

基础研究

兔不同节段椎间盘髓核细胞培养特性的比较

于占革,杨 威,温 莹,徐学振,魏 伟,李念龙

(哈尔滨医科大学附属第一医院骨科 150001 哈尔滨市)

【摘要】目的:探讨兔颈段、胸段及腰段椎间盘髓核细胞的培养特性。**方法:**3~4 月龄兔 10 只,麻醉后,在无菌条件下手术分离整段脊柱,分别取颈段(C1/2~C7/T1)、胸段(T1/2~T7/L1)、腰段(L1/2~L7/S1)髓核细胞进行培养,于培养后的 24h 计算贴壁率。并于贴壁后的第 3、7、14 及 21 天计算细胞死亡/成活比,判断细胞活力并检测蛋白多糖的含量。**结果:**颈段、胸段、腰段细胞贴壁率差异具有显著性,腰段细胞贴壁率最高($P<0.01$)。不同节段之间,在多个时间点观察髓核细胞死亡/存活比差异具有显著性,腰段椎间盘髓核细胞的死亡/成活比最低($P<0.01$)。不同节段之间,不同时间点观察的蛋白多糖含量差异具有显著性,且腰段椎间盘髓核细胞的蛋白多糖含量最高($P<0.01$)。**结论:**腰段椎间盘髓核细胞较颈段及胸段的髓核细胞生长状态好,兔腰椎髓核细胞更适宜作为细胞培养的种子细胞。

【关键词】髓核细胞;不同节段;细胞活力;细胞培养

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2010.08.19

中图分类号:Q813.1 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2010)-08-0689-05

Comparison of culturing characteristics of rabbit intervertebral disc nucleus pulposus cells at different segments/YU Zhan'ge, YANG Wei, WEN Ying, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2010, 20(8): 689-693

【Abstract】 Objective: To investigate the culturing characteristics of nucleus pulposus cells from the neck, thoracic and lumbar intervertebral disc. **Method:** After anesthesia, the whole spine specimen was immediately separated from 10 white rabbits (3-4 months) under the sterile conditions. Nucleus pulposus cells of different segments (C1/C2-C7/T1, T1/T2-T7/L1, L1/L2-L7/S1) were cultured and the attachment rates were recorded after 24h respectively. The proteoglycan contents was detected and the cell viability was accounted on 3, 7, 14, 21 days. **Result:** There were statistical significances among every group with regard to attachment rate ($P<0.01$) and the lumbar disc nucleus pulposus cells had the highest attachment rate. The difference of both the cell death/viability and proteoglycan contents among different segments on 3, 7, 14, 21 days after culturing was significant ($P<0.01$), and lumbar disc nucleus pulposus cells had the lowest death/viability rate ($P<0.01$) and the highest proteoglycan contents ($P<0.01$). **Conclusion:** Lumbar disc nucleus pulposus cells, compared with the cervical and thoracic have a better growth status, which as a seed cell is more suitable for culturing.

【Key words】 Nucleus pulposus cells; Different segment; Cell viability; Cell culturing

【Author's address】 Department of orthopaedics, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, 150001, Harbin

近年来,椎间盘细胞的组织工程学研究,例如在椎间盘进行细胞移植^[1,2]、生长因子注射^[3,4]及基因治疗等^[5]逐渐成为治疗椎间盘退变的研究热点。髓核细胞是种子细胞之一^[6-9]。虽然一些学者对髓核细胞的培养条件,例如 pH 值、温度、渗透

压等做了一些研究^[10],但髓核细胞的选材部位研究仍少见报道。笔者通过观察不同节段椎间盘髓核细胞培养的难易程度及生长活性,为基础研究提供实验数据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及髓核细胞的培养

2~3 月龄的中国雌性白兔 10 只,体重 2.5~3.0kg(哈尔滨医科大学附属第一医院实验动物中

基金项目:黑龙江省攻关课题项目(编号 GC06C414)

第一作者简介:男(1976-)硕士研究生,研究方向:脊柱外科

电话:(0451)85555040 E-mail: zhangy1967@yahoo.com.cn

通讯作者:杨威 E-mail: vick1894_cn@sina.com

心提供)。给予 2.5%戊巴比妥钠 1ml/kg 麻醉,待麻醉满意后,对兔背部的皮肤消毒,铺无菌单,切开皮肤,游离整段脊柱,取脊柱两端 (C1/2~L7/S1),迅速转移至无菌台内,用无菌 PBS 冲洗,直至冲洗液澄清无血色为止。按照解剖部位不同分为颈段、胸段及腰段三组,切开纤维环,小刮匙取出各段髓核组织分别置于标记颈段 (C1/2~C7/T1)、胸段 (T1/2~T7/L1)、腰段 (L1/2~L7/S1) 含有 PBS 缓冲液的培养皿内,洗 3 遍。

眼科剪刀将其剪至 1×1×1mm 大小, 0.25%的胰蛋白酶消化,置于 5%CO₂、37℃恒温培养箱内,每 5min 震荡一次。30min 后取出离心 (4min, 1000rpm) 弃上清,加入 2%的 II 型胶原酶,放置于 5% CO₂、37℃恒温培养箱内消化 2.5h, 200 目滤网滤过,对滤过液进行离心 (4min, 1000 转/分钟),弃上清,加入 DMEM/F12 培养基冲洗、离心三遍,细胞计数板计数,细胞密度调整到 1×10⁵/ml 后接种于 96 孔培养板上,每个节段的细胞接种 24 孔,放置于 5% CO₂、37℃恒温培养箱内培养,记录细胞 24h 贴壁率,并于第 3、7、14 及 21 天计算细胞死亡/成活比及蛋白多糖含量。

1.2 细胞 24h 贴壁率

培养 24h 后,取出培养板,随机选取每组中的 5 个孔作为研究对象,吸出培养液,用 0.01M 的 PBS 缓冲液冲洗三遍,加入 0.25%胰蛋白酶消化 10s,加入培养基中止消化,并进行吹打细胞。记录每组细胞的细胞浓度,与培养细胞个数进行比较。细胞 24h 贴壁率=24h 后已贴壁的细胞数/24h 前细胞数×100%。

1.3 细胞死亡/成活比

于培养后的第 3、7、14 及 21 天每组取 2 个孔,台盼兰染色,于细胞计数板上计数并计算细胞死亡/成活比,细胞死亡/成活比=死亡的细胞数/成活的细胞数×100%

1.4 蛋白多糖含量测定

于培养后的第 3、7、14 及 21 天,每组分别取两孔细胞,提取细胞总蛋白,加入 3% NaOH 1.0ml,置于恒温振荡器振荡 3h,控制温度在 40℃。用 HCl 调整溶液的 pH 值至 8~9。加入 100μl 胰蛋白酶 (100mg/ml),恒温振荡器中振荡酶解 1h,温度控制在 50℃。将酶解液用蒸馏水稀释至 10ml,摇匀后取 1ml,采用间苯三酚分光光度法^[1]测定光密度值,转换为量值作为蛋白多糖

含量。

1.5 II 型胶原免疫组化染色和甲苯胺蓝染色

各组髓核细胞培养调整浓度后,于 6 孔培养板中进行爬片,24h 后取出,分别采用 SABC-DAB 法进行髓核细胞 II 型胶原免疫组化染色和甲苯胺蓝染色。

1.6 统计学分析

所得数据以均数±标准差的方式表示,均采用 SAS 9.1.2 统计学软件进行统计学处理,24h 贴壁率的比较采用随机分组设计的方差分析,不同兔、不同时间点及不同节段的细胞死亡/成活比和蛋白多糖含量的比较采用重复测量的方差分析,设 $P<0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 24h 贴壁率

最早贴壁的是颈椎椎间盘髓核细胞,从 8.5h 就开始有细胞贴壁生长 (图 1a)。到 34h 后细胞贴壁基本完成 (图 1b)。同节段培养细胞的贴壁率差异无显著性 ($P>0.05$)。三组比较贴壁率差异具有显著性 $P<0.01$ 。虽然最早贴壁的为颈段髓核细胞,但腰段细胞贴壁率要高于颈段和胸段 (表 1)。

2.2 不同时间点细胞死亡/成活比

第 3 天,颈段、胸段和腰段椎间盘髓核细胞间的死亡存活比差异无统计学意义。第 7、14 及 21 天三组间比较椎间盘髓核细胞的死亡/存活比差异均具有显著性,腰段最小 ($P<0.01$, 表 2)。培养细胞形态随着时间延长由类圆形逐渐变为菱形及长梭形 (图 2)。

2.3 不同时间点的蛋白多糖含量比较

表 1 各兔不同节段 24h 贴壁率 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

	颈段	胸段	腰段
1	26.18±3.61	31.51±3.20	41.86±3.83
2	24.90±3.76	30.37±5.50	45.05±5.45
3	25.33±3.61	29.49±3.76	38.13±7.79
4	27.53±1.80	30.53±2.93	42.20±5.86
5	25.32±4.58	29.95±2.30	40.26±4.15
6	23.06±2.57	31.68±3.04	43.87±4.33
7	24.94±3.51	29.60±7.52	43.53±6.37
8	25.44±4.20	31.41±2.24	41.07±7.60
9	25.59±4.89	31.21±2.25	41.60±5.61
10	23.98±2.86	30.81±2.17	41.33±6.67
合计	25.23±1.20	30.66±0.80	41.89±1.96

注:同一个体不同节段之间比较有差异有显著性 ($P<0.01$)



图 1 倒置相差显微镜观察 a 颈椎髓核细胞从 8.5h 最先开始贴壁生长($\times 100$),细胞大多呈类圆形 b 34h 大多数细胞贴壁,此时细胞形态有长梭形、类圆形和不规则形等多种形态($\times 100$) 图 2 倒置相差显微镜观察 a 腰段髓核细胞,培养 4d,形态大多呈类圆形($\times 100$) b 腰段髓核细胞到达 14d 后细胞形态逐渐向长梭形和不规则形等多种形态过渡($\times 100$)

测定不同时间点各组细胞蛋白多糖含量。第 3 天及 21 天胸段蛋白多糖含量最高,与其他两组比较差异有显著性,而颈段和胸段的蛋白多糖含量差异无显著性。第 7、14 天,三组间蛋白多糖含量差异均有显著性,腰段的含量最高(表 3)。

2.4 II 型胶原免疫组化染色和甲苯胺蓝染色

胞浆黄褐色颗粒沉着,以核周区为著,苏木素复染后核呈蓝色(图 3)。甲苯胺蓝染色可见其胞浆蓝染,形态为长梭形和不规则型居多(图 4)。

表 2 10 只兔不同部位不同时间点的死亡成活比
($\bar{x} \pm s, n=10$)

	颈段	胸段	腰段
第 3 天	23.23 $\pm$ 2.14	24.30 $\pm$ 1.14	23.75 $\pm$ 2.98
第 7 天	15.04 $\pm$ 1.32	12.66 $\pm$ 1.34	11.54 $\pm$ 1.29
第 14 天	13.86 $\pm$ 1.45	12.22 $\pm$ 1.01	11.08 $\pm$ 0.53
第 21 天	27.33 $\pm$ 1.77	23.37 $\pm$ 1.42	21.79 $\pm$ 1.63

注:同一时间点不同节段之间比较($P<0.01$)

3 讨论

椎间盘退变的组织工程学研究,一方面要选择良好的种子细胞、最佳的培养环境;另一方面适宜的支架材料,与种子细胞共培养也至关重要。对于种子细胞的选择,Risbud 等^[12]选择完整

表 3 颈段、胸段和腰段不同时间点蛋白聚糖的含量
($\bar{x} \pm s, n=10, \text{mg}/100\text{mg}$)

	颈段	胸段	腰段
第 3 天	2.57 $\pm$ 0.23	2.44 $\pm$ 0.13	2.77 $\pm$ 0.09
第 7 天	2.65 $\pm$ 0.10	2.76 $\pm$ 0.12	3.02 $\pm$ 0.10
第 14 天	2.76 $\pm$ 0.12	2.95 $\pm$ 0.10	3.24 $\pm$ 0.12
第 21 天	2.78 $\pm$ 0.07	2.81 $\pm$ 0.15	3.09 $\pm$ 0.07

注:同一时间点不同节段之间比较($P<0.01$)

的椎间盘细胞进行培养,培养的细胞包含成纤维细胞、髓核细胞和类软骨细胞等多种细胞,且无特异性的方法使各种细胞分开。Ichimura 等^[13]分别对鼠髓核细胞和纤维环细胞进行培养。随着研究的深入,Gan 等^[14]进行髓核细胞单层培养和三维培养,证实了髓核细胞可在体外很好的生长,并且可以表达蛋白聚糖、CD44 等。而 Preradovic 等^[15]分离了人的椎间盘髓核细胞,并进行培养,发现人髓核的原代细胞 I、II 型胶原及蛋白聚糖 (aggrecan) mRNA 表达水平较低,传代细胞的 II 型胶原及蛋白聚糖 mRNA 水平保持稳定。由于颈段、胸段和腰骶段的椎间盘髓核细胞所承受的压力和退变程度不同、各个节段所含的细胞量和细胞增殖能力也不同。因此,我们有必要研究各个节段的椎间盘髓核细胞的生长增殖情况,以便于

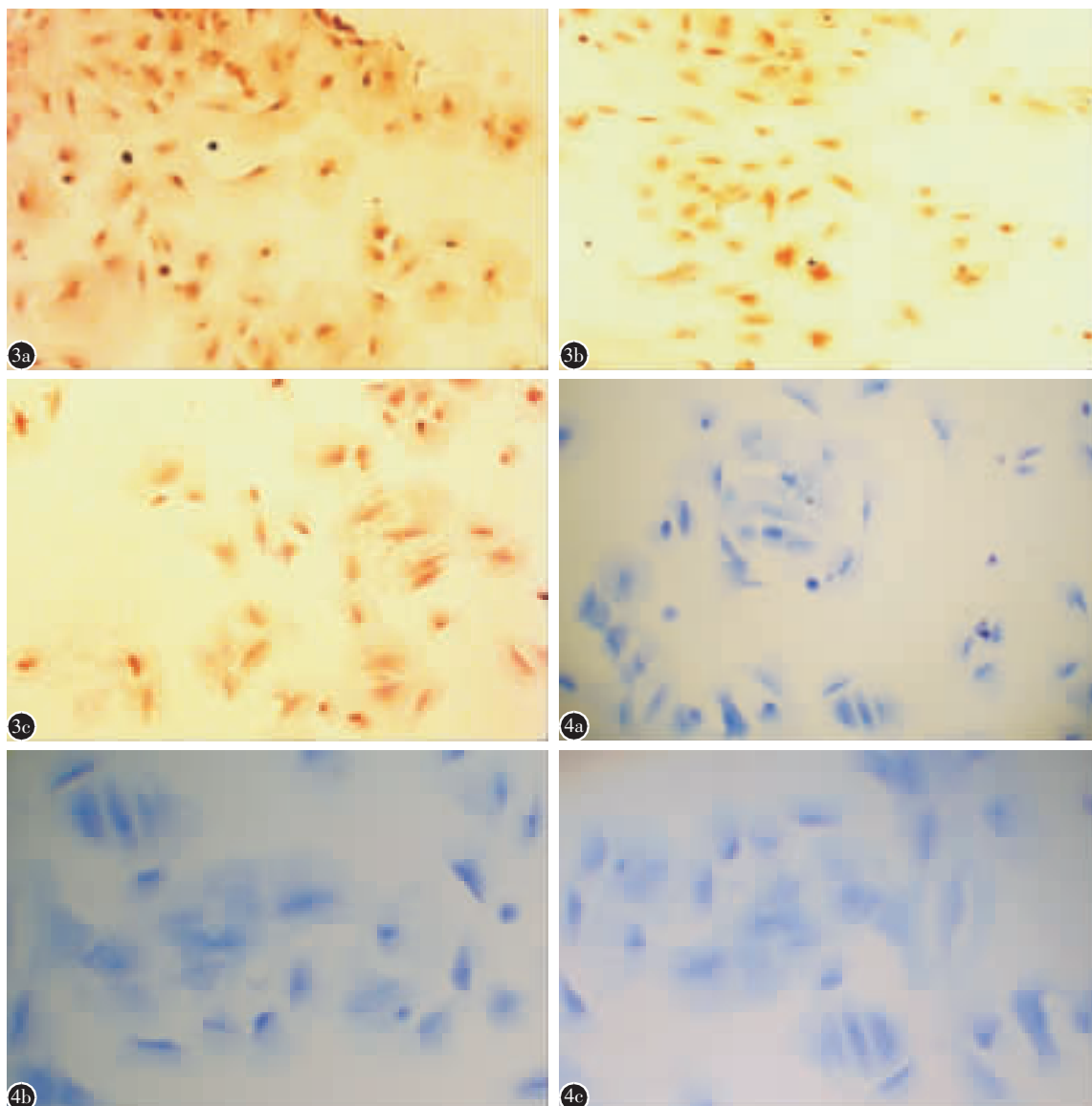


图 3 倒置相差显微镜观察二型胶原免疫组化染色,胞浆见黄褐色颗粒沉着,核周区显著,核呈蓝染($\times 100$) a 颈段髓核细胞培养 14d b 胸段髓核细胞培养 14d c 腰段髓核细胞培养 14d 图 4 倒置相差显微镜观察甲苯胺蓝染色结果($\times 100$) a 颈段髓核细胞培养 14d 细胞偏小,细胞形态以长梭形居多 b 胸段髓核细胞培养 14d,细胞较大形态以类圆形和长梭形居多 c 腰段髓核细胞培养 14d,细胞较大呈长梭形、多角形和不规则形

选择更好的取材部位。

本实验研究结果表明,兔腰椎间盘髓核细胞与胸和颈椎间盘髓核细胞相比较,其贴壁所需时间更短,贴壁速度更快。腰椎间盘髓核细胞比其他两组细胞体积稍大,活性更高。这可能是与脊柱动物腰椎活动度大,受到力的作用也有关。Stokes 等^[9]也证实这种力的作用和活动度与椎间盘的退变有显著相关性。因此选取腰椎间盘髓核细胞作为种子细胞具有一定的优势。

兔的生命周期较其他哺乳动物如人、羊、牛

和猪等要短的多,其椎间盘髓核细胞的寿命也要短许多,在培养至第 4 代后就可见到明显的老化现象,所以在实验研究过程中保证选材细胞的生命活力,缩短实验时间是十分必要的。本实验研究发现,虽然第 3 天,颈椎,胸椎和腰椎间盘髓核细胞的死亡/成活比没有明显的差异,这可能与细胞刚刚贴壁生长,并没有显示出其不同节段之间的差异性有关。而第 7 天和 14 天,腰椎间盘髓核细胞的死亡/成活比最低,细胞状态好,生长繁殖较稳定。在第 21 天,腰椎和胸椎间盘的髓核细胞

的存活细胞数仍然要比颈椎髓核细胞的多。随着细胞贴壁生长,其细胞形态和大小逐渐稳定。腰椎间盘突出髓核细胞的增殖速度要快于胸段和颈段髓核细胞。所以,选取腰椎髓核细胞做为以后实验的种子细胞可以有效地缩短实验时间,更有利于达到实验目的。

蛋白多糖的含量在活体髓核细胞中可能具有保持椎间盘营养供给、维持渗透压和髓核细胞形态的作用。蛋白多糖的含量也间接反映髓核细胞的增殖和活力情况。在本研究的三组当中,相应时间点的蛋白多糖含量也是腰段髓核细胞较胸段和颈段髓核细胞多,在第 7 天和 14 天,胸段髓核细胞比颈段髓核细胞的蛋白多糖含量要高,这也提示腰段髓核细胞比起其他两组的细胞营养状态和活力要高。

对于腰椎间盘突出变的组织器官以及细胞学的研究结果为进一步研究椎间盘退变的发病机制提供了良好的基础。而不同的动物实验模型是从不同的角度破坏髓核细胞,以达到引起椎间盘退变的目的。本实验选取了常用的实验动物兔椎间盘髓核细胞作为研究对象,发现其腰段髓核细胞具有贴壁快,Ⅱ型胶原表达含量稳定,蛋白多糖含量较高的培养生长特点。可为进一步实验研究提供较好的实验细胞。但本实验仍然存在不足之处,例如,兔脊柱的解剖结构和生物力学特点与人类的脊柱特性相比较,存在一些差异性,因此椎间盘髓核细胞培养特性与人类的相比存在一定的差异性,故尚不可应用于临床。关于临床人各节段椎间盘细胞培养特性研究尚有待于深化,如基因学方面的研究,观察各个节段培养细胞基因水平是否存在差异,其表型是否随着细胞的培养时间发生改变。以及各个节段发生退变时其相关基因的表达等。另外,细胞毒素方面的检测,髓核细胞生长环境变化如 pH 值、离子变化和营养因子等对细胞培养特性影响研究等。

4 参考文献

- Bertram H, Kroeber M, Wang H, et al. Matrix-assisted cell transfer for intervertebral disc cell therapy [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 331(4): 1185-1192.
- Gruber HE, Johnson TL, Leslie K, et al. Autologous intervertebral disc cell implantation; a model using *Psammomys obesus*, the sand rat [J]. *Spine*, 2002, 27(15): 1626-1633.
- An HS, Takegami K, Kamada H, et al. Intradiscal administration of osteogenic protein-1 increases intervertebral disc height and proteoglycan content in the nucleus pulposus in normal adolescent rabbits [J]. *Spine*, 2005, 30(1): 25-31.
- Masuda K, Takegami K, An H, et al. Recombinant osteogenic protein-1 upregulates extracellular matrix metabolism by rabbit annulus fibrosus and nucleus pulposus cells cultured in alginate beads [J]. *J Orthop Res*, 2003, 21(5): 922-930.
- Moon SH, Gilbertson LG, Nishida K, et al. Human intervertebral disc cells are genetically modifiable by adenovirus-mediated gene transfer: implications for the clinical management of intervertebral disc disorders [J]. *Spine*, 2000, 25(20): 2573-2579.
- Sun YL, Hurtig M, Pilliar RM, et al. Characterization of nucleus pulposus tissue formed in vitro [J]. *Orthop Res*, 2001, 19(6): 1078-1084.
- Ganey T, Libera J, Moos V, et al. Disc chondrocyte transplantation in a canine model: a treatment for degenerated or damaged intervertebral disc [J]. *Spine*, 2003, 28(23): 2609-2260.
- Gomes ME, Bossano CM, Johnston CM, et al. In vitro localization of bone growth factors in constructs of biodegradable scaffolds seeded with marrow stromal cells and cultured in a flow perfusion bioreactor [J]. *Tissue Eng*, 2006, 12(1): 177-188.
- Mizuno H, Roy AK, Vacanti CA, et al. Tissue-engineered composites of annulus fibrosus and nucleus pulposus for intervertebral disc replacement [J]. *Spine*, 2004, 29(12): 1290-1297.
- 牛朋彦, 熊伟, 李峰, 等. 渗透压负荷对兔椎间盘器官培养模型的影响 [J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2009, 19(10): 729-734.
- 高华, 刘坤, 于兹东, 等. 间苯三酚分光光度法测定硫酸软骨素的研究 [J]. *中国生化药物杂志*, 2000, 21(5): 247-248.
- Risbud MV, Izzo MW, Adams CS, et al. An organ culture system for the study of the nucleus pulposus: description of the system and evaluation of the cells [J]. *Spine*, 2003, 28(24): 2652-2659.
- 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.
- Gan JC, Ducheyne P, Vresilovic EJ, et al. Intervertebral disc tissue engineering. II, cultures of nucleus pulposus cells [J]. *Clin Orthop*, 2003, 411: 315-324.
- Preradovic A, Kleinpeter G, Feichtinger H, et al. Quantitation of collagen I, collagen II, and aggrecan mRNA and expression of the corresponding proteins in human nucleus pulposus cells in monolayer cultures cell [J]. *Tissue Res*, 2005, 321(3): 459-464.
- Stokes IA, Latndis JC. Mechanical conditions that accelerate intervertebral disc degeneration: overload versus immobilization [J]. *Spine*, 2004, 29(23): 2724-2732.

(收稿日期: 2010-01-19 修回日期: 2010-06-03)

(英文编审 蒋欣/郭万首)

(本文编辑 刘彦)