

基础研究

退变腰椎间盘髓核细胞立体培养
与单层培养的生物活性比较

刘 勇, 胡有谷, 宁 斌

(青岛大学医学院附属医院骨科 山东省创伤骨科研究所 266003 青岛市)

【摘要】目的:比较体外单层培养和旋转微载体立体培养人退变腰椎间盘髓核细胞的生物学活性指标,探讨更加有效的椎间盘髓核细胞体外培养方法。**方法:**对获取的腰椎间盘突出症患者的 24 个椎间盘按年龄分为 A 组(20~25 岁)、B 组(26~30 岁)、C 组(36~45 岁)及 D 组(>45 岁),分别利用酶消化法进行单层细胞培养和旋转微载体立体培养系统进行立体培养,观察细胞生长形态,检测细胞生长曲线及速度、细胞生长活性、细胞分裂指数及胶原含量。**结果:**单层培养的髓核细胞贴壁后为多角形或梭形,伸出伪足;立体培养的细胞在微载体上呈梭形或不规则形,呈立体状生长。立体培养的细胞生长速度较快,1 周内两种培养方法各时间点及各组间比较均具有统计学意义($P<0.05$)。立体培养的髓核细胞活性提高,随年龄增加细胞活性下降;指数生长期细胞分裂指数与单层培养相比有统计学意义($P<0.05$);I、II 型胶原含量与单层培养相比有统计学意义($P<0.05$),A 组分别与 B 组、C 组及 D 组比较均有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**旋转立体培养人退变椎间盘髓核细胞的活性保持良好,较单层培养能够大量、优质收集种子细胞,可用于椎间盘组织工程中种子细胞的研究。

【关键词】椎间盘;退变;细胞培养;微载体

中图分类号:Q813.1,R681.5 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2007)-05-0376-04

Comparison of biological potentiality of degenerated human lumbar disc cells between three-dimensional microcarrier culturing and monolayer culturing/LIU Yong, HU Yougu, NING Bin//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2007, 17(5):376~379

【Abstract】Objective:To compare the biological potentiality of intervertebral disc cells between the three-dimension microcarrier culturing and the monolayer culturing, and to find a more efficient way of in vitro disc cell culturing. **Method:** 24 samples of human degenerated intervertebral discs obtained during surgical procedures were isolated and digested. All these samples were assigned according to age as group A (20~25 years old), group B (26~30 years old), group C (36~45 years old) and group D (>45 years old). After proliferation in monolayer culture, cells were seeded in a new three-dimension microcarrier stirring system. The cytobiology index containing cell curve, cell proliferating and cell growth activity were detected. The content of different type of collagen and proteoglycan in disc cells were analyzed quantitatively. **Result:** It showed that three-dimension culturing could improve the cell growth rate and cell growth activity. There were significant difference with respect to the number of cells between monolayer culturing and three-dimension culturing after a week ($P<0.05$). The indexes of cell division during growing period between monolayer culturing and three-dimension culturing showed significant difference ($P<0.05$), compared group A to group D showed significant difference ($P<0.05$), too. Comparison of collagen type I and type II between monolayer culture and three-dimensional culture showed significant difference ($P<0.05$). There were significant difference between group A and the other three groups ($P<0.05$). There were significant difference with respect to the amount of type I, II collagen between monolayer culturing and three-dimension culturing ($P<0.05$). **Conclusion:** Human disc cells cultured in three-dimension microcarrier stirring system could keep cell growth and the phenotype well as well as express more extracellular matrix. The apoptosis rate of the cells in three-dimension culturing is lower than that in monolayer culturing which suggest that we can collect considerable seed cells by the new cultivation system.

【Key words】 Intervertebral disc; Degeneration; Cell culture; Three-dimensional culture

【Author's address】 Department of Orthopaedic of Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao, 266003, China

基金项目:国家自然科学基金资助(编号:30271318)

第一作者简介:男(1968-),副主任医师,研究方向:脊柱外科 电话:(0532)82911331 E-mail:liuyong@medmail.com.cn

椎间盘退变是引起慢性腰腿痛最常见的病因之一。目前对椎间盘退变引入了生物学治疗,其中椎间盘组织工程学是骨科生物学研究中的新领域。椎间盘组织工程的研究中,种子细胞的培养是椎间盘组织工程构建的起始和关键部分。本研究拟在椎间细胞单层培养的基础上建立立体培养的细胞模型,对细胞生物学进行检测,并将两种方法进行对比分析,以期找到一种方法来解决成人退变椎间盘组织工程学实施中种子细胞难于收集且难于成活的难题。

1 材料和方法

1.1 椎间盘组织来源

24 个标本取材于 24 例腰椎间盘突出症患者术中切除的髓核组织。A 组:20~25 岁,6 例;B 组:26~35 岁,6 例;C 组:36~45 岁,6 例;D 组:>45 岁,6 例。

1.2 椎间盘髓核细胞培养

1.2.1 单层培养 把获取的椎间盘髓核组织剪成 1mm^3 大小的碎块。于 37°C 下,以 0.25% 的胰蛋白酶消化 20min。低速离心 (1000r/min) 5min。于 36.5°C 下用 0.2% 的胶原酶静置消化 4h。用 Ham's F12+10% 胎牛血清 (FBS) 培养液冲洗,离心 (1000r/min) 5min,重复 3 次。将细胞分别接种于培养瓶中,加足含青、链霉素 Ham's F12+10% FBS 培养液。在 37°C 、体积分数为 5% CO_2 的培养箱中培养。分别进行倒置相差显微镜观察及透射电镜观察。

1.2.2 旋转立体培养 称取 2.04g/100ml 的微载体颗粒 (Biosilion, Nalge NUNC international corporation, 丹麦),同旋转培养瓶一同进行环氧乙烷消毒。将微载体放入旋转培养瓶,加入含青、链霉素的 Ham's F12/DMEM +10% FBS 培养液 100ml,将旋转培养瓶置于慢速磁力搅拌器上,以 10r/min 的速度旋转。将其置于 37°C 、体积分数为 5% CO_2 的培养箱中 24h。将单层培养的对数生长期的细胞 (密度为 $10^5/\text{ml}$) 接种于旋转培养瓶中,旋转培养 48h 后,将慢速磁力搅拌器的搅拌速度调整至 30r/min。约 5d 半量换液。分别进行倒置相差显微镜观察及扫描电镜观察。

1.3 细胞生长活性检测

分别将单层贴壁细胞和微载体上的贴附细胞消化制备细胞悬液,稀释后接种于 24 孔板内。每

天取出 3 孔细胞进行计数,每孔计数 4 大格取平均数,再计算 3 孔的平均数。培养第 7 天给未计数的细胞半量换液。以培养时间为横坐标,细胞数为纵坐标 (对数),描绘在半对数坐标纸上。

用消化液消化生长状态良好的单层贴壁细胞及微载体上的细胞,用培养液配成单个细胞悬液,以每孔 200 μl 接种于 96 孔培养板中,细胞密度为 ($10^3\sim 10^4$) 个/ml。培养 3~5d 后每孔加入噻唑蓝 (MTT) 溶液 (5mg/ml) 20 μl , 37°C 孵育 4h。吸取培养上清液,每孔加入 150 μl 二甲基亚砷,振荡 10min。选择 490nm 波长,测定各孔光吸收值。以时间为横坐标,光吸收值为纵坐标绘制细胞生长曲线。

根据每组细胞的生长曲线来确定其相应的稳定生长期和指数生长期的时间段,载玻片经防脱片剂处理,分别将稳定生长期和指数生长期的细胞消化后进行细胞涂片。4% 多聚甲醛固定 10min。0.3% 的 H_2O_2 室温浸泡 30min。PBS 冲洗 3 次,3~5min/次。滴加 5% 牛血清白蛋白封闭液, 24°C 20min。滴加小鼠抗增殖细胞核抗原抗体, 37°C 1~2h。滴加生物素化山羊抗小鼠 IgG, 37°C 20min。滴加链霉亲和素-生物素-过氧化物酶, 37°C 20min。使用 2,3-二氨基联苯氨 (DAB) 显色试剂, 24°C 10min。苏木素轻度复染。脱水,透明,封片,20 $\times$ 的光镜下随机取 5 个视野,对阳性细胞进行计数,每组取其均值进行比较,并进行统计学分析。

1.4 主胶原含量的检测

将培养 1 周的贴壁细胞消化制备细胞悬液,4% 多聚甲醛固定 10min。0.2% Triton X-100 孵育 5min。PBS 冲洗 3 次,每次 3~5min。封闭液阻断 60h。滴加兔抗人 I、II 型胶原, 37°C 1h。滴加山羊抗兔 IgG 抗体, 37°C 30h。滴加辣根过氧化物酶, 37°C 30min。DAB 显色 15min,封片。20 $\times$ 的光镜下随机取 5 个视野对阳性细胞进行分别计数。

2 结果

2.1 细胞形态观察

单层培养时细胞悬浮生长时为圆形,细胞大小不等,轮廓较清,可见胞核。细胞贴壁后形态为多角形、梭形或纺锤形,并伸出伪足。进入指数生长期细胞增殖、融合非常活跃,可见团簇状生长的细胞团块。可见胞体略大,呈椭圆、梭形或多角形

的软骨细胞或软骨样细胞(图 1,后插页Ⅲ)。透射电镜观察细胞呈梭形或多角形,胞周有许多绒毛突起,体积较大,细胞之间界限清晰,细胞膜完整,细胞膜上的微绒毛较多,胞浆电子密度较高,细胞内线粒体的数量较少,线粒体嵴清楚,内质网丰富,细胞核位于细胞的中央或偏于一侧,边界清楚,胞核形态丰富,有分叶状,椭圆形,内有电子密度较高的核仁(图 2,后插页Ⅲ)。

立体培养时,在光镜下能够看到在微载体表面呈现梭形或不规则形状的细胞光影,不同的聚焦层面能够看到不同的细胞(图 3,后插页Ⅲ)。扫描电镜下观察空白的微载体为基本规则的球形,表面粗糙不平,半透明。可看到不同密度的细胞附着在微载体的表面,细胞多呈不规则形或梭形,与单层培养的扁平状生长不同,细胞呈立体状生长,细胞长满整个微载体的表面时仍能维持其表型(图 4,后插页Ⅲ)。

2.2 细胞生长活力测定结果

见表 1、2。各组单层培养细胞数与同时间点立体培养细胞数相比有显著性差异 ($P<0.05$);相同培养方法同一时间点各组间比较均具有统计学意义($P<0.05$)。两种培养方法的细胞生长活力曲线见图 5、6(后插页Ⅲ)。单层培养细胞的 OD 值在培养 10~13d 时有所下降,立体培养细胞 OD 值呈逐渐上升状态,随平均年龄的增加,各组 OD 值

减低。稳定生长期单层培养和三维培养细胞分裂指数相比没有统计学意义($P>0.05$);指数生长期单层培养细胞分裂指数同立体培养相比有统计学意义 ($P<0.05$)。A 组和 D 组比较有统计学意义 ($P<0.05$)。

2.3 主胶原含量

见表 3。立体培养时 I 型胶原、II 型胶原含量同单层培养比较有统计学意义 ($P<0.05$);A 组分别与 B 组、C 组及 D 组比较均有统计学意义 ($P<0.05$)。

3 讨论

1975 年,Herbert 首先进行椎间盘的组织培养^[1],最初的椎间盘组织培养用来分析椎间盘中蛋白多糖的合成。Thompson 等^[2]应用无血清培养基对成年牛的纤维环、纤维环和髓核之间的移行区分别进行培养,通过测定 ^3H 的结合评价细胞的增殖,测定 ^{35}S 对蛋白多糖的结合率评价生化合成反应情况。1988 年 Ichimura 等^[3]应用培养的兔纤维环细胞观察人重组 IL-1 α 对兔椎间盘蛋白多糖代谢的影响。细胞在 IL-1 α 的刺激下,蛋白多糖释放显著提高。刘勇等^[4]对人胚胎及成人椎间盘髓核进行细胞培养,探讨了培养的方法并观察了培养细胞的形态、超微结构及生长特性。Helen 等^[5]应用人椎间盘纤维环建立了单层细胞培养,

表 1 不同时间点单层培养细胞数与微载体立体培养细胞数 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

培养时间 (天)	单层培养细胞数(10^3 个/ml)				立体培养细胞数(10^5 个/ml)			
	A组	B组	C组	D组	A组	B组	C组	D组
1	1.2 $\pm$ 0.4	0.8 $\pm$ 0.3	0.4 $\pm$ 0.2	0.17 $\pm$ 0.1	3.2 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.2
2	2.5 $\pm$ 1.1	1.3 $\pm$ 0.3	0.7 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1	9.2 $\pm$ 1.2	6.5 $\pm$ 1.1	4.3 $\pm$ 1.2	2.3 $\pm$ 1.1
3	7.2 $\pm$ 2.1	36 $\pm$ 3.2	3.8 $\pm$ 0.9	0.5 $\pm$ 0.1	87 $\pm$ 3.2	45 $\pm$ 4.1	29 $\pm$ 5.2	8.9 $\pm$ 2.3
4	120 $\pm$ 5.6	101 $\pm$ 4.7	72 $\pm$ 9.9	46 $\pm$ 11.2	205 $\pm$ 12.1	161 $\pm$ 1.9	112 $\pm$ 7.2	45 $\pm$ 3.5
5	212 $\pm$ 2.1	191 $\pm$ 3.7	132 $\pm$ 4.9	102 $\pm$ 8.9	313 $\pm$ 8.7	249 $\pm$ 3.2	191 $\pm$ 4.7	143 $\pm$ 9.8
6	309 $\pm$ 2.1	271 $\pm$ 4.6	215 $\pm$ 9.3	161 $\pm$ 6.7	504 $\pm$ 7.9	321 $\pm$ 7.6	269 $\pm$ 7.4	212 $\pm$ 3.2
7	513 $\pm$ 4.5	422 $\pm$ 6.2	356 $\pm$ 4.7	265 $\pm$ 6.8	719 $\pm$ 9.3	532 $\pm$ 10.1	471 $\pm$ 7.8	332 $\pm$ 5.2

注:立体培养与同时间点单层培养比较 $P<0.05$;相同培养方法同一时间点各组间比较 $P<0.05$

表 2 单层培养和微载体立体培养稳定期和指数期的细胞分裂指数比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

	单层培养		立体培养	
	稳定期	指数期	稳定期	指数期
A组	12.21 $\pm$ 3.42	18.72 $\pm$ 7.27	15.27 $\pm$ 5.12 ^①	36.28 $\pm$ 6.83 ^②
B组	9.12 $\pm$ 6.82	10.98 $\pm$ 3.31	13.86 $\pm$ 3.41 ^①	32.56 $\pm$ 4.12 ^②
C组	7.01 $\pm$ 6.83	10.21 $\pm$ 2.62	9.85 $\pm$ 2.72 ^①	29.17 $\pm$ 6.21 ^②
D组	4.67 $\pm$ 2.82 ^③	6.84 $\pm$ 4.32 ^③	7.32 $\pm$ 6.18 ^{①③}	21.33 $\pm$ 4.28 ^{②③}

注:与单层培养比较① $P>0.05$,② $P<0.05$;③与 A 组比较 $P<0.05$

表 3 单层培养和微载体立体培养 1 周时贴壁细胞的主胶原含量比较 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

	单层培养		立体培养	
	I 型	II 型	I 型	II 型
A组	24.38 $\pm$ 4.26	25.32 $\pm$ 4.12	32.26 $\pm$ 2.17 ^①	36.89 $\pm$ 4.12 ^①
B组	11.51 $\pm$ 6.12 ^②	10.32 $\pm$ 4.27 ^②	21.49 $\pm$ 2.26 ^{①②}	17.37 $\pm$ 4.68 ^{①②}
C组	9.14 $\pm$ 5.26 ^②	7.89 $\pm$ 4.31 ^②	18.12 $\pm$ 8.14 ^{①②}	15.21 $\pm$ 6.56 ^{①②}
D组	7.21 $\pm$ 5.67 ^②	6.24 $\pm$ 5.72 ^②	11.15 $\pm$ 3.34 ^{①②}	13.65 $\pm$ 5.63 ^{①②}

注:与单层培养比较① $P<0.05$;②与 A 组比较 $P<0.05$

然后将细胞置于藻酸盐或琼脂糖进行三维立体培养,显示该生长环境下细胞保持梭形并形成了细胞的克隆簇。但由于重力作用,静止培养时细胞多聚集到载体的底部和载体之外,载体内部黏附生长的细胞数量很少^[6],导致载体内部移植细胞数量不足,限制了载体内部细胞的数量,从而影响了椎间盘组织的形成。

尽管三维结构的载体适合椎间盘组织的形成,但采用静止细胞培养则不利于细胞向载体内部生长,培养液很难扩散渗透到载体的中心,使氧气、营养物质扩散和代谢物排出受限,从而影响载体内部细胞的代谢活性。动力性三维细胞培养有许多静止细胞培养所不具备的优点^[7]:①在三维载体中,能够产生有效、均匀的细胞种植,允许移植最大数量的细胞;②能够促进氧气和营养物质向载体内部输送,保持载体内部细胞的活性和功能的发挥;③能够促进载体中黏附生长细胞的增殖,分泌更多细胞外基质,促进细胞再生;④细胞能够沿着三维载体的孔隙生长;⑤能够排出更多的 CO₂,维持生理性 pH 值,为细胞代谢和功能发挥提供更有利的微环境;⑥培养液流动能够对细胞产生机械应力刺激,调节成纤维性细胞功能的发挥。在立体培养的条件下,能够大量、优质地收集细胞。本研究成功构建了成人退变椎间盘髓核细胞的立体培养模型,其生长曲线、细胞增殖、细胞生长活性等指标同单层培养的细胞比较显示,立体培养能够促进椎间盘细胞的生长速度、提高其生长活性、提高处于 DNA 合成期的细胞百分比。光镜及电镜观察结果发现,旋转细胞培养条件下,载体表面细胞呈三维均匀分布,为细胞代谢和功能发挥提供了更有利的生长条件和方式。

Gruber 等^[8]的研究发现在兔椎间盘细胞藻酸盐三维培养中,细胞形态变圆并形成多聚细胞群,在细胞间及其周围形成细胞外基质成分;利用免疫组化的方法只有在三维培养中才能检测出 I 型和 II 型胶原。Sato 等^[9]发现大鼠椎间盘细胞在琼脂三维培养中,两种细胞都呈球形,蛋白多糖合成无差异,细胞外基质合成增多。Horner 等^[10]应用藻酸盐微载体进行细胞培养时,髓核细胞呈软骨样细胞形态,髓核中蛋白多糖是内层纤维环细胞的 10 倍。无论在单层培养还是藻酸盐培养,蛋白多糖在髓核细胞表达最高,而在外纤维环细胞表达最低。与蛋白多糖相比,髓核中胶原表达始终较

低。Sato 等^[11]利用 Western blot 和 Northern blot 检测经三维培养后的人椎间盘纤维环细胞的 II 型胶原和它的 mRNA 表达,发现其比单层培养细胞表达的水平高;Western blot 分析显示,三维培养中葡糖胺聚糖的表达、蛋白多糖的含量明显比单层培养的细胞水平高。本实验发现,三维立体培养的细胞 I、II 型胶原分泌量都较单层培养有所提高,体现了立体培养方法的优越性。A 组 I、II 型胶原含量与其它组相比有显著性差异,提示随患者年龄增加,细胞体外培养的活性逐渐减弱。

4 参考文献

- Herbert CM, Lindberg KA, Jayson MI, et al. Proceedings: intervertebral disc collagen in degenerative disc disease [J]. Ann Rheum Dis, 1975, 34(5): 467-471.
- Thompson JP, Oegema TR Jr, Bradford DS. Stimulation of mature canine intervertebral disc by growth factors [J]. Spine, 1991, 16(3): 253-260.
- Ichimura K, Tsuji H, Matsui H, et al. Cell culture of the intervertebral disc of rats: factors influencing culture, proteoglycan, collagen, and deoxyribonucleic acid synthesis [J]. J Spinal Disord, 1991, 4(4): 428-436.
- 刘勇, 胡有谷, 吕振华. 腰椎间盘突出细胞的培养及形态学观察 [J]. 中华医学杂志, 1999, 79(2): 109-111.
- Helen E, Gruber E, Carl Fisher J, et al. Human intervertebral disc cells from the annulus: three dimensional culture in agarose or alginate and responsiveness to TGF- β 1 [J]. Exp Cell Res, 1997, 235: 13-21.
- Holy C, Shcichert M, Davies J. Engineering three dimension a bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds in vestigation in itadell seeding lens it and culture period [J]. J Biomed Mater Res, 2000, 51: 376-382.
- 唐开, 党耕町. 三维细胞培养在骨组织中的应用 [J]. 中华骨科杂志, 2003, 23(2): 121-123.
- Gruber H, Hanley E. Human disc cells in monolayer vs 3D culture: cell shape, division and matrix formation [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2000, 1(1): 1-6.
- Sato M, Kikuchi T, Asazuma T, et al. Glycosaminoglycan accumulation in primary culture of rabbit intervertebral disc cells [J]. Spine, 2002, 26(24): 2653-2660.
- Horner H, Roberts R, Menage J, et al. Cell from different regions of the intervertebral disc: effect of culture system matrix expression and cell phenotype [J]. Spine, 2002, 27(10): 1018-1028.
- Sato M, Asazuma T, Ishihara M, et al. An atelocollagen honeycomb-shaped scaffold with a membrane seal (ACHMS-scaffold) for the culture of annulus fibrosus cells from an intervertebral disc [J]. J Biomed Mater Res, 2003, 64A(2): 248-256.

(收稿日期: 2006-08-30 修回日期: 2007-02-01)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 卢庆霞)