

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.06.003

改良胶原酶消化法分离培养人原代髓核细胞*

李玲慧^{1,2} 龚浩^{3Δ} 陈明¹ 展嘉文¹ 李凯明⁴ 朱立国^{2,4} 王尚全¹

(1 中国中医科学院望京医院骨伤综合科 北京 100102; 2 中医正骨技术北京市重点实验室 北京 100102;

3 北京市昌平区中西医结合医院 北京 102208; 4 中国中医科学院望京医院脊柱二科 北京 100102)

摘要 目的:优化人原代髓核细胞的体外分离培养方法,为椎间盘退变的防治研究提供种子细胞。**方法:**无菌环境中摘取人椎间盘髓核组织,采用多次胶原酶消化法分离提取原代人髓核细胞,置于 5% CO₂ 培养箱中 37℃ 恒温培养,倒置相差显微镜中观察细胞形态,采用 MTT 法绘制细胞生长曲线,甲苯胺蓝染色法检测髓核细胞内蛋白多糖的表达情况,细胞免疫荧光染色法检测 II 型胶原蛋白表达情况。**结果:**本研究获得的细胞形态不规则,呈梭形或多角形,原代细胞 48 h 内贴壁,培养第 8 天左右细胞融合度可达 90%,第三代细胞 12 h 内即可贴壁,生长至融合 90% 约需 5d。甲苯胺蓝染色及细胞免疫荧光染色均阳性,提示所得细胞具有分泌蛋白多糖及 II 型胶原蛋白的功能。**结论:**改良胶原酶消化法可获得大量纯净的人髓核细胞,提高培养效率,原代及传代细胞具备类软骨细胞表型,且活性及功能均较为稳定,可作为椎间盘组织工程研究的种子细胞。

关键词:髓核细胞;椎间盘退变;II 型胶原酶

中图分类号:R-33;R681.53 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)06-1011-04

In vitro Isolation and Culture of Human Degenerative Nucleus Pulposus Cells by Improved Enzymatic Digestions*

LI Ling-hui^{1,2}, GONG Hao^{3Δ}, CHEN Ming¹, ZHAN Jia-wen¹, LI Kai-ming⁴, ZHU Li-guo^{2,4}, WANG Shang-quan¹

(1 Department of Orthopaedics and Traumatology, Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100102, China;

2 Beijing Key Laboratory of Bone-setting Technology of Traditional Chinese Medicine, Beijing, 100102, China;

3 Beijing Changping Hospital of Integrated Chinese And Western Medicine, Beijing, 102208, China;

4 Department of Second Spinal Orthopedics, Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100102, China)

ABSTRACT Objective: To optimization the method of isolating and culturing human degenerative nucleus pulposus cells in vitro, and to provide seed cells for the prevention and cure investigation of intervertebral disc degeneration. **Methods:** Nucleus pulposus tissue was collected in a sterile environment. Multiple enzymatic digestions were adopted to extract primary human nucleus pulposus cells. The cells were cultured in thermostat incubator with 5% CO₂ under the condition of 37℃. Cell morphous was observed under inverted phase contrast microscope. The cell growth curve was plotted by MTT assay. The expression of proteoglycan and type II collagen were detected by toluidine blue staining and cellular immunofluorescence staining respectively. **Results:** The cells had spindle or polygonal shapes. The primary cells had an average adherence time of 48 hours and took nearly 8 days to reach 90% confluence. Cells at passage 3 had an average adherence time of 12 hours and took nearly 5 days to reach 90% confluence. The results of toluidine blue staining and cellular immunofluorescence staining showed that the cultured cells secreted proteoglycan and type II collagen. **Conclusion:** Multiple enzymatic digestions of nucleus pulposus tissue could release a large amount of pure human nucleus pulposus cells. The culture efficiency was improved. The primary and passage cells could maintain stable chondrocyte-like phenotype and could be used as seed cells for intervertebral disc tissue engineering.

Key words: Nucleus pulposus cells; Intervertebral disc degeneration; Type II collagenase

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R681.53 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)06-1011-04

前言

椎间盘退变(intervertebral disc degeneration, IDD)可以导

致各类脊柱疾患的发生,如腰椎间盘突出症、腰椎失稳和颈椎病等^[1,2]。随着组织工程研究的深入,采用髓核细胞移植对退变椎间盘组织进行修复被认为是具有良好应用前景的治疗方式^[3,4]。

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81904230;81674005;81804120;81302992);中央本级重大增减支项目(2060302);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助(ZZ10-015);北京市自然科学基金项目(7164313);中国博士后科学基金项目(2017M611125;2016M591364)

作者简介:李玲慧(1986-),女,博士后,主治医师,主要从事慢性退行性骨与关节退变相关疾病的防治工作

Δ 通讯作者:龚浩,男,主治医师,电话:15210466442, E-mail:270641352@qq.com

(收稿日期:2019-10-23 接受日期:2019-11-18)

能否获得大量较为理想的种子细胞,是组织工程治疗成功与否的关键因素^[9]。传统的酶消化法对髓核细胞的获得率有限,且常因消化时间长而使细胞受损严重,降低了其活性和功能,在一定程度上限制了髓核细胞移植疗法的研究和应用^[6]。本研究采用改良的多次胶原酶消化法分离培养原代人髓核细胞,并在体外进行传代扩增,连续观察其形态、活性及功能,旨在优化原代人髓核细胞的分离培养效率,为椎间盘移植的组织工程学研究提供优质的种子细胞。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

胎牛血清 (Life Technologies 公司);PBS 缓冲液(HyClone 公司);DMEM/F12 (HyClone 公司);0.25%胰酶-EDTA (HyClone 公司);双抗(青霉素、链霉素,Life Technologies 公司);红细胞裂解液(Genview 公司);II型胶原酶(Sigma 公司);甲苯胺蓝染料(Sigma 公司);细胞培养皿、离心管等耗材(Corning 公司);微量移液器(Eppendorf 公司);生物安全柜(Labconco 公司);CO₂ 细胞培养箱(Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.2 标本来源

选取拟施髓核摘除术的腰椎间盘突出症患者作为纳入对象,所有纳入患者均已排除肿瘤、结核及其他感染性疾病病史。在患者及家属知情同意的情况下,于腰椎髓核摘除术中摘取髓核组织,浸泡于含双抗的 DMEM/F12 培养基中,无菌条件下转移至实验室,待后续处理。

1.3 人髓核细胞的分离与培养

将上述髓核组织标本置于 PBS 中充分漂洗,剔除肉眼可见的血细胞和混杂的纤维环组织;将组织块剪碎,置于 0.25% 胰酶-EDTA 中消化 20 min;弃上清,将组织块转移至 0.1% II 型胶原酶消化液中,37℃ 恒温震荡消化 30 min;将含细胞的消化液转移至 15 mL 离心管,离心后以 DMEM/F12 完全培养液(含体积分数 10%胎牛血清及适量双抗)重悬底部细胞团块,以待进一步体外培养;将剩余组织块重复进行以上消化步骤两次,所得细胞悬液离心后弃上清;加入 5 倍体积的 ACK Lysis Buffer,轻轻吹打混匀,室温裂解 3 min,以 1000 r/min 的转速离心 8 min,弃红色上清液;细胞以 PBS 洗涤 2 次后混匀并接种于细胞培养皿中,置于含 5% CO₂ 的培养箱 37℃ 培养;48 h 左右首次换液,清除未贴壁的杂质细胞,以后每 2~3 d 换液一次;光镜下观察细胞生长情况,当细胞达 90%汇合度时,以 0.25%胰酶-EDTA 消化细胞,将细胞以 1:3 传代,隔日更换培养液一次。

1.4 细胞增殖情况检测

将细胞制成单细胞悬液,1000 r/min 离心 8 min,以完全培养液(含 10% FBS)重悬细胞团块;以 5000 个/孔的密度将细胞均匀接种于 96 孔培养板,置于 5% CO₂ 培养箱 37℃ 恒温孵育;分别于接种后 24h 开始,每天于相同时间点取出细胞培养板进行检测,连续观察 5 天;移除待测孔中的细胞培养液,加入浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液,5%CO₂ 培养箱中 37℃ 孵育 4 小时;弃上清,加入 DMSO 150 μL,避光震荡溶解 15 min;多功能酶标仪检测并读取波长为 490 nm 处的 OD 值。

1.5 甲苯胺蓝染色

将第三代细胞以适当密度接种于细胞培养皿,24 h 贴壁后

换液,以完全培养液(含体积分数 10%FBS 及适量双抗)孵育,置于含 5% CO₂ 的培养箱中,37℃ 恒温培养,隔天换液一次;染色前移除培养液,PBS 缓冲液清洗 2 次;以 4%中性多聚甲醛固定液孵育 20 min;PBS 缓冲液清洗后加入适量 1%甲苯胺蓝染色工作液,常温避光孵育 1 h;95%酒精冲洗以去除多余染液,光镜下观察并摄片。

1.6 细胞免疫荧光技术检测 II 型胶原表达

取出待测的第三代人髓核细胞,移除培养液,PBS 缓冲液清洗 2 次,以 4%中性多聚甲醛固定液室温下孵育 5 min;PBS 缓冲液清洗 2 次,以 PBST(即 PBS 中含 0.1% TritonX100)通透液室温下孵育细胞 20 min;5%BSA(PBST 配制)室温下封闭 1 h;移除封闭液,加入 II 型胶原抗体工作液(1:200),4℃ 低温孵育过夜;移除一抗,PBS 清洗 5 min× 3 次,加入荧光二抗工作液孵育 1 h;弃掉二抗,PBS 清洗 5 min× 3 次,加入 DAPI 染色工作液孵育 20 min;倒置荧光显微镜下观察 II 型胶原表达情况,并拍照记录。

2 结果

2.1 细胞形态学观察

原代消化分离获得的人髓核细胞折光性较好,呈亮球状漂浮于细胞培养皿中。48h 后首次换液可去除未贴壁细胞及杂质,光镜下观察可见大部分细胞已贴壁,呈圆形、短梭形或多角形,大小不一。约 4 天后细胞形态逐渐变为短梭形或多角形为主,约 6~7 天左右进入对数生长期,细胞增殖速度加快,培养第 8 天左右细胞融合度可达 90%。以 1:3 传代后的细胞生长速度较原代细胞更快,呈火焰状或集落状分布,约在接种后 5~6 天生长至单层融合。本研究体外分离的髓核细胞从第三代起,细胞突起逐渐增多、延长,细胞体积变大,形态演变为梭形且逐渐不规则,折光性减弱(见图 1)。

2.2 细胞增殖情况检测

MTT 法检测细胞增殖率,结果显示,原代人髓核细胞接种后前 48 小时内,生长速度缓慢,处于生长适应期;第二天以后增殖速度逐渐加快,约第三天开始进入对数生长期,接种后第四天为减速期,大约第五天以后细胞停止生长,进入平台期。第三代细胞在对数生长期的生长曲线较第一代细胞略平缓,但不同生长阶段的增殖趋势基本相同(见图 2)。

2.3 细胞甲苯胺蓝染色

细胞染色结果显示,本研究获得的细胞形态以多角形为主,胞质内的蛋白聚糖被染为蓝色,且越靠近细胞核染色越深,提示原代分离培养的人髓核细胞可以合成和分泌蛋白聚糖,表达类软骨细胞功能(见图 3-A)。

2.4 细胞免疫荧光染色

荧光染色结果显示,细胞形态与倒置相差显微镜观察结果相似,II 型胶原蛋白被荧光染料染成绿色,主要分布于细胞质内,越靠近细胞核,荧光信号越强。本研究中的原代细胞与第一代、第三代细胞之间的染色强度均无明显差异(见图 3-B)。

3 讨论

髓核细胞的老化或凋亡、细胞外基质成分的降解、纤维环和软骨终板的变性被认为是造成 IDD 的主要原因^[7,8]。目前针

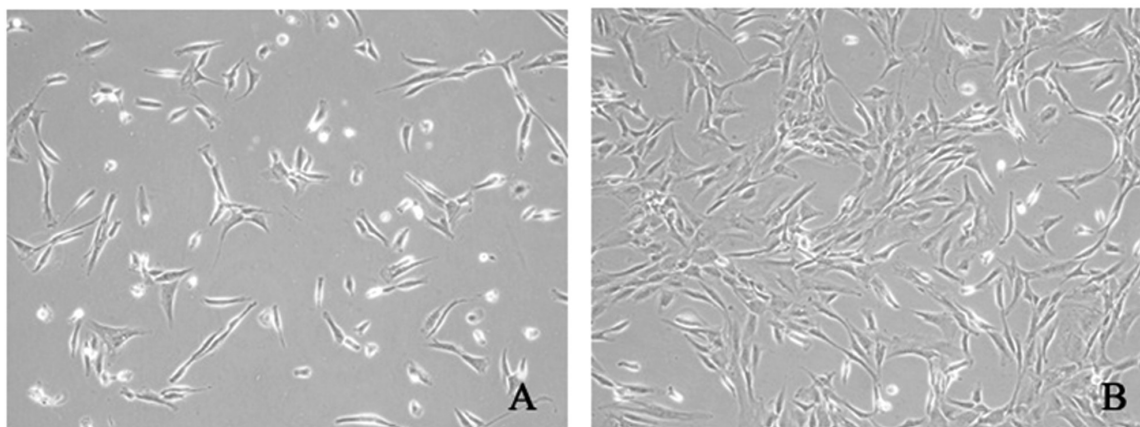


图1 第三代人髓核细胞形态学观察

(光镜× 100; A 为第三代 NPCs 培养 1 d, B 为第三代 NPCs 培养 3 d)

Fig.1 Morphological observation of the third generation of human nucleus pulposus cells

(light mirror × 100; A is the third generation NPCs culture 1 d, B is the third generation NPCs culture 3 d)

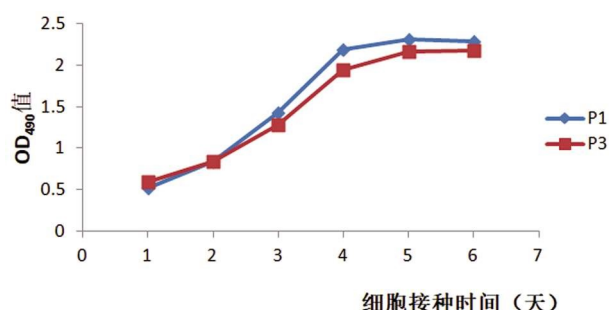


图2 人髓核细胞增殖情况(P1:第一代细胞生长曲线;P3:第三代细胞生长曲线)

Fig.2 Proliferation of human nucleus pulposus cells (P1: growth curve of first-generation cells; P3: growth curve of third-generation cells)

对IDD的治疗手段分为非手术治疗和手术治疗,非手术治疗包括功能锻炼、物理治疗和药物治疗等,主要目的在于增强腰

背肌肌力、改善疼痛等临床症状^[9,10]。通过手术方式摘除髓核虽然可缓解部分临床症状,但常引发邻近节段椎间盘的退变。随着研究的深入,国内外同行将研究的重点聚焦于生物学治疗,认为IDD的治疗目标应当是逆转该过程中发生的生物学变化^[11,12]。在新兴的生物学治疗手段中,无论是细胞疗法还是组织工程疗法,其成功与否的关键前提,都是具备大量优质的种子细胞^[13,14]。椎间盘是人体内最大的无血管组织,其外层的营养供应主要来源于纤维环外层软组织中的毛细血管,而纤维环内层及髓核细胞的营养主要依赖于上、下终板的弥散功能^[15,16]。因此,椎间盘组织的含氧量较低、乳酸含量较高,细胞的活性和增殖能力均较差;在退变的椎间盘内,终板钙化、通透性下降,导致细胞的活性和增殖能力进一步降低,这些都为椎间盘细胞的体外培养及扩增带来许多困难,使其相较于人体其他部位组织器官的离体培养更难^[17,18]。

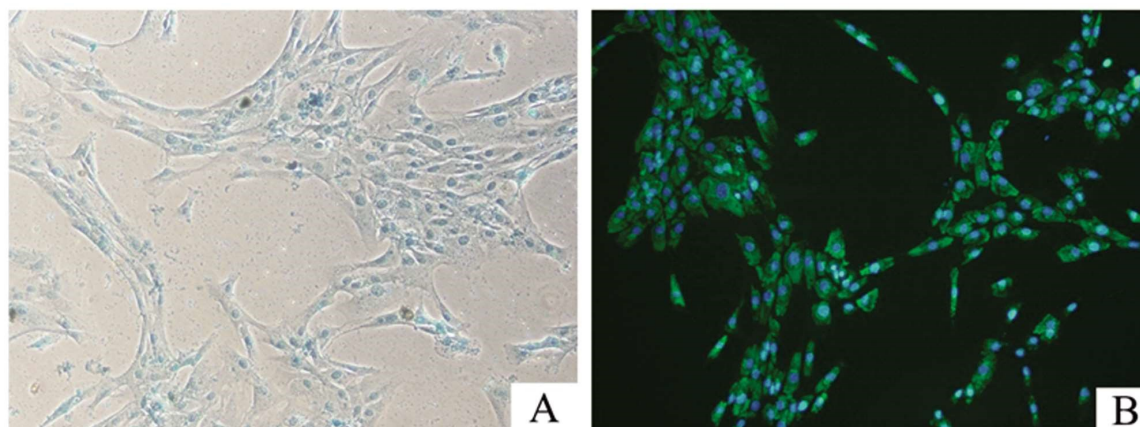


图3 人髓核细胞染色观察 A:甲苯胺蓝染色,细胞以多角形为主,胞质内的蛋白聚糖被染为蓝色,且越靠近细胞核染色越深(光镜× 100); B:细胞免疫荧光染色,Ⅱ型胶原蛋白主要分布于细胞质内,越靠近细胞核,荧光信号越强(光镜× 100)

Fig.3 Staining observation of human nucleus pulposus cells A: toluidine blue staining, the cells are mainly polygonal, the proteoglycan in the cytoplasm is stained blue, and the closer to the nucleus, the darker the staining is (light microscope × 100); B: cell immunofluorescence staining, II collagen are mainly distributed in the cytoplasm, closer to the nucleus, the stronger the fluorescent signal (BNH × 100)

传统的体外培养多采用胰酶-胶原酶联合或序贯消化法、单纯胶原酶消化法以及组织块法等^[19-21]。组织块法操作简单,污染率低,但其所需培养周期较长,细胞活性及功能受到影响,且

部分细胞始终滞留于组织块中无法贴壁,对髓核组织的利用率较低。髓核组织包括了髓核细胞和细胞外基质两大部分,后者主要由胶原成分和聚集蛋白聚糖组成,传统的序贯酶消化法需

要用胰蛋白酶预处理髓核组织,然后加用胶原酶分离髓核细胞,操作步骤较为繁琐,污染率随之提高,同时也增强了胰蛋白酶对细胞活力的损害作用,在实际应用中,胰酶作用时间多为30 min以上,胶原酶的作用时间多为1~4h或者4℃过夜;有学者^[22,23]对比了不同酶处理方案对人髓核细胞原代分离的影响,发现胶原酶孵育过夜的细胞活性显著降低,而胰酶联合胶原酶消化4h所获得的细胞数量较多,对组织标本的利用率也最大。也有学者报道,提高胶原酶浓度可增强消化效率,但该方法成本较高,且难以提供高重复性和高活力的种子细胞。可见,把握好消化酶的用法、用量以及作用时间是原代细胞培养的关键所在。基于II型胶原是髓核组织细胞外基质的主要成分,有学者研究指出单纯胶原酶消化法可以避免胰酶对细胞的损伤,但该方法获得率略有降低且延长了消化时间,至少需3~6小时才能完成细胞的提取,游离出的细胞受到消化酶工作液的持续损伤、长时间缺乏营养供给,均可使其生物学活性降低。研究报道^[24],采用单纯胶原酶消化法获得的原代细胞,其平均贴壁时间为7 d,细胞生长至汇合需要30 d以上,而本研究在原代提取48 h首次换液时绝大部分细胞已经贴壁良好;约8 d左右细胞便可生长至90%融合,提示本研究采用的多次胶原酶消化法对细胞的获得率较高,且细胞活性较好。

鉴于以上特点,本研究将胰酶的作用时间缩短为20 min,使标本经过初次消化后,剩余组织中的髓核细胞较为纯净;再经过3次II型胶原酶消化,每次作用时间仅为30 min,既缩短了游离细胞在消化酶工作液中的时间,重复消化环节又可保证组织标本被充分利用,力求在最大程度上提高细胞获得率及生物学活性。研究结果证实,多次胶原酶消化法分离培养人髓核细胞效率较高,所得细胞48h内可贴壁,折光率及增殖率良好,原代细胞约8~9d可生长至汇合,传代细胞约5~6d可生长至汇合。第一代和第三代细胞在不同生长阶段的增殖趋势基本相同,提示细胞可稳定传代、维持良好的增殖活性及类软骨表型,可作为椎间盘组织工程研究的种子细胞。

参考文献(References)

- [1] Ghorbani M, Ai J, Nourani MR, et al. Injectable natural polymer compound for tissue engineering of intervertebral disc: In vitro study[J]. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017, 80: 502-508
- [2] Schol J, Sakai D. Cell therapy for intervertebral disc herniation and degenerative disc disease: clinical trials [J]. *Int Orthop*, 2019, 43(3): 1011-1025
- [3] Kepler CK, Anderson DG, Tannoury C, et al. Intervertebral disk degeneration and emerging biologic treatments [J]. *J Am Acad Orthop Surg*, 2011, 19(9): 543-553
- [4] Han C, Jiang C, Yu C, et al. Differentiation of transforming growth factor beta1 -induced mesenchymal stem cells into nucleus pulposus-like cells under simulated microgravity conditions [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2015, 61(2): 50-55
- [5] Yang J, Yang X, Wang L, et al. Biomimetic nanofibers can construct effective tissue-engineered intervertebral discs for therapeutic implantation[J]. *Nanoscale*, 2017, 9(35): 13095-13103
- [6] Vadala G, Studer RK, Sowa G, et al. Coculture of bone marrow mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells modulate gene expression profile without cell fusion[J]. *Spine*, 2008, 33(8): 870-876
- [7] Lian C, Gao B, Wu Z, et al. Collagen type II is downregulated in the degenerative nucleus pulposus and contributes to the degeneration and apoptosis of human nucleus pulposus cells [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(4): 4730-4736
- [8] Nukaga T, Sakai D, Tanaka M, et al. Transplantation of activated nucleus pulposus cells after cryopreservation: efficacy study in a canine disc degeneration model[J]. *Eur Cells Mater*, 2016, 31: 95-106
- [9] Gąsiorowski A. The role of weight training in treating farmers with lumbar discopathy[J]. *Ann Agric Environ Med*, 2012, 19(4): 817-820
- [10] Blanquer SB, Grijpma DW, Poot AA. Delivery systems for the treatment of degenerated intervertebral discs [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2015, 84: 172-187
- [11] Wang SZ, Chang Q, Lu J, et al. Growth factors and platelet-rich plasma: promising biological strategies for early intervertebral disc degeneration[J]. *Int Orthop*, 2015, 39(5): 927-934
- [12] Huang B, Li CQ, Zhou Y, et al. Collagen II /hyaluronan/chondroitin-6-sulfate tri-copolymer scaffold for nucleus pulposus tissue engineering [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2010, 92(2): 322-331
- [13] Yue B, Lin Y, Ma X, et al. Effect of Survivin gene therapy via lentivirus vector on the course of intervertebral disc degeneration in an in vivo rabbit model[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(5): 4593-4598
- [14] Cui X, Trinh K, Wang YJ. Chinese herbal medicine for chronic neck pain due to cervical degenerative disc disease [J]. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2010, (1): CD006556
- [15] Choi YS. Pathophysiology of degenerative disc disease [J]. *Asian Spine J*, 2009, 3(1): 39-44
- [16] Sivan SS, Hayes AJ, Wachtel E, et al. Biochemical composition and turnover of the extracellular matrix of the normal and degenerate intervertebral disc[J]. *Eur Spine J*, 2014, 23 Suppl 3: S344-53
- [17] Deng B, Ren JZ, Meng XQ, et al. Expression profiles of MMP-1 and TIMP-1 in lumbar intervertebral disc degeneration[J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(4): 19080-19086
- [18] Ma X, Lin Y, Yang K, et al. Effect of lentivirus-mediated survivin transfection on the morphology and apoptosis of nucleus pulposus cells derived from degenerative human disc in vitro[J]. *Int J Mol Med*, 2015, 36(1): 186-194
- [19] 赛佳明, 马学晓, 邱晨生, 等. 慢病毒介导生存素基因转染反分化早期和晚期椎间盘髓核细胞生物学效应的比较[J]. *中国骨与关节损伤杂志*, 2015, 30(9): 954-958
- [20] 陆海涛, 袁峰, 张峻玮, 等. 低氧环境下共培养的骨髓细胞和髓核细胞骨向分化能力的研究 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2016, 24(9): 839-844
- [21] Bei K, Du Z, Xiong Y, et al. BMP7 can promote osteogenic differentiation of human periosteal cells in vitro [J]. *Molecul Biol Reports*, 2012, 39(9): 8845-8851
- [22] 张子言, 佟坤, 颜华东, 等. 人类髓核细胞分离培养方法的优化选择[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(28): 5151-5156
- [23] Strassburg S, Hodson NW, Hill PI, et al. Bi-directional exchange of membrane components occurs during co-culture of mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells [J]. *PLoSOne*, 2012, 7(3): e33739
- [24] 王锋, 吴小涛, 王运涛, 等. 单纯II型胶原酶消化法分离、培养人退变椎间盘髓核细胞的形态学观察[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2010, 20(4): 300-304