

· 论 著 ·

成人正常和突出椎间盘髓核细胞的形态及生长动力学比较

张荣峰, 张 超, 阮狄克*

(第二军医大学海军临床医学院骨科, 北京 100037)

[摘要] **目的:**比较成人正常和突出椎间盘髓核细胞体外培养的形态及生长动力学差异。**方法:**从成人正常和突出髓核组织分离培养髓核细胞,分别取传1、3、5代细胞作为研究对象,光镜和电镜下观察细胞形态,并对细胞生长速率、MTT摄取、最大生长密度、分裂指数、克隆形成率等生长动力学指标进行比较研究。**结果:**体外培养的突出髓核细胞与正常髓核细胞相比,形态学上可见突出髓核细胞排列较紊乱,极性消失,胞质内粗面内质网轻度扩张。在接种相同的细胞密度和相同的培养条件下,成人正常和突出髓核细胞的生长速率差异在传1代时为 $T=52.5(P>0.05)$,传3、5代分别为 $T=72.0(P<0.01)$ 、 $T=67.5(P<0.05)$;二者的最大生长密度、MTT摄取、分裂指数、克隆形成率在传1代时分别为 7.28 ± 0.23 和 7.41 ± 0.17 、 0.186 ± 0.015 和 0.173 ± 0.008 、 $(25.36\pm 2.14)\%$ 和 $(23.13\pm 2.55)\%$ 、 $(52.4\pm 2.8)\%$ 和 $(47.7\pm 2.6)\%$,差异均无显著性($P>0.05$),传3代时分别为 6.96 ± 0.19 和 5.48 ± 0.22 、 0.154 ± 0.018 和 0.110 ± 0.009 、 $(22.52\pm 2.16)\%$ 和 $(16.68\pm 2.35)\%$ 、 $(48.7\pm 3.3)\%$ 和 $(40.7\pm 2.5)\%$,传5代时分别为 2.42 ± 0.13 和 0.98 ± 0.14 、 0.085 ± 0.006 和 0.050 ± 0.007 、 $(15.61\pm 1.96)\%$ 和 $(9.34\pm 2.12)\%$ 、 $(40.2\pm 2.3)\%$ 和 $(28.34\pm 2.9)\%$,传3、5代时差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**成人正常和突出椎间盘的髓核细胞在体外培养状态下,突出组细胞在细胞形态学上与正常对照组存在一定差异,在生长动力学方面,突出组细胞的持续增殖能力明显低于正常髓核细胞组,更容易出现老化现象。

[关键词] 椎间盘;髓核;细胞;培养的**[中图分类号]** R 681.53**[文献标识码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2006)05-0479-05**Comparison of morphology and growth kinetics of adult normal and herniated nucleus pulposus cells cultured *in vitro***

ZHANG Rong-feng, ZHANG Chao, RUAN Di-ke* (Department of Orthopaedics, Navy College of Clinical Medicine, Second Military Medical University, Beijing 100037, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the morphology and growth kinetics of the cells derived from the adult normal and herniated nucleus pulposus tissues. **Methods:** The cells derived from the adult normal and herniated nucleus pulposus were cultured *in vitro*. Passage 1, 3, 5 cells were chosen for light microscope and electron microscope observation. The cell growth rate, MTT value, maximal growth density, cellular mitotic index, cloning efficiency, and other parameters were observed in normal and herniated nucleus pulposus and the results were compared. **Results:** Compared with adult normal nucleus pulposus cells, the cells isolated from herniated nucleus pulposus were irregularly arranged and lost polarization, with rough endoplasmic reticulum slightly dilated. Under the same cellular density and culture conditions, the growth rate of passage 1 cells from adult normal and herniated nucleus pulposus had no significant difference, but the differences of passage 3 cells ($P<0.01$) and passage 5 cells ($P<0.05$) were statistically significant. The maximal growth density, MTT value, cellular mitotic index, and cloning efficiency of passage 1 cells of adult normal and herniated nucleus pulposus were respectively 7.28 ± 0.23 and 7.41 ± 0.17 , 0.186 ± 0.015 and 0.173 ± 0.008 , $(25.36\pm 2.14)\%$ and $(23.13\pm 2.55)\%$, and $(52.4\pm 2.8)\%$ and $(47.7\pm 2.6)\%$ (all $P>0.05$); those of passage 3 cells were respectively 6.96 ± 0.19 and 5.48 ± 0.22 , 0.154 ± 0.018 and 0.110 ± 0.009 , $(22.52\pm 2.16)\%$ and $(16.68\pm 2.35)\%$, and $(48.7\pm 3.3)\%$ and $(40.7\pm 2.5)\%$; and of passage 5 cells were respectively 2.42 ± 0.13 and 0.98 ± 0.14 , 0.085 ± 0.006 and 0.050 ± 0.007 , $(15.61\pm 1.96)\%$ and $(9.34\pm 2.12)\%$, and $(40.2\pm 2.3)\%$ and $(28.34\pm 2.9)\%$. There were significant differences between the parameters of passage 3 and 5 cells ($P<0.05$). **Conclusion:** The adult normal and herniated nucleus pulposus cells are different in cellular morphology when cultured *in vitro*. The continuous proliferation ability of the herniated nucleus pulposus cells is obviously decreased than that of the adult normal control group, and aging is more easily seen in the herniated ones.

[KEY WORDS] intervertebral; nucleus pulposus; cells, cultured

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(5): 479-483]

椎间盘是一个独特复杂的连接性组织,在脊柱的负重及运动功能中扮演着重要的角色。椎间盘突出症在成人中的发生率很高,椎间盘突出的主要机

[基金项目] 国家自然科学基金(30370389)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30370389)。**[作者简介]** 张荣峰,硕士生,医师。

* Corresponding author. E-mail: Ruandike@yahoo.com.cn

制是椎间盘髓核细胞逐渐衰老、凋亡,并导致细胞外基质的成分和结构改变,从而使髓核组织承受和吸收压力的能力降低,外周纤维环组织承受的压力增大,导致纤维环破裂,髓核突出^[12]。本研究通过对成人正常和突出椎间盘组织的髓核细胞进行体外培养,比较研究其形态学和生长动力学特性,探讨椎间盘髓核组织突出的细胞学机制。

1 材料和方法

1.1 材料和组织来源 HAM'S/F12 培养液、胎牛血清和胰蛋白酶(HyClone 公司),II 型胶原蛋白(Gibco 公司),MTT(二甲基噻唑二苯基四唑溴盐)、二甲基亚砜(DMSO,Sigma 公司),培养瓶、培养板(Costar)。成人正常髓核组织 2 例,取自意外死亡的青年男性(平均年龄 24 岁);突出髓核组织 6 例,取自腰椎间盘突出症行手术摘除患者(平均年龄 46.3 岁)。根据 Gries 评分标准^[3],轻度退变 2 例,中度退变 4 例。

1.2 细胞分离与培养 取得组织后,将组织浸泡在生理盐水中,立即在超净工作台内筛选实验用的髓核组织,去除纤维环及交界区组织,以消除纤维环细胞对实验的影响。髓核组织用 PBS 冲洗后,剪成碎组织块,用体积分数 0.25% 的胰蛋白酶于 37℃ 消化 20 min,每 5 min 摇动 1 次,800~1 000 r/min 离心 5 min,去上清液,用 0.2% 的胶原酶于 37℃ 下消化 2~4 h,120 目尼龙网筛过滤,细胞悬液 1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,D-Hanks 液悬浮细胞,1 000 r/min,离心 5 min,进行酶液清洗,共 3 次。清洗后的细胞,用 F12-10% FBS(胎牛血清)2 ml 稀释,锥虫蓝染色,计数板进行细胞计数。以 2×10^5 细胞/cm² 接种在 25 cm² 培养瓶中,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。隔 2~3 d 换液,细胞生长达 80% 融合后,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。实验用传 1、3、5 代细胞。

1.3 细胞形态及电镜观察 每日在倒置相差显微镜观察下观察活细胞形态、生长情况,并行 H-E 和 II 型胶原免疫组化染色。在细胞对数生长期时用细胞刮刀刮取细胞,常规透射电镜制样处理,在 JEOL-1230 型电镜下观察细胞超微结构。

1.4 细胞生长曲线及最大生长密度 细胞消化悬浮后,调整密度为 1×10^5 /ml,接种于 24 孔培养板,每孔 0.5 ml,在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,隔日换液。每天取 3 孔细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化后计数,取均值绘制生长曲线。比较正常和突出椎间盘的髓核细胞在传代培养中的最大生长密度。

1.5 MTT 摄取实验 细胞消化悬浮后,调整密度为 1×10^5 /ml,接种于 96 孔培养板,每孔 0.1 ml,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h,每孔内加入 MTT 20 μ l,继续孵箱内培养,4 h 后移除培养液,每孔加入 DMSO 100 μ l,振荡 10 min,于酶标仪 490 nm 波长下测定各孔的光密度值。

1.6 细胞分裂指数 将细胞悬液调整密度为 1×10^5 /ml,接种于含盖玻片的培养皿内,从次日起每日在显微镜下观察细胞形态,取出盖玻片,经 10% 的中性甲醇固定,Gimsa 染色,光镜下计数 1 000 个细胞中分裂细胞数,计算细胞分裂指数。

1.7 细胞克隆形成率 在直径 5 cm 的培养皿中,加入含 1 000 个细胞的细胞悬液,置入 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养。10 d 后细胞克隆形成,终止培养。经 10% 的中性甲醇固定,Gimsa 染色,低倍镜下观察,以一个细胞群 15 个以上细胞算作一个克隆,计算细胞克隆形成率。

1.8 统计学处理 以上实验重复 5 次。采用 SPSS 11.0 统计软件,生长速度间比较用秩和检验,组间比较采用 One-Way ANOVA 方法,实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 髓核组织大体观察及细胞分离 观察发现正常髓核组织与纤维环内层界限明显,呈半透明胶冻状,含水量丰富;突出的髓核组织随退变程度的增加,逐渐丧失胶冻状,更加不透明,韧性和强度增加,含水减少。正常髓核组织平均分离细胞 3.6×10^6 /g,锥虫蓝染色活性细胞数 92%,退变髓核组织平均分离细胞 0.82×10^6 /g,锥虫蓝染色活细胞占 85%。

实验用细胞行 H-E 染色和 II 型胶原免疫组化染色,证实为髓核细胞,免疫组化染色可见胞质和胞核内棕黄色颗粒集聚(图 1)。

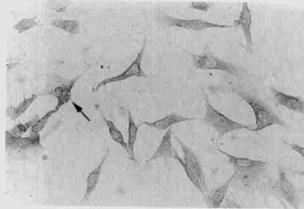


图 1 传一代骨髓核细胞 II 型胶原染色
Fig 1 Collagen II dyeing of passage 1
nucleus pulposus cells($\times 100$)

Brown granules(shown by arrow) were found in the karyon and cytoplasm

2.2 光镜下细胞形态学观察 (1)原代细胞:初消化的成人正常和突出髓核的原代细胞,需6~7 d贴壁,初贴壁时呈短梭形、多角形,胞质向外伸突,然后突起逐渐伸长,经8~12 d达亚融合状态后呈漩涡状或火焰状的细胞团,胞质丰富,具有折光性,有一个较大的卵圆形核,轮廓清晰,可见1~3个核仁。退变的髓核细胞形态与正常髓核细胞相似,但细胞的胞突相对偏长,排列紊乱,极性消失,有明显的交叉重叠现象。(2)传代细胞:与原代细胞相比,正常和突出髓核的细胞传代后的细胞贴壁时间明显缩短,均于4 h即可见大部分细胞贴壁,形态与原代细胞相似,但细胞的胞突略有伸长(图2)。突出髓核细胞从传4代起,生长明显趋缓,细胞突起延长,向梭形演化,胞质逐渐减少,丧失折光性,于传5代时大部分细胞演化为长梭形,生长滞缓,即出现老化现象。正常髓核细胞随着传代次数的增多,具有与突出细胞相似的形态演变过程,但传5代时仅有少量细胞演变为长梭形,传7代时方出现生长停滞。



图2 传一代正常髓核细胞光镜观察

Fig 2 Optical microscopic observation of passage 1 normal nucleus pulposus cells($\times 100$)

Cells were triangle- or spindle-shaped with abundant cytoplasm

2.3 超微结构观察 透射电镜下见正常髓核细胞内均胞质丰富,有丰富的线粒体、粗面内质网和游离核糖体,核大圆形,核仁明显(图3A)。突出椎间盘的髓核细胞与正常髓核细胞相似,但可见胞质内含有少量空泡,粗面内质网轻度扩张(图3B)。传3代内细胞的超微结构与原代细胞相似,细胞老化后正常和突出髓核细胞均呈现胞器明显减少,内质网扩张现象。

2.4 细胞生长曲线及最大生长密度 体外培养条件下,传1代时细胞生长速率差异不显著($T=52.5, P>0.05$),传3,5代的正常细胞生长速度均明显快于突出髓核细胞(分别为 $T=72.0, P<$

$0.01; T=67.5, P<0.05$)。从图4还可看出,随着传代次数的增加,正常和突出髓核的细胞生长速度均呈逐渐下降趋势,突出髓核细胞表现更加明显,于传5代时即出现生长停滞。二者的最大生长密度传1代时分别为 7.28 ± 0.23 和 7.41 ± 0.17 , 差异无显著性($P=0.684$),说明突出椎间盘的髓核细胞与正常髓核细胞一样具有相同的密度依赖性抑制。但传3代时分别为 6.96 ± 0.19 和 $5.48 \pm 0.22, P=0.024$; 传5代时分别为 2.42 ± 0.13 和 $0.98 \pm 0.14, P=0.016$, 差异具有统计学意义,说明突出髓核细胞的持续生长能力低于正常髓核细胞。

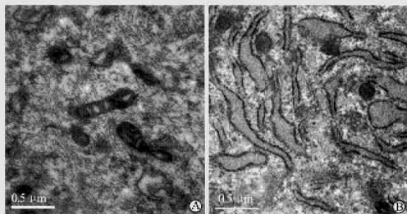


图3 正常髓核细胞(A)和突出椎间盘髓核细胞(B)的超微结构

Fig 3 Ultrastructure of normal nucleus pulposus cells(A) and herniated nucleus pulposus cells(B)

Abundant mitochondria and ribosome(A); abundant ribosome and slight dilation of endoplasmic reticulum(B)

2.5 MTT 摄取实验 此法的原理是活细胞的线粒体脱氢酶能将染料 MTT 转变为不可溶性的紫色颗粒,用酶标仪读取光密度值可反映出活细胞的代谢水平。正常与突出髓核细胞的 MTT 摄取实验传1代时分别是 0.186 ± 0.015 和 0.173 ± 0.008 , 两者差异无显著性($P=0.054$),传3代为 0.154 ± 0.018 和 $0.110 \pm 0.009, P=0.026$, 传5代时分别为 0.085 ± 0.006 和 $0.050 \pm 0.007, P=0.014$, 差异具有统计学意义,说明传代次数增加后,突出髓核细胞的增殖活性降低明显。

2.6 细胞分裂指数 正常和突出髓核细胞的细胞分裂指数传1代时分别是 $(25.36 \pm 2.14)\%$ 和 $(23.13 \pm 2.55)\%$, 两者差异无显著性($P=0.078$)。传3代时分别为 $(22.52 \pm 2.16)\%$ 和 $(16.68 \pm 2.35)\%$; 传5代时为 $(15.61 \pm 1.96)\%$ 和 $(9.34 \pm 2.12)\%$, 统计学差异显著(P 分别为 $0.037, 0.021$)。

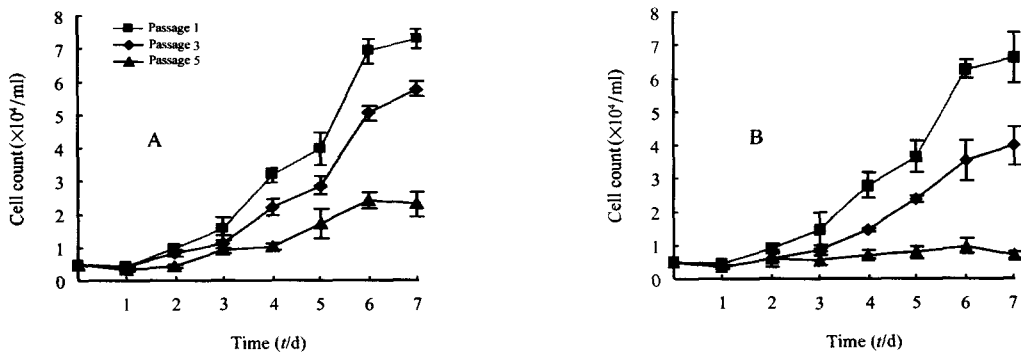


图4 正常髓核细胞(A)和突出髓核细胞(B)的生长曲线

Fig 4 Growth curve of normal nucleus pulposus cells(A) and herniated nucleus pulposus cells(B)

n=18, $\bar{x} \pm s$

2.7 细胞克隆形成率 细胞培养 10 d 后,正常和突出椎间盘髓核细胞的细胞克隆形成率分别为 $(52.4 \pm 2.8)\%$ 和 $(47.7 \pm 2.6)\%$,两者对比无统计学差异($P=0.059$)。随着传代增多,克隆形成能力都逐渐降低,但突出髓核细胞降低更为显著,传 3 代时分别为 $(48.7 \pm 3.3)\%$ 和 $(40.7 \pm 2.5)\%$, $P=0.024$;传 5 代时分别为 $(40.2 \pm 2.3)\%$ 和 $(28.34 \pm 2.9)\%$, $P=0.016$,二者传 3 代和传 5 代时的克隆形成率对比差异具统计学意义。

3 讨论

椎间盘位于两个椎体之间,由髓核、纤维环、软骨终板三部分组成。髓核和纤维环内的细胞数量均很少,细胞外基质丰富^[3]。在胚胎期和小儿期的髓核组织内有脊索细胞和软骨样细胞组成。脊索细胞出生后逐渐减少,正常人 10 岁以后消失,完全被软骨样细胞取代^[4],所以本实验从成人髓核内分离出的细胞大小均一,都为软骨样细胞。本实验还发现从组织分离后,正常和突出椎间盘的髓核原代细胞的贴壁时间均明显延长,需 6~7 d,而传代后的细胞贴壁时间仅需 4 h,原因可能为原代细胞从组织消化分离过程中受胰酶和胶原酶作用时间长,细胞活性受到抑制,以及细胞由体内无氧环境生长和三维存在方式,转移到体外有氧环境和单层生长方式的适应过程所至。

正常髓核组织呈凝胶样,具亲水性,含水量可达 80%,其细胞外基质成分主要是蛋白聚糖和 II 型胶原蛋白,与软骨细胞的表型表达特征相似^[5]。蛋白聚糖的主要形式是聚集蛋白聚糖 (aggrecan),并含

有硫酸软骨素和角质软骨素。Aggrecan 在吸收水分方面发挥重要作用。正是髓核的这种特殊结构,使其具有独特的黏弹特性,从而在承受和吸收脊柱的压力方面发挥重要作用^[6]。

椎间盘组织承受人体躯干和上肢的重量,在日常生活和劳动中所承受压力、剪切力、旋转力较其他组织要大得多,因椎间盘系无血管组织,营养的供给主要通过组织间的弥散和渗透^[7],随着年龄的增长极易发生退变。退变的机制主要有:力学因素,营养供应减少,存活的细胞减少,活性降低,脊索细胞丢失,细胞衰老、凋亡,基质金属蛋白酶(MMPs)的产生,这导致细胞外基质的成分和结构发生生化改变^[8]。主要的变化是髓核细胞表达的软骨特异性基因产物蛋白聚糖和 II 型胶原的减少^[9]。椎间盘退变后蛋白聚糖和水分含量减少,II 型胶原减少,I 型和 III 型胶原增多,逐渐呈纤维样变化,丧失黏弹特性,这种变化与退变程度正相关^[10]。在椎间盘突出的部分患者,则整个椎间盘被 I 型胶原及部分 III 型胶原取代,椎间盘表现为明显的纤维化。本实验也证实退变突出的髓核组织呈纤维样变。由于细胞外基质是由细胞产生和维持,所以这种成分和结构的改变必然由细胞本身的信号转导、蛋白和表型表达发生变化所致,引起这种变化的机制尚不完全清楚,Peng 等^[11]通过对人正常和突出椎间盘进行组织病理学研究后发现,突出椎间盘内血管肉芽组织通过破裂的纤维环长入髓核组织;Jimbo 等^[12]研究证实 IL-1 可以作用于退变椎间盘细胞产生炎性介质,加速退变进程;尼古丁成分^[13]和基质酶活性改变,可以显著地抑制髓核细胞的增殖和细胞外基质的合

成,此外,还与 NO、TNF α 等因子抑制 Sox9 基因的表达有关^[14]。椎间盘退变后细胞数量减少,并与年龄和退变程度呈正相关^[9]。细胞数量减少的原因主要是细胞的衰老、死亡,其中凋亡是细胞死亡的一种重要形式^[15]。

本实验中突出的髓核组织分离出的细胞数量明显少于正常对照组,并且通过形态学和生长动力学观察比较,发现退变突出组细胞和正常髓核细胞在体外培养条件下,原代和传 1 代的细胞无明显差异,但随传代次数的增多,突出组髓核细胞的各组生长动力学统计数据显著低于正常髓核细胞,并且于传 5 代时生长停滞,多数细胞老化,说明在体外培养条件下,突出椎间盘的髓核细胞持续增殖能力低,更容易衰老、凋亡。

如何增加髓核细胞的增殖能力,促进表型的表达和维持,国内外已进行了较多的研究。其中基因转染是目前研究的主要方向,转入的基因主要有细胞因子 BMP-2、TGF- β 1、IGF-1 等的基因,Sox9 基因,LMP-1 基因,抑制分解代谢基因 TIMP-1,以及通过转染 SV40、端粒酶相关基因来达到细胞的永生^[4]。这些方法通过实验证实可以不同程度的增强髓核细胞的活性,促进细胞正常表型的表达和维持,这为将来临床开展基因治疗椎间盘退变等脊柱疾病提供了可能。但要真正过渡到临床还有很多困难和问题需要解决。

[参考文献]

- [1] 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[J]. Spine, 2003, 28: 446-454.
- [2] Gries NC, Berlemann U, Moore RJ, et al. Early histologic changes in lower lumbar discs and facet joints and their correlation [J]. Eur Spine J, 2000, 9: 23-29.
- [3] Poiraudau S, Monteiro I, Anract P, et al. Phenotypic characteristics of rabbit intervertebral disc cells; Comparison with cartilage cells from the same animals [J]. Spine, 1999, 24: 837-844.
- [4] Sakai D, Mochida J, Yamamoto Y, et al. Immortalization of human nucleus pulposus cells by a recombinant SV40 adenovirus vector[J]. Spine, 2004, 29: 1515-1523.
- [5] Freemont AJ, Watkins A, Le Maitre C, et al. Current understanding of cellular and molecular events in intervertebral disc degeneration; implications for therapy[J]. J Pathol, 2002, 196: 374-379.
- [6] Sive JI, Baird P, Jeziorski M, et al. Expression of chondrocyte markers by cells of normal and degenerate intervertebral discs [J]. Mol Pathol, 2002, 55: 91-97.
- [7] Le Maitre CL, Hoyland JA, Freemont AJ. Studies of human intervertebral disc cell function in a constrained *in vitro* tissue culture system[J]. Spine, 2004, 29: 1187-1195.
- [8] Nerlich AG, Bachmeier BE, Boos N. Expression of fibronectin and TGF- β 1 mRNA and protein suggest altered regulation of extracellular matrix in degenerated disc tissue[J]. Eur Spine J, 2005, 14: 17-26.
- [9] 赵勇, 王文波, 李吉友, 等. 骨形态发生蛋白-2 与椎间盘细胞 Sox9 和 II 型胶原基因的调控关系 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2005, 15: 612-615.
- [10] Takegami K, An HS, Kumano F, et al. Osteogenic protein-1 is most effective in stimulating nucleus pulposus and annulus fibrosus cells to repair their matrix after chondroitinase ABC-induced *in vitro* chemonucleolysis[J]. Spine J, 2005, 5: 231-238.
- [11] Peng B, Hao J, Hou S, et al. Possible pathogenesis of painful intervertebral disc degeneration[J]. Spine, 2006, 31: 560-566.
- [12] Jimbo K, Park JS, Yokosuka K, et al. Positive feedback loop of interleukin-1beta upregulating production of inflammatory mediators in human intervertebral disc cells *in vitro* [J]. J Neurosurg Spine, 2005, 2: 589-595.
- [13] Akmal M, Kesani A, Anand B, et al. Effect of nicotine on spinal disc cells; a cellular mechanism for disc degeneration [J]. Spine, 2004, 29: 568-575.
- [14] Paul R, Haydon RC, Cheng H, et al. Potential use of Sox9 gene therapy for intervertebral degenerative disc disease [J]. Spine, 2003, 28: 755-763.
- [15] Horner HA, Roberts S, Bielby RC, et al. Cells from different regions of the intervertebral disc; effect of culture system on matrix expression and cell phenotype [J]. Spine, 2002, 27: 1018-1028.

[收稿日期] 2005-09-27

[修回日期] 2006-03-29

[本文编辑] 尹茶