

· 基础研究 ·

H₂O₂ 氧化应激诱导兔椎间盘髓核细胞衰老的研究谢健¹, 童培建², 单乐天¹, 吴承亮¹

(1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江省中医院骨科, 浙江 杭州 310006)

【摘要】 目的: 研究 H₂O₂ 不同浓度对兔椎间盘髓核细胞形态、活力、增值、周期等的影响。方法: 新西兰大白兔(2~3 kg, 雌)10 只, 无菌条件下酶消化法分离髓核细胞。含 15%FBS 的 DMEM/F12(1:1) 培养液培养, 细胞 90% 融合后传第 1 代。按照 H₂O₂ 不同浓度(0 μmol/L、130 μmol/L、216 μmol/L、360 μmol/L、600 μmol/L、1 000 μmol/L) 分组, 0 μmol/L H₂O₂ 为空白对照组。在细胞对数生长期, 不同浓度 H₂O₂ 处理 1 h 后原培养液继续培养 48 h, 通过检测, 分析比较各组髓核细胞与空白对照组间形态、活力、增值、周期的差异性。结果: 与空白对照组比较, 当 H₂O₂ 浓度为 130 μmol/L、216 μmol/L 时, 髓核细胞生物学特性未见显著性改变($P>0.05$); 当 H₂O₂ 浓度为 360 μmol/L、600 μmol/L、1 000 μmol/L 时, 髓核细胞出现衰老改变: 细胞质减少并出现空泡、增值减慢、衰老相关-β-半乳糖苷酶染色率增加、细胞周期阻滞于 G1 期而进入 S 期减少($P<0.05$)。随着 H₂O₂ 浓度的增高, 衰老程度不断升高。结论: 一定浓度的 H₂O₂ 能够导致髓核细胞提前衰老, 引起髓核细胞生物学特性的改变。

【关键词】 椎间盘; 细胞衰老; 过氧化氢; 兔

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2013.04.016

Research of oxidative stress induces aging in rabbit intervertebral disc nucleus pulposus cells injured by H₂O₂ XIE Jian, TONG Pei-jian, SHAN Le-tian, and WU Cheng-liang*. *Traditional Chinese Medicine Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310006, Zhejiang, Chinese.

ABSTRACT Objective: To study the effect of H₂O₂ on the morphological pattern, vitality, proliferation, cycle period of rabbit intervertebral disc nucleus pulposus cells. **Methods:** Ten New Zealand white rabbits (2 to 3 kg, female) were used for isolating nucleus pulposus cells under sterilized condition. The culture solution with 15% FBS and DMEM/F12 (1:1) was applied for cell cultivation. After 90% cell fusion, the first generation was obtain and stimulated by H₂O₂ with different concentrations of 0 μmol/L (control group), 130 μmol/L, 216 μmol/L, 360 μmol/L, 600 μmol/L, and 1000 μmol/L. **Results:** Compared with the control group, there was little difference of the biological property ($P>0.05$) in 130 μmol/L and 216 μmol/L H₂O₂-treated groups. When the concentration of H₂O₂ attained 360 μmol/L, 600 μmol/L, and 1 000 μmol/L, the cells suffered aging, with increased cell vacuoles, decreased proliferation, and aging-related increase of β-galactosidase dyeing. The cell cycle of many nucleus pulposus cells was blocked in G1 stage other than entering S stage. With increasing H₂O₂ concentrations, the aging degree was increased. **Conclusion:** A certain concentration of H₂O₂ could induce early aging of nucleus pulposus cells, resulting in biological abnormalities of these cells.

KEYWORDS Intervertebral disk; Cell aging; Hydrogen peroxide; Rabbits

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2013, 26(4): 332-335 www.zggszz.com

随着人们生活与工作环境的改变, 由椎间盘退变引起的脊柱病变的发病率正逐年增高^[1]。细胞衰老是导致椎间盘退变的根本原因, 而体内或细胞内氧自由基的增多是促进细胞衰老的主要启动因素之一。髓核组织位于椎间盘中心位置, 本实验通过分离髓核组织建立髓核细胞体外培养模型, 运用过氧化氢进行氧化应激处理, 导致髓核细胞衰老, 观测其生

长增殖情况, 为研究髓核细胞衰老机制及寻找特异性抗衰老药物治疗椎间盘退变性疾病提供基础。

1 材料与方

1.1 实验动物 清洁级新西兰大白兔 10 只, 雌性, 体质量 2~3 kg, 由浙江中医药大学动物实验中心提供, 用于椎间盘髓核组织分离提取, 培养髓核细胞。

1.2 实验药物、主要试剂与仪器 0.25%胰蛋白酶-EDTA(Gbico)、II 型胶原酶(Solarbio)、DMEM 培养液(吉诺)、F12 培养液(吉诺)、胎牛血清(FBS)(四季青)、30%过氧化氢溶液(上海凌峰化学试剂有限公司, 分析纯 AR)、MTT(Solarbio)、DMSO(Sigma)、细胞衰老 β-半乳糖苷酶(SA-β-gal)染色试剂盒(碧云

基金项目: 浙江省自然科学基金(编号: Y20091189); 浙江省医药卫生科技计划项目(编号: 2010KYA142)

Fund program: Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No. Y20091189)

通讯作者: 吴承亮 Tel: 0571-86613684 E-mail: wu.c@163.com

天)、细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒(碧云天)、培养箱(Thermo)、洁净工作台(Airtech)、倒置相差显微镜(Olympus)、台式离心机(上海安亭科学仪器厂)、酶标仪(Bio-tek)、流式细胞仪(Epics Altra)、电热恒温水浴锅(上海森信实验仪器有限公司)、微量振荡器(杭州亚美电子设备厂)、培养瓶及培养板(NEST)、细胞计数板等。

1.3 髓核细胞的分离与培养 无菌条件下分离新西兰大白兔椎间盘中的髓核,置于培养皿中。不含 FBS 的培养液(DMEM:F12, 1:1)洗 2 遍后剪成 1 mm³ 的小块,按 0.25%胰蛋白酶-EDTA、0.2% II 型胶原酶 37 °C 水浴顺序消化 30 min、3 h,每 5 min 摇晃 1 次。消化完毕后离心(1 500 r/min, 5 min),弃上清,加入含 15%FBS 的培养液制成细胞悬液,200 目细胞筛过滤后细胞培养板计数,以 5×10⁵/ml 的密度接种至培养瓶。置于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养。根据培养液颜色情况半数换液 3 次后每 2~3 d 换液 1 次。细胞达 90%融合后传第 1 代:0.25%胰蛋白酶-EDTA 溶液消化 2 min,镜下见细胞缩小变圆后含 15%FBS 的培养液终止消化,细胞计数调整密度为 10⁵/ml。

1.4 观察项目与方法

1.4.1 细胞组织学观察及活力测定 将细胞接种至 24 孔板,细胞进入对数生长期后去培养液,分别加入不同浓度 H₂O₂ 溶液(分别为 0、130、216、360、600、1 000 μmol/L),每个浓度 4 个复孔。作用 1 h 后,换成含 15%FBS 的培养液继续培养,48 h 后倒置相差显微镜下观察细胞形态,然后其中 1 孔行“苏木精+番红 O”染色,其他 3 孔进行细胞活力测定。各孔胰酶消化后,按细胞悬液:0.4%台盼蓝染液(9:1)混匀,等待片刻,吸取适量混合液计数板上计数。细胞活力=[未蓝染细胞/(蓝染细胞+未蓝染细胞)]×100%。

1.4.2 MTT 比色法检测细胞增殖 将细胞接种于 96 孔板,H₂O₂ 溶液处理同前,每个浓度 12 个复孔。作用 1 h 后换成含 10% FBS 培养液培养,每孔 200 μl。48 h 后向 96 孔板中加入 20 μl MTT 溶液,细胞培养箱中继续孵育。4 h 后小心吸除上清,滴加 150 μl DMSO 溶液,微量振荡器上震荡 10 min,使结晶物充分溶解。选择 490 nm 波长,酶标仪测定各孔吸光度值为 m,吸净孔内溶液再测一次为 n,实际吸光度(OD 值)为 m-n。

1.4.3 衰老相关-β-半乳糖苷酶活性检测 将细胞接种于 24 孔板,H₂O₂ 溶液处理同前,每个浓度 6 个复孔。作用 1 h 后,换成含 15%FBS 的培养液继续培养。48 h 后进行 SA-β-gal 活性检测:胰酶消化,

PBS 清洗 1 次后离心,加入 250 μl SA-β-gal 染色固定液室温固定 15 min。离心后吸除固定液,PBS 洗涤 3 次,每次 3 min。离心去除 PBS,每孔加入 1 ml 染色工作液,37 °C 孵育过夜。孵育完毕后混匀,细胞计数板计数。其中 2 孔不用胰酶处理,其他操作相同,镜下观察贴壁髓核细胞染色情况。染色率=[蓝染细胞/(蓝染细胞+未蓝染细胞)]×100%。

1.4.4 流式细胞仪检测细胞周期及凋亡 将细胞接种于 6 孔板,H₂O₂ 溶液处理同前。作用 1 h 后,换成含 15%FBS 培养液继续培养。48 h 后进行细胞周期及凋亡检测:酶消化法收集细胞后离心(1 000 r/min, 5 min),冰浴预冷的 PBS 清洗后再次离心弃上清,管内可残留 50 μl 左右 PBS,将离心后的细胞悬液加入至 1.5 ml 离心管(预先加入 1 ml 冰浴预冷的 70%乙醇),轻轻吹打混匀。水浴 4 °C 固定 20 h 以上。固定结束后离心弃上清,预冷 PBS 清洗 1 遍。离心弃上清后加入 0.5 ml 碘化丙啶染色液缓慢充分重悬细胞,37 °C 避光温浴 30 min。温浴完毕,使用 488 nm 波长流式细胞仪检测红色荧光并进行分析。

1.5 统计学处理 数据均采用 SPSS16.0 统计软件进行统计。结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用两样本均数比较的 *t* 检验统计分析各浓度组与空白对照组(H₂O₂ 浓度 0)之间的差异。

2 结果

2.1 细胞组织学观察及活力测定 髓核细胞 50 h 后开始贴壁,细胞呈梭形,5 d 后完全贴壁,细胞呈多角形或梭形,见长突触,细胞呈岛状分布,6~8 d 后细胞数明显增多,细胞进入对数生长期,体积较大,核大、多核。17 d 后细胞贴满瓶底,达 90%融合。经过细胞传代,H₂O₂ 作用 1 h 后倒置相差显微镜下观察,细胞形态未有明显改变,继续培养 48 h 后进行“苏木精+番红 O”染色,与 H₂O₂ 浓度为 0 的空白对照组(见图 1a)比较,空白对照组细胞胞质丰富,细胞多呈多角型,有突触。当 H₂O₂ 浓度为 130、216 μmol/L 时,细胞形态未见明显改变。当 H₂O₂ 浓度为 360 μmol/L 时(见图 1b),细胞质减少,胞质内见空泡,为细胞衰老的表现。当 H₂O₂ 浓度继续增加,髓核细胞胞质不断减少,并且空泡数量增多。

细胞活力测定结果见表 1,与 H₂O₂ 浓度为 0 的空白对照组相比,当 H₂O₂ 浓度为 130、216 μmol/L 时,对髓核细胞活力无明显影响(*P*>0.05),细胞活力在 90%以上;当 H₂O₂ 浓度为 360 μmol/L 时,髓核细胞活力明显下降(*P*<0.05),并随着 H₂O₂ 浓度的升高,细胞活力逐渐下降。当 H₂O₂ 浓度 1 000 μmol/L 时,细胞活力只有 60%左右。说明当 H₂O₂ 达到一定

表 1 椎间盘髓核细胞在不同浓度 H₂O₂ 作用下的细胞活力、吸光度(OD)、β-半乳糖苷酶染色蓝染率、细胞周期的变化(̄x±s)

Tab.1 Changes of cell vital force, optical density (OD), rate of β-galactosidase staining, cell cycles under different H₂O₂ concentration in nucleus pulposus cells (̄x±s)

观测项目	孔数	H ₂ O ₂ 浓度					
		0 μmol/L	130 μmol/L	216 μmol/L	360 μmol/L	600 μmol/L	1 000 μmol/L
细胞活力(%)	24	93.00±2.91	93.67±0.59	93.30±2.23	84.33±1.31	75.20±2.17	61.23±3.07
吸光度	96	0.257±0.010	0.247±0.006	0.257±0.032	0.214±0.005	0.184±0.013	0.144±0.019
蓝染率(%)	24	3.60±0.66	3.40±1.21	3.23±0.95	37.70±4.27	43.10±2.54	53.07±3.51
细胞周期 G1 期	6	15.24±6.63	18.76±4.31	19.02±3.33	32.10±3.17	41.04±2.44	48.97±1.29
细胞周期 S 期	6	44.52±3.67	41.37±3.01	41.42±6.56	12.30±1.72	5.19±0.53	2.76±0.47

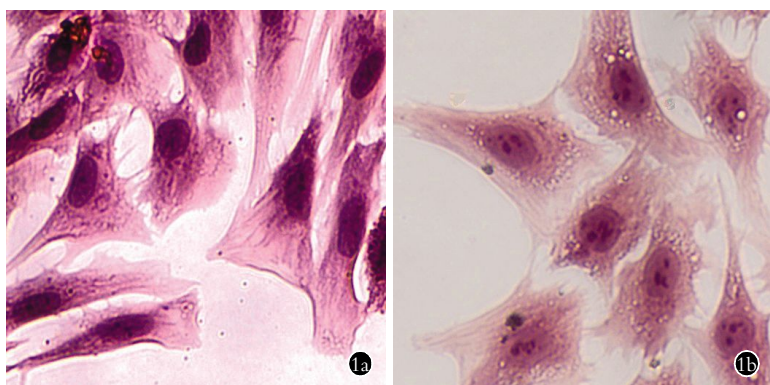


图 1 髓核细胞“苏木精+番红 O”染色 1a. H₂O₂ 浓度 0 μmol/L (“苏木精+番红 O”染色 ×400) 1b. H₂O₂ 浓度 360 μmol/L (“苏木精+番红 O”染色 ×400)

Fig.1 Hematoxylin+Safranin O staining of NPCs 1a. H₂O₂ concentration;0 μmol/L (Hematoxylin+Safranin O staining ×400) 1b. H₂O₂ concentration;360 μmol/L (Hematoxylin+Safranin O staining ×400)

浓度时能够导致髓核细胞提前衰老, 细胞形态产生改变, 细胞活力逐渐降低。

2.2 氧化应激的髓核细胞增殖情况 不同浓度 H₂O₂ 作用下的吸光度(OD)检测结果见表 1。吸光度与细胞数量成正比, 吸光度越大代表细胞数量越多。与空白对照组 (H₂O₂ 浓度为 0) 相比, H₂O₂ 浓度为 130、216 μmol/L 时, 细胞增殖明显改变 ($P>0.05$), 当 H₂O₂ 浓度超过 360 μmol/L 时, 细胞增殖差异具有显著性 ($P<0.05$)。说明当 H₂O₂ 达到一定浓度时, 能够减缓髓核细胞增殖, 这是细胞衰老的表现。

2.3 衰老相关-β-半乳糖苷酶活性检测 髓核细胞胰酶消化后进行 SA-β-gal 染色, 计算蓝染率。衰老的髓核细胞能够特异性表达衰老相关 β-半乳糖苷酶, 本研究所用试剂盒以 X-Gal 为底物, 在 SA-β-gal 催化下会生成深蓝色产物, 且仅有衰老细胞显色, 而未衰老的髓核细胞不表达 β-半乳糖苷酶, 所以细胞质不显色。贴壁髓核细胞 SA-β-gal 染色见图 2, 光镜下衰老髓核细胞胞质蓝染, 但正常细胞的胞质不显色。染色率计算结果见表 1, 与空白对照组 (H₂O₂ 浓度为 0) 相比, 当 H₂O₂ 浓度为 130、216 μmol/L 时, 细胞蓝染率低于 5% ($P>0.05$); 当 H₂O₂ 浓度为 360、600、1 000 μmol/L 时, 蓝染率均在 40% 以上, 当

H₂O₂ 浓度 1 000 μmol/L 时, 髓核细胞蓝染率达 50% ($P<0.05$)。随着 H₂O₂ 浓度的升高, 髓核细胞蓝染率也随之升高。

2.4 细胞周期及凋亡检测 细胞周期及凋亡检测结果见表 1, 与空白对照组 (H₂O₂ 浓度为 0) 相比, 当 H₂O₂ 浓度超过 360 μmol/L 时, G1 期比例升高, 而 S 期比例下降, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。说明当 H₂O₂ 达到一定浓度时, 髓核细胞对有氧分裂的反应能力变得迟钝, 而合成 DNA 的能力逐渐减弱, 细胞阻滞于 G1 期, 而不能进入 S 期。这是髓核细胞衰老的表现。

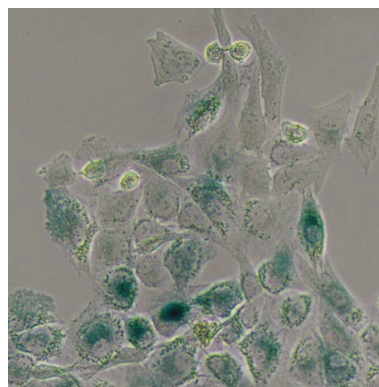


图 2 360 μmol/L H₂O₂ 干预下髓核细胞 β-半乳糖苷酶染色(SA-β-gal 染色×200)

Fig.2 β-galactosidase staining of NPCs (H₂O₂ concentration; 360 μmol/L)(SA-β-gal ×200)

3 讨论

本实验研究髓核细胞在 H₂O₂ 不同浓度下的氧化应激状态, 明确氧化应激对髓核细胞的形态、活力、增值及周期产生的影响。研究结果显示, 当 H₂O₂ 浓度为 130、216 μmol/L 时, 对髓核细胞无明显影响, 说明此时细胞本身具有足够的抗氧化能力。而当 H₂O₂ 浓度为 360、600、1 000 μmol/L 时, 髓核细胞出现形态发生改变、活力下降, 细胞增殖降低、S 期细胞减少等细胞衰老征象。同时髓核细胞 SA-β-gal 蓝染率也随之增加, Roberts 等^[2]研究同样显示, 突出的

椎间盘 SA- β -gal 阳性率较高,髓核细胞阳性率较纤维环更高。Gruber 等^[3]进一步研究发现,随着椎间盘退变程度的加重,SA- β -gal 阳性率随之增加,且有显著性差异。说明此时已超过了髓核细胞本身抗氧化能力,而且本研究显示随着 H₂O₂ 浓度的增高,细胞衰老程度逐渐加重。

椎间盘退变受多因素、多环节的影响,生物力学的改变、营养不足、细胞凋亡增多都能够加速椎间盘退变的发生。Buckwalter 等^[4]最早认为细胞衰老是椎间盘衰老和退变的潜在原因,直到最近才有直接证据显示细胞衰老在椎间盘退变中起作用。导致细胞衰老的原因主要分两类:复制老化和应激诱导早衰,前者为程序性衰老过程,而后者是在一些亚致死性应激如高氧、过氧化氢、紫外线、慢性炎症等作用下细胞提前发生衰老,其中氧化应激可直接损伤 DNA 而引起细胞早衰^[5],故作为本研究的重点。体内或细胞内存在清除活性氧(ROS)的抗氧化酶如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等,正常情况下,ROS 与抗氧化酶处于平衡状态,当这种平衡打破,细胞处于相对高氧环境则容易导致衰老的发生。

氧化应激诱导细胞衰老主要包括以下 4 种方式^[6]:①DDR 通路:氧化应激产生单链 DNA 损伤信号,激活共济失调毛细血管扩张突变(ataxia telangiectasia mutated, ATM)激酶活性,促进受损 DNA 附近组蛋白磷酸化,上调 p53/p21 的活性,引发细胞衰老^[7]。②核因子 κ B(nuclear factor κ B, I κ Bs)通路:氧化应激可激活 I κ Bs 激酶(I κ B kinase, IKK),促进 I κ B α 的磷酸化,释放并激活 NF- κ B^[8]。活化的 NF- κ B 由细胞质转移到细胞核而与相应的 DNA 序列结合,刺激白细胞介素 8(interleukin 8, IL-8)表达^[8]或增加 p53 蛋白稳定性^[9],促进细胞衰老的发生。③p38 MAPKs 通路:分裂原激活的蛋白激酶(mitogen activated protein kinases, MAPK)是信号转导过程中一组主要的信号分子。p38 MAPKs 信号通路通过 3 级级联放大反应将细胞外的信号传递到细胞核,调控目的基因的表达。氧化应激激活 p38MAPKs 通路,上调 p16 和 p19ARF 的表达,限制细胞自我更新能力及其

寿命。④microRNA 通路: microRNA 是一种内源性的非转录小 RNA,在 DNA 转录时产生,然后转移到细胞质,作为一种反式作用元件直接与目的 mRNA 结合,改变 mRNA 的二级结构,调控其翻译活性。新近发现氧化应激也可通过调节 microRNA 的量,促进细胞衰老^[10]。如何延缓椎间盘细胞衰老是治疗椎间盘退变性疾病的突破点,而明确其衰老机制是关键。通过本研究明确了衰老髓核细胞的各项生物学指标的差异性,为进一步的衰老机制研究打下基础,从而有利于筛选出可以延缓髓核细胞衰老的特异性药物治疗椎间盘退变性疾病。

参考文献

- [1] Woods BL, Vo N, Sowa G, et al. Gene therapy for intervertebral disk degeneration[J]. Orthop Clin North Am, 2011, 42(4): 563-574.
- [2] Roberts S, Evans EH, Kleitsas D, et al. Senescence in human intervertebral discs[J]. Eur Spine J, 2006, 15(3): S312-S316.
- [3] Gruber HE, Ingram JA, Norton HJ, et al. Senescence in cells of the aging and degenerating intervertebral disc: immunolocalization of senescence-associated beta-galactosidase in human and sand rat discs[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2007, 32(3): 321-327.
- [4] Buckwalter JA. Aging and degeneration of the human intervertebral disc[J]. Spine (Phila Pa 1976), 1995, 20(11): 1307-1314.
- [5] Itahana K, Campisi J, Dimri GP. Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells[J]. Biogerontology, 2004, 5(1): 1-10.
- [6] 闫海龙, 龚勇珍. 氧化应激及 p16 和 p53/p21 与细胞衰老关系的研究进展[J]. 医学综述, 2011, 17(5): 682-685.
Yan HL, Gong YZ. Investigation progress of the relation of cell aging and oxidative stress, p16, p53/p21[J]. Yi Xue Zong Shu, 2011, 17(5): 682-685. Chinese.
- [7] Rai P, Onder TT, Young JJ, et al. Continuous elimination of oxidized nucleotides is necessary to prevent rapid onset of cellular senescence[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(1): 169-174.
- [8] Bhattacharyya S, Dudeja PK, Tobacman JK. ROS, Hsp27, and IKK-beta mediate dextran sodium sulfate (DSS) activation of I κ B α , NF κ B, and IL-8[J]. Inflamm Bowel Dis, 2009, 15(5): 673-683.
- [9] Lee MY, Wang Y, Vanhoutte PM. Senescence of cultured porcine coronary arterial endothelial cells is associated with accelerated oxidative stress and activation of NF κ B[J]. J Vasc Res, 2010, 47(4): 287-298.
- [10] Ivanovska I, Ball AS, Diaz RL, et al. MicroRNAs in the miR-106b family regulate p21/CDKN1A and promote cell cycle progression[J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(7): 2167-2174.

(收稿日期: 2012-09-25 本文编辑: 王玉蔓)