

脱矿脱细胞骨基质环支架体外构建 组织工程化椎间盘纤维环

潘 勇, 周 跃, 郝 勇, 李长青, 初同伟, 张 峡, 王卫东, 王建

(第三军医大学新桥医院骨科 400037 重庆市)

【摘要】目的:探讨以脱矿脱细胞骨基质环为支架、纤维环细胞为种子细胞体外培养构建组织工程化椎间盘纤维环的可行性。**方法:**取兔椎间盘纤维环细胞培养,应用甲苯胺蓝染色和 I 型、II 型胶原免疫组织化学染色进行鉴定。用纤维蛋白凝胶接种技术将兔椎间盘纤维环细胞接种到经脱矿脱细胞制备的骨基质环支架材料上,体外培养 3 个月。每月取培养的细胞支架复合体进行大体形态、HE 染色光镜检查 and 扫描电镜观察,并用生化方法检测羟脯氨酸、氨基葡萄糖(GAG)、脱氧核糖核酸(DNA)含量;逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测 I、II 型胶原原使核糖核酸(mRNA)表达;免疫组化和蛋白质印迹方法检测 I、II 型胶原蛋白表达。**结果:**培养的第 1 代细胞甲苯胺蓝染色呈异染性, I 型、II 型胶原免疫组化染色均可见阳性表达,表明培养的第 1 代细胞具有椎间盘纤维环细胞的表型特点。构建的复合体外培养 1、2、3 个月时大体呈白色半透明样环状,有光泽,质韧,具有一定弹性,可扭曲;HE 染色光镜下见支架孔洞被红染的组织填充,且空洞内的细胞密度逐渐增加;扫描电镜观察材料表面逐渐被组织填充; I 型、II 型胶原免疫组化染色均为阳性;培养 2 个月时复合体羟脯氨酸、GAG、DNA 含量明显高于 1 个月时($P<0.01$), 3 个月时与 2 个月时比较无显著性差异($P>0.05$),各时间点复合体羟脯氨酸、GAG、DNA 含量均低于正常纤维环($P<0.05$ 或 <0.01);培养 1 个月时复合体可检测到 I、II 型胶原 mRNA 和蛋白的表达, 2 个月时与 1 个月时比较有显著性差异($P<0.01$), 3 个月时与 2 个月时比较无显著性差异($P>0.05$)。**结论:**以脱矿脱细胞骨基质环为支架、纤维环细胞为种子细胞构建的复合体在体外培养时,细胞能够保持表型特点、逐渐增殖和行使功能,此复合体可被鉴定为类纤维环组织,用其构建组织工程化椎间盘纤维环可行。

【关键词】 组织工程;椎间盘纤维环;脱矿脱细胞骨基质;兔

doi:10.3969/j.issn.1004-406X.2009.06.14

中图分类号:Q813.1 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2009)-06-0451-07

Demineralized and decellular bone as scaffold for in vitro construction of intervertebral disc anulus fibrosus/PAN Yong,ZHOU Yue,HAO Yong,et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord,2009,19(6):451~457

【Abstract】 Objective:To explore the feasibility of demineralized and decellular bone as scaffold and anulus fibrosus cells as seed cells for in vitro construction of intervertebral disc anulus fibrosus.**Method:**Rabbit intervertebral disc anulus fibrosus cells were isolated and cultured in vitro.After tained with toluidine blue and type I and II collagens immunohistochemistry,the anulus fibrosus cells were seeded into demineralized and decellular scaffolds by fibrin gelatum inoculation method,and continued culturing for 3 months in vitro.At the 1th,2th and 3 month,the cell-scaffold complexes were examined by macroscopy,scanning electron microscopy and histology stained by hematoxylin and eosin (HE).Hydroxyproline,glycosaminoglycan (GAG) and deoxyribonucleic acid (DNA) were measured with biochemical methods.Messenger ribonucleic acids (mRNA) of type I and II collagens were determined by reverse transcription-polymerase chain raction (RT-PCR).Proteins of type I and II collagens were determined by Western blot and immunohistochemistry.**Result:**The primary cells displayed intense toluidine blue metachromasia and expressed type I and II collagens which indicates the cells retain the phenotypes of the intervertebral disc anulus fibrosus cells.Macroscopically,the cell-scaffold

基金项目:重庆市自然科学基金(CSTC,2007BB5019)

第一作者简介:男(1972-),主治医师,医学博士,研究方向:脊柱外科,组织工程,骨质疏松

电话:(23)68774908 E-mail:bravepan@163.com

complexes were ring shaped, semitransparent and maleabale which was similar to normal anulus fibrosus as for palpation and texture at each time points. Under light microscope, cell-scaffold complexes revealed more red stained tissues in the pore and the number increased gradually. The pore spaces of the scaffolds were filled gradually by tissues observed by scanning electron microscope. Collagen immunohistochemistry demonstrated heterogeneous type I and type II collagen. The content of hydroxyproline, GAG and DNA in cell-scaffold complexes cultured for 2 months was higher than those for 1 month ($P < 0.01$). But there was no significant difference between 2 and 3 months ($P > 0.05$). Meanwhile, the content of hydroxyproline, GAG and DNA in cell-scaffold complexes was lower than those in normal anulus fibrosus at each time points ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The type I and type II collagen mRNA and protein in cell-scaffold complexes could be detected at 1 month. The expression of the type I and type II collagen mRNA and protein in the cell-scaffold complexes at 1 and 2 months showed significant significance ($P < 0.01$), however no significant significance were noted between 2 and 3 months ($P > 0.05$). **Conclusion:** Demineralized and decellular bone as scaffold and anulus fibrosus cells as seed cells for in vitro construction of intervertebral disc anulus fibrosus can retain the phaenotypes, function as proliferation gradually, which can be identified as intervertebral disc anulus fibrosus-like tissues and can be used tissue engineering intervertebral disc anulus fibrosus.

【Key words】 Tissue engineering; Intervertebral disc anulus fibrosus; Demineralized and decellular bone; Rabbit

【Author's address】 Department of Orthopaedics, Xinqiao Hospital, the Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China

纤维环的再生修复是椎间盘组织工程首先要研究的问题。目前椎间盘组织工程的研究中缺乏性能优异的支架材料。能否使用脱矿、脱细胞骨基质作为支架材料用于组织工程化纤维环的构建研究? 种子细胞能否粘附支架内部并增殖和行使功能? 本研究旨在探索以脱矿脱细胞骨基质环为支架、纤维环细胞为种子细胞体外培养构建组织工程化椎间盘纤维环的可行性。

1 材料与方法

1.1 实验动物

细胞培养使用动物: 清洁级 1 月龄 Sprague-Dauley 兔 2 只, 体重 500g 左右, 雌雄不拘。支架制备使用动物: 健康 3 月龄 Sprague-Dauley 兔 10 只, 体重 2000g 左右, 雌雄不拘。正常椎间盘纤维环取材动物: 健康 3 月龄 Sprague-Dauley 兔 9 只, 体重 2000g 左右, 雌雄不拘。均由第三军医大学新桥医院动物中心提供, 使用证号为 SYXK-(军) 2002-031。

1.2 主要试剂和仪器

DMEM 培养基 (Gibco), 4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES, Amresco), 胰蛋白酶 (Gibco), II 型胶原酶 (Gibco), 胎牛血清、多聚赖氨酸 (Sigma), 台盼蓝 (北京鼎国, Sigma 分装), MTT (Amresco), II 型胶原单克隆抗体 (Merke), I 型胶原单克隆抗体

(Merke), SP 免疫组化试剂盒 (北京中杉公司), DAB 显色试剂盒 (北京中杉公司), 人纤维蛋白原 (福建省莱士公司), TritonX-100 (Sigma), 酶抑制剂混合液 Protease Inhibitor Cocktail (Sigma), DNase、RNase (晶美公司), 羟脯氨酸检测试剂盒 (南京建成生物研究所), Hoechst33258 (Sigma), 木瓜蛋白酶 (Sigma), Tripure RNA 提取液 (ROCH), 聚合酶链反应 (PCR) 试剂盒 (Promega), 放射免疫沉淀试验 (RIPA) 蛋白提取液 (上海申能博)。相差倒置显微镜 (Leica), BB5060UV 型恒温 CO₂ 孵箱 (Heraeus), 超净工作台 (中国蚌埠净化设备厂), 离心机 (Heraeus), 820 型切片机 (American Optical), Olympus 荧光显微镜、超纯水仪 (Milipore), Mag-Mix 磁力搅拌器 (GCA 公司), GLZY 型冷冻干燥机 (上海沛东冷冻干燥设备有限公司), 扫描电子显微镜 (AMRAY1000B 型, 美国)。

1.3 纤维环细胞的培养及鉴定

取 2 只 1 月龄 Sprague-Dauley 兔脱颈处死, 用 70% 酒精浸泡 5min, 无菌条件下切取纤维环剪成 1mm³ 大小, 用 0.25% 胰蛋白酶消化液重悬组织, 37℃ 消化 10~15min, 800r/min 离心 2min, 去上清, 用无血清培养液清洗 2 次, 加入 0.1% II 型胶原酶 37℃ 消化, 至组织大部分消化、培养液浑浊。用 200 目不锈钢网过滤, 收集悬液, 1000r/min 离

心 5min。稀释细胞至 1×10^5 个/ml, 接种细胞到 100ml 塑料培养瓶中, 生长培养液为 DMEM (含 10% 胎牛血清、青霉素 10 万 U/L、链霉素 10 万 U/L、20mmol/L HEPES, pH 7.2), 置于 37℃、饱和湿度、含 5%(V/V)CO₂ 的孵箱中培养。倒置显微镜观察细胞生长情况, 3d 换液一次。当细胞接近 90% 汇合时进行传代。0.01M PBS 洗涤, 用 0.25% 胰蛋白酶和 0.01% 乙二胺四乙酸(EDTA)混合消化液镜下消化, 用含血清的培养液 3ml 终止消化; 用滴管轻轻吹打细胞数次制成细胞悬液。将悬液 1000r/min 离心 5min, 弃上清, 用培养液混悬细胞后按以 1×10^4 个/cm² 的密度接种, 取原代和第 1 代细胞进行鉴定。细胞爬片成功后, 常规甲苯胺蓝染色, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 显微镜下观察拍照。将第 1 代细胞接种在放有预处理盖玻片的 6 孔培养板中进行细胞爬片, 待细胞长成单层时, 用 SP 免疫组化试剂盒进行细胞 I 型、II 型胶原免疫组织化学染色。脱水、透明, 中性树胶封片, 显微镜下观察拍照。

1.4 脱矿脱细胞骨基质环的制备

3 月龄 Sprague-Dauley 兔 10 只速眠新肌肉注射麻醉。取其双侧股骨髁部, 剔除骨膜, 并用 PBS 清洗去除骨髓, 将骨修整成椭圆形的骨块。根据 Courtman^[1]的中性去污剂-酶四步脱细胞方法和王昊等^[2]方法脱细胞。用去离子水冲洗, 然后在 4℃ 0.6mol/L HCl 中处理 48h 脱钙。脱矿脱细胞骨基质环比照纤维环形状塑形, 然后经去离子水充分冲洗后, 冷冻干燥, 经 100Gray⁶⁰ 钴照射消毒灭菌后 -20℃ 保存备用。

1.5 细胞支架复合体的构建

取 36 个脱矿脱细胞骨基质环支架材料用细胞培养基 DMEM 在培养箱内浸泡 1 周, 换液 2 次。接种时取出支架, 用 PBS 洗涤后尽量吸出水分, 浸入人纤维蛋白原溶液 (2mg/ml) 中 30min, 无菌纱布吸去多余液体; 取第 1 代纤维环细胞消化、调整细胞 6×10^6 个/ml, 按 9:1 体积加入 PBS 配置的凝血酶 (20U/ml); 在 24 孔培养板中, 将细胞悬液滴加至支架材料内, 随后滴加 1~3 滴 50mM CaCl₂ 溶液; 30min 后将细胞支架复合体移入培养瓶中培养, 每 2d 换液一次。

1.6 细胞支架复合体的检测

(1) 在培养 1、2、3 个月时, 每个时间点取 3 个标本用数码相机(索尼 w5)拍照观察。拍照后, 用

4% 多聚甲醛固定液固定 24h, 常规石蜡包埋切片, 每个标本共切片 90 张, 30 张切片用于 HE 染色, 光镜下观察; 30 张切片常规 SP 法检测 I 型胶原, 30 张切片常规 SP 法检测 II 型胶原; 脱水、透明, 中性树胶封片, 光镜下观察。

(2) 每个时间点取 3 个培养标本经 3% 戊二醛固定后, 1% 锇酸固定, 梯度酒精脱水, 最后干燥, 真空喷金处理, 进行扫描电镜观察。

(3) 每个时间点取 3 个培养标本(实验组), 每个标本分为 3 份, 每份 50~100mg。于麻醉下切取 3 只健康 3 月龄 Sprague-Dauley 兔正常椎间盘纤维环共 3 个标本(正常纤维环组, 即对照组), 每个标本分为 3 份, 每份 50~100mg。每个标本取 1 份, 按羟脯氨酸检测试剂盒说明书操作, 按以下公式计算羟脯氨酸含量: 羟脯氨酸含量(μg/mg 湿重) = (测定管吸光度 - 空白管吸光度) / (标准管吸光度 - 空白管吸光度) × 标准管含量 (5μg/ml) × 水解液总体积 (10ml) / 组织湿重 (mg)。

每个标本取 1 份, 用胰蛋白酶及木瓜蛋白酶提取氨基葡聚糖(GAG), 6-硫酸软骨素(6-CS)制作标准曲线, 阿利新兰染色, 于 480nm 处测 OD 值。回归分析得到回归方程。待测样品测定: 取 0.1ml GAG 样品, 加入 0.9ml 阿利新兰染液, 10min 内 480nm 处比色, 根据回归方程计算 GAG 浓度, 然后根据 GAG 含量(μg/mg 湿重) = GAG 浓度(μg/ml) × 稀释体积 (100ml) / 重量 (mg), 计算标本 GAG 含量。

每个标本取 1 份, 进行 DNA 含量检测。①标准曲线的绘制: 小牛胸腺 DNA 标准品荧光分光光度计的激发波长设定在 365nm 处, 发射波长设定在 454.4nm 处, 测定荧光强度, 绘制标准曲线。②液氮中取适量细胞支架复合体及用于对照的正常纤维环准确称重。③标本分别入装有 5ml 木瓜酶消化液的离心管, 60℃ 水浴消化 24h。④各取消化好的样品 1ml, 每管加 Hoechst 33258 贮备液 3μl 室温避光 5min, 将荧光分光光度计的激发波长设定在 365nm 处, 发射波长设定在 454.4nm 处, 测定荧光强度。记录并根据标准曲线计算样本 DNA 浓度, 然后根据 DNA 含量(μg/mg) = 浓度(μg/ml) × 10(ml) / 重量 (mg), 计算 DNA 含量。

(4) 基因表达的检测 每个时间点另取 3 个细胞支架复合体标本(实验组)放入液氮中, 使用时各切取 100mg; 于麻醉下切取 3 只健康 3 月龄

Sprague-Dauley 兔正常椎间盘纤维环共 3 个放入液氮中,使用时各标本切取 100mg 设为正常纤维环组。RT-PCR 检测 I、II 型胶原基因表达。组织总 RNA 抽提:常规 Tripure 法提取总 RNA,贮存于 70%乙醇并保存于 -70℃。兔 I、II 型胶原 mRNA 全长序列从互联网上的基因库 (Gene-Bank) 查得,使用 DNA-star 软件进行 PCR 引物设计,引物序列见表 1。

表 1 兔 I、II 型胶原 mRNA 及 β -actin 引物序列

引物名称	引物序列	片段长度
I 型胶原 (D49399)	上游 5'-GGGGCCCTGCTGCTCCTAC-3' 下游 5'-GGTGGAGCTGGGTCTCTCC-3'	329bp
II 型胶原 (D83228)	上游 5'-GCCACGCTCAAGTCCCTCAACAAC-3' 下游 5'-ACAGCAGCGCGAGGAAGTCATCT-3'	376bp
β -actin	上游 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3' 下游 5'-CTTCCTTAATGTCACGACGATTTC-3'	540bp

RT 反应 调制反应液:5 $\times$ RNA PCR Buffer 4 μ l;Rnase Free dH₂O 7.5 μ l;逆转录酶(MMLV) 1 μ l;dNTP 2 μ l;mRNA 提取液 2 μ l;Oligodt 1 μ l;Rnasin 0.5 μ l;MgCl₂ 2 μ l; 每管反应体积 20 μ l,反应液按以下条件进行反转录反应:室温放置 10min,42℃ 60min,95℃ 10min,4℃ 5min。

PCR 反应 调制反应液:RT 反应产物 2 μ l;10 $\times$ PCR buffer 2 μ l;dNTP 2 μ l; 上游引物 0.5 μ l;下游引物 0.5 μ l;Taq 酶 0.5 μ l;MgCl₂ 2 μ l;DEPC-ddH₂O 10.5 μ l; 按以下条件进行 PCR 扩增:94℃ 预变性 4min,94℃ 预变性 50s,51℃~60℃ 复性 45s,72℃ 延伸 60s, 扩增 30 个循环,72℃ 延伸 10min,4℃ 保存。取 5 μ l PCR 产物及 5 μ l TakaraDNA Marker,加 1 μ l 5 $\times$ 上样缓冲液,在质量分数为 1.5%的琼脂糖凝胶上电泳,5V/cm,60~90min,使用 SX-100 凝胶成像仪对条带进行扫描和图像存储;以 Image-pro-plus 图像处理系统进行图像分析,以平均光密度 $\times$ 面积 (OD $\times$ mm²)表示,分别计算目的条带和内参照条带的积分光密度值 (IOD 值),结果以 I、II 型胶原 mRNA/ β -actin 的积分光密度比值表示。

(5)蛋白表达的检测 从实验(4)剩余标本中各切取 100mg,分别放入研钵中,加入液氮磨碎;将组织粉末转入 1ml EP 管中;加 1ml RIPA 和 10 μ l 苯甲基磺酰氟丝氨酸蛋白酶抑制剂 (PMSF),吹打重悬后置于冰上静置 30min;4℃,

20000r/min 离心 30min;吸取上清分装,-20℃ 保存。十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE):①制好模具,先灌制 10%分离胶,待胶聚合后,双蒸水冲洗,滤纸吸干,再灌制 5%的浓缩胶,插入梳子,待胶聚合后取下梳子,双蒸水冲洗,加入电泳缓冲液;②将蛋白样品从 -20℃ 中取出解冻后加入 2 $\times$ SDS 上样缓冲液和终浓度为 100mM/L 的二硫苏糖醇 (DTT),100℃ 煮沸 5min,静置 10min;③用微量移液器上样后,加满电泳缓冲液,先以 80V 恒压电泳,待溴酚蓝进入分离胶后将电压改为 120V 恒压,电泳至溴酚蓝指示剂到底边停止电泳。取下凝胶,一块用于考马斯亮蓝染色,另外一块用于转膜。将转印完毕的聚偏氟乙烯膜 (PVDF) 膜取出后放置于封闭液中,水平摇床上 37℃ 轻摇封闭 60min;将膜放置于杂交袋中,加入一抗 (鼠抗兔单克隆抗体, I 型胶原,1:100; II 型胶原,1:100 封闭液稀释)4℃ 过夜;三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水 (TBST) 洗膜 5min $\times$ 3 次;将膜放置于杂交袋中,加入二抗 (辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG,1:2000,封闭液稀释),37℃,摇床上 40r/min $\times$ 1h;TBST 洗膜 5min $\times$ 3 次。DAB 显色,拍照保存结果。同样的方法做磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 内参的蛋白质印迹。用 SX-100 凝胶成像仪对条带进行扫描和图像存储;以 Image-pro-plus 图像处理系统进行图像分析,以平均光密度 $\times$ 面积 (OD $\times$ mm²)表示,分别计算目的条带和内参照条带的积分光密度值 (IOD 值),结果以 I、II 型胶原蛋白/GAPDH 的积分光密度比值表示。

1.7 统计学分析

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 10.0 软件验证数据符合正态分布后,采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 细胞鉴定

原代及第 1 代细胞甲苯胺蓝染色见胞核蓝染,胞浆染为紫色,呈异染性 (图 1、2)。第 1 代细胞 I 型胶原和 II 型胶原免疫组织化学染色均可见阳性表达,胞浆呈棕黄色,而胞核未见染色 (图 3、4)。

2.2 细胞支架复合体形态学观察

大体观察细胞支架复合体呈白色半透明样环状,有光泽,质韧,可扭曲,原始支架的孔洞随时间

延长而逐渐被填充,1 个月时仍可见少量孔洞,2 个月时表面只有少量凹陷,3 个月时表面比较平整(图 5)。HE 染色光镜下见支架孔洞被红染的组织填充,且空洞内的细胞密度逐渐增加,原有的支架结构仍然保留(图 6)。I 型胶原、II 型胶原免疫组织化学染色均为阳性, I 型胶原主要分布于细胞外基质, II 型胶原主要分布于细胞质(图 7、8)。扫描电镜示材料表面逐渐被组织填充(图 9)。

2.3 细胞支架复合体羟脯氨酸、GAG 和 DNA 含量

GAG 浓度回归方程: $F=1.34C+1.41$ ($r=0.9872, P<0.01$, F 为 OD 值, C 为 GAG 浓度); DNA 浓度回归方程: $Y=0.0004X+0.0151$ ($r=0.9855, P<0.01$, Y 为 DNA 浓度, X 为 OD 值)。体

外培养 2 个月时羟脯氨酸、GAG、DNA 含量明显高于培养 1 个月时($P<0.01$),但培养 3 个月时与 2 个月时比较无显著性差异($P>0.05$);各时间点羟脯氨酸、GAG、DNA 含量均低于正常纤维环($P<0.05$ 或 <0.01)(表 2)。

2.4 I、II 型胶原 mRNA 和蛋白的表达

细胞支架复合体培养 1 个月即可检测到其 I、II 型胶原 mRNA 和蛋白的表达,培养 2 个月时 I、II 型胶原 mRNA 和蛋白表达同培养 1 个月时比较无显著性差异($P>0.05$);培养 3 个月时与培养 2 个月时比较无显著性差异($P>0.05$);培养 1、2、3 个月时 I、II 型胶原 mRNA 和蛋白的表达与正常纤维环比较均有显著性差异($P<0.05$, 表 3)。表明培养 1、2 个月的细胞支架复合体 I、II 型

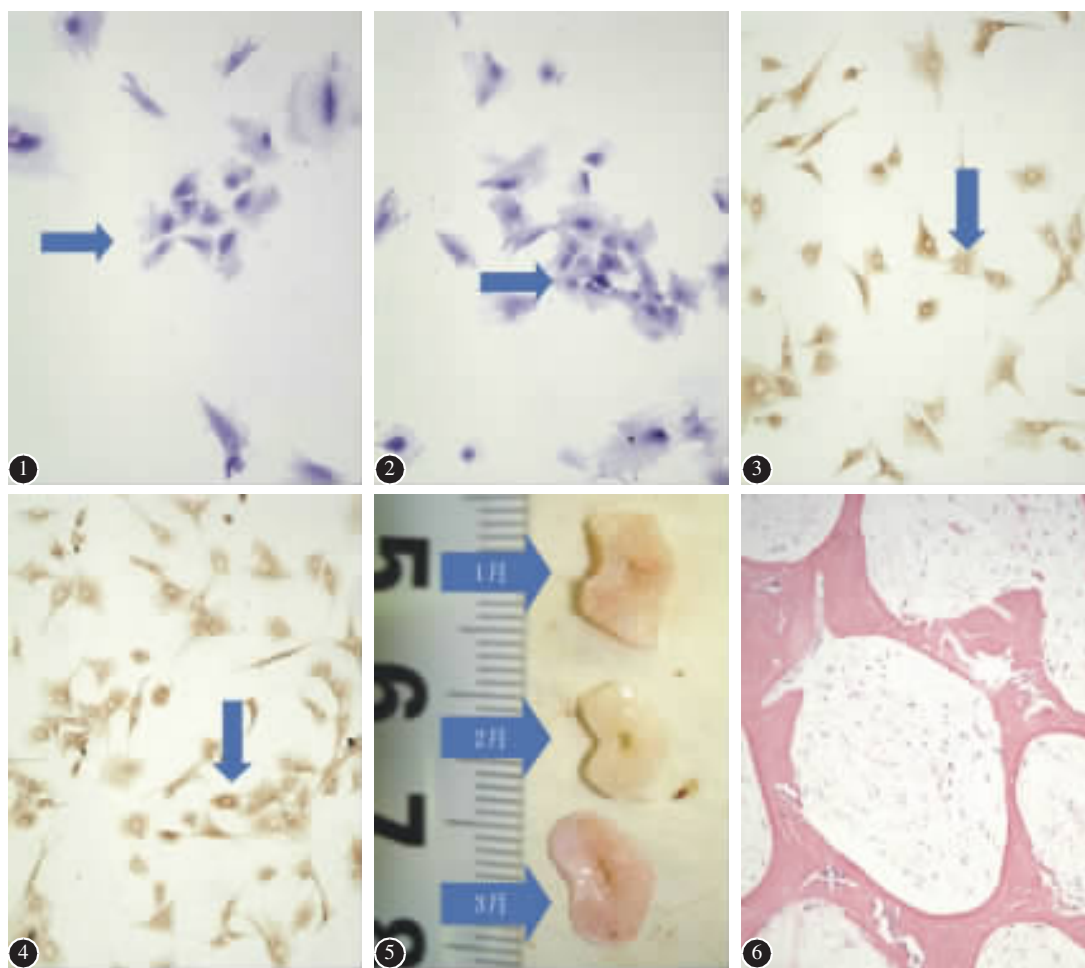


图 1 原代培养椎间盘纤维环细胞甲苯胺蓝染色显示胞核蓝染,胞浆染为紫色,呈异染性($\times 200$) 图 2 第 1 代培养椎间盘纤维环细胞甲苯胺蓝染色显示胞核蓝染,胞浆染为紫色,呈异染性($\times 200$) 图 3 第 1 代培养椎间盘纤维环细胞 I 型胶原免疫组化染色见胞浆呈棕黄色,而胞核未见染色($\times 200$) 图 4 第 1 代培养椎间盘纤维环细胞 II 型胶原免疫组化染色见胞浆呈棕黄色,而胞核未见染色($\times 200$) 图 5 细胞支架复合体培养 1、2、3 个月时大体观察呈白色半透明样环状,有光泽,质韧,可扭曲,原始支架的孔洞随时间延长而逐渐被填充,1 个月时仍可见少量孔洞,2 个月时表面只有少量凹陷,3 个月时表面比较平整($\times 1$) 图 6 细胞支架复合体培养 3 个月时 HE 染色见红染的组织比较致密($\times 100$)

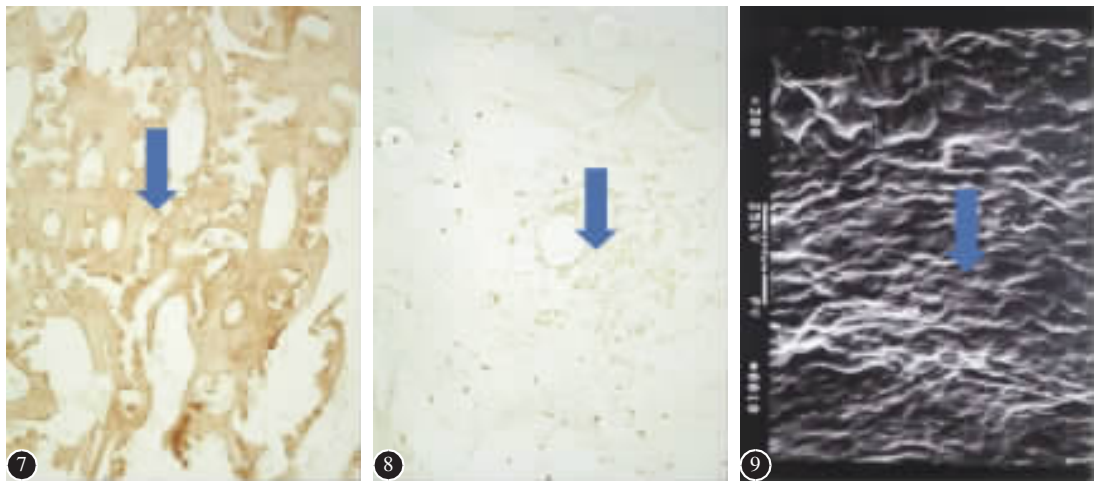


图 7 细胞支架复合体培养 3 个月时免疫组化染色见 I 型胶原被染为棕黄色主要分布于细胞外基质(×200) 图 8 细胞支架复合体培养 3 个月时免疫组化染色见 II 型胶原被染成棕黄色,主要分布于细胞质(×100) 图 9 细胞支架复合体培养 3 个月时扫描电镜观察示支架空隙大部分被新生组织填充(×300)

表 2 不同时间点细胞支架复合体及正常纤维环羟脯氨酸、GAG 和 DNA 含量				($\mu\text{g}/\text{mg}$ 湿重, $\bar{x}\pm s, n=3$)
	细胞支架复合体			正常纤维环
	培养 1 个月时	培养 2 个月时	培养 3 个月时	
羟脯氨酸含量	9.37±0.85 ^①	11.99±0.12 ^{①③}	12.23±0.62 ^{②③④}	14.35±1.02
GAG 含量	9.32±0.63 ^②	12.57±1.74 ^{②③}	13.41±1.85 ^{②④}	27.39±1.99
DNA 含量	0.28±0.04 ^②	0.42±0.02 ^{②③}	0.45±0.02 ^{②④}	0.75±0.01

注:与正常纤维环比较,① $P<0.01$,② $P<0.05$;③与培养 1 个月时比较 $P<0.01$;④与培养 2 个月时比较 $P>0.05$

表 3 不同时间点细胞支架复合体及正常纤维环中 I、II 型胶原 mRNA 和蛋白的表达量(IOD 值)				($\bar{x}\pm s, n=3$)
	细胞支架复合体			正常纤维环
	培养 1 个月时	培养 2 个月时	培养 3 个月时	
I 型胶原 mRNA/ β -actin	0.14±0.01 ^①	0.24±0.02 ^{①②}	0.25±0.01 ^{①③}	0.33±0.04
II 型胶原 mRNA/ β -actin	0.06±0.04 ^①	0.14±0.03 ^{①②}	0.16±0.05 ^{①③}	0.22±0.04
I 型胶原蛋白/ GAPDH	0.45±0.02 ^①	0.53±0.02 ^{①②}	0.54±0.02 ^{①③}	0.78±0.02
II 型胶原蛋白/GAPDH	0.17±0.03 ^①	0.31±0.02 ^{①②}	0.32±0.02 ^{①③}	0.70±0.02

注:①与正常纤维环比较 $P<0.01$,②与培养 1 个月时比较 $P<0.01$,③与培养 2 个月时比较 $P>0.05$

胶原 mRNA 和蛋白的表达量增加迅速,但 2 个月
后增加不明显,且 I、II 型胶原 mRNA 和蛋白表
达量均低于正常纤维环的表达量。

3 讨论

理想的组织工程椎间盘支架材料除了具备良
好的生物相容性、类似椎间盘的结构特征以及适
当的降解性能等共性以外,还应该成分、形状、
结构、力学性能上与椎间盘基质相似^[3]。然而在构
建组织工程化纤维环的研究中,目前缺乏理想的
支架材料,使得组织工程纤维环支架材料的选择
和构建成为首要问题^[4,5]。经过筛选我们发现脱矿
脱细胞同种异体股骨髁骨基质环具有的环形形状

与纤维环几何形状一致,是弹性组织且主要成分
是 I 型胶原,与纤维环组织非常相似。这些特点促
使我们进一步深入研究脱矿脱细胞骨基质环的特
性并展开相应研究。

在本研究中我们采用免疫细胞化学技术,分
别利用 I 型胶原、II 型胶原单克隆抗体检测到培
养的兔纤维环细胞有 I 型胶原、II 型胶原的表达。
证明培养的细胞与髓核细胞以及终板透明软骨细
胞不同,所检测的抗原表达特性符合纤维环细胞
的特点。对培养的纤维环细胞进行甲苯胺蓝染色,
细胞具有异染性,表明细胞可以合成蛋白聚糖亚
单位(PGs),与文献报道一致^[6]。以上的结果表明,
我们所培养的细胞为纤维环细胞。

目前在椎间盘组织工程的研究中主要采用形态学观察、生化指标分析、PCR 检测基因表达、蛋白印迹检测蛋白表达等方法对产物进行分析。

本研究大体观察结果表明,体外培养的细胞支架复合体呈白色半透明环状,有光泽,质韧,具有一定弹性,可扭曲,这些特点均与正常纤维环组织相似^[7]。原始支架的孔洞随时间延长而逐渐被填充,表明接种的种子细胞在支架内增生活跃,逐渐长满了支架内部。HE 染色光镜观察的结果也证明支架内细胞数量逐渐增加,同时也注意到在体外培养的过程中支架的分解吸收不明显,提示在体外环境中本支架材料不能够被种子细胞分泌的细胞外基质所替换,证明本细胞支架复合体在体外培养环境中很难最终转化为纤维环组织。

免疫组化结果证实体外培养的细胞支架复合体虽然形态上与纤维环组织有差距,但在 I 型、II 型胶原蛋白的定性表达方面与纤维环组织是一致的。

羟脯氨酸的含量可用来代表胶原的含量^[8]。我们的检测结果证实体外培养的细胞支架复合体含有丰富的胶原,但是因为本研究的支架材料的主要成分为胶原,所以胶原含量并不能说明细胞分泌胶原。而胶原含量随时间的延续而增加才证明了培养的细胞支架复合体的确能够分泌胶原。从培养 1 到 2 个月羟脯氨酸含量显著增加,但 2 到 3 个月羟脯氨酸含量没有明显增加,原因考虑为培养方法的局限性所致。

GAG 保持了椎间盘基质内固定电荷密度和离子浓度、渗透压等。它们吸附大量水分子,使椎间盘保持高度水合状态,利于椎间盘发挥生物学功能^[9]。GAG 及其他功能基团是 PG 分子乃至整个椎间盘材料发挥正常生物力学性能的生化基础^[10]。本研究结果表明,细胞支架复合体培养 1 个月时 GAG 即有明显表达,培养 2 个月时 GAG 含量明显增加,培养 3 个月时较 2 个月时增加不明显。从实验结果可以看出,体外培养的细胞-支架复合体含有 GAG,虽然含量低于正常纤维环,但可以肯定其具有软骨组织的特点,同时证明纤维环细胞在支架内不但可以增殖还可以发挥生物学功能。

DNA 的含量代表了组织内细胞的数量多少。

本研究中,培养组织内细胞增殖迅速,特别是 2 个月以前,2 到 3 个月增殖不明显,原因考虑是培养条件的限制影响了继续形成成熟的纤维环组织。

由于羟脯氨酸含量检测无法区分 I 型胶原蛋白、II 型胶原蛋白,所以本研究进一步检测了二者的基因和蛋白表达。检测结果证实培养的细胞支架复合体能够表达 I 型、II 型胶原蛋白基因和蛋白,在表达量上的规律与前述生化指标相似,前 2 个月增长明显,第 3 个月增长不明显。以上情况证明培养的细胞支架复合体特点符合纤维环的特点,但组织结构以及特征成分的含量与正常纤维环仍有差距,所以静态培养的细胞支架复合体仅可以鉴定为类纤维环组织。

4 参考文献

1. Courtman DW, Pereira CA, Kashef V, et al. Development of a pericardial acellular matrix biomaterial: biochemical and mechanical effects of cell extraction [J]. J Biomed Mater Res, 1994, 28(6): 655-666.
2. 王昊, 柏树令. 骨脱细胞后的有机成分分析[J]. 中国修复重建外科杂志, 2003, 17(5): 422-424.
3. Gruber HE, Leslie K, Infram J, et al. Cell-based tissue engineering for the intervertebral disc: in vitro studies of human disc cell gene expression and matrix production within selected cell carriers[J]. Spine J, 2004, 4(1): 44-55.
4. 李华壮, 周跃. 椎间盘组织工程研究进展[J]. 中华骨科杂志, 2005, 25(5): 316-318.
5. Seguin CA, Grynblas MD, Pilliar RM, et al. Tissue engineered nucleus pulposus tissue formed on a porous calcium polyphosphate substrate[J]. Spine, 2004, 29(12): 1299-1307.
6. 陈岩, 胡由谷, 刘勇. 椎间盘细胞培养过程中的反分化研究[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2000, 10(3): 188-189.
7. Sato M, Asazuma T, Ishihara M, et al. An experimental study of the regeneration of the intervertebral disc with an allograft of cultured annulus fibrosus cells using a tissue engineering method[J]. Spine, 2003, 28(6): 548-553.
8. 孔璐, 王继峰, 周子悦, 等. 碱解法测定组织羟脯氨酸的实验研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2003, 9(4): 319-322.
9. 孟和, 顾志华. 骨伤生物力学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991. 188-190.
10. Best BA, Guilak F, Setton LA, et al. Compressive mechanical properties of human annulus fibrosus and their relationship to biochemical composition[J]. Spine, 1994, 19(2): 212-221.

(收稿日期: 2008-08-04 修回日期: 2009-03-16)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 李伟霞)