

人颈椎间盘髓核细胞的体外培养和鉴定*

杨 勇 梁 伟 张世磊 陶慧人 罗卓荆[△]

(第四军医大学西京医院全军骨科研究所 陕西 西安 710032)

摘要 目的:建立人颈椎间盘髓核细胞体外培养体系,并对其细胞表型进行鉴定。方法:采用酶消化法分离人颈椎间盘髓核细胞,进行单层培养,倒置相差显微镜观察细胞生长和形态,流式细胞仪测定细胞周期和凋亡率,并行甲苯胺蓝、Ⅱ型胶原及CK8免疫组化染色对其细胞表型进行鉴定。结果:原代髓核细胞凋亡率 $6.1 \pm 1.4\%$,S期细胞比例 $7.3 \pm 0.5\%$ 。贴壁后形态为多角形或短楔形,传代后生长加速。细胞呈甲苯胺蓝染色性;Ⅱ型胶原免疫组化染色阳性;只有少量椭圆形大细胞CK8免疫组化染色阳性。结论:成功建立人颈椎间盘髓核细胞体外培养模型,并证实成年后髓核内仍有少量细胞保持脊索细胞表型。

关键词:椎间盘;髓核细胞;脊索细胞;细胞鉴定

中图分类号:R681.53 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)02-237-03

Cultivation and identification of human cervical nucleus pulposus cells*

YANG Yong, LIANG Wei, ZHANG Shi-lei, TAO Hui-ren, LUO Zhuo-jing[△]

(Institute of Orthopaedics, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To establish the system for culturing the human cervical nucleus pulposus cells and to identify the phenotype. **Methods** The human cervical nucleus pulposus cells were isolated by collagenase digestion method and cultured in monolayer by culture solutions of DMEM+20%FBS. Morphologic changes and growth of the cells were detected by microscope. The cell cycle and apoptosis rate were detected by Flow cytometric. The morphological structure and the phenotype were identified with the toluidine blue staining and immunocytochemistry means. **Result** The apoptosis rate of primary cells was $6.1 \pm 1.4\%$. The Cells at S phase were $7.3 \pm 0.5\%$. The cells were polygonal or short wedged morphology. The second passage cells grew more fast than that of the primary cells. The cells displayed intense toluidine blue metachromasia. The cells expressed collagen type II, but only a few elliptic giant cells expressed CK8. **Conclusion** The human cervical nucleus pulposus cells were isolated and cultured in monolayer successfully. A few cells of the nucleus pulposus still maintain notochord cells phenotype in adult specimens.

Key words: Intervertebra disc; Nucleus pulposus cells; Notochordal cells; Cell identification

Chinese Library Classification(CLC): R681.53 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)02-237-03

前沿

颈椎病是中老年人的常见病、多发病之一。随着年龄增长发病率越来越高。给患者及其家庭和社会带来沉重的精神和经济负担,是影响健康的重要障碍之一。颈椎间盘退变是导致颈椎病始动因素。椎间盘组织学构成包括椎间盘细胞和细胞外基质:椎间盘细胞可以合成和分泌细胞外基质成分并调控细胞外基质成分有序合理的组织,从而使椎间盘行使正常功能的基本要求^[1],所以椎间盘退变必有其细胞学基础。近几年椎间盘组织工程成为了国内外研究热点^[2],有望彻底改进目前的治疗模式,这就需要大量的获取合适的种子细胞。最近的研究发现成年后髓核组织内可能仍有脊索细胞的存在^[3]。本研究旨在建立颈椎

间盘髓核细胞体外培养体系,并对其细胞表型进行鉴定,为从细胞学水平研究颈椎间盘退变、颈椎间盘组织工程种子细胞的选择及明确成人髓核内脊索细胞的存在与否提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料试剂

DMEM/F12 培养液 (Gibco 公司)、20%胎牛血清(FBS) (Gibco 公司)、Ⅱ型胶原酶、胰蛋白酶、D-Hanks 平衡液、台盼蓝染色液 (Gonso 公司)。培养箱、超净台、光学显微镜 (日本, OLYMPUS 公司)、倒置相差显微镜(NIKON 公司)、眼科手术器械、低温离心机、200 目网筛过滤器、培养瓶、计数板、流式细胞仪(Becton Dickinson 公司)、小鼠抗人Ⅱ型胶原单克隆抗体

* 基金项目:国家自然科学基金资助(81000813)

作者简介:杨勇(1984-),男,硕士研究生,主要研究方向:椎间盘退变机理研究 电话:15877488107

E-mail:15877488107@163.com

共同第一作者:梁伟,主治医师,讲师 电话:13991880801, E-mail:liangwei@fmmu.edu.cn

△通讯作者:罗卓荆,博士生导师,教授 电话:029-84775285, E-mail:luozj@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2010-10-01 接受日期:2010-10-23)

(武汉博士德生物工程公司)、兔抗人 CK8 单克隆抗体(武汉博士德生物工程公司)免疫组化染色 SABC 试剂盒(武汉博士德生物工程公司)。

1.2 髓核细胞的收集、分离和培养

收集西京医院骨科治疗的颈椎新鲜椎体骨折(不超过 3 日)病人术中椎间盘 5 例, C4、5 椎间盘 2 个, C5、6 椎间盘 3 个; 病人年龄 16~31 岁, 平均 22.3 岁。所有患者均由同一术者完成手术, 所取标本置入预先准备好的内含少量 D-Hank's 液的无菌培养瓶并置入冰盒内迅速带回实验室。半小时内超净台内用 D-Hank's 液冲洗组织 3 次去除血污, 修剪掉纤维环、软骨板和交界性组织将剩余胶冻样髓核组织剪碎至 1mm³ 大小。与 0.25% (m/v) 的胰蛋白酶按 1:2 体积装入试管, 37℃ 消化 30min, 每 5 min, 轻轻摇动 1 次。加入含 10%FBS 的 DMEM/F12 培养液终止消化并吹打。1000 r/min 离心 5min, 弃去上清液。加入 1.5 倍体积 0.2% 的 II 型胶原酶 37℃ 静置消化 4 h, 组织块由块状变为絮状直至消失; 200 目不锈钢网过滤, 去除未能完全消化的组织; 1000 r/min 离心 5 min, 去除上清液; 用 DF12 培养液吹匀细胞, 再次离心, 重复 3 次。吸取适量悬液, 用计数板进行细胞计数, 台盼蓝试验测定细胞活性, 按 1×10^5 /ml 接种于底面积为 25 cm² 培养瓶中, 加入 5ml 含青霉素 100 U/ml、链霉素 100 U/ml 和 20% 胎牛血清 (FBS) 的 DF12 培养液。37℃、CO₂ 体积分数为 5%、饱和湿度的培养箱中培养。3 天后半量换液, 以后每 3 天全量换液一次。细胞生长达 80% 融合后, 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。定时用倒置相差显微镜观察细胞贴壁及生长情况并拍照。

1.3 流式细胞仪检测细胞凋亡率

初消化的原代髓核细胞 PBS 洗涤, 采用 Annexin V2 FITC/PI 方式检测细胞凋亡率用流式细胞仪测定细胞凋亡率。采用碘化丙啶 (PI) 标记分析细胞内 DNA 含量的方式测定细胞周期。

1.4 细胞表型鉴定

1.4.1 甲苯胺蓝染色 细胞爬片成功后, 去除培养液, 磷酸盐缓冲液冲洗 3 遍, 40 g/L 多聚甲醛室温固定 20 min; 磷酸盐缓冲液冲洗, 滴加甲苯胺蓝染液, 室温 30 min; 自来水冲洗数秒; 冰醋酸液分化数秒; 蒸馏水洗 2 次, 冷风吹干; 二甲苯透明, 中性树胶封固。

1.4.2 髓核细胞 II 型胶原和 CK8 免疫细胞化学染色 将细胞爬片用 PBS 振洗; 多聚甲醛固定; PBS 振洗 3 次; 体积分数 0.03 的双氧水室温 30 min 以封闭内源性过氧化物酶; PBS 振洗 3 次; 滴加 5% 正常山羊血清封闭非特异性背景染色、室温下 30 min, 不洗, 甩去多余血清, 加 1:200 小鼠抗胶原 II 单克隆抗体和 1:400 兔抗 CK8 单克隆抗体, 4℃ 过夜。37℃ 复温 1 h, PBS 振洗 3 次。分别加生物素羊抗小鼠或羊抗兔 IgG (1:100) 37℃, 30 min, PBS 振洗 3 次。加 SABC 复合物 (1:100) 37℃, 30 min, PBS 冲洗 5 min, 3 次, 自来水冲洗切片常规脱水、透明、封固、镜下观察。

2 结果

2.1 形态学观察

髓核组织成胶冻样外观。初消化的髓核细胞为球形, 具有折光性, 台盼兰染色活性比率为 95% 左右。细胞贴壁缓慢, 达

80% 贴壁需一周左右, 逐渐伸展为短梭形或多角形, 生长缓慢, 一月左右达 80% 融合。传代后细胞贴壁时间明显缩短, 6 小时即达 90% 贴壁率, 且其增殖速度加快, 7 天就可达 80% 融合。4 代后细胞突起逐渐延长变为长梭形, 遮光性降低, 增殖变慢, 表现出细胞老化的趋势(图 1)。

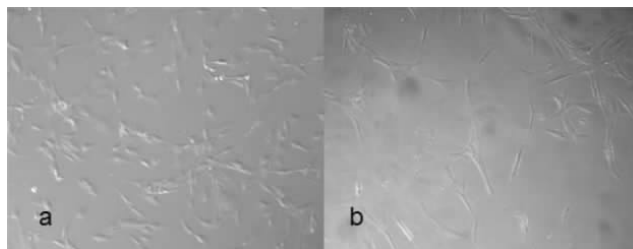


图 1 髓核细胞倒置相差显微镜观察 a 原代髓核细胞($\times 100$) b 传 5 代髓核细胞($\times 100$)

Fig 1 Morphologic changes of the nucleus pulposus cells were observed by phase contrast microscope: a. primary cells ($\times 100$); b. cells of passage 5 ($\times 100$)

2.3 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡率

原代髓核细胞凋亡率 $6.1 \pm 1.4\%$, S 期细胞比例 $7.3 \pm 0.6\%$ (图 2)。

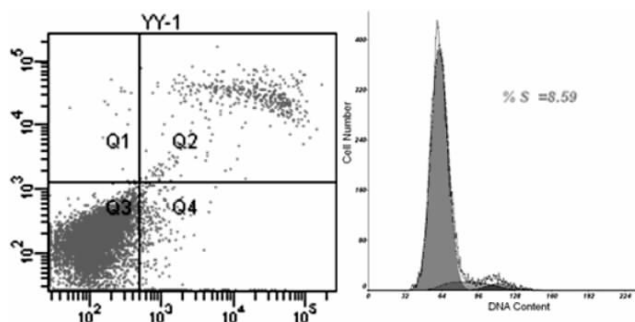


图 2 1 号标本 - 原代细胞的凋亡率 7.3%, 细胞周期中 S 期细胞比例 8.59%。

Fig 2 Specimens 1 -The apoptosis rate of primary cells was 7.3%.
The rate of Cells at S phase was 8.59%.

2.4 细胞表型鉴定

原代髓核细胞甲苯胺蓝染色阳性, 二型胶原免疫组化染色阳性。CK8 免疫组化染色有少量阳性细胞, 这些细胞形态呈圆形且比其它细胞体积大(图 3)。

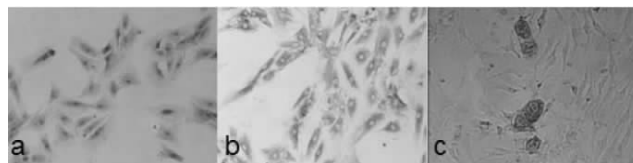


图 3 a 原代髓核细胞呈甲苯胺蓝异染性 b 原代髓核细胞二型胶原免疫组化染色阳性 c 少量椭圆形的大细胞 CK8 免疫组化染色阳性。

Fig 3 a. The primary cells displayed intense toluidine blue metachromasia; b. The cells positive expressed collagen type; c. only a few elliptical giant cells positive expressed CK8

3 讨论

退变颈椎间盘的髓核脱水变薄, 椎间隙变狭, 使纤维环及

周围韧带变松弛,颈椎稳定性减弱,并引发颈椎椎体后缘、钩椎关节和后关节骨质增生,纤维环椎出现裂隙和断裂不能承受日常的生理应力并引发椎间盘的突出,导致颈椎病的一系列相应症状。颈4、5,颈5、6椎间活动度最大,应力也最集中,所以最易受累。髓核作为体内最大的无血管组织被上下的软骨板和周围的纤维环包围,其内细胞密度低,自身修复能力差,是椎间盘内最早发生退变的组织。虽然已知的相关因素包括年龄、遗传、机械负荷、炎症因子等。但其内在原因是髓核细胞的退变^[4]。所以建立颈椎间盘髓核细胞体外培养体系对于从细胞学水平研究椎间盘退变的防治和其组织工程意义重大。目前统一的人椎间盘髓核细胞系及其应用研究尚处于早期阶段。仅有一例人髓核细胞系的报道,取自腰椎爆裂骨折患者^[5]。另外,对于髓核细胞的分离条件如消化介质及其浓度、消化时间^[6-8]等在不同研究中并不一致。培养条件如培养液的组成和浓度、培养方式也并不一致,且多取材腰椎。人颈椎间盘髓核细胞培养的报道少见。虽颈椎间盘和腰椎间盘具有同样的发育来源和相似的解剖结构及细胞外基质,但是两者所处的生物力学环境不一样。所以在研究颈椎间盘退变和颈椎间盘组织工程时不能简单的用腰椎髓核细胞代替。有必要建立颈椎髓核细胞的培养体系。

本研究参考 Sakai^[5]的培养条件成功进行了人颈椎间盘髓核细胞的分离和培养。因退变的髓核组织不能做为髓核组织工程的种子细胞,所以本研究取材于颈椎骨折后3日内的青壮年。与腰椎髓核组织相比颈椎髓核组织量少且大部分与软骨终板紧密贴附,所以不易分离。分离后的原代髓核细胞贴壁缓慢,贴壁后形态为多角形和短楔形,多次传代后出现去分化现象。流式细胞仪凋亡检测结果表明原代髓核细胞存在少量比例的凋亡细胞。细胞周期检测结果显示髓核细胞的增殖缓慢。免疫组化证实其分泌蛋白多糖和二型胶原。这些特征都与体外培养的腰椎髓核细胞相似^[9]。

在胚胎脊椎原基形成过程中,脊索被挤入两脊椎原基之间,从而形成脊索源性髓核。内含脊索细胞。随着生长发育,具有典型脊索细胞形态的细胞消失。被类软骨细胞所代替。以往认为10岁后髓核内脊索细胞全部消失。但最近的研究表明成年后髓核内仍会有脊索细胞存在^[10,11]。在体外对脊索细胞的动态观察研究也表明脊索细胞具有分化能力,但并不是所有的都分化为软骨样细胞^[12]。为了证实成年后髓核内是否还有脊索细胞存在,本课题组对原代颈椎髓核细胞进行CK8免疫组化染色。CK8- 既角蛋白8是上皮来源细胞的表面标志物,脊索是上皮来源的组织,因此CK8可作为脊索细胞的标志物^[13]。CK8免疫组化染色证实了少量细胞呈阳性表达。值得注意的是阳性表达

的细胞外形和体积与周围类软骨细胞不一致。进一步说明髓核内细胞群不是均质的。椎间盘组织工程的开展要考虑到髓核组织的这种特殊性。

参考文献(References)

- [1] Zhao CQ, Wang LM, Jiang LS, et al. The cell biology of intervertebral disc aging and degeneration[J]. Ageing Res Rev, 2007, 6(3):247-261
- [2] Calderon L, Collin E, Velasco BD, et al. Type II collagen-hyaluronan hydrogel a step towards a scaffold for intervertebral disc tissue engineering[J]. European Cells and Materials, 2010, 20: 134-148
- [3] Gilson A, Dreger M, Urban JP. Differential expression level of cytokeratin 8 in cells of the bovine nucleus pulposus complicates the search for specific intervertebral disc cell markers [J]. Arthritis Res Ther, 2010, 12(1): R24
- [4] Tow BP, Hsu WK, Wang JC. Disc regeneration: a glimpse of the future[J]. Clin Neurosurg, 2007, 54:122-128
- [5] Sakai D, Mochida J, Yamamoto Y, et al. Immortalization of human nucleus pulposus cells by a recombinant SV40 adenovirus vector: establishment of a novel cell line for the study of human nucleus pulposus cells[J]. Spine, 2004, 29 :1515-1523
- [6] Horner HA, Urban JPG, 2000 Volvo Award in basic science: effect of nutrient supply on the viability of cells from the nucleus pulposus of the intervertebral disc[J]. Spine, 2001, 26: 2543-2549
- [7] Gruber HE, Hanley JEN. Human disc cells in monolayer vs 3D culture: cell shape, division and matrix formation [J]. BMC Musculoskeletal Disord, 2000, 1 (1) : 1
- [8] Chiba K, Andersson GB, Masuda K, et al. A new culture system to study the metabolism of the intervertebral disc in vitro [J]. Spine, 1998, 17: 18212-1828
- [9] Horner H, Roberts S, Bielby R, et al. Cells from different regions of the intervertebral disc effect of culture system on matrix expression and cell phenotype[J]. Spine, 2002, 27(10) :1018-1028
- [10] Can JC, Ducheyne P, Vresilovic EJ. Intervertebral disc tissue engineering II : cultures of nucleus pulposus cells [J]. Clin Orthop, 2003, (411) : 315 - 324
- [11] Hunter CJ, Matyas JR, Duncan NA, The notochordal cell in the nucleus pulposus: a review in the context of tissue engineering[J]. Tissue Eng, 2003, 9:667-677
- [12] Kim JH, Deasy BM, Seo HY, et al.. Differentiation of intervertebral notochordal cells through live automated cell imaging system in vitro [J]. Spine, 2009,34(23):2486-2493
- [13] Gotz W, Kasper M, Fischer G, et al. Intermediate filament typing of the human embryonic and fetal notochord [J]. Cell Tissue Res, 1995, 280:455-462