

· 基础研究 ·

兔髓核与纤维环细胞生物学特性差异的研究

谢健¹, 童培建², 肖鲁伟¹, 金红婷¹, 吴承亮¹, 单乐天¹, 毛强¹, 潘佳菲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: 同时建立兔髓核细胞与纤维环细胞体外培养模型, 比较两者生物学特性差异。方法: 新西兰大白兔 5 只(2~3 kg, 雌雄不限), 无菌条件下分离髓核及纤维环, 酶消化法联合组织块法含 15% FBS 的 DMEM/F12(1:1) 培养液培养, 当细胞 90% 融合后进行传代培养。通过倒置相差显微镜观测细胞形态, 台盼蓝染色测定细胞活力, 甲苯胺蓝和 HE 染色进行组织学观察, MTT 法测定细胞增殖, 分析比较髓核细胞与纤维环细胞形态、活力、增殖的差异。结果: 原代及第 1 代髓核细胞和纤维环细胞形态上无明显差异, 第 2 代髓核细胞开始有空泡出现。髓核细胞较纤维环细胞贴壁时间晚、细胞活力低; 原代髓核细胞从第 9 天开始增殖速度较纤维环细胞慢($P < 0.05$)。结论: 纤维环细胞的细胞活性明显高于髓核细胞。椎间盘退变性疾病可能是由髓核发生衰退引起, 从而局部生物力学改变, 导致纤维环破裂等组织结构的变化及功能的丢失。

【关键词】 兔; 椎间盘; 细胞培养; 生物差异

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2013.06.010

Different biological characteristics between nucleus pulposus and annulus fibrosus cells in rabbits XIE Jian, TONG Pei-jian, XIAO Lu-wei, JIN Hong-ting, WU Cheng-liang*, SHAN Le-tian, MAO Qiang, and PAN Jia-fei. *Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, Zhejiang, China

ABSTRACT Objective: To compare biological characteristics between nucleus pulposus and annulus fibrosus cells in vitro model. **Methods:** Five New Zealand white rabbits (2 to 3 kg, either gender) were isolated nucleus pulposus and annulus fibrosus under sterilized condition, then cultured in nutrient solution with 15% FBS and DMEM/F12 (1:1) by enzyme digestion combined with tissue block method. When 90% cells fused, subculturing were performed. Cell morphology were observed by inverted phase contrast microscope, cell viability were detected by trypan blue staining, histological were observed by a toluidine blue and HE staining, cell proliferation were tested by MTT method, then the cell morphology, viability, proliferation between nucleus pulposus and annulus fibrosus were compared. **Results:** There were no obviously differences between nucleus pulposus and annulus fibrosus in original and the first strain. Physalides were appeared in annulus fibrosus on the second generation. The strapping time was later, and activity was lower in nucleus pulposus than annulus fibrosus. The growth of cell proliferation in nucleus pulposus was lower than annulus fibrosus from the ninth day. **Conclusion:** The cell activity in annulus fibrosus is higher than nucleus pulposus. Degenerative disc disease may caused by recession of nucleus pulposus, local biomechanical changes, further caused structure change and function loss of annulus fibrosus.

KEYWORDS Rabbits; Intercerebral disk; Cell culture techniques; Biological diversity

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2013, 26(6): 481-485 www.zggszz.com

颈腰椎退变性疾病是骨科的多发病、常见病, 虽然发病机制仍未明确, 但目前公认其与椎间盘退变密切相关。随着分子生物学、遗传学及免疫技术的发展, 学者们认为自然条件下和各种应激状态下导致的椎间盘细胞衰老是椎间盘退变发生的基础^[1]。因此, 椎间盘细胞衰老的研究作为探讨椎间盘退变性疾病突破点, 成为近年研究的重点。椎间盘主要由

中央的髓核以及外围包绕的纤维环构成, 两者位置邻近, 生理和病理上相互影响, 以往只是单一的研究髓核细胞或纤维环细胞, 而忽视了它们之间的差异性对比。因此, 本研究通过同时建立髓核细胞及纤维环细胞的体外培养体系, 观察其生物学差异性。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、仪器和材料 胰蛋白酶(Gibco)、II型胶原酶(Solarbio)、DMEM培养液(吉诺)、F12培养液(吉诺)、胎牛血清(四季青)、HE染液、甲苯胺蓝染液、番红O染液、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)、电热恒温水浴锅(上海森信

基金项目: 2009年浙江省自然科学基金(编号: Y2091189); 浙江省医药卫生科技计划项目(编号: 2010KYA142)

Fund program: Natural Science Fund of Zhejiang Province (No. Y2091189)

通讯作者: 吴承亮 E-mail: wu.cl@163.com

实验仪器有限公司)、200 目尼龙网筛、培养瓶及培养板(NEST)、计数板及计数器、普通手术器械及眼科手术器械等。

1.2 髓核细胞、纤维环细胞的分离与培养 新西兰大白兔 5 只(2~3 kg)(清洁级,雌雄不限,浙江中医药大学动物实验中心提供),耳缘静脉水合氯醛过量麻醉致死,背部备皮,75%乙醇消毒后铺巾,延后正中中线切开皮肤,分离椎旁肌肉,取下颈胸腰段脊柱。在超净台中剔除脊柱周围肌肉组织及筋膜,用 0.01 mol/L PBS 冲洗至无明显血迹,分离髓核及纤维环(约 40 个椎间盘)如图 1,分别置于带盖培养皿中,培养皿中预先放入 5 ml 不含 FBS 的培养液(DMEM:F12,1:1)。待所有髓核及纤维环处理好后相同培养液洗 2 遍,分别用眼科剪剪成 1 mm³ 的小块,并转移入 50 ml 无菌离心管中,消化时加入同体积的 0.25%胰蛋白酶、0.2% II 型胶原酶进行消化。即髓核 0.125%胰酶、0.1%胶原酶顺序消化各 30 min,2 h;纤维环 0.125%胰酶、0.1%胶原酶顺序消化各 40 min,3 h,每 5 min 摇晃 1 次。每次消化完毕均离心(1 500 r/min,5 min),弃上清,消化完毕后加入含 15% FBS 的培养液制成细胞悬液,吹打悬液,待未消化的组织块稍微下沉时吸取上层悬液,细胞培养板计数,以 5×10⁵ 个/ml 的密度接种至培养瓶,并将剩余组织块接种于培养容器中(培养液高度<3 mm)。最后置于培养箱(37 ℃,5% CO₂)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%融合后传代培养。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 细胞形态观察 每次换液前在倒置相差显微镜下观察原代及传代髓核细胞和纤维环细胞形态、增殖情况并拍照。

1.3.2 细胞活力检测 分别在不同时间段(取材后、原代将铺满时、第 1 代消化后、第 1 代将铺满时、

第 2 代消化后)检测髓核细胞及纤维环细胞活力。方法:细胞计数制成 10⁵ 个/ml 悬液,按细胞悬液:0.4% 台盼蓝染液为 9:1 的比例混匀,等待片刻,吸取适量混合液至计数板上计数,计数 3 次取平均值。细胞活力=[未蓝染细胞/(蓝染细胞+未蓝染细胞)]×100%。

1.3.3 细胞组织学观察 原代、第 1 代、第 2 代髓核细胞及纤维环细胞直接于细胞板上行甲苯胺蓝、HE、苏木精+番红 O 染色。

1.3.4 MTT 测定细胞生长曲线 离心后使用含 10%FBS 的培养液制成细胞悬液,分别用 200 目尼龙网过筛,细胞密度调整至 5×10⁴ 个/ml,200 μl/孔接种于 96 孔板,髓核细胞及纤维环细胞各 6 个孔,分别于 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19 d 以 MTT 法测定吸光度(OD)值。方法: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 1 次为 n,实际吸光度(OD 值)为 m-n。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用两样本配对 t 检验对各组间的差异性进行比较,取 α=0.05 为检验水准。

2 结果

2.1 细胞形态观察 髓核细胞 50 h 后开始贴壁(图 2a),细胞呈梭形,5 d 后完全贴壁(图 2b),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(图 2c),细胞进入指数生长期,体积较大,核大、多核。17 d 后细胞贴满瓶底,出现接触抑制,可进行细胞传代。以 10⁵ 个/ml 的密度细胞传代后,4 h 开始贴壁(图 2d),细胞大多呈多角形;40 h 广泛贴壁,较原代细胞生长快;5 d 细胞贴满瓶底,细胞形态未见明显异常。细胞第 2 次传代后,细胞增殖明显减慢,细胞器减少,少数细胞内出现空泡,12 d 后贴满瓶底。髓核细胞第 3 代开始基本停止增殖,细胞核收缩,细胞质明显减少。

纤维环细胞 22 h 后开始贴壁(图 3a),细胞呈扇形;4 d 后完全贴壁(图 3b),细胞呈类圆形见细小突触或梭形;4~5 d 后细胞数目明显增多(图 3c),细胞进入指数生长期,细胞散在分布于培养瓶底,形态大小较均匀;12 d 后纤维环细胞贴满瓶底,排列紧密处呈层状排列。以 10⁵ 个/ml 的密度细胞传代后,2 h 开始贴壁(图

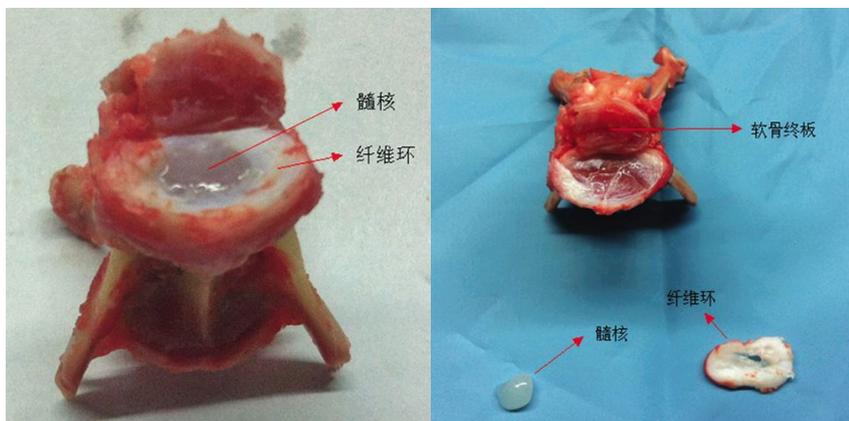


图 1 兔子骺间线水平椎间盘俯视图

Fig.1 Plane view of intervertebral disc in rabbit's IC intercrystal diameter

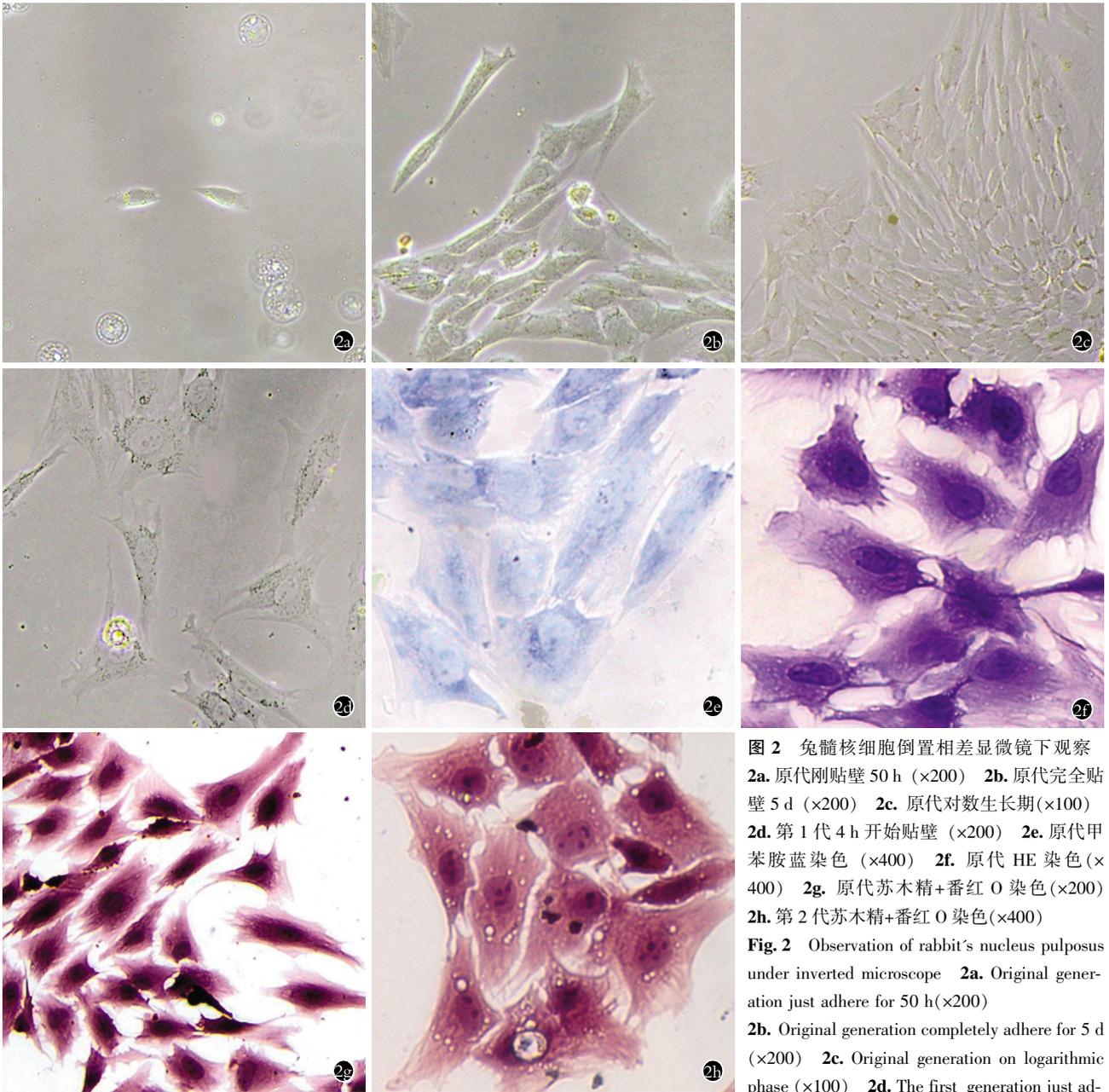


图 2 兔髓核细胞倒置相差显微镜下观察
 2a. 原代刚贴壁 50 h (×200) 2b. 原代完全贴壁 5 d (×200) 2c. 原代对数生长期 (×100)
 2d. 第 1 代 4 h 开始贴壁 (×200) 2e. 原代甲苯胺蓝染色 (×400) 2f. 原代 HE 染色 (×400)
 2g. 原代苏木精+番红 O 染色 (×200) 2h. 第 2 代苏木精+番红 O 染色 (×400)

Fig. 2 Observation of rabbit's nucleus pulposus under inverted microscope 2a. Original generation just adhere for 50 h (×200)

2b. Original generation completely adhere for 5 d (×200) 2c. Original generation on logarithmic phase (×100) 2d. The first generation just ad-

here for 4 h (×200) 2e. Original generation with toluidine blue staining (×400) 2f. Original generation with HE staining (×400) 2g. Original generation with hematoxylin and his red O staining (×200) 2h. The 2nd generation with hematoxylin and his red O staining (×400)

3d), 24 h 广泛贴壁, 细胞快速增殖, 4 d 后细胞贴满瓶底。细胞第 2 次传代后, 生长状态与第 1 代相类似, 从第 4 代开始, 纤维环细胞形态发生变化, 细胞多样性且细胞质减少。

2.2 细胞活力检测 髓核细胞刚分离完成后的活力为 90%~95%, 原代培养期间均为 97% 以上。第 1 代传代后活力稍有下降, 平均 90%, 第 1 代培养期间细胞活力维持在 88%~90%; 第 2 代传代后髓核细胞活力下降至 83%, 第 2 代培养期间细胞活力约 80%。

纤维环细胞刚分离完成后的活力为 95%~97%, 原代培养、第 1 代及第 2 代培养期间细胞活力均能

保持在 98% 以上, 期间细胞生长也保持较快速度, 未见明显衰退表现。

2.3 组织学观察 染色显示稳定生长期的髓核细胞与纤维环细胞形态上无明显差异, 原代细胞核周多见颗粒状物质, 为细胞器等。甲苯胺蓝染色显示核周浓染, 细胞质淡染, 细胞核内见 2~3 个核仁 (图 2e, 3e); HE 染色显示细胞核及核周呈鲜明蓝色, 胞质呈粉红色至桃红色不等 (图 2f, 3f); 苏木精染色后番红 O 复染, 见细胞核深染, 细胞质显粉红色。第 1 代髓核细胞苏木精联合番红 O 染色见细胞核周颗粒状物质少见, 细胞核内普遍多核, 第 2 代后期髓核细胞质内见空泡增多 (图 2h), 为髓核细胞衰

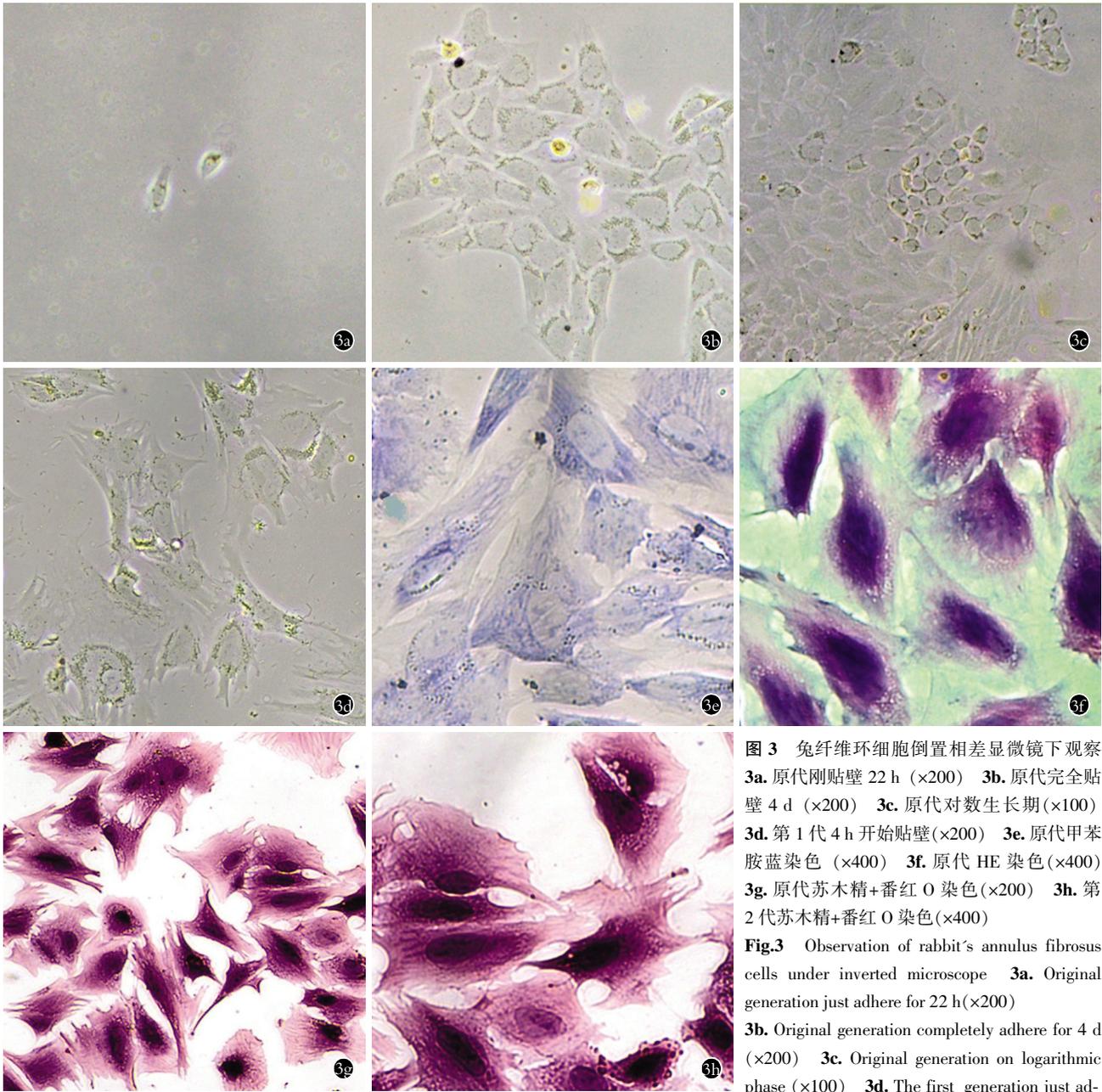


图3 兔纤维环细胞倒置相差显微镜下观察
 3a. 原代刚贴壁 22 h (×200) 3b. 原代完全贴壁 4 d (×200) 3c. 原代对数生长期 (×100)
 3d. 第 1 代 4 h 开始贴壁 (×200) 3e. 原代甲苯胺蓝染色 (×400) 3f. 原代 HE 染色 (×400)
 3g. 原代苏木精+番红 O 染色 (×200) 3h. 第 2 代苏木精+番红 O 染色 (×400)

Fig.3 Observation of rabbit's annulus fibrosus cells under inverted microscope 3a. Original generation just adhere for 22 h (×200)

3b. Original generation completely adhere for 4 d (×200) 3c. Original generation on logarithmic phase (×100) 3d. The first generation just adhere for 4 h (×200)

3e. Original generation with toluidine blue staining (×400) 3f. Original generation with HE staining (×400) 3g. Original generation with hematoxylin and his red O staining (×200) 3h. The 2nd generation with hematoxylin and his red O staining (×400)

老甚至退变的表现，而第 2 代纤维环细胞与原代相比仍无明显差别(图 3h)。

2.4 MTT 绘制生长曲线 MTT 值与细胞数量呈正比,所得 MTT 值的大小符合细胞培养过程中所观察的细胞增殖情况。髓核细胞与纤维环细胞在 7 d 内增值情况无明显差异 (第 7 天,髓核细胞吸光度 0.240 ± 0.019 ,纤维环细胞吸光度 0.271 ± 0.041 , $P > 0.05$),从第 9 天开始其增殖情况出现显著性差异 (第 9 天,髓核细胞吸光度 0.267 ± 0.022 ,纤维环细胞吸光度 0.306 ± 0.029 , $P < 0.05$)。如图 4 为两种细胞 MTT 均值曲线,由图可知髓核细胞生长较为缓慢,至第 15 天基本停止增殖,之后出现细胞凋亡。而纤维

环细胞增殖较快,从第 17 天开始增殖减缓。

3 讨论

3.1 椎间盘细胞培养的难点 椎间盘是人体最大的无血运组织,细胞分裂极不活跃,随着年龄的增长,椎间盘中的水分逐渐丢失,其主要成分胶原及蛋白聚糖的质与量减低,导致椎间盘退变性疾病的发生。根据以往文献报道^[2],细胞活性低、贴壁困难、生长周期长是椎间盘细胞培养的难点。本实验通过以下措施,使细胞培养难度降低,有效缩短了培养时间,从而保持细胞稳定性,为后续实验做准备。①降低消化酶浓度是关键,特别是胰蛋白酶,使用浓度为 0.125%,且不含 EDTA。蛋白质是生命活动的物质承

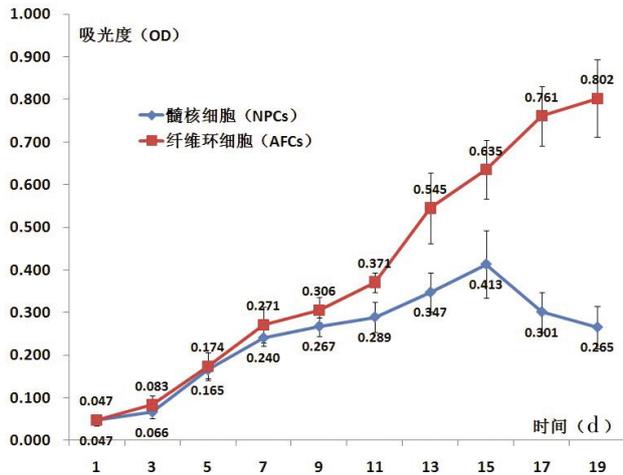


图 4 髓核细胞及纤维环细胞 MTT 均值曲线(x±s)

Fig.4 MTT's mean arithmetical value curve of NPCCs and AFCs(x±s)

担者, 过度消化能够影响细胞活性。从消化时间来讲, 本实验组曾将髓核细胞消化 40 min, 最后髓核细胞贴壁数极少甚至未有贴壁, 而纤维环细胞消化 40 min 以上未有影响贴壁, 通过控制消化时间可以达到细胞纯化的效果; ②酶消化法与组织块法联合培养: 本实验组曾使用单种方法培养, 结果发现, 经过酶消化后将剩余的组织块同时接种, 并均匀分布, 细胞得率较大, 贴壁数较多; ③控制细胞密度及培养液高度: 细胞与培养容器间的接触及一定的细胞密度是细胞贴壁的关键, 本实验以 5×10^5 个/ml 先制得细胞悬液然后与剩余组织块一同接种, 并且控制培养液的高度 (<3 mm), 得到较短的贴壁时间。按照本实验的经验, 5 只兔子可以得到 (不含组织块) 髓核细胞悬液 6 ml, 纤维环细胞悬液 18 ml。

3.2 髓核细胞及纤维环细胞的差异 原代及第 1 代髓核细胞和纤维环细胞形态上无明显差异, 但其贴壁时间、增殖速度差异明显。椎间盘髓核及纤维环细胞培养过程中, 第 2 代髓核细胞培养后期细胞质内空泡多见, 这是由于水分流失细胞质浓缩所致, 这是细胞衰老的表现。而纤维环细胞至第 2 代末期仍未见细胞质内空泡。在椎间盘细胞实验时, 应选择原代或第 1 代髓核细胞、3 代以内的纤维环细胞进行实验, 如此方能保持一定细胞活性的同时不影响实验结果。本研究结果显示纤维环细胞活性高于髓核细胞, 由此笔者推断椎间盘退变性疾病首先是髓核发生衰退, 从而局部生物力学改变, 导致纤维环破裂等组织结构的变化及功能的丢失。因此, 临床治疗更因重视对髓核的保护。

3.3 研究方向 椎间盘是保持脊柱稳定的重要结

构, 髓核的缺失或纤维环的损伤可以引起椎间盘高度的降低, 从而影响脊柱生物力学导致原有轴向稳定性的改变, 必须重新建立新的稳定关系, 维持正常生理功能。已有研究表明, 髓核细胞中胶原以 II 型为主而纤维环细胞以 I 型为主。髓核细胞内的 II 型胶原将水分含量维持在较高水平从而抵御来自脊柱的压缩负荷。纤维环细胞内的 I 型胶原则具有较好的张力, 使内部髓核维持一定的形态, 更好地承受来自脊柱不同方向的牵引力。椎间盘细胞尚缺乏特异的表型标志物, 目前的鉴定方法是同时检测多种抗原以及使用特异亲和力的染料对细胞进行染色, 以便和表型相近的细胞加以区别^[3]。本实验细胞甲苯胺蓝染色具有异染性, 与文献报道^[2,4]一致。椎间盘退化过程中, 髓核与纤维环原本非常清楚的界限开始模糊。髓核组织随着空化、干燥和成纤维细胞的增生, 逐渐被纤维软骨样组织替代, 而纤维环组织开始纤维软骨化, 内层板状结构中出现软骨细胞。本实验明确了髓核细胞及纤维环细胞的生长特性差异, 为研究椎间盘退变性疾病发生过程中髓核与纤维环相互间作用提供了基础。而如何不断改进其细胞培养体系, 构建能够多次传代、持续增殖的髓核及纤维环细胞株, 并保持形态及功能的稳定性及与原代细胞的一致性, 是未来椎间盘细胞体外培养新的研究方向。

参考文献

[1] Kim KW, Chung HN, Ha KY, et al. Senescence mechanisms of nucleus pulposus chondrocytes in human intervertebral discs[J]. Spine J, 2009, 9(8): 658-666.

[2] 刘杰, 王建, 周跃. 兔椎间盘髓核细胞体外生物学特性的实验研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2008, 22(9): 1121-1125. Liu J, Wang J, Zhou Y. Experimental study on biological feature of rabbit intervertebral disc nulleus pulposus in vitro[J]. Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi, 2008, 22(9): 1121-1125. Chinese.

[3] 潘勇, 周跃, 李长青, 等. 组织工程椎间盘纤维环种子细胞的培养和鉴定[J]. 四川医学, 2009, 4(30): 450-452. Pan Y, Zhou Y, Li CQ, et al. Culture and identification of annulus fibrosus tissue engineering seed cells in vitro[J]. Si Chuan Yi Xue, 2009, 4(30): 450-452. Chinese.

[4] 张坤木, 陈少清, 宋红梅, 等. 大鼠椎间盘纤维环细胞的培养及鉴定[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(11): 1973-1976. Zhang KM, Chen SQ, Song HM, et al. Cultivation and identification of annulus fibrosus cells of intervertebral disc in rats[J]. Zhongguo Zu Zhi Gong Cheng Yan Jiu Yu Lin Chuang Kang Fu, 2011, 15(11): 1973-1976. Chinese.

(收稿日期: 2013-02-18 本文编辑: 李宜)