

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00099

## 探讨年龄因素对人黄韧带细胞原代培养的影响

张宇<sup>1</sup>, 吴少鹏<sup>1</sup>, 夏雄智<sup>1</sup>, 邓崇礼<sup>1</sup>, 李参天<sup>1</sup>, 许学猛<sup>1</sup>, 钟招明<sup>2</sup>, 陈建庭<sup>2\*</sup>

1. 广东省第二中医院脊柱骨科, 广州 510095

2. 南方医科大学南方医院脊柱骨病外科, 广州 510515

**[摘要]** **目的** 探讨从不同年龄的人获得黄韧带组织与原代培养细胞游出之间的关系, 以提高黄韧带细胞原代培养的成功率。**方法** 采用酶消化加组织块培养法, 对来自 21 例不同年龄腰椎管狭窄和腰椎间盘突出症患者的黄韧带组织进行黄韧带细胞原代培养, 倒置相差显微镜下观察细胞从组织块迁出时间、形态和生长状态; 采用细胞免疫荧光染色法对传第 3 代细胞进行 I 型胶原和波形蛋白表达鉴定; 对组织块内细胞游出率和年龄进行相关性分析。**结果** 倒置显微镜下见黄韧带细胞形态生长良好, 培养细胞的波形蛋白和 I 型胶原免疫荧光化学染色均呈阳性。患者年龄与黄韧带组织块原代培养时细胞游出率之间呈负相关关系 ( $r = -0.618, P < 0.05$ ), 年轻患者黄韧带组织细胞游出率高。**结论** 原代培养人黄韧带细胞时尽量采用年轻人黄韧带组织。

**[关键词]** 黄韧带; 细胞培养技术; 年龄因素; 组织块加酶消化法

**[中图分类号]** R 329.28 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)01-0099-04

### Effect of age on primary culture of human ligamentum flavum cells

ZHANG Yu<sup>1</sup>, WU Shao-peng<sup>1</sup>, XIA Xiong-zhi<sup>1</sup>, DENG Chong-li<sup>1</sup>, LI Can-tian<sup>1</sup>, XU Xue-meng<sup>1</sup>, ZHONG Zhao-ming<sup>2</sup>, CHEN Jian-ting<sup>2\*</sup>

1. Department of Orthopaedic and Spinal Surgery, Second Provincial Traditional Chinese Medicine Hospital of Guangdong, Guangzhou 510095, Guangdong, China

2. Department of Orthopaedic and Spinal Surgery, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China

**[Abstract]** **Objective** To study the relationship of different ages with harvesting of ligamentum flavum and cell growth rate in primary culture, so as to improve the success rate of human ligamentum flavum cells (LFCs) culture *in vitro*. **Methods** A total of 21 surgical ligamentum flavum specimens from patients with intervertebral disc herniation and lumbar spinal stenosis were primary cultured with tissue block enzymolytic method. Cell outgrowth, morphology and growth status were observed under an inverted phase microscope. Expression of vimentin and type I collagen was detected in the cells of third passage by immunofluorescence staining. The correlation between age and cell growth rate was analyzed. **Results** Cell morphology and growth status were well under inverted phase microscope and immunofluorescence staining showed vimentin and collagen type I expression in the all LFCs. The cell growth rate of primary culture was negatively correlated with the age of patients from whom ligamentum flavum had been collected ( $r = -0.618, P < 0.05$ ). Cell growth rate was high when the patients were young. **Conclusion** Ligamentum flavum specimens should be taken from young subjects to ensure the success rate of primary culture of LFCs.

**[Key words]** ligamentum flavum; cell culture techniques; age factors; tissue block enzymolytic method

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(1):99-102]

人黄韧带细胞(ligamentum flavum cells, LFCs)体外培养体系是研究人黄韧带细胞分化的主要体外模型<sup>[1-2]</sup>, 人黄韧带组织内细胞含量少, 细胞活性低, 原代培养相对比较困难。原代培养过去大多采用组织块法, 成功率较低, 采用酶消化

**[收稿日期]** 2011-04-18 **[接受日期]** 2011-11-04

**[基金项目]** 广东省自然科学基金博士启动项目(S2011040005276), 广东省中医药局建设中医药强省立项资助课题(20111124)。Supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province(S2011040005276) and Fund for Building Strong Province for Traditional Chinese Medicine of Guangdong Traditional Chinese Administration Bureau(20111124).

**[作者简介]** 张宇, 博士, 副主任医师。E-mail: zhangyu020@126.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 020-62787195, E-mail: chenjt99@tom.com

法可以获得较多的黄韧带细胞,但其步骤烦琐、易污染及实验成本较高。黄韧带组织存在着增龄性变化<sup>[3]</sup>,随着年龄的增加,黄韧带组织中弹性纤维减少,胶原组织表达增加<sup>[4]</sup>,成纤维细胞(黄韧带细胞)的数量和大小均逐渐减少,黄韧带功能由此降低。本研究结合酶消化法与组织块法,探讨不同年龄的黄韧带组织对黄韧带细胞原代培养的影响,以期提高黄韧带细胞原代培养的成功率。

## 1 材料和方法

**1.1 主要试剂和仪器** CO<sub>2</sub> 孵箱(Forma Scientific,美国);倒置相差显微镜(Olympus,日本);Biontek ELK 800 酶标仪(Gene),LSM510 激光共聚焦显微镜(Carl Zeiss,德国)。25 ml 塑料培养瓶(Gibco,美国);FBS(PAA,德国);高糖 DMEM 培养液、胰蛋白酶(Gibco,美国);I 型胶原酶(Sigma,美国);波形丝蛋白(北京中山生物技术有限公司);山羊抗 I 型胶原多克隆抗体(Santa Cruz,美国);小鼠抗波形蛋白单克隆抗体、荧光素异硫氰酸酯(FITC)标记山羊抗小鼠 IgG、FITC 标记兔抗山羊 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

**1.2 标本来源与采集** 人脊柱黄韧带标本来源于南方医科大学南方医院脊柱骨病外科,行后路减压手术的腰椎间盘突出症和腰椎管狭窄症患者共计 21 名。患者年龄 23~49 岁,平均(36.48±5.30)岁。标本采集经患者和家属同意。

无菌条件下,取患者后路开窗术中的黄韧带标本。0.9%冰生理盐水冲洗掉血液,以眼科手术刀仔细修剪、剔除外周附着骨质和脂肪组织等非韧带组织,将标本移入盛有 D-Hanks 平衡盐缓冲溶液的 25 ml 的血清瓶内,置于冰上,迅速转移至实验室细胞台进行下一步处理。

**1.3 人黄韧带细胞培养** 参照文献<sup>[5]</sup>的方法并加以修改,采用胶原酶预消化加组织块培养法分离黄韧带细胞。韧带标本先用 PBS 清洗血迹 3~5 次,然后用显微外科剪将韧带剪成大小约 0.2 mm<sup>3</sup> 的碎块。小组织块移入 50 ml 离心管内,加入 0.2% I 型胶原酶消化液,混匀,置入 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱内消化 90 min,消化过程中每间隔 30 min 震荡离心管 1 min。消化结束后行 560×g 离心 5 min,弃去上清。然后组织块用 PBS 清洗,离心,共重复 3 次,弃去上清。消化后的组织块均匀放入 25 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶内,并用 0.5 ml PAA 血清浸润组织块,置于 37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的孵箱中静置 8 h 后,沿孔板侧壁小心加入含有 20% FBS、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素的 DMEM 培养液,使组织块浸没在培养液中,继续培养。在加液和观察过程中避免过度晃动以防组织块重新漂起。培养 6~8 d 后首次更换培养液,换液时小心清除已经漂浮的组织块,同时避免造成其他组织块浮起,随后每隔 3 d 换液 1 次,待组织块周围有大量细胞迁出后,摇动培养瓶,使残留组织块脱落,更换培养液,去除脱落的组织块,根据细胞的生长状况,每 2~3 d 更换细胞培养液。

**1.4 细胞观察、传代** 在倒置显微镜下观察组织块解离和细胞生长状况,记录原代细胞从组织块迁出时间。原代细胞

生长至 80% 融合时,吸去培养液,D-Hanks 液清洗细胞 2 次,用含 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 的细胞消化液消化细胞 3~5 min;以含 10% FBS-DMEM 培养液终止消化,将 20% FBS-DMEM 换为 10% FBS-DMEM 培养液,将细胞吹打成单细胞悬液,以 1:3 的比例进行细胞传代。

**1.5 人黄韧带细胞鉴定** 在有盖玻片的 6 孔细胞培养板上进行人黄韧带细胞培养,细胞生长至约 70% 融合时取出盖玻片,用 PBS 洗 5 min×2 次,盖玻片上的细胞用 4.0% 多聚甲醛溶液固定 10 min。吸去固定液,用 PBS 洗 5 min×3 次,0.5% Triton 透化 2 min,PBS 漂洗 5 min×2 次。1% 牛血清白蛋白(BSA)室温孵育封闭 30 min 后,倾去封闭液,勿洗。对盖玻片上的细胞加入 1:100 稀释的小鼠抗波形蛋白单克隆抗体和山羊抗 I 型胶原多克隆抗体,用 BSA 作阴性对照,置入湿盒,4℃ 震动,过夜。PBS 洗 5 min×3 次,分别用 1:50 稀释的 FITC 荧光标记的山羊抗小鼠 IgG 和兔抗山羊 IgG,37℃ 避光孵育 45 min。PBS 洗 5 min×3 次,50% 缓冲甘油封片,4℃ 避光保存。在激光共聚焦显微镜下观察并摄像。

**1.6 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。年龄与细胞培养成功率之间相关性采用 Spearman 相关分析。检验水平( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

**2.1 细胞形态学观察** 所培养的 21 例人黄韧带组织块中,组织经消化后均能顺利贴壁,贴附组织块中约有 1/3~1/2 能有细胞游出,其中最早的在第 7 天就有细胞游出(图 1A、1B、1C),在组织块周围形成生长晕,细胞游出后 14~21 d 可达汇合;整个培养瓶中细胞生长密度不均匀,细胞聚集在各个组织块周围,生长会合后呈放射状或漩涡状排列,而远离组织块的区域,细胞数量逐渐减少,甚至没有。传代后细胞生长良好。

倒置显微镜下可见人黄韧带细胞形态呈梭形和多角形,镜下透明度及折光性强,胞体透亮,胞质丰富,胞膜清晰,细胞核呈椭圆型,核仁明显,保持良好细胞形态(图 1D、1E、1F)。

**2.2 波形蛋白和 I 型胶原的免疫荧光染色** 所有人黄韧带细胞的波形蛋白和 I 型胶原免疫荧光染色呈阳性(图 2)。

**2.3 不同年龄人黄韧带组织中细胞游出情况** 如表 1 所示,随年龄增长,组织块中细胞游出率呈下降趋势。

**2.4 患者年龄与细胞游出率的相关性分析** 患者年龄与人黄韧带细胞游出率呈负相关( $r=-0.618$ ,  $P<0.01$ ),随患者年龄增长,细胞游出率降低(图 3)。

## 3 讨论

黄韧带增生肥厚退变可引起椎管狭窄,诱发腰痛和间歇性跛行等神经症状<sup>[6]</sup>。人黄韧带细胞的体外培养是研究黄韧带生物学特性的重要手段。从组织中分离的原代细胞

能较好地保存源组织细胞的遗传特性, 在体外与各种实验底物的反应均与体内相近。因此, 离体培养所获得的黄韧带细

胞对于黄韧带退变机制、椎管狭窄的研究都有着极其重要的意义。

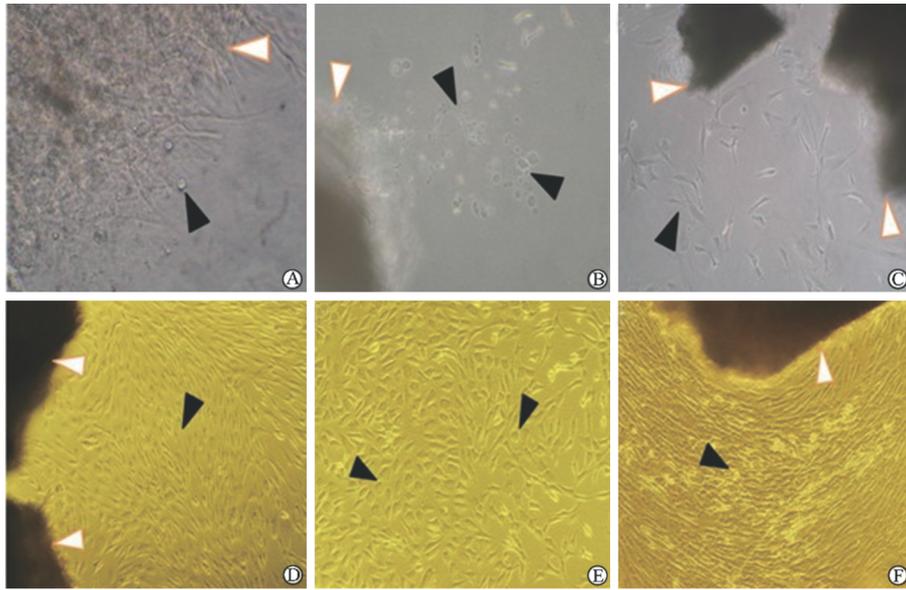


图 1 倒置相差显微镜观察结果

△: 组织块; ▲: 细胞。A: 培养 7~10 d, 细胞团块自组织块迁出; B: 细胞尚未完全附着底物; C: 细胞贴壁; D: 细胞迁出逐渐增多, 主要为梭形和多角形; E: 细胞结构完整, 形态良好; F: 细胞接近融合时呈漩涡样生长。Original magnification: ×100

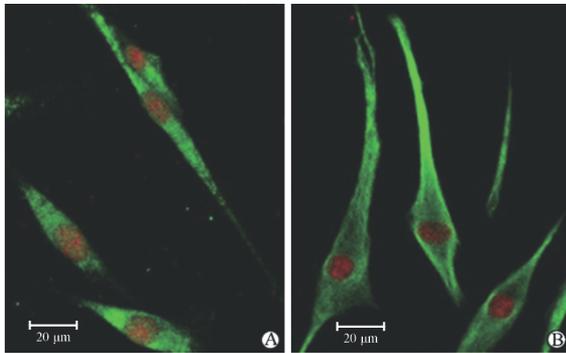


图 2 人黄韧带细胞免疫荧光染色

A: I 型胶原阳性; B: 波形蛋白阳性。标尺为 20 μm

Ishida 等<sup>[7]</sup>在 1993 年首先报道了用 0.2% I 型胶原酶消化人脊柱后纵韧带 3~4 h 获取后纵韧带细胞的方法。Nakatani 等<sup>[8]</sup>也介绍了用 0.25% 胶原酶消化黄韧带组织获取黄韧带细胞的经验。但黄韧带组织内多为弹性纤维和胶原组织, 黄韧带细胞含量少, 采用酶消化法脱离组织后的少量细胞会被胰酶损伤而难以成活; 而组织块法培养周期过长, 一次培养失败会浪费大量的时间和精力。本研究采用钟招明等<sup>[9]</sup>酶消化加组织块培养法, 即将剪碎的组织块用酶短时间预消化, 一般采用 I 型胶原酶进行消化黄韧带组织, 因为人黄韧带组织的细胞外基质成分主要是 I 型胶原, 然后再植块培养, 可以缩短黄韧带细胞的培养周期, 这种培养方法的优点在于人为促进了黄韧带细胞在韧带内的分离, 尽可能去除了细胞间质, 细胞容易从组织块迁出, 从而提高了人黄韧带细胞培养的成功率。

表 1 不同年龄人黄韧带组织中黄韧带细胞游出率

编号	年龄(岁)	总组织块数	有细胞游出的组织块数	细胞游出率(%)
例 1	37	32	10	31.25
例 2	23	39	23	58.97
例 3	28	35	22	62.86
例 4	34	31	13	41.94
例 5	49	37	7	18.92
例 6	43	39	10	25.64
例 7	24	36	17	47.22
例 8	29	41	15	36.59
例 9	48	36	11	30.56
例 10	38	32	9	28.13
例 11	41	37	8	21.62
例 12	47	33	10	30.30
例 13	40	38	13	34.21
例 14	27	39	17	43.59
例 15	31	29	12	41.38
例 16	33	35	13	37.14
例 17	45	43	18	41.86
例 18	26	28	18	64.29
例 19	36	30	13	43.33
例 20	44	37	7	18.92
例 21	43	33	11	33.33

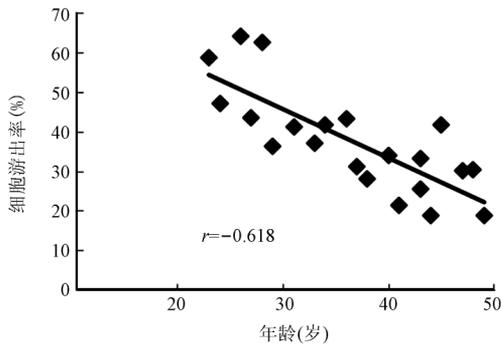


图3 患者年龄与黄韧带细胞游出率相关性分析

$r = -0.618, P < 0.05$

黄韧带增生肥厚引发的退变和性别无关<sup>[10]</sup>,但和年龄有关<sup>[9]</sup>。在人体老龄化的过程中,黄韧带增生肥厚与脊柱失稳或椎体退行性变产生的机械性应力刺激有关。正常人体椎体在屈伸活动中,黄韧带会受到不断的牵拉,同时由于人体退变产生腰椎不稳,可以导致黄韧带增生变厚<sup>[11]</sup>。年龄因素是否会是影响黄韧带细胞培养的关键因素,我们在实验进行了分析。本研究结果表明,黄韧带细胞原代培养时组织块中细胞游出率与患者年龄之间存在负相关关系( $r = -0.618, P < 0.05$ ),提示在黄韧带细胞的原代培养时,应尽量用年轻患者的黄韧带组织。在原代培养时,细胞实际上是从组织块中游出来的而并非经分裂增殖,组织块中黄韧带细胞游出降低可能与韧带组织老龄化,细胞数量减少及活力下降有关。

黄韧带起源于中胚层间叶组织,呈成纤维细胞样特征,目前认为黄韧带组织内主要细胞成分是成纤维细胞和未分化的间充质细胞。波形蛋白是间充质细胞和中胚层来源细胞(如成纤维细胞)的标志物。I型胶原是成纤维细胞的主要细胞外基质。免疫荧光技术是一种被广泛采用的鉴定细胞表型的实验方法,本实验使用了免疫荧光方法对黄韧带细胞进行波形蛋白和I型胶原染色,所有细胞均呈阳性染色,说明本研究原代培养的细胞为人黄韧带细胞<sup>[12-14]</sup>。

以上结果表明,选取年轻患者黄韧带组织,采用胶原酶消化加组织块法,是人黄韧带细胞原代培养的较佳方法。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] Miyakoshi N, Shimada Y, Suzuki T, Kasukawa Y, Okada K, et al. Factors related to long-term outcome after decompressive surgery for ossification of the ligamentum flavum of the thoracic spine [J]. *J Neurosurg*, 2003, 99: 251-256.
- [2] 王哲, 王全平, 李明全, 袁志, 张俊华. 体外培养人黄韧带细胞系的建立及细胞学特性分析[J]. *现代康复*, 2001, 5: 58-59.
- [3] Safak A A, Is M, Sevinc O, Barut C, Eryoruk N, Erdogmus B, et al. The thickness of the ligamentum flavum in relation to age and gender[J]. *Clin Anat*, 2010, 23: 79-83.
- [4] Zhang Y, Chen J, Zhong Z M, Yang D, Zhu Q. Is platelet-derived growth factor-BB expression proportional to fibrosis in the hypertrophied lumbar ligamentum flavum? [J]. *Spine(Phila Pa 1976)*, 2010, 35: E1479-E1486.
- [5] Specchia N, Pagnotta A, Gigante A, Logroscino G, Toesca A. Characterization of cultured human ligamentum flavum cells in lumbar spine stenosis[J]. *J Orthop Res*, 2001, 19: 294-300.
- [6] Okuda T, Baba I, Fujimoto Y, Tanaka N, Sumida T, Manabe H, et al. The pathology of ligamentum flavum in degenerative lumbar disease[J]. *Spine(Phila Pa 1976)*, 2004, 29: 1689 - 1697.
- [7] Ishida Y, Kawai S. Characterization of cultured cells derived from ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine[J]. *Bone*, 1993, 14: 85-91.
- [8] Nakatani T, Marui T, Hitora T, Doita M, Nishida K, Kurosaka M. Mechanical stretching force promotes collagen synthesis by cultured cells from human ligamentum flavum via transforming growth factor-beta1[J]. *J Orthop Res*, 2002, 20: 1380-1386.
- [9] 钟招明, 张宇, 查丁胜, 赵成毅, 徐俊昌, 陈建庭. 成人黄韧带细胞的体外培养[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2010, 20: 62-65.
- [10] Abbas J, Hamoud K, Masharawi Y M, May H, Hay O, Medlej B, et al. Ligamentum flavum thickness in normal and stenotic lumbar spines[J]. *Spine(Phila Pa 1976)*, 2010, 35: 1225-1230.
- [11] Ono K, Yonenobu K, Miyamoto S, Okada K. Pathology of ossification of the posterior longitudinal ligamentum and ligamentum flavum[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1999, (359): 18-26.
- [12] Fan D, Chen Z, Wang D, Guo Z, Qiang Q, Shang Y. Osterix is a key target for mechanical signals in human thoracic ligament flavum cells[J]. *J Cell Physiol*, 2007, 211: 577-584.
- [13] Fan D, Chen Z, Chen Y, Shang Y. Mechanistic roles of leptin in osteogenic stimulation in thoracic ligament flavum cells[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282: 29958-29966.
- [14] Moon S H, Park S R, Kim H, Kwon U H, Kim K H, Kim H S, et al. Biologic modification of ligamentum flavum cells by marker gene transfer and recombinant human bone morphogenetic protein-2[J]. *Spine(Phila Pa 1976)*, 2004, 29: 960-965.

[本文编辑] 周燕娟, 尹茶