

椎间盘细胞培养及调控

Cultivation and control on intervertebral disc cells

周泉,王拥军

ZHOU Quan, WANG Yongjun

关键词 细胞,培养的; 椎间盘 Key words Cells, cultured; Intervertebral disk

现代科学对椎间盘退变疾病虽然做了大量的研究,但关于体外培养的椎间盘细胞的研究及认识却相对较少。由于细胞与组织培养技术具有较好的重复性、费用低、结果分析较简单,无伦理问题等特点^[1],使其在椎间盘退变研究中引起重视并不断得到应用。

1 椎间盘细胞来源及培养意义

体外培养的椎间盘细胞按取材部位可分为四种来源细胞:外层纤维环细胞(OAF)^[2],主要由成纤维样细胞组成。

内层纤维环细胞(IAF)^[2]或移行区细胞(TZ)^[3],主要包括类软骨样细胞。髓核细胞(NP)^[2],幼年为脊索细胞,成年多为类软骨细胞。软骨终板细胞^[4],由软骨细胞组成,表达具有软骨表型特征的Ⅱ型胶原。椎间盘细胞的培养方法由开始的单层培养到立体培养不断发展,目的在于研究椎间盘细胞生物学特性^[5],找到一种理想的能模拟体内椎间盘退变的实验模型。随着组织工程三维载体结构支架的出现,开始将椎间盘细胞的体外培养用于椎间盘修复的研究。如 Alini 等^[6]在Ⅱ型胶原支架上种植髓核和纤维环细胞,这些细胞在支架中有相似的合成细胞外大分子蛋白多糖和Ⅱ型、Ⅲ型胶原能力。探讨椎间盘细胞体外培养用于椎间盘修复的研究,寻求退变椎间盘理想的生物修复途径。其中支架对细胞外基质成分的保留还有待进一步研究。

2 培养条件的作用

健康的椎间盘基质主要有胶原和蛋白多糖组成,大分子的蛋白聚糖分子通过聚糖蛋白单体分子与连接蛋白和硫酸软骨素相互作用聚集形成,并与胶原纤维相互作用组成有序的基质结构,对抗张力和压力。椎间盘最多的糖胺多糖为硫酸软骨素和硫酸角质素,前者在正常椎间盘占多数,而后者在退变椎间盘中占优。不同椎间盘细胞方法对细胞外基质的产生能力和维持细胞表型有所不同,细胞的形态与细胞外基质形成及增殖密切相关。

2.1 单层培养 单层培养椎间盘细胞技术被广泛采用,但在这种培养条件对细胞形态和合成细胞外基质影响较大。Gruber 等^[7]研究发现单层培养基中纤维环细胞形态为扁平、梭形,免疫组化显示形成少量的Ⅱ型胶原;在血小板衍生生长因子(PDGF)作用下单层培养细胞有丝分裂能力较强。另

一实验发现纤维环细胞和移行区细胞在单层培养基基因表达水平有变化,基因表达的特征型没有出现^[8]。Sato 等^[2]实验研究表明单层培养条件下内层纤维环细胞基质中糖胺聚糖含量高于外层纤维环细胞。

2.2 三维培养 椎间盘细胞采用组织工程基质材料培养能很好的维持细胞表型,促进细胞外基质形成。目前用于椎间盘细胞组织工程材料有琼脂糖凝胶、藻酸盐材料、藻酸盐珠、透明质酸凝胶、生物活性玻璃等。在三维培养中细胞形态多为圆形,形成结节性群落,可产生丰富的硫酸软骨素和硫酸角质素。免疫组化显示大量Ⅱ型、Ⅲ型胶原形成^[7]。藻酸盐培养基特征型基因表达无变化,而髓核细胞对培养条件不敏感,纤维环细胞和移行区细胞在单层培养后藻酸盐再包裹过程中经历了基因型可逆变化,不同培养条件影响细胞基因型表现,同时可扮演一个体外细胞生物物理和化学刺激角色^[8]。三维培养条件下内层纤维环细胞基质中糖胺聚糖含量于外层纤维环细胞含量相等^[2]。Can 等研究采用生物活性玻璃为底物培养的髓核细胞,在此培养条件下细胞特征型得到维持,细胞基质中富含 aggrecan、Ⅱ型、Ⅲ型胶原,但未见 X 型胶原,细胞同时表达 CD44,一种连接透明质酸的糖蛋白,使透明质酸“锚”定在细胞上^[8]。Stern 等^[9]比较了在藻酸盐与纤维和透明质酸(HA)复合材料中培养的髓核细胞与蛋白多糖合成有关的 DNA 含量,3 周后纤维和 HA 复合物中与蛋白多糖合成有关的 DNA 明显高于藻酸盐中,认为纤维和 HA 复合物可以作为体外培养底物。Schneider 等^[10]在多孔Ⅱ型胶原-糖胺聚糖复合物中体外培养纤维环细胞表现出有收缩性的能力,在Ⅱ型胶原-糖胺聚糖复合物中体外培养纤维环细胞基质中糖胺聚糖明显高于单层培养条件。

3 细胞因子对体外培养椎间盘细胞的影响

1991 年 Thompson 等^[11]报道了利用细胞培养方法观察一些细胞因子对椎间盘细胞增殖和对细胞外基质更新的影响。细胞因子对椎间盘细胞的增殖、细胞外基质合成的影响逐渐被重视。其中细胞外基质成分的变化是椎间盘力学特征丧失的直接原因。

3.1 白介素(IL-1) Doita 等^[12]在手术摘除的突出椎间盘中发现有 IL-1 和 IL-1 免疫阳性细胞,证明其与椎间盘退变有关。体外培养椎间盘细胞加入 IL-1 可影响蛋白多糖的代谢,建立基质退变模型。Rand 等^[13]发现体外培养的大鼠椎间盘

细胞在脂多糖的刺激下,可大量合成分泌 IL-6 和 IL-1 等炎症细胞因子。Shinmei 等^[14]根据体内退变有关炎症因子,研究 IL-1 对体外椎间盘纤维环细胞的影响,实验发现按 IL-1 计量大小引起蛋白多糖的不同程度的减少,并增强了基质中酶的活性,同时蛋白多糖合成轻度减少,DNA 合成没有变化。提出 IL-1 在椎间盘细胞蛋白多糖代谢中起了重要作用,尤其是蛋白多糖的分解。Rannou 等^[15]研究了纤维环细胞区别于关节软骨细胞对 IL-1 的反应,从年幼的兔中获取纤维环细胞和软骨细胞,在原始培养基内生长,加用 IL-1 孵育。发现纤维环细胞比关节软骨细胞少 2.5 倍的 I 型胶原 mRNA,IL-1 对此无影响。纤维环细胞合成分泌的蛋白多糖比关节软骨细胞少 4 倍。IL-1 减少纤维环细胞中的硫酸蛋白多糖达 35% ($P < 0.01$),关节细胞有 41% 的上述标记物减少,并减少了蛋白多糖的积聚。IL-1 在两种细胞中都能诱导基质溶解素-1 mRNA (Stromelysimr-1) 产生。Stromelysimr-1 mRNA 在纤维环细胞中含量是关节软骨细胞中的 1/2。IL-1 在两种体外培养细胞中促进了前列腺素 E2 和 II 型磷脂酶 A2 的产生。因此,纤维环细胞能被 IL-1 激动,产生在局部降解和炎症反应过程有关的炎症因子。这种产物和蛋白多糖积聚下降相关。而在体外,纤维环细胞比关节软骨细胞对 IL-1 的反应略弱。Takegami 等^[16]在髓核细胞和纤维环细胞中加入 IL-1 引起细胞外基质中蛋白多糖和胶原的降低,作为细胞外基质退变,用于其它因子作用的模型。纤维环细胞随年龄增长而增加对 IL-1 的敏感性,这可能是椎间盘退变的原因之一。内层细胞对 IL-1 的反应增强,可解释为什么人椎间盘内层纤维环和髓核比外层纤维环更易退变。IL-1 受体拮抗蛋白有抑制椎间盘降解作用^[17]。

3.2 转化生长因子 (TGF- β) 转化生长因子 (TGF- β) 最初被描述为一种可诱导大鼠成纤维细胞增殖的因子,是一族广泛存在、具有多种功能的多肽生长因子,具有调节细胞的生长、分化、凋亡和细胞外基质 (ECM) 合成的功能。体外培养的椎间盘细胞加入 TGF- β 4 d 后增殖明显增强,10 d 后有丝分裂减弱,双糖链蛋白聚糖 (biglycan) 基因表达增加,核心蛋白聚糖 (decorin) 基因表达 4 d 时无变化,10 d 时减少或停止^[18]。Thompson 等^[11]报告转化生长因子能刺激体外培养的椎间盘细胞合成蛋白多糖率为 500%。Yung 等^[19]观察到 TGF- β 1 能增加采用“球形培养”的椎间盘细胞基质 I 型胶原的形成及蛋白多糖的合成。TGF- β 对细胞外基质的影响通过调整金属蛋白酶 (MMP) 和金属蛋白酶组织抑制剂 (TIMP) 来实现,在体外培养牛椎间盘髓核细胞中 TGF- β 1 能降低所有 MMP 活性,细胞表面 TIMP-2 和 MTI-MMP 水平同时降低^[20]。

骨形态发生蛋白 (BMP) 是 TGF- β 的超家族成员之一,BMP-7(OP-1) 是 BMP 家族中的一员,能促进软骨细胞合成 I 型胶原和蛋白多糖。Takegami 等^[16]观察到 IL-1 培养条件下髓核细胞、纤维环细胞基质中蛋白多糖和胶原含量降低,加入 OP-1 后髓核细胞、纤维环细胞恢复了蛋白多糖含量,而且弹性分子多于没加 IL-1 的细胞。

3.3 胰岛素样生长因子 (IGFs) 和血小板衍生生长因子 (PDGF)

胰岛素样生长因子是一种低分子量多肽,具有胰岛素样作

用。体外培养条件下具有维持细胞表型,促进细胞外基质合成、抑制凋亡和促进细胞增殖作用。年龄大者椎间盘细胞数目少,有学者认为其主要原因是细胞的凋亡,Gruber 等^[21]在 1% 血清中培养纤维环细胞,引起明显凋亡,发现暴露于 50 ~ 500 ng/ml 胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 或 100 ng/ml 血小板衍生生长因子 (PDGF) 的 1% 血清培养液中,椎间盘细胞凋亡的比例明显减少,体外培养椎间盘细胞中 IGF-1 和 PDGF 明显抗凋亡作用。Gruber 等还发现 PDGF 对体外培养细胞有明显促分裂作用^[6]。Osada 等^[22]研究发现 IGF-1 和 IGF-1 受体在体外培养胎牛髓核细胞多于成年牛髓核细胞,其能刺激体外培养髓核细胞蛋白多糖合成。IGF-1 对细胞外基质的影响通过也可能通过调整金属蛋白酶 (MMP) 和金属蛋白酶组织抑制剂 (TIMP) 来实现,IGF-1 能降低 MMP-2 活性,IGF-1 和刀豆球蛋白 A 联合刺激培养细胞,能恢复 MMP-2 活性^[20]。

总之,椎间盘组织含有多种细胞因子,共同作用于椎间盘细胞的分裂、生长、成熟、凋亡各阶段。通过对各种细胞因子对体外培养椎间盘细胞作用的研究,希望找到合适的因子来阻止、甚至逆转椎间盘退变过程。

4 其他

成熟的椎间盘无血管分布,所以,细胞主要靠物质在基质中的扩散而生存,Hörner 等研究营养供应和体外细胞发育和代谢的关系,模拟体内椎间盘细胞生存生理环境,采用扩散盒培养髓核细胞,营养供应由边缘经过凝胶扩散到中心^[23]。发现细胞低密度时,盒内细胞发育正常,高密度时中心细胞死亡,其中葡萄糖是关键营养物质。在酸性环境 (pH = 6) 和无氧条件下,细胞保持了生长和发育能力,但合成蛋白多糖非常少。证实椎间盘细胞最大密度由营养物质供应决定,营养物质供应减少降低细胞繁育能力,引起退变。Wehling 等利用逆转录腺病毒作载体,将 IL-1 受体拮抗蛋白基因转染进入体外培养牛软骨终板细胞,细胞表达 IL-1 受体拮抗蛋白,利用基因疗法治疗椎间盘退变^[3]。随着年龄增长,椎间盘的蛋白多糖含量减少,椎间盘退变加速,其原因是多样的。Shingo^[17]等通过对兔纤维环内外层的细胞体外培养中蛋白多糖合成随年龄变化而变化的研究来解释其原因。使用 2 个月龄 (年青组) 和 3 岁 (年老组) 的日本大白兔内外层纤维环细胞。年老组中蛋白多糖合成明显减少且释放率明显增加,原因是在内层纤维环细胞中,年老组比年青组的 IL-1 含量多,故蛋白多糖合成受抑制。Chiba 等通过对培养的人纤维环细胞加入抗生素,细胞的发育和增殖力下降,代谢率降低,认为椎间盘炎时使用抗生素治疗要注意其对椎间盘细胞的毒害作用^[24]。Rannou 等^[25]研究力学刺激对体外培养椎间盘纤维环细胞代谢和基质形成的研究,在 CTS 调控可伸缩底物上 (20%, 5%, 1 Hz) 纤维环细胞无从底物上脱落,表达 I 型胶原,无 II 型胶原表达,和单层培养纤维环细胞比较,蛋白多糖合成无变化,该培养方式可用于研究力学刺激对纤维环细胞代谢影响。Gruber 等^[26]采用免疫组化和逆转录多聚酶链式反应在体外培养椎间盘细胞发现雌激素受体,17- β -雌二醇能明显刺激椎间盘细胞增殖。

总之,椎间盘细胞培养的调控因素很多,生理生化及生物因子作用复杂。培养条件及方式、细胞密度、力学变化、pH

值、细胞因子等等影响椎间盘细胞体外培养表型的维持。随着组织工程学的发展,将加深我们对培养方式的认识。而今后的主要研究工作有:建立更近似于体内环境的培养体系,理想的体外细胞培养方式能模拟体内生理、病理变化,将为我们研究椎间盘退变提供新思路、新方法。进一步研究细胞因子对椎间盘细胞的调控及其机制。加快基因疗法和生物修复的研究,为治疗退变椎间盘开拓新的途径。

参考文献

- 1 Brune K, Lanz R, Mülle N. Tissue culture methods for the investigation of anti-inflammatory drugs. *Agents Actions*, 1986, 17(3-4): 342.
- 2 Sato M, Kikuchi T, Asazuma T, et al. Glycosaminoglycan accumulation in primary culture of rabbit intervertebral disc cells. *Spine*, 2001, 26(24): 2653-2660.
- 3 Wang J Y, Baer AB, Kraus VE, et al. Intervertebral disc cells exhibit differences in gene expression in alginate and monolayer culture. *Spine*, 2001, 26(16): 1747-1751.
- 4 Wehling P, Schulitz KP, Robbins PD, et al. Transfer of genes to chondrocytic cells of the lumbar spine. Proposal for a treatment strategy of spinal disorders by local gene therapy. *Spine*, 1997, 22(10): 1092-1097.
- 5 Chiba K, Andersson GB, Masuda K, et al. Metabolism of the extracellular matrix formed by intervertebral disc cells cultured in alginate. *Spine*, 1997, 22(24): 2885-2893.
- 6 Alini M, Li W, Markovic P, et al. The potential and limitations of a cell-seeded collagen/hyaluronan scaffold to engineer an intervertebral disc-like matrix. *Spine*, 2003, 28(5): 446-454.
- 7 Gruber HE, Hanley EN Jr. Human disc cells in monolayer vs 3D culture: Cell shape, division and matrix formation. *BMC Musculoskelet Disord*, 2000, 1(1): 1.
- 8 Ducheyne P, Vresilovic E, Shapiro IM. Bioactive glass serves as a substrate for maintenance of phenotype of nucleus pulposus cells of the intervertebral disc. *J Biomed Mater Res*, 2000, 51(4): 596-604.
- 9 Stern S, Lindenhayn K, Schultz O, et al. Cultivation of porcine cells from the nucleus pulposus in a fibrin/hyaluronic acid matrix. *Acta Orthop Scand*, 2000, 71(5): 496-502.
- 10 Schneider TO, Mueller SM, Shortkroff S, et al. Expression of alpha-smooth muscle actin in canine intervertebral disc cells in situ and in collagen-glycosaminoglycan matrices in vitro. *J Orthop Res*, 1999, 17(2): 192-199.
- 11 Thompson JP, Oegema TR Jr, Bradford DS. Stimulation of mature canine intervertebral disc by growth factors. *Spine*, 1991, 16: 253-260.
- 12 Doita M, Kanatani T, Harada T, et al. Immunohistology study of the ruptured intervertebral disc of the lumbar spine. *Spine*, 1996, 21: 235-241.
- 13 Rand N, Reichert F, Floman Y, et al. Murine nucleus pulposus-derived cells secrete interleukin-1, and -10 and stimulating factor in cell culture. *Spine*, 1997, 22: 2598-2602.
- 14 Shinmei M, Kikuchi T, Yamagishi M, et al. The role of interleukin-1 on proteoglycan metabolism of rabbit annulus fibrosus cells cultured in vitro. *Spine*, 1988, 13(11): 1284-1290.
- 15 Rannou F, Corvol MT, Hudry C, et al. Poiraudou S. Sensitivity of annulus fibrosus cells to interleukin-1 beta. Comparison with articular chondrocytes. *Spine*, 2000, 25(1): 17-23.
- 16 Takegami K, Thonar EJ, An HS, et al. Osteogenic protein-1 enhances matrix replenishment by intervertebral disc cells previously exposed to interleukin-1. *Spine*, 2002, 27(12): 1324.
- 17 Maeda S, Kokubun S. Hanges with age in proteoglycan synthesis in cells cultured in vitro from the inner and outer rabbit annulus fibrosus responses to interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist protein. *Spine*, 2000, 25(2): 166.
- 18 Ruber HE, Fisher EC Jr, Desai B, et al. Human intervertebral disc cells from the annulus: Three-dimensional culture in agarose or alginate and responsiveness to TGF-beta. *Exp Cell Res*, 1997, 235(1): 13-21.
- 19 Yung LJ, Hall R, Pelinkovic D, et al. New use of a three-dimensional pellet culture system for human intervertebral disc cells: Initial characterization and potential use for tissue engineering. *Spine*, 2001, 26(21): 2316-2322.
- 20 Pattison ST, Melrose J, Ghosh P, et al. Regulation of gelatinase-A (MMP-2) production by ovine intervertebral disc nucleus pulposus cells grown in alginate bead culture by transforming growth factor-beta 1 and insulin like growth factor-1. *Cell Biol Int*, 2001, 25(7): 679-689.
- 21 Gruber HE, Norton HJ, Hanley EN Jr. Anti-apoptotic effects of IGF-1 and PDGF on human intervertebral disc cells in vitro. *Spine*, 2000, 25(17): 2153-2157.
- 22 Osada R, Ohshima H, Ishihara H, et al. Autocrine/paracrine mechanism of insulin-like growth factor-1 secretion, and the effect of insulin-like growth factor-1 on proteoglycan synthesis in bovine. *J Orthop Res*, 1996, 14(5): 690-699.
- 23 Rner HA, Urban JP. Effect of nutrient supply on the viability of cells from the nucleus pulposus of the intervertebral disc. *Spine*, 2001, 26(23): 2543-2549.
- 24 Hoelscher GL, Gruber HE, Coldham G, et al. Effects of very high antibiotic concentrations on human intervertebral disc cell proliferation, viability, and metabolism in vitro. *Spine*, 2000, 25(15): 1871-1877.
- 25 Rannou F, Poiraudou S, Foltz V, et al. Monolayer annulus fibrosus cell cultures in a mechanically active environment: Local culture condition adaptations and cell phenotype study. *J Lab Clin Med*, 2000, 136(5): 412-421.
- 26 Gruber HE, Yamaguchi D, Ingram J, et al. Expression and localization of estrogen receptor-beta in annulus cells of the human intervertebral disc and the mitogenic effect of 17-beta-estradiol in vitro. *BMC Musculoskelet Disord*, 2002, 3(1): 4.

(收稿日期: 2003-05-09 本文编辑: 李为农)

国家级继续医学教育学习班通知

广东省中医药学会骨伤科专业委员会定于 2004 年 11 月上旬在广东省佛山市南海区举办脊柱退行性疾病和骨肿瘤中西医结合治疗学习班, 会期 1 天半, 届时将有著名专家教授进行 6 次专题报告。会议由广东省中医院承办、南海中医院协办。欲参加者请速与广东省广州市大德路 111 号广东省中医院骨科孔畅(邮编: 510160; 办公室电话: 020-81887233 转 33029, 手机: 13802505905, 如无人接听, 请发短信息)联系。(该学习班为 2004 年国家级继续医学教育, 项目编号: 230208013, 国家级学分 13 分)。http://www.gdhtcm.com.