

利用 CRISPR/Cas9 系统在 Beta - TC - 6 细胞株中剔除 *Sidt2* 基因

吕康甲^{1a} 梁飞腾^{1a} 郑慧豪^{1b} 张 杨^{1a} 徐海平^{1a} 董莹莹^{1a} 高家林²

(皖南医学院 a. 临床医学院; b. 医学影像学院 安徽 芜湖 241002; 2. 皖南医学院第一附属医院 弋矶山医院 内分泌科, 安徽 芜湖 241001)

【摘要】目的: 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑系统和电穿孔技术, 在小鼠胰岛素瘤胰岛 β 细胞(Beta-TC-6) 中剔除溶酶体膜蛋白 *Sidt2* 基因。方法: 针对小鼠 *Sidt2* 基因设计向导 RNA(sgRNA) ,sgRNA 退火合成双链后克隆到 px459 载体中。测序鉴定成功的重组质粒命名为 px459-*Sidt2* 并大量扩增。使用 NEPA 21 高效基因转染系统将 px459-*Sidt2* 重组质粒电转到 Beta-TC-6 细胞中, 电转染 48 h 后使用嘌呤霉素加压进行阳性细胞筛选。阳性细胞扩增冻存, 得到 *Sidt2* 基因剔除混合克隆细胞株, 提取细胞 DNA 及蛋白, 利用 T7 酶以及 Western blot 方法检测细胞株中 *Sidt2* 的敲除效果。结果: 成功构建靶向小鼠 *Sidt2* 基因的 px459 重组质粒 px45-*Sidt2*。使用 NEPA 21 高效基因转染系统电转 Beta-TC-6 的最佳电转参数为脉冲电压 150 V, 脉冲时间 5 ms, 脉冲间隔 50 ms, 脉冲次数 2 次, 电压衰减 10%, 电穿孔模式为正方向。与对照组细胞相比, 嘌呤霉素加压筛选得到的 Beta-TC-6 阳性细胞中的 *Sidt2* 蛋白表达缺失(*P* < 0. 05) , 成功在小鼠胰岛素瘤胰岛 β 细胞(Beta-TC-6) 中剔除溶酶体膜蛋白 *Sidt2* 基因。结论: 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑系统以及电穿孔技术, 在相对难转染的小鼠胰岛素瘤胰岛 β 细胞 Beta-TC-6 成功剔除 *Sidt2* 基因。

【关键词】CRISPR/Cas9; 电穿孔; *Sidt2*; Beta-TC-6

【中图分类号】R-332; R 446. 6 **【文献标志码】**A

【DOI】10. 3969/j. issn. 1002-0217. 2019. 03. 003

Sidt2 gene knocked out in Beta - TC - 6 cell line using CRISPR/Cas9 system

LÜ Kangjia LIANG Feiteng ZHENG Huihao ZHANG Yang XU Haiping DONG Yingying GAO Jialin

School of Clinical Medicine ,Wannan Medical College ,Wuhu 241002 ,China

【Abstract】Objective: To knock out the lysosomal membrane protein *Sidt2* gene in mouse pancreatic islet tumor cells (Beta-TC-6) using the CRISPR / Cas9 gene editing technique. **Methods:** Single-guided RNAs (sgRNAs) target on *Sidt2* gene was designed and colonized into BbsI site in px459 after annealing. The correct recombinant plasmids were identified by sequencing ,named as px459-*Sidt2* and subjected to amplification and sequence verification. Then the recombinant plasmids were extracted with EndoFree Maxi Plasmid Kit to achieve the purity and concentration required for cell electrical transfection. The px459-*Sidt2* recombinant plasmid was transfected into Beta-TC-6 cells using NEPA 21 efficient gene transfection system ,and the positive cells were screened with the pressure of puromycin for 48 hours following transfection. The positive cells were amplified and frozen to obtain mixed clone cell lines from which *Sidt2* gene was deleted. The cell DNA and protein were extracted ,and the knockout effect of *Sidt2* was detected using T7 enzyme and Western blot. **Results:** px459 recombinant plasmid targeting mouse *Sidt2* gene was successfully constructed. The optimal electrotransport parameter of electroporation Beta-TC-6 using NEPA 21 high-efficiency gene transfection system was at impulse voltage 150V ,time 5 ms ,interval 50 ms ,frequency 2 times , and voltage attenuation by 10%. Compared with control cells ,*sidt* protein expression in puromycin-screened Beta-TC-6 positive cells was absent. **Conclusion:** The *Sidt2* gene was successfully knocked out in Beta-TC-6 ,a relatively difficult-to-transfect mouse pancreatic tumor cell line using CRISPR / Cas9 gene editing and electroporation.

【Key words】 CRISPR/Cas9; electroporation; *Sidt2* gene; Beta-TC-6

CRISPR/Cas 系统是细菌和古细菌在长期进化 过程中形成的一种免疫防御机制 ,能够抵御外来病

基金项目: 国家自然科学基金项目(81471002); 安徽省大学生创新创业训练计划项目(201710368134); 安徽省自然科学基金项目(1708085MH188)

收稿日期: 2018-09-27

作者简介: 吕康甲(1997-) ,男, 2015 级临床医学专业本科生 (电话) 18315319525 (电子信箱) 18315319525@163. com;

高家林, 男, 副主任医师, 教授 (电子信箱) jialing. gao@ yahoo. com, 通信作者。

毒、噬菌体、质粒等元件的侵入^[1-3]。该系统主要通过细胞之内引入特异性的向导 RNA (sgRNA) 和 cas9 酶,在特异性 sgRNA 的引导下,cas9 酶切割 sgRNA 下游的 PAM 区而造成 DNA 双链断裂,然后利用细胞自身的非同源末端连接(NHEJ)或者同源重组(HR)修复机制修复,对断裂的 DNA 进行插入缺失、修复或替换,从而实现基因编辑功能^[4]。CRISPR/Cas9 系统相对于传统的基因编辑工具 ZFN 和 TALEN 具有成本低、操作简单等优点^[5-6]。但是由于 Cas9 是一种分子质量比较大的多功能核酸酶,相对于普通表达质粒转染细胞难度偏大,尤其在难转染的细胞系中^[7]。虽然 CRISPR/Cas9 系统对转染效率要求不高,可以依靠转染后的抗生素加压筛选和单克隆培养建立基因稳定剔除细胞系,但是对大多数实验室来说,挑取单克隆仍然是一项繁重且效率低下的工作,极大地妨碍这种基因编辑手段的推广使用,所以 CRISPR/Cas9 质粒转染进入目的细胞系其实对于大多数实验室来说,是一个不可逾越的屏障。为了有效地解决这个问题,我们将电穿孔转染技术和 CRISPR/Cas9 系统结合,在相对难转染的内分泌细胞系小鼠胰岛素瘤胰岛 β 细胞(Beta-TC-6)中剔除溶酶体膜蛋白 *Sid2* 基因,希望为大多数实验室提高 CRISPR/Cas9 系统的应用效率提供切实可行的方法。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株以及细胞 质粒载体 pSpCas9 (BB)-2A-Puro (PX459) (Addgene plasmid # 62988);感受态细胞 DH5 α (天根生化科技有限公司);Beta-TC-6(中国科学院细胞库)。

1.2 主要试剂及仪器 BbsI 限制性内切酶、T4 DNA Ligase、T7 核酸内切酶 I (美国 NEB 公司);Opti-MEM 减血清培养基(美国 GE 公司);胎牛血清(标准级)(依科赛生物科技有限公司);Annealing Buffer for DNA Oligos (5X) (上海碧云天公司)、 β -actin 抗体(sigma 公司);*Sid2* 兔多克隆抗体(abgent 公司);PCR 仪(德国耶拿分析仪器股份公司);蛋白印记系统(美国 Bio-Rad 公司);NEPA 21 高效基因转染系统(日本 NEPA 公司)。

1.3 其他 基因测序由华大科技公司完成。sgRNA ssDNA 由上海生工生物科技有限公司合成。

1.4 实验方法

1.4.1 sgRNA oligo DNA 序列的设计 利用 sgRNA 在线设计工具(<http://crispr.mit.edu/>)针对小鼠 *Sid2* 基因设计长度为 20 bp 左右的 oligo DNA,

sgRNA ssDNA 序列 F 链 5'端需要添加 CACC 从而可以和 BbsI 酶切后的载体互补,需要注意的是 F 链的第一个碱基必须是 G,如果选取的 Guide 序列的第一个碱基不是 G,可自行添加一个 G 以增强 U6 启动子的活性,R 链的 5'端添加 AAAC。另外,需在位点上下游各设计一条引物,用于后续检测阳性克隆,引物能扩增约 300 bp 的 DNA 片段,上游引物距突变位点约 100 bp,下游引物距突变位点约 200 bp。将设计后的序列送公司合成,纯化级别为 PAGE。

1.4.2 oligo DNA 退火 合成的 sgRNA 稀释为终浓度为 100 μ mol/L,配制退火反应体系:稀释的 sgRNA 各 1 μ L 2 μ L Annealing Buffer for DNA Oligos (5X),用超纯水补足到 10 μ L。PCR 仪中 95 $^{\circ}$ C 10 min,随后取出室温冷却 2 h。稀释 10 倍后 -20 $^{\circ}$ C 储存备用。

1.4.3 px459 重组质粒的构建与鉴定 px459 质粒为含有 U6 启动子的 sgRNA 骨架的表达载体。① px459 载体的线性化:使用 BbsI 限制性内切酶线性化 px459 载体,使用胶回收试剂盒回收线性化 px459 载体;②sgRNA 与线性化 px459 连接:按照 T4 连接酶说明书配置反应体系,PCR 中 25 $^{\circ}$ C 反应 3 h;③连接产物转化感受态细胞 DH5 α ,37 $^{\circ}$ C 培养过夜。次日挑取菌落摇菌抽提质粒;④px459 重组质粒的验证:质粒送生物公司测序,测序引物为 U6 启动子通用引物,根据测序结果鉴定 sgRNA 是否正确连接到载体中。测序成功的质粒命名为 px459-*Sid2*,使用去内毒素质粒大量提取试剂盒抽提质粒,要求质粒浓度大于 1 g/L 并且纯度达到电转染要求。

1.4.4 Beta-TC-6 细胞的培养、重组质粒电转参数的优化及阳性细胞的筛选 ①Beta-TC-6 细胞的培养:细胞培养条件为含 15% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,细胞汇合度达到 70% 左右进行传代。② px459-*Sid2* 质粒的电转:电转前细胞融合度达到 80% 左右,胰酶消化细胞后加入 Opti-MEM 使其成为单细胞悬液并且调整细胞数量为 1×10^6 个/90 μ L,吸取 90 μ L 细胞悬液加入 10 μ L 质粒轻轻混匀后加入电转杯中。设置导入电转参数:脉冲电压为 20 V,脉冲时间为 20 ms,脉冲间隔为 50 ms,脉冲次数为 5 次,电压衰减为 40%,电穿孔模式为正方向。穿孔电转参数为:固定脉冲时间 5 ms,脉冲间隔 50 ms,脉冲次数 2 次,电压衰减 10%,电穿孔模式为正方向,设置脉冲电压梯度为 125、150、175、200 V。完成电转染的细胞在六孔板中培养过夜。③阳性细胞的筛选:电转染 48 h 加入嘌呤霉素至终浓度为 3 μ g/mL 进行筛选(提前需要进行嘌呤霉素筛选梯

度的摸索,本实验室 Beta-TC-6 的筛选浓度为 3 mg/L, 72 h 后换为正常培养条件,扩增冻存。

1.4.5 T7 酶和 Western blot 检测 野生型细胞以及阳性细胞一部分使用试剂盒提取 DNA,一部分使用细胞裂解液提取全细胞蛋白。提取的 DNA 通过 PCR 对 sgRNA 的靶向区域进行扩增,扩增引物的退火温度 54℃。①T7 酶切分析:按照说明书进行操作,酶切后的产物通过 2% 琼脂糖凝胶分析。② Western blot 检测:使用微量分光光度计测定蛋白浓度,取等量的蛋白加入蛋白上样缓冲液,煮沸后进行 SDS-PAGE 电泳,电泳完成后湿转到 PVDF 膜上,用 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h,一抗孵育过夜,第 2 天进行二抗孵育,加入曝光底物后使用超灵敏多功能成像仪进行曝光,以 β -actin 作为内参。

1.5 统计学分析 使用 GraphPad Prism 6 软件进行数据处理分析,组间数据分析采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

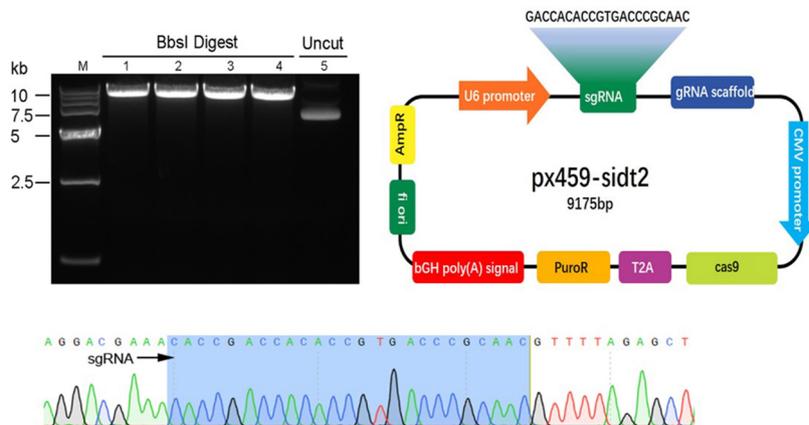


图 1 成功构建 px459-Sid2 克隆

2.3 Beta-TC-6 细胞 px459-Sid2 最佳电转染参数的优化 电转染后抗生素筛选,结果显示脉冲电压为 150 V 时转染效率最高并且细胞状态没有明显改变,因此确定 Beta-TC-6 细胞电转染 px459-Sid2 最优电转穿孔电转参数为:脉冲电压 150 V,脉冲时间 5 ms,脉冲间隔 50 ms,脉冲次数 2 次,电压衰减 10%,电穿孔模式为正方向(图 2)。

2.4 T7E1 酶及 Western blot 检测小鼠 Sid2 基因的敲除效果 T7E1 酶结果显示,电转染 px459-Sid2 的混合克隆细胞有一条明显的切开的条带,即混合克隆细胞中出现碱基错配,表明 px459-Sid2 在 Beta-TC-6 细胞中实现靶向敲除。Western blot 检测敲除效果,结果显示同野生型细胞比较,混合克隆细胞

2.1 小鼠 Sid2 基因敲除靶点的选择以及 sgRNA 序列 小鼠 Sid2 基因 sgRNA 和验证引物的 DNA 序列见表 1。

表 1 小鼠 Sid2 sgRNA 及验证引物序列

名称	引物序列(5'-3')
sgRNA-F	CACCGACCACACCGTGACCCGCAAC
sgRNA-R	AAACGTTGCGGCTCACGGTGTGGTC
验证引物-F	TATCTGAGCCGGGTTAAAGT
验证引物-R	TGGCAGGGAAGCTCCCAAGC

2.2 px459-Sid2 克隆构建 px459 空载体经 BbsI 酶切线性化后,从琼脂糖凝胶中回收酶切后的线性化片段。将退火的 sgRNA 双链和回收的线性化 px459 载体相连,构建 px459-Sid2 重组质粒。构建的 px459-Sid2 经测序表明插入序列的位置、方向均正确,重组质粒 px459-Sid2 构建成功(图 1)。

Sid2 蛋白表达降低($t = 6.668, P = 0.0026$)(图 3)。进一步实验需要进行单克隆培养,从而得到敲除效率为 100% 的克隆细胞株。

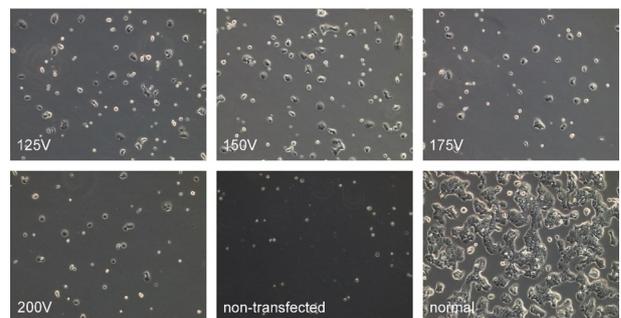
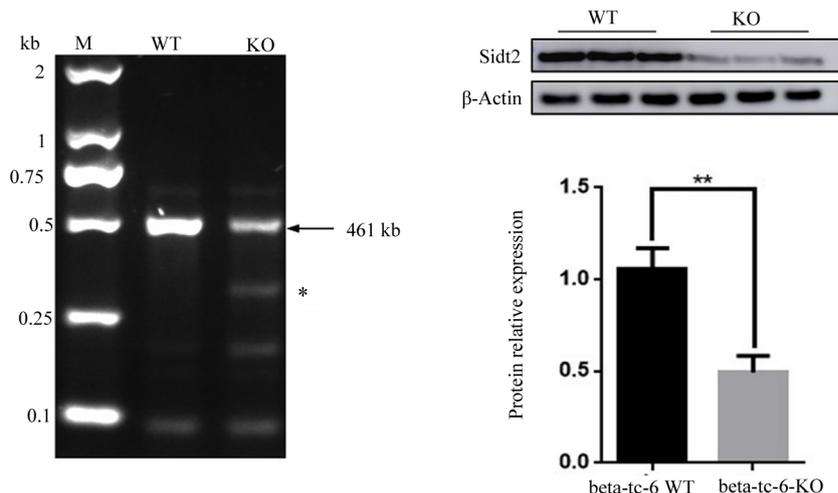


图 2 设置脉冲电压梯度加压筛选 72 h 后的阳性细胞



* T7E1 酶切开的条带; ** $P < 0.05$ 。

图3 T7E1 酶及 western blot 检测小鼠 *Sid2* 基因的敲除效果

3 讨论

CRISPR/Cas9 基因编辑系统成为继锌指蛋白 (ZFPs)、转录激活子样效应因子核酸酶 (TALEs) 之后的第三代基因编辑技术^[8-9]。与传统的基因编辑工具相比具有诸多的优点,首先 CRISPR/Cas9 基因编辑系统适应性和操作性强,来自产脓链球菌和嗜热链球菌的 Cas9 由于 PAM 识别序列仅为 2 个碱基 (GG),几乎可以在所有的基因中找到大量靶点^[8]。Cas9 蛋白在目前测试过的几乎所有生物和细胞中均有活性,包括细菌、酵母、植物、鱼以及哺乳动物细胞^[10-14];其次,CRISPR/Cas9 基因编辑系统简单易学,目前已有多种成熟的 CRISPR/Cas9 基因编辑系统质粒载体,常规的分子生物学实验室即可开展构建,只需要将长约 25 bp 左右的 sgRNA 双链连接到线性化的载体中,构建难度相对于常见的表达载体和报告基因载体小,构建完成的载体只需要通过菌落 PCR 或者测序即可鉴定,不必像构建表达载体那样担心长片段的碱基突变问题。但是 CRISPR/Cas9 质粒需要表达的 cas9 蛋白相对于其他的载体偏大,一般常常在 10 kbp 以上,转染细胞难度较大,尤其对于难转染细胞更是雪上加霜。虽然可以通过对成功转染的细胞表达的抗生素筛选或者荧光标记束进行筛选,但是转染效率低将对后续的筛选和单克隆培养造成很大的困难,并且 cas9 蛋白具有一定的细胞毒性^[15],后续的抗生素筛选和流式分选也会对转染成功的细胞产生影响。因此提高 CRISPR/Cas9 质粒的转染效率是急需解决的问题。

目前质粒转染主流的方法包括脂质体转染、阳离子非脂质体转染、磷酸钙转染等。这些方法有各自的优点,同时也存在着缺点^[16]。比如脂质体转染

效率高,但是对于一些原代细胞或者难转染的分泌性的细胞转染效率较低。电穿孔也称为电转染,是通过高强度的电场作用,使细胞膜上形成可逆的瞬间通道,质粒在电场的作用下通过通道进入细胞内^[17]。电穿孔转染相比于其他转染方法具有操作简单,对于原代细胞和难转染细胞效率高、重复性好等优点;但是电穿孔转染对于不同的细胞系转染参数差异较大,因此需要针对不同的细胞系进行电转染参数的优化^[18]。目前比较成熟的运用电穿孔的细胞都是常见细胞系或者原代细胞,对胰岛细胞系使用电穿孔较少,也没对其进行电转染参数进行优化;另外质粒的纯度以及浓度、细胞的状态等都会对电转的效率产生影响。电转参数优化时一般在保证转染质粒纯度浓度以及细胞状态的前提下,通过固定穿孔时间,摸索不同穿孔电压梯度,以摸索细胞系最优穿孔电压。

本实验针对 Beta-TC-6 难转染以及 CRISPR/Cas9 质粒分子较大的特点,采取电穿孔进行 Cas9 质粒的递送,并且设置不同的穿孔电压梯度进行电转参数的优化,从而实现了在 Beta-TC-6 中高效的递送 CRISPR/Cas9 质粒。通过将 CRISPR/Cas9 基因编辑系统和电穿孔相结合,克服了 CRISPR/Cas9 质粒难转导的特点,为常规的分子生物学实验室开展 CRISPR/Cas9 基因编辑系统提供了切实可行的办法。

【参考文献】

[1] BOLOTIN A, QUINQUIS B, SOROKIN A *et al*. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin[J]. *Microbiology* 2005, 151(Pt 8): 2551-2561.

[2] MOJICA FJ ,DIEZ-VILLASENOR C ,GARCIA-MARTINEZ J ,*et al.* Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements [J]. *J Mol Evol* ,2005 ,60 (2) : 174 - 182.

[3] POURCEL C ,SALVIGNOL G ,VERGNAUD G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA ,and provide additional tools for evolutionary studies [J]. *Microbiology* 2005 ,151(Pt 3) : 653 - 663.

[4] DOUDNA JA ,CHARPENTIER E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 [J]. *Science* 2014 , 346(6213) : 1258096.

[5] WANG H ,YANG H ,SHIVALILA CS *et al.* One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering [J]. *Cell* 2013 ,153(4) : 910 - 918.

[6] YANG H ,WANG H ,SHIVALILA CHIKDU S *et al.* One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by crispr/cas-mediated genome engineering [J]. *Cell* 2013 ,154(6) : 1370 - 1379.

[7] LIANG X ,POTTER J ,KUMAR S *et al.* Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection [J]. *Journal of Biotechnology* 2015 ,208:44 - 53.

[8] CONG L ,RAN FA ,COX D *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science* 2013 ,339(6121) : 819 - 823.

[9] MILLER JC ,TAN S ,QIAO G *et al.* A TALE nuclease architecture for efficient genome editing [J]. *Nature Biotechnology* ,2010 ,29: 143.

[10] ZHOU X ,XIN J ,FAN N *et al.* Generation of CRISPR/Cas9-media-

ted gene-targeted pigs via somatic cell nuclear transfer [J]. *Cell Mol Life Sci* 2015 ,72(6) : 1175 - 1184.

[11] WAN H ,FENG C ,TENG F *et al.* One-step generation of p53 gene biallelic mutant *Cynomolgus* monkey via the CRISPR/Cas system [J]. *Cell Res* 2015 ,25(2) : 258 - 261.

[12] ZHAO P ,ZHANG Z ,KE H *et al.* Oligonucleotide-based targeted gene editing in *C. elegans* via the CRISPR/Cas9 system [J]. *Cell Res* 2014 ,24(2) : 247 - 250.

[13] HRUSCHA A ,KRAWITZ P ,RECHENBERG A ,*et al.* Efficient CRISPR/Cas9 genome editing with low off-target effects in zebrafish [J]. *Development* 2013 ,140(24) : 4982 - 4987.

[14] SHAN Q ,WANG Y ,LI J *et al.* Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system [J]. *Nat Biotechnol* 2013 , 31(8) : 686 - 688.

[15] MORGENS DW ,WAINBERG M ,BOYLE EA *et al.* Genome-scale measurement of off-target activity using Cas9 toxicity in high-throughput screens [J]. *Nature Communications* 2017 ,8: 15178.

[16] TAKEI H ,BABA Y ,HISATSUNE A *et al.* Glycyrrhizin inhibits interleukin-8 production and nuclear factor-kappaB activity in lung epithelial cells ,but not through glucocorticoid receptors [J]. *J Pharmacol Sci* 2008 ,106(3) : 460 - 468.

[17] FAURIE C ,REBERSEK M ,GOLZIO M ,*et al.* Electro-mediated gene transfer and expression are controlled by the life-time of DNA/membrane complex formation [J]. *J Gene Med* ,2010 ,12 (1) : 117 - 125.

[18] XU Y ,LU Y ,XING W. An individually addressable suspended-drop electroporation system for high-throughput cell transfection [J]. *Lab Chip* 2014 ,14(4) : 686 - 690.

(上接第 213 页)

第二 ,目前脱细胞髓核支架暂停留在支架的制备及性能检测 ,未接种种子细胞在体外及体内构建出椎间盘^[16]。第三 ,脱髓核细胞基质本身会不会对种子细胞向髓核细胞分化具有诱导作用 ,以及对髓核细胞表型具有维持作用? 需要接下来进一步研究。目前脱髓核细胞基质构建组织工程椎间盘的研究还处于初步阶段 ,相信通过后续临床研究和体外研究的深入 ,脱髓核细胞基质作为组织工程基质具有良好的发展前景。

【参考文献】

[1] ANDERSSON GB. Epidemiological features of chronic low-back pain [J]. *Lancet* ,1999 ,354(9178) : 581 - 585.

[2] TONG F ,LV Q ,LI A *et al.* An epidemiological study of the prevalence rate of inflammatory back pain and axial spondyloarthritis in a university in the south of China [J]. *Clin Rheumatol* ,2018 ,37 (11) : 3087 - 3091.

[3] HUGHES SP ,FREEMONT AJ ,HUKINS DW *et al.* The pathogenesis of degeneration of the intervertebral disc and emerging therapies in the management of back pain [J]. *J Bone Joint Surg Br* , 2012 ,94(10) : 1298 - 1304.

[4] KALICHMAN L ,HUNTER DJ. The genetics of intervertebral disc degeneration. Associated genes [J]. *Joint Bone Spine* ,2008 ,75 (4) : 388 - 396.

[5] ADAMS MA ,ROUGHLEY PJ. What is intervertebral disc degener-

ation and what causes it [J]. *Spine (Phila Pa 1976)* ,2006 ,31 (18) : 2151 - 2161.

[6] MASSEY CJ ,VAN DONKELAAR CC ,VRESILOVIC E ,*et al.* Effects of aging and degeneration on the human intervertebral disc during the diurnal cycle: a finite element study [J]. *J Orthop Res* , 2012 ,30(1) : 122 - 128.

[7] ADAMS MA ,FREEMAN BJ ,MORRISON HP *et al.* Mechanical initiation of intervertebral disc degeneration [J]. *Spine (Phila Pa 1976)* 2000 ,25(13) : 1625 - 1636.

[8] 周志杰. 腰椎融合术后邻近节段退变的手术相关危险因素分析和早期临床观察 [D]. 杭州: 浙江大学 ,2012.

[9] 董视师 ,李景峰 ,周逸驰 ,等. 腰椎间盘退变: 组织工程修复及生物力学评价 [J]. *中国组织工程研究* ,2015 ,(37) : 6024 - 6030.

[10] 陶铁卿. II 型胶原荷载成髓核细胞分化的脂肪间充质干细胞修复椎间盘退变的体内外研究 [D]. 杭州: 浙江大学 ,2016.

[11] 崔翔. 骨髓间充质干细胞结合静电纺丝生物活性支架治疗椎间盘退变的研究 [D]. 重庆: 第三军医大学 ,2014.

[12] 李大鹏. IGF - 1 促进大鼠退变髓核细胞 Aggrecan 和 II 型胶原的表达及其机制 [D]. 苏州: 苏州大学 ,2013.

[13] 潘宗友. 吉非替尼治疗椎间盘退变与半月板损伤的效应和机制研究 [D]. 杭州: 浙江大学 ,2018.

[14] 谭伟. 去细胞髓核基质来源三维多孔支架构建组织工程髓核的研究 [D]. 广州: 南方医科大学 ,2015.

[15] 谭伟 ,吕海 ,周初松. 去细胞基质支架构建组织工程椎间盘: 最为接近正常髓核三维结构 [J]. *中国组织工程研究* ,2015 ,(8) : 1289 - 1294.

[16] 曹纬. 同种异体脱细胞髓核支架的构建及其性能的体外初步研究 [D]. 广州: 南方医科大学 ,2014.