因, 这提示 MSC 能够向髓核样细胞分化。Richardson 等^[9]将人 MSC 种植在壳聚糖磷酸甘油水凝胶上培养, 也可诱导 MSC 向髓核样细胞分化。上述体外诱导的方法虽然能够有效促进 MSC 向软骨细胞表型分化, 但将其运用到体内而发挥修复椎间盘的作用还存在诸多问题, 如三维培养体系会限制细胞的大量扩增^[12], 不能满足细胞移植治疗时对细胞数量的需求; MSC 经藻酸盐微球包裹后, 细胞的释放技术要求高, 难以掌握; 各种支架材料的长期应用对细胞活力的影响还未明确等。总之, 调控 MSC 向软骨类细胞分化的确切机制目前还不十分清楚, 对最优诱导方法的认定还存在争议。

SOX9 是软骨分化的必需转录因子, 是维持软骨表型的主要调控基因。研究显示, 过表达 SOX9 基因在琼脂平板或藻酸盐培养基中均能促进骨、关节及软骨细胞的再分化。Sive 等^[13]发现成人椎间盘髓核细胞中有 SOX9 基因表达, 而这类表达 SOX9 基因的细胞呈软骨样表型, 根据这一研究结果推测, 如果上调 SOX9 基因在 MSC 中的表达水平, 则可能诱导 MSC 向髓核样细胞表型分化。由于椎间盘细胞没有特异性的表面分子标志, 通常把椎间盘细胞称为“软骨样细胞”或“椎间盘样细胞”。尽管椎间盘细胞和软骨细胞之间有很大的区别, 但二者均为间充质来源细胞, 某些表型特征相同^[14-15]。SOX9 已被证实为软骨细胞表型的主要调控者^[16], II 型胶原与 Aggrecan 是软骨细胞的特征性表面标志, 因此, 本实验选用 SOX9、II 型胶原及 Aggrecan 作为 MSC 向髓核样细胞分化的特征指标。

慢病毒可感染分裂期与非分裂期细胞, 具有转移外源性目的基因片段的容量较大, 目的基因表达时间长, 不易诱发宿主免疫反应等优点^[17], 因此, 本研究选择慢病毒作为载体。通过 RT-PCR 获得人 SOX9 基因编码区片段, 将该片段克隆入质粒 Pwpxl-MOD2 中获得 Pwpxl-MOD2/SOX9, 用磷酸钙沉淀法将质粒 Pwpxl-MOD2/SOX9、pRsv-REV、pMDlg-pRRE、pMD2G 共感染至 293T 细胞, 获得携带目的基因 SOX9 的重组慢病毒载体, 采用 RT-PCR、Western blot 检测目的基因和蛋白质的表达, 慢病毒载体感染第 3 代 MSC 的感染复数为 30, 经荧光显微镜观察到 GFP 的表达, 流式细胞仪检测感染率达 100%。MTT 显示病毒感染对细胞生长没有影响, 流式细胞仪检测表明 3 组细胞凋亡率的差异无统计学意义, 说明慢病毒载体对 MSC 的生物学行为无明显影响。

本实验证实, 慢病毒载体感染第 3 代 MSC, 后者在单层培养条件下, 保持了继续分化的能力。感染 48 h 后, 经 RT-PCR 及 Western blot 检测到目的基因 SOX9 的表达; 2 周后, SOX9 转导组细胞 SOX9 蛋白的表达明显增高, 并开始出现过表达效应, SOX9 转导组细胞 II 型胶原及 Aggrecan 在蛋白及 mRNA 水平的表达明显高于空转导组及未转导组。同时, SOX9 转导组细胞 II 型胶原及 Aggrecan 的免疫荧光染色阳性, 而空转导组及未转导组均为阴性。以上实验结果提示经 SOX9 基因修饰的 MSC 能够分泌合成 SOX9、II 型胶原及 Aggrecan, 具有了椎间盘

髓核细胞的功能,从而实现了向髓核样细胞表型的分化。

参考文献:

- [1] Cancedda R, Descalzi Cancedda F, Castagnola P. Chondrocyte differentiation[J]. *Int Rev Cytol*, 1995, 159: 265-358.
- [2] Wright E, Hargrave MR, Christiansen J, et al. The Sry-related gene SOX9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos[J]. *Nat Genet*, 1995, 9(1): 15-20.
- [3] Hering TM. Regulation of chondrocyte gene expression [J]. *Front Biosci*, 1999, 4: D743-761.
- [4] Lefebvre V, Huang W, Harley VR, et al. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene[J]. *Mol Cell Biol*, 1997, 17(4): 2336-2346.
- [5] Zhao Q, Eberspaecher H, Lefebvre V, et al. Parallel expression of SOX9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis[J]. *Dev Dyn*, 1997, 209(4): 377-386.
- [6] 许运, 陈亮, 朱雪松, 等. SOX9 基因慢病毒载体的构建及其在骨髓间充质干细胞中的表达[J]. *中华医学杂志*, 2010, 90(47): 3376-3380.
- [7] 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.
- [8] Richardson SM, Walker RV, Parker S, et al. Intervertebral disc cell-mediated mesenchymal stem cell differentiation [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(3): 707-716.
- [9] 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.
- [10] Wei A, Chung SA, Tao H, et al. Differentiation of rodent bone marrow mesenchymal stem cells into intervertebral disc-like cells following coculture with rat disc tissue[J]. *Tissue Eng Part A*, 2009, 15(9): 2581-2595.
- [11] Risbud MV, Albert TJ, Guttapalli A, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells towards a nucleus pulposus-like phenotype in vitro; implications for cell-based transplantation therapy [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2004, 29(23): 2627-2632.
- [12] Zhang Y, Markova D, Im HJ, et al. Primary bovine intervertebral disc cells transduced with adenovirus overexpressing 12 BMPs and SOX9 maintain appropriate phenotype[J]. *Am J Phys Med Rehabil*, 2009, 88(6): 455-463.
- [13] Sive JI, Baird P, Jeziorski M, et al. Expression of chondrocyte markers by cells of normal and degenerate intervertebral discs[J]. *Mol Pathol*, 2002, 55(2): 91-97.
- [14] 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.
- [15] Aota Y, An HS, Imai Y, et al. Comparison of cellular response in bovine intervertebral disc cells and articular chondrocytes; effects of lipopolysaccharide on proteoglycan metabolism[J]. *Cell Tissue Res*, 2006, 326(3): 787-793.
- [16] Lefebvre V, Behringer RR, de Crombrughe B. L-Sox5, Sox6 and SOX9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2001, 9 Suppl A: S69-75.
- [17] Bartosch B, Cosset FL. Strategies for retargeted gene delivery using vectors derived from lentiviruses [J]. *Curr Gene Ther*, 2004, 4(4): 427-443.
- (收稿日期: 2012-06-09 修回日期: 2012-09-03)
- (上接第 7 页)
- dominant polycystic kidney disease and the PKD1/TSC2 contiguous gene syndrome[J]. *Kidney Int*, 2008, 74(11): 1468-1479.
- [4] O'Callaghan FJ, Shiell AW, Osborne JP, et al. Prevalence of tuberous sclerosis estimated by capture-recapture analysis[J]. *Lancet*, 1998, 351(9114): 1490.
- [5] Niida Y, Lawrence-Smith N, Banwell A, et al. Analysis of both TSC1 and TSC2 for germline mutations in 126 unrelated patients with tuberous sclerosis [J]. *Hum Mutat*, 1999, 14(5): 412-422.
- [6] Ali M, Girimaji SC, Markandaya M, et al. Mutation and polymorphism analysis of TSC1 and TSC2 genes in Indian patients with tuberous sclerosis complex[J]. *Acta Neurol Scand*, 2005, 111(1): 54-63.
- [7] Dabora SL, Jozwiak S, Franz DN, et al. Mutational analysis in a cohort of 224 tuberous sclerosis patients indicates increased severity of TSC2, compared with TSC1, disease in multiple organs[J]. *Am J Hum Genet*, 2001, 68(1): 64-80.
- [8] Green AJ, Smith M, Yates JR. Loss of heterozygosity on chromosome 16p13.3 in hamartomas from tuberous sclerosis patients[J]. *Nat Genet*, 1994, 6(2): 193-196.
- [9] Plank TL, Yeung RS, Henske EP. Hamartin, the product of the tuberous sclerosis 1(TSC1) gene, interacts with tuberin and appears to be localized to cytoplasmic vesicles [J]. *Cancer Res*, 1998, 58(21): 4766-4770.
- [10] Lamb RF, Roy C, Diefenbach TJ, et al. The TSC1 tumour suppressor hamartin regulates cell adhesion through ERM proteins and the GTPase Rho[J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(5): 281-287.
- [11] Haddad LA, Smith N, Bowser M, et al. The TSC1 tumor suppressor hamartin interacts with neurofilament-L and possibly functions as a novel integrator of the neuronal cytoskeleton[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(46): 44180-44186.
- [12] Serti J, Barisi N, Sostarko M, et al. Deletion screening of the Duchenne/Becker muscular dystrophy gene in Croatian population[J]. *Coll Antropol*, 1997, 21(1): 151-156.
- [13] Clemens PR, Fenwick RG, Chamberlain JS, et al. Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophy families, using dinucleotide repeat polymorphisms[J]. *Am J Hum Genet*, 1991, 49(5): 951-960.
- [14] Chamberlain JS, Gibbs RA, Ranier JE, et al. Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy [M]. San Diego: Academic Press, 1990.
- (收稿日期: 2012-04-27 修回日期: 2012-09-12)