

基础研究

椎间盘灌注培养条件下压应力频率对
纤维环细胞基质合成的影响李 培¹, 甘翼搏¹, 徐 源², 李松涛¹, 宋 磊¹, 周 强¹

(1 第三军医大学西南医院骨科 400038 重庆市; 2 第三军医大学新桥医院骨科 400038 重庆市)

【摘要】目的:观察压应力频率对椎间盘纤维环(AF)细胞基质合成的影响。**方法:**获取 4~6 月龄巴马香猪胸腰段椎间盘 72 个后,随机分为无应力对照组和应力组(分别为 0.1Hz 组、0.5Hz 组、1Hz 组、3Hz 组、5Hz 组),每组 12 个样本,将各组椎间盘置于生物反应器中进行灌注培养。无应力对照组不施加应力刺激,各应力组每天施加对应频率的应力刺激 2h。灌注培养 5d 后分离全层纤维环组织行 HE 染色、阿利新蓝染色、胞外基质基因 Aggrecan、Collagen I、Collagen II 定量 PCR、糖胺多糖(GAG)含量和羟脯氨酸(HYP)含量的检测。**结果:**培养 5d 后,各组纤维环组织仍保持天然的层状叠加结构。与对照组比较时,除 5Hz 组外其他应力组(0.1Hz、0.5Hz、1Hz、3Hz)纤维环组织阿利新蓝染色强度增强、各胞外基质基因的表达得到维持(0.1Hz)或上调(0.5Hz、1Hz、3Hz)、GAG 和 HYP 的含量也维持在同等水平(0.1Hz)或显著升高(0.5Hz、1Hz、3Hz)。然而各应力组组间比较时,5Hz 组纤维环组织阿利新蓝染色强度、胞外基质基因的表达水平及 GAG 和 HYP 的含量比其他应力组(0.1Hz、0.5Hz、1Hz、3Hz)都下调($P<0.05$)。**结论:**椎间盘体外灌注培养条件下,压应力刺激频率影响纤维环细胞的基质合成,低频率(0.1~3Hz)的应力刺激增加基质合成,高频率(5Hz)的应力刺激减少基质合成。

【关键词】椎间盘;退变;器官培养;压应力;频率

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2015.03.11

中图分类号:Q813.1 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2015)-03-0252-07

Effects of loading frequency on matrix synthesis of annulus fibrosus cells in an intervertebral disc perfusion culture system/LI Pei, GAN Yibo, XU Yuan, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2015, 25(3): 252-258

【Abstract】 Objectives: To investigate the effects of loading frequency on matrix synthesis of annulus fibrosus (AF) cells. **Methods:** Discs from porcine(4-6 months old) were isolated and randomly divided into control group (no loading) and loading groups(0.1Hz, 0.5Hz, 1Hz, 3Hz and 5Hz group, respectively). All discs were put in tissue culture chamber for perfusion culturing. No loading was applied to the discs in the control group while different loading frequencies(0.1Hz, 0.5Hz, 1 Hz, 3Hz and 5Hz, respectively) were applied to the discs in the loading groups. After culturing for 5 days, the full-thickness AF tissues were used for the analysis of HE staining, alcian blue staining, matrix genes(Aggrecan, Collagen I, collagen II) expression, GAG content and HYP content. **Results:** After 5 days, AF in each group remained the natural lamellar structure. Compared with the control group, stronger intensity of alcian blue staining, up-regulated expression of matrix genes and increased GAG content and HYP content were observed in loading groups except for the 5Hz group. When compared among loading groups, the alcian blue staining intensity, expression of matrix genes, GAG content and HYP content in 5Hz group all decreased compared with those of other loading groups (0.1Hz, 0.5Hz, 1Hz and 3Hz group). **Conclusions:** Under condition of intervertebral disc perfusion culturing, matrix synthesis of AF cells is influenced by loading frequency, which increases at low frequency (0.1-3Hz) and decreases at high frequency(5Hz).

基金项目:国家自然科学基金(NSFC 81272029, NSFC 81027005),校转化基金(2011XZH006)

第一作者简介:男(1988-),博士研究生,研究方向:脊柱外科

电话:(023)68765283 E-mail:lipeizj@163.com

通讯作者:周强 E-mail:zq_tlh@163.com

[Key words] Intervertebral disc; Degeneration; Organ culture; Loading; Frequency

[Author's address] Department of Orthopedic Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China

椎间盘退变是引起患者腰痛的重要病因,目前发病机制不明^[1]。纤维环结构破坏是椎间盘退变时的主要病理特征之一,正常情况下纤维环细胞通过合成各种胞外基质来维持组织的正常结构及力学性能,退变时胞外基质合成减少可破坏纤维环力学功能并最终导致其结构上的损伤^[2]。过去国外学者在细胞三维培养模型和动物体内模型中的研究表明,应力作用能影响纤维环细胞的基质代谢^[3-5]。虽然这些研究阐述了压应力对纤维环细胞的生物学影响,但细胞培养模型使纤维环细胞脱离了天然的胞外微环境,动物体内研究干扰因素复杂、可控性较差,因而这些研究的相关结论不能真实地反应体内生理情况^[6]。近年来出现的椎间盘器官培养模型,不但具有较好的可控性,而且保留了组织结构的完整性及天然的胞外基质环境,因此基于该模型的各种外部刺激对纤维环细胞的生物学作用可能更加接近体内情况^[7]。然而,压应力刺激频率作为一项重要的应力参数,对器官培养条件下椎间盘纤维环细胞基质合成的影响,目前国内外鲜见报道。本研究旨在利用自主研发的生物反应器平台,观察不同压应力频率对椎间盘纤维环细胞基质合成的影响,为压应力相关椎间盘退变的病理机制研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂、仪器

健康幼龄巴马香猪(7只,4~6月龄)由第三军医大学基础部实验动物学教研室提供。

高糖型 DMEM 培养基(Hyclone 公司)、胎牛血清(FBS, Gibco 公司)、双抗(Hyclone 公司)、氯化钠及抗坏血酸(sigma 公司)、6-硫酸软骨素、阿利新蓝染液(上海远慕生物)、TriPure Isolation Reagent (Roche 公司)、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche 公司)、SYBR Green qPCR Mix(东盛生物)、木瓜蛋白酶及其他生化试剂(上海生工)、羟脯氨酸含量试剂盒(南京建成)、靶基因引物合成(上海生工)、正置荧光显微镜(Zeiss)、Real-Time PCR 仪(Bio-Rad)、生物反应器(课题组自主研发)。

1.2 生物反应器施力原理

该实验中使用的生物反应器为课题组前期自主研发成果,能对培养的组织施加各种条件的拉压应力^[8]。整套系统由脉动仿生的闭环式培养液自动循环系统、培养液自动更新及反馈调控系统、仿生模式轴向拉压应力施加系统及整机运行的自动化控制和智能化调控系统构成(图1)。操作过程中首先设置压应力学参数,然后系统会自动生成相应的仿生压应力模式作用曲线,当按设定参数的仿生压应力模式实施压应力的加载与卸载时,数字处理器会实时监测组织的受力信号,并与设定的仿生施力曲线进行比较,通过闭环反馈对误差进行高速动态调节,以此实现对组织的精确稳定施力。

1.3 巴马香猪椎间盘的获取

过量戊巴比妥钠肌肉注射处死巴马香猪,经背侧入路依次切开皮肤及周围软组织,充分暴露脊柱后于无菌条件下完整切取胸腰段脊柱(T7~L5),随后用20号手术刀片依次分离各椎间盘,并尽量去除椎体骨及骨性终板但保留软骨终板的完整性,取材过程中若损伤了软骨终板,则丢弃样本(图2),最后用无菌磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)对分离的椎间盘进行3次冲洗,每次5min。

1.4 分组及培养

将分离的椎间盘随机进行如下分组:无应力对照组和应力组(分别为0.1Hz组、0.5Hz组、1Hz组、3Hz组、5Hz组),每组12个样本。将各组椎间盘置于生物反应器的组织培养室中(37℃, 21% O₂ 及 5% CO₂)进行灌注培养,同时各应力组椎间盘每天施加大小为0.4MPa、频率分别为0.1、0.5、1、3、5Hz的压应力刺激2h。应力大小的选择参考人生理情况下的受力情况^[9],应力频率及受力时间的选择相关外文文献。各培养室给予30ml DMEM 培养基(高糖型,含10% FBS、1%双抗、25μg/ml 抗坏血酸)并以2ml/min的流速进行循环。所有培养基渗透压均用氯化钠调节至430mOsm/kg, pH值调节至7.2。各组培养周期为5d,每2天换液1次。

1.5 纤维环组织学观察

培养结束后,各组 3 个椎间盘经 PBS 缓冲液冲洗后放入 Bouin's 固定液中室温固定 24h,10% EDTA液脱钙 15d 后行常规石蜡包埋切片,切片厚 5um。各样本取 3 张切片进行 HE 染色和阿利新蓝染色,分别观察纤维环显微结构及纤维环组织中蛋白多糖类物质的含量和分布。

1.6 纤维环组织 RNA 提取及 Real-Time PCR 检测

为了观察不同压应力频率对纤维环组织主要胞外基质基因表达的影响,我们利用荧光定量 PCR方法检测了 Aggrecan、Collagen I、及 Collagen II 的表达情况。培养结束后,在显微解剖镜下小心分离出各组椎间盘的全层纤维环组织(每组 3 个),并迅速置于液氮中研磨成粉末,加入 1ml TriPure 后按说明书步骤提取总 RNA。待 RNA 浓度测定完毕,用逆转录试剂盒将各组 1μg RNA

逆转录为 cDNA,然后构建由 cDNA 模板、上下游引物及 SYBR Green qPCR Mix 组成的定量 PCR 体系进行荧光定量检测。靶基因引物序列见表 1。PCR反应条件为 94℃预变性 5min,94℃变性 15s,58℃退火 15s,72℃延伸 20s,40 个循环。与新鲜纤维环样本做归一化处理,以 GAPDH 基因为内参,各基因的相对表达强度表示为 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。

1.7 纤维环组织糖胺多糖(GAG)含量检测

各组椎间盘培养结束后(每组 3 个),按上述方法分离出全层纤维环并低温冻干,精确称量组织干重后,将冻干组织放入 1.5ml EP 管中,各管分别加入 5 mg/ml 的木瓜蛋白酶消化液 1ml (含 0.2mol/L 氯化钠,0.01mol/L 盐酸半胱氨酸,0.1mol/L 乙酸钠 和 0.05mol/L 乙二醇四乙酸二钠),60℃ 消化 36h。以鲸 6-硫酸软骨素(6-CS)为标准品,配制浓度为 50μg/ml 至 500μg/ml 的梯度标准品溶液(间隔浓度为 50μg/ml)用以制作标准曲线。

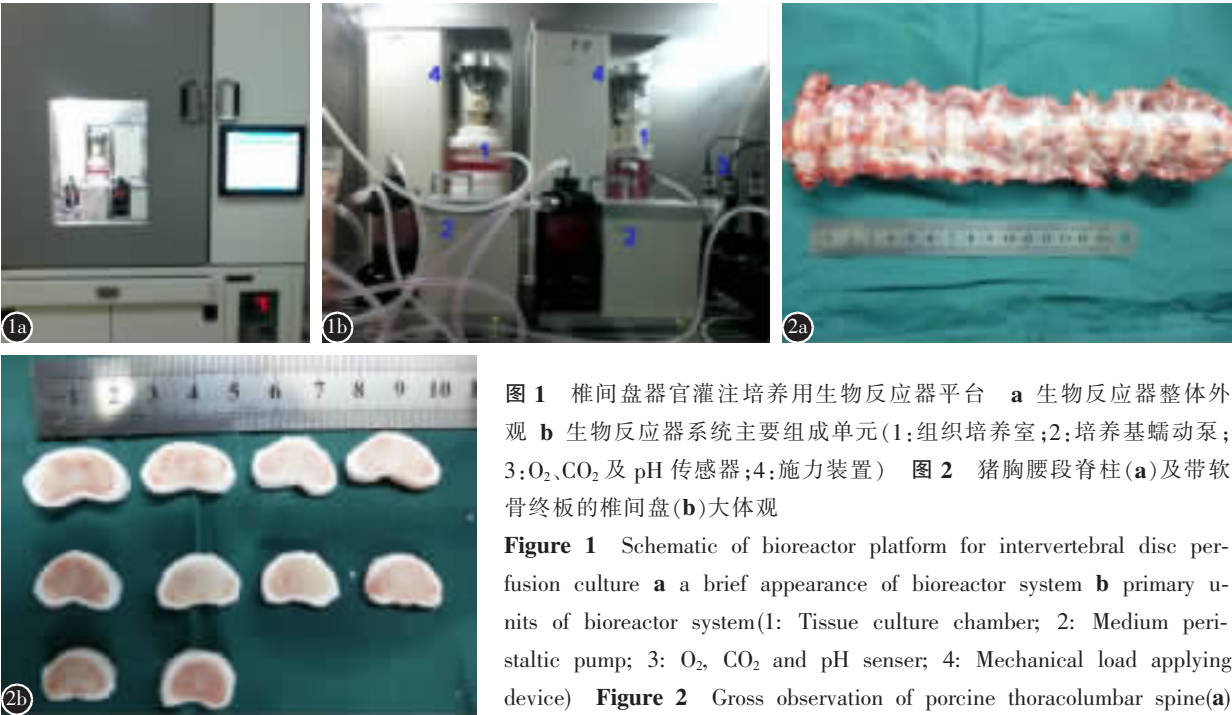


图 1 椎间盘器官灌注培养用生物反应器平台 a 生物反应器整体外观 b 生物反应器系统主要组成单元(1:组织培养室;2:培养基蠕动泵;3:O₂、CO₂及 pH 传感器;4:施力装置) 图 2 猪胸腰段脊柱(a)及带软骨终板的椎间盘(b)大体观

Figure 1 Schematic of bioreactor platform for intervertebral disc perfusion culture a a brief appearance of bioreactor system b primary units of bioreactor system(1: Tissue culture chamber; 2: Medium peristaltic pump; 3: O₂, CO₂ and pH sensor; 4: Mechanical load applying device) Figure 2 Gross observation of porcine thoracolumbar spine(a) and the isolated discs with cartilage endplate(b)

表 1 靶基因引物序列

Table 1 Primers of target genes

基因名称 Genes	上游引物(5'-3') Forward (5'-3')	下游引物(5'-3') Reverse (5'-3')
GAPDH	ACCTCCACTACATGGTCTACA	ATGACAAGCTTCCCGTTCTC
Aggrecan	CGTGCTCCAGCACTTCTAA	AGTCCACTGAGATCCTCTACTC
Collagen I	CCAAGAAGAAGGCCAACAAGGC	CATCGCACAAACACATTGCCG
Collagen II	CAGGATGGGCAGAGGTATAATG	GAGGCAGTCTTTCAGGTCTTC

随后按照文献报道的二甲基亚甲蓝(DMMB)法,将样本液与 1,9-二甲基亚甲蓝染液混合,测定 525nm 波长处吸光度值(OD 值),根据标准曲线计算获得不同样本 GAG 的含量。GAG 含量计算公式为:GAG 含量($\mu\text{g}/\text{mg}$ 干重)=GAG 浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$) $\times$ 消化液总体积(1ml)/组织干重(μg) $\times 100\%$ 。

1.8 纤维环组织羟脯氨酸(HYP)含量检测

各组椎间盘培养结束后(每组 3 个),按前述方法小心分离出全层纤维环,并精确称量获得组织湿重,随后按照 HYP 含量测定试剂盒说明书步骤进行检测。HYP 含量表示为 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 湿重。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示,经方差齐性检验后,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 纤维环组织形态学变化

培养 5d 后,各组椎间盘纤维环组织仍然保持

天然的层状叠加结构,并且由外至内纤维环层状结构的厚度逐渐增加。各应力组纤维环组织显微结构与无应力对照组比较时,无明显变化(图 3)。

2.2 阿利新蓝染色

镜下见各组椎间盘纤维环组织被染成蓝色,且外层纤维环染色强度均弱于内层纤维环;0.1、0.5、1 及 3Hz 组染色强度均强于或接近无应力对照组;5Hz 组染色强度稍弱于无应力对照组及其他应力组(图 4)。

2.3 基因表达

荧光定量 PCR 结果显示不同压应力刺激频率对纤维环组织中胞外基质基因的表达具有一定影响(表 2)。应力组与对照组比较,除 5Hz 组中 Aggrecan、Collagen II 及 Collagen I 表达下调外($P<0.05$),其他应力组均能维持或上调 Aggrecan、Collagen II 及 Collagen I 的表达;各应力组与 5 Hz 组比较时,胞外基质基因表达呈上调趋势($P<0.05$)。

2.4 纤维环组织 GAG 含量

培养 5d 后,各应力组与对照组比较,发现除



图 3 培养 5d 后,HE 染色显示各组椎间盘纤维环保持天然的层状结构,各组之间纤维环结构无明显区别($\times 100$) a、b、c、d、e、f 分别为无应力对照组、0.1Hz 组、0.5Hz 组、1Hz 组、3Hz 组、5Hz 组。IAF:内层纤维环;OAF:外层纤维环

Figure 1 After 5 days culture, HE staining showed the annulus fibrosus in every group kept its native lamellar structure and no obvious structural differences were found between groups($\times 100$) a, b, c, d, e and f are representative images of control, 0.1Hz, 0.5Hz, 1Hz, 3Hz and 5Hz groups, respectively. IAF: inner annulus fibrosus; OAF: outer annulus fibrosus

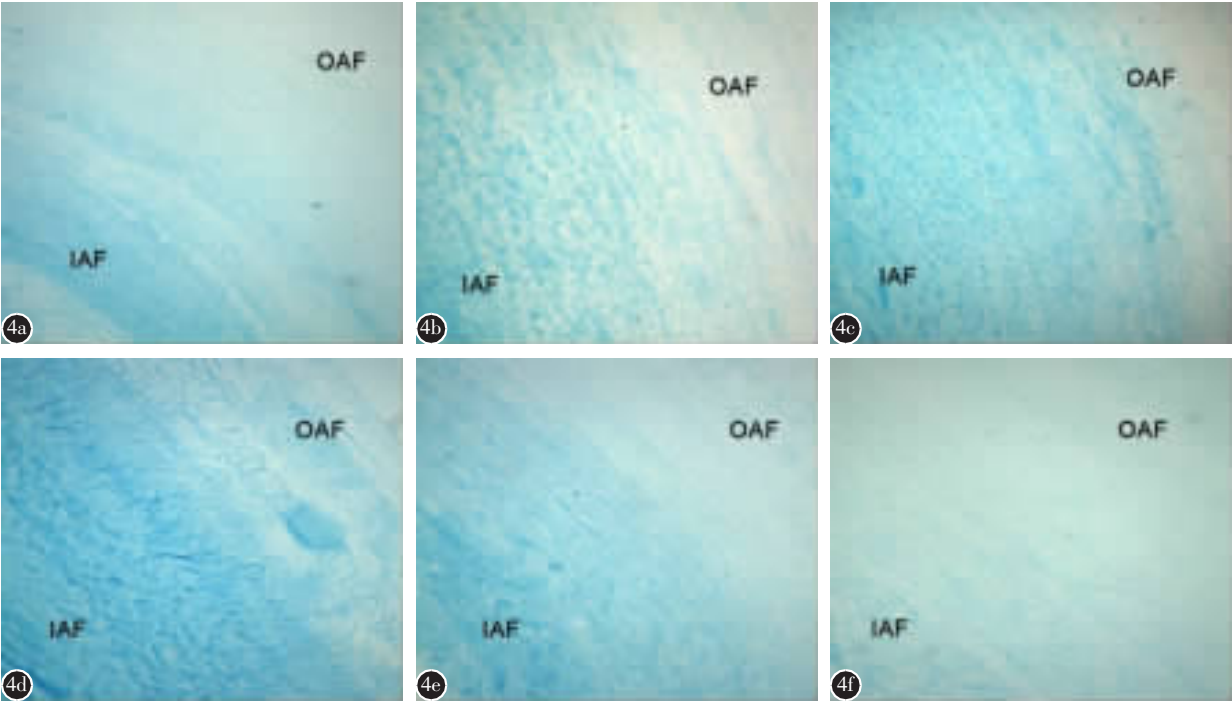


图 4 培养 5d 后,阿利新蓝染色($\times 100$)显示各组纤维环被染成蓝色,且内层纤维环染色强度强于外层纤维环染色。0.1Hz 组、1Hz 组和 3Hz 组染色强度强于无应力对照组,5Hz 组染色强度弱于无应力对照组。a、b、c、d、e、f 分别为无应力对照组、0.1Hz 组、0.5Hz 组、1Hz 组、3Hz 组、5Hz 组(IAF 表示内层纤维环;OAF 表示外层纤维环)

Figure 4 After 5 days culture, alcian blue assay($\times 100$) in every group showed the annulus fibrosus was stained to blue and the staining intensity of the inner annulus fibrosus(IAF) was stronger than the outer annulus fibrosus(OAF). Compared with the control group, an increased staining intensity was found in the 0.1Hz, 0.5Hz, 1Hz and 3Hz group, while a decreased staining intensity was found in the 5Hz group. a, b, c, d, e and f are representative images of control, 0.1Hz, 0.5Hz, 1Hz, 3Hz and 5Hz groups, respectively. IAF: inner annulus fibrosus; OAF: outer annulus fibrosus

表 2 各组椎间盘纤维环组织胞外基质基因定量 PCR 分析

Table 2 Real-time PCR analysis for matrix genes expression of annulus fibrosus cells in control、0.1Hz、0.5Hz、1Hz、3Hz and 5Hz group

分组(Group)	Aggrecan	Collagen II	Collagen I
对照组(Control group)	2.7841 $\pm$ 0.2771	0.8436 $\pm$ 0.0676	1.6606 $\pm$ 0.1349
0.1Hz 组(0.1Hz group)	2.8076 $\pm$ 0.1438 ^①	0.8090 $\pm$ 0.0521	2.7999 $\pm$ 0.1209 ^{①②}
0.5Hz 组(0.5Hz group)	4.2828 $\pm$ 0.5147 ^{①②}	0.9162 $\pm$ 0.0681 ^{①②}	3.2464 $\pm$ 0.1382 ^{①②}
1Hz 组(1Hz group)	5.7519 $\pm$ 0.3588 ^{①②}	1.4637 $\pm$ 0.0716 ^{①②}	5.4104 $\pm$ 0.2400 ^{①②}
3Hz 组(3Hz group)	4.8788 $\pm$ 0.2536 ^{①②}	1.3566 $\pm$ 0.1015 ^{①②}	3.0950 $\pm$ 0.1090 ^{①②}
5Hz 组(5Hz group)	1.7758 $\pm$ 0.3845 ^②	0.6947 $\pm$ 0.0260 ^②	0.7600 $\pm$ 0.1323 ^②

注:①与 5Hz 组比较 $P<0.05$;②与对照组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with 5Hz group, $P<0.05$; ②Compared with control group, $P<0.05$

5Hz 组外,其他应力组 GAG 含量均高于对照组 ($P<0.05$);各应力组与 5Hz 组比较时,发现 0.1Hz、0.5Hz、1Hz 及 3Hz 组纤维环组织中 GAG 含量均高于 5Hz 组 ($P<0.05$)(表 3)。

2.5 纤维环组织 HYP 含量

培养 5d 后,各应力组与对照组比较,除 5Hz

组外,其他应力组 HYP 含量均高于对照组 ($P<0.05$);各应力组与 5Hz 组比较时,发现 0.1Hz、0.5Hz、1Hz 及 3Hz 组纤维环组织中 HYP 含量均高于 5Hz 组 ($P<0.05$)(表 4)。

3 讨论

表 3 各组椎间盘纤维环组织 GAG 含量分析

Table 3 GAG content analysis for control, 0.1Hz, 0.5Hz, 1Hz, 3Hz and 5Hz group

分组(Group)	GAG含量(GAG content)
对照组(Control group)	51.2173±2.5192
0.1Hz 组(0.1Hz group)	53.5451±5.1617 ^①
0.5Hz 组(0.5Hz group)	67.0908±2.0135 ^{①②}
1Hz 组(1Hz group)	72.7097±3.0719 ^{①②}
3Hz 组(3Hz group)	69.7190±2.5574 ^{①②}
5Hz 组(5Hz group)	48.0682±2.6506 ^②

注:①与 5Hz 组比较 $P<0.05$;②与对照组比较 $P<0.05$ Note: ①Compared with 5Hz group, $P<0.05$; ②Compared with control group, $P<0.05$

表 4 各组椎间盘纤维环组织 HYP 含量分析

Table 4 HYP content analysis for control, 0.1Hz, 0.5Hz, 1Hz, 3Hz and 5Hz group

分组(Group)	GAG含量(GAG content)
对照组(Control group)	4.1702±0.1933
0.1Hz 组(0.1Hz group)	4.8168±0.2549 ^{①②}
0.5Hz 组(0.5Hz group)	5.3042±0.3091 ^{①②}
1Hz 组(1Hz group)	7.1997±0.1801 ^{①②}
3Hz 组(3Hz group)	5.5547±0.1290 ^{①②}
5Hz 组(5Hz group)	2.3746±0.2721 ^②

注:①与 5Hz 组比较 $P<0.05$;②与对照组比较 $P<0.05$ Note: ①Compared with 5Hz group, $P<0.05$; ②Compared with control group, $P<0.05$

纤维环作为椎间盘的重要组成之一,以层状排列多层叠加的方式紧密包裹着椎间盘中心凝胶状的髓核组织^[10]。纤维环细胞是纤维环组织内的主要细胞,对纤维环组织内胞外基质的合成、分泌及转归起关键作用。一方面,当椎间盘发生退变时,纤维环组织内的基质更新异常可影响其力学性能,最终导致结构上的撕裂甚至完全破裂^[11];另一方面,压应力作用在椎间盘退行性变的整个病理过程中发挥重要作用,能影响纤维环细胞的基质代谢。由此可见纤维环组织内胞外基质的更新与压应力刺激相互联系,深入了解压应力刺激对纤维环细胞胞外基质合成行为的影响对椎间盘退变机理的研究具有重要的指导意义。

椎间盘由髓核、纤维环及上下端软骨终板构成,是脊柱运动功能的基础^[12],由于椎间盘具有粘弹性和蠕变特性,所以椎间盘细胞对应力的反应呈现大小、频率及时间依赖性^[13]。以往国内外学者主要在动物体内模型及细胞培养模型上研究了机

械压应力频率或静水压频率对纤维环细胞的影响。在体内研究方面,Maclean 等^[14]就不同压应力大小(1MPa 或 0.2MPa)和压应力频率(1Hz、0.2Hz 及 0.01Hz)在大鼠尾椎模型上进行了研究,发现在 1MPa 下,所有频率刺激都上调相关基质金属蛋白酶的表达,而在 0.2MPa 或 0.2Hz 时,胞外基质基因和基质金属蛋白酶基因的表达无明显变化。在细胞三维培养模型中,Korecki 等^[14]将幼年 and 成熟牛尾椎间盘纤维环细胞接种至藻酸盐支架上,研究了年龄和应力频率对纤维环细胞的作用,发现动物年龄对纤维环细胞的生物学影响比应力频率明显,而应力频率仅产生微小的生物作用;Kasra 等^[15]研究了不同静水压频率(1~20Hz)对单层培养条件下兔椎间盘外层纤维环细胞蛋白合成的作用,结果发现高频(20Hz)和高应力(1.7MPa)刺激促进外层纤维环细胞的胶原蛋白合成;随后 Kasra 等^[16]研究了猪内层纤维环细胞对不同静水压频率刺激的反应,结果发现在 5Hz 附近时基质蛋白合成减少,并且蛋白降解增加。以上研究均表明压应力频率对纤维环细胞基质合成具有调控作用,并且这一调控作用可能与压应力大小、动物年龄、研究模型及纤维环细胞的来源等因素有关。

本研究中,我们主要是从整体概念出发,在椎间盘器官培养模型的基础上施加压应力刺激,并对全层纤维环组织进行分析。相对以往动物体内模型及细胞三维培养模型而言,具有可控性强、维持了细胞天然的胞外微环境及组织结构完整性的特点,因此该模型上应力频率对椎间盘纤维环组织基质合成的作用可能更加符合生理情况。我们发现 0.1~3Hz 频率范围增加或维持胞外基质基因的表达、GAG 含量和 HYP 含量,然而 5Hz 的应力频率减少纤维环组织中的基质合成,这提示不同的频率刺激对椎间盘纤维环细胞的基质合成具有不同作用,相对较高的频率刺激不利于基质合成,而相对较低的频率刺激能促进或维持胞外基质的合成。Kasra 等^[16]的研究与我们一致,都证明了压应力频率可调控纤维环胞外基质的合成,并且接近人体共振频率(4~6Hz)的应力刺激对纤维环基质的合成具有破坏性作用。然而 Maclean 等^[14]发现应力大小为 1MPa 时,0.2Hz、1Hz 都能上调基质金属蛋白酶基因的表达,而后的上调可促进胞外基质的降解,这正可能是研究模型和应力大小上的区别造成结果的不一致。另外,Korecki 等^[14]认

为动物年龄的不同也会引起纤维环细胞对外界刺激的不同反应, 本研究中幼龄猪纤维环细胞与其他研究中成年动物纤维环细胞在表型上的不同也可能造成纤维环细胞对外界刺激的不同反应。

总之, 本研究在椎间盘体外器官培养水平观察了不同压应力频率刺激下椎间盘纤维环组织内的胞外基质合成反应, 结果表明纤维环组织内的基质合成呈频率依赖性, 适当的压应力频率(0.1~3Hz) 增加胞外基质合成, 过高的压应力频率(5Hz) 减少胞外基质合成。然而, 纤维环可进一步分为内层纤维环和外层纤维环, 外层纤维环和内层纤维环在组织内部的结构成分和细胞成分上均存在区别^[17], 本研究在全层纤维环整体水平上进行探讨可能存在某些方面的不足。另外, 猪和人类相比具有许多可变性, 虽然实验中所选择的应力参数符合人类的生理范围受力情况, 但完全将动物水平上的研究结果推导至人类是不合理的。椎间盘退变与压应力之间的关系非常复杂, 本研究中压应力频率调控纤维环细胞胞外基质合成的具体机制还有待进一步的研究。

4 参考文献

1. Yang G, Wang Y, Zeng Y, et al. Rapid health transition in China, 1990–2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010[J]. Lancet, 2013, 381(9882): 1987–2015.
2. Wu LC, Chiang CJ, Liu ZH, et al. Fabrication and properties of acellular porcine annulus fibrosus for tissue engineering in spine surgery[J]. J Orthop Surg Res, 2014, 9(1): 118–125.
3. Yurube T, Takada T, Suzuki T, et al. Rat tail static compression model mimics extracellular matrix metabolic imbalances of matrix metalloproteinases, aggrecanases, and tissue inhibitors of metalloproteinases in intervertebral disc degeneration[J]. Arthritis Res Ther, 2012, 14(2): R51.
4. Korecki CL, Kuo CK, Tuan RS, et al. Intervertebral disc cell response to dynamic compression is age and frequency dependent[J]. Orthop Res, 2009, 27(6): 800–806.
5. Walsh AJ, Lotz JC. Biological response of the intervertebral disc to dynamic loading[J]. J Biomech, 2004, 37(3): 329–337.
6. Seol D, Choe H, Ramakrishnan PS, et al. Organ culture stability of the intervertebral disc: rat versus rabbit[J]. J Orthop Res, 2013, 31(6): 838–846.
7. Walter BA, Illien-Junger S, Nasser PR, et al. Development and validation of a bioreactor system for dynamic loading and mechanical characterization of whole human intervertebral discs in organ culture[J]. J Biomech, 2014, 47(9): 2095–2101.
8. Li ST, Liu Y, Zhou Q, et al. A novel axial-stress bioreactor system combined with a substance exchanger for tissue engineering of 3D constructs[J]. Tissue Eng Part C Methods, 2014, 20(3): 205–214.
9. Wilke HJ, Neef P, Caimi M, et al. New in vivo measurements of pressures in the intervertebral disc in daily life [J]. Spine, 1999, 24(8): 755–762.
10. Marchand F, Ahmed AM. Investigation of the laminate structure of lumbar disc annulus fibrosus[J]. Spine, 1990, 15(5): 402–410.
11. Guterl CC, See EY, Blanquer SB, et al. Challenges and strategies in the repair of ruptured annulus fibrosus[J]. Eur Cell Mater, 2013, 25(1): 1–21.
12. Setton LA, Chen J. Cell mechanics and mechanobiology in the intervertebral disc[J]. Spine, 2004, 29(23): 2710–2723.
13. Palmer EI, Lotz JC. The compressive creep properties of normal and degenerated murine intervertebral discs[J]. J Orthop Res, 2004, 22(1): 164–169.
14. Maclean JJ, Lee CR, Alini M, et al. Anabolic and catabolic mRNA levels of the intervertebral disc vary with the magnitude and frequency of in vivo dynamic compression [J]. J Orthop Res, 2004, 22(6): 1193–1200.
15. Kasra M, Goel V, Martin J, et al. Effect of dynamic hydrostatic pressure on rabbit intervertebral disc cells[J]. J Orthop Res, 2003, 21(4): 597–603.
16. Kasra M, Merryman WD, Loveless KN, et al. Frequency response of pig intervertebral disc cells subjected to dynamic hydrostatic pressure[J]. J Orthop Res, 2006, 24(10): 1967–1973.
17. Hsieh AH, Twomey JD. Cellular mechanobiology of the intervertebral disc: new directions and approaches [J]. J Biomech, 2010, 43(1): 137–145.

(收稿日期: 2014-12-28 修回日期: 2015-03-15)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 彭向峰)