

基础研究

成人黄韧带细胞的体外培养

钟招明, 张宇, 查丁胜, 赵成毅, 徐俊昌, 陈建庭

(南方医科大学南方医院脊柱骨病外科 510515 广州市)

【摘要】目的:探讨成人黄韧带细胞的体外培养方法,为研究黄韧带退变的发病机制奠定基础。**方法:**采集成年胸腰椎骨折患者后路减压术中的黄韧带,应用胶原酶预消化组织块培养法分离黄韧带细胞,并传代培养;倒置相差显微镜下观察细胞从组织块内迁出时间、细胞形态和生长状态;传 1、3、5 代细胞培养 1~8d,用四甲基偶氮唑盐比色法(MTT)测定其吸光度(OD)值,评价细胞增殖状况,并绘制细胞生长曲线;用免疫荧光染色法检测传 3 代细胞的波形蛋白和 I 型胶原的表达。**结果:**在原代培养第 10~14 天,黄韧带细胞开始从组织块迁出,细胞呈多种形态,主要为梭形和多角形,细胞接近融合时呈涡流状生长。传 1、3、5 代细胞生长曲线呈 S 形,同一代细胞在不同时间点的 OD 值差异有统计学意义($P<0.001$),同一时间点不同代次细胞的 OD 值无统计学差异($P>0.05$),细胞代次与时间点间无交互效应,各代细胞增殖状况无统计学差异($F=0.283, P=0.957$)。传 3 代细胞的波形蛋白和 I 型胶原免疫荧光染色呈阳性。**结论:**胶原酶预消化组织块培养法能有效分离成人黄韧带细胞;体外培养的黄韧带细胞呈成纤维细胞样表型,细胞在传 5 代以内生物学特性稳定。

【关键词】黄韧带;细胞培养;退行性变

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2010.01.14

中图分类号:R686.5, Q813.1 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2010)-01-0062-04

In vitro culture of adult human ligamentum flavum cells/ZHONG Zhaoming, ZHANG Yu, ZHA Dingsheng, et al/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2010, 20(1): 62~65

【Abstract】 Objective: To explore the culturing of human ligamentum flavum (HLF) cells in vitro. **Method:** HLF were harvested during surgery for thoracolumbar burst fractures. HLF cells were isolated by collagenase-predigested explants cultures. Under an inverted phase microscope, cells were examined for outgrowth, morphology and growth status. After 1~8 days' culturing, for HLF cells at the first, third and fifth passage (P1, P3, P5), the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-di-phenyltetrazolium bromide (MTT) method was used to analyze the cell proliferation by measuring the optical density (OD) values, and cell growth curves were drawn. Expressions of vimentin and type I collagen in cells of third passage were detected by immunofluorescence staining. **Result:** Within 10~14 days after explants, outgrowth of cells was observed from ligament tissue explants and became monolayer. Morphologically, HLF cell lines varied widely in appearance, and arranged mainly as spindle-shape and polygonal-shape. At subconfluence, cells showed vortex-like growth. S-shaped growth curve was shown in the P1, P3 and P5 cells. The OD values at different time points showed significant difference compared with the same passage cells ($P<0.001$). Significant differences in OD value was not found among the 3 different passage cells ($P>0.05$). No interaction effect was observed between cell passages and time points, the cell proliferation of the P1, P3 and P5 showed no significant difference ($F=0.283, P=0.957$). Immunofluorescence staining showed expression of vimentin and type I collagen. **Conclusion:** HLF cells can be successfully isolated by collagenase-predigested explant cultures. HLF cells in primary culture shows fibroblast-like phenotype. Biological characteristics of cells within 5 generations are stable.

【Key words】 Ligament flavum; Cell culture; Degeneration

【Author's address】 Department of Orthopedic and Spinal Surgery, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, 510515, China

第一作者简介:男(1976-),主治医师,医学博士,研究方向:脊柱外科

电话:(020)62787195 E-mail:zhongzhaoming@126.com

通讯作者:陈建庭 E-mail:chenjt99@tom.com

黄韧带起自第二颈椎下缘,止于第一骶椎上缘,连接脊柱邻位椎板,参与构成椎管后壁;是维持脊柱稳定和人体直立姿势,保护脊髓和马尾神经的重要结构之一。随着年龄增加,黄韧带会出现肥厚、钙化和骨化等退变现象。黄韧带退变是引起椎管狭窄、造成脊髓压迫的主要病因之一^[1,2],但其确切发病机制尚不清楚。本研究旨在探索成人黄韧带细胞体外培养方法及其生物学特性,为深入研究黄韧带退变的发病机制提供细胞实验模型。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器

优级胎牛血清(FBS),DMEM培养基(Gibco);四甲基偶氮唑盐(MTT),胰蛋白酶(Amresco);I型胶原酶,二甲基亚砜(DMSO)(Sigma);山羊抗I型胶原多克隆抗体(Santa);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(北京中杉金桥公司)。CO₂孵育箱(Heraeus),Formaclass A2生物安全柜(Thermo),倒置相差显微镜(Nikon),Biontek ELK 800酶标仪(Gene),LSM-510激光共聚焦显微镜(Carl Zeiss)。

1.2 标本来源与采集

成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4例因胸腰椎骨折行后路减压内固定手术的患者,年龄20~33岁,平均27.5岁。标本采集经患者和家属同意。无菌条件下取术中切除的黄韧带标本,生理盐水清洗血迹后用手术刀仔细剔除附着的骨质和外周脂肪组织,将标本移入25ml的血清瓶内,置于冰上迅速转移至实验室进行下一步处理。

1.3 细胞培养

参照文献^[3]报告的方法并加以修改,采用胶原酶预消化组织块培养法分离黄韧带细胞。每例患者的黄韧带标本分别用PBS液清洗2次,剪成约0.5mm的碎块,加入0.2%的I型胶原酶预消化90min,然后离心1000r/min,5min,弃消化液。消化后的组织块用PBS清洗,离心,重复3次。将组织块均匀贴附于培养皿中,置于37℃、5%CO₂、饱和湿度的孵箱中静置培养8h后,沿培养皿侧壁小心加入含10%FBS的DMEM培养液,继续培养。培养液在第5~7天后首次更换,随后每隔3d

更换1次。待组织块周围有大量细胞迁出后,摇动培养皿,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2~3d更换培养液1次。原代细胞生长至80%融合时,以1:2的比例进行传代培养。

1.4 细胞生长和形态观察

在倒置相差显微镜下观察原代、传代细胞的形态和生长状态,记录原代细胞从组织块迁出时间。

1.5 细胞增殖状态观测

采用MTT法检测细胞的吸光度(OD)值,评价细胞增殖状态^[4]。将1例患者的传1、3、5代(分别命名为P1、P3和P5)黄韧带细胞以 2.0×10^3 个/孔的密度接种于8块96孔板中,每块板分别接种各代细胞6个复孔,置于37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱内,待细胞完全贴壁后,每24h分别取一块板,向各孔中加入20μl MTT溶液,继续培养4h,随后终止培养,吸去孔内培养液,每孔加入150μl DMSO,室温下置摇床上低速振荡10min,使结晶物充分溶解,然后用酶联免疫检测仪在波长570nm处测量各孔的OD值,连续检测8d。根据MTT检测结果,绘制细胞生长曲线。

1.6 波形蛋白和I型胶原的检测

将每例患者的P3黄韧带细胞接种于预置盖玻片的6孔细胞培养板内,生长至70%融合时,取出盖玻片并用PBS洗5min×2次,盖玻片上的细胞经4.0%多聚甲醛溶液固定10min。倾去固定液,用PBS洗5min×3次,0.5% Triton 透化2min, PBS漂洗5min×2次。1%牛血清白蛋白(BSA)室温封闭30min后,倾去封闭液。每一盖玻片上的细胞加1:100稀释的小鼠抗波形蛋白单克隆抗体或山羊抗I型胶原多克隆抗体50μl孵育,用BSA作阴性对照,置入湿盒,在4℃震动,过夜。PBS洗5min×3次,分别用1:50稀释的FITC荧光标记的山羊抗小鼠IgG或兔抗山羊IgG,37℃避光孵育45min。PBS洗5min×3次,50%缓冲甘油封片,共聚焦显微镜下观察,绿色荧光表示波形蛋白和I型胶原呈阳性表达。

1.7 统计学分析

采用SPSS 16.0软件进行统计学处理,所有数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。不同代次细胞在不同时间点的OD值采用重复测量数据的方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞生长和形态观察

原代培养第 10~14 天,组织块周围开始有细胞迁出,随着培养时间增加,迁出细胞数量逐渐增多,细胞生长迅速(图 1a)。传代黄韧带细胞形态多样化,主要为梭形和多角形,细胞体积较大,其透明度及折光性强,胞体透亮,胞浆丰富,胞膜清晰,细胞核呈椭圆形,核仁明显(图 1b),细胞接近融合时呈涡流状生长(图 1c),连续传代培养至第 5 代(P5)仍保持良好的细胞形态。

2.2 传代细胞增殖与生长曲线

传代细胞 P1、P3、P5 接种后生长迅速,0~2d 为生长潜伏期;2~5d 细胞增生极为活跃,呈指数级递增,为对数增生期;此后细胞生长减缓,进入平台期,细胞生长曲线呈 S 形(图 2)。培养 1~8d 的细胞通过 MTT 检测的 OD 值见表 1,同一代细胞在不同时间点的 OD 值差异有统计学意义 ($P<0.001$);同一时间点不同代次细胞的 OD 值无统计学差异 ($P>0.05$);细胞代次与时间点间无交互

效应,各代细胞增殖状况无统计学差异 ($F=0.283, P=0.957$)。

2.3 波形蛋白和 I 型胶原的免疫荧光染色

所有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 3)。

表 1 成人黄韧带细胞体外培养不同时间点 MTT 检测的吸光度(OD)值 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

培养时间	细胞代次			F	P
	传 1 代	传 3 代	传 5 代		
1d	0.300±0.052	0.299±0.017	0.308±0.028	0.104	0.902
2d	0.294±0.032	0.289±0.289	0.289±0.028	0.072	0.931
3d	0.403±0.030	0.377±0.047	0.419±0.084	0.846	0.458
4d	0.545±0.058	0.567±0.126	0.589±0.059	0.977	0.410
5d	0.665±0.086	0.681±0.081	0.678±0.066	0.129	0.881
6d	0.671±0.103	0.678±0.032	0.675±0.031	0.017	0.983
7d	0.645±0.094	0.654±0.049	0.638±0.033	0.077	0.927
8d	0.608±0.081	0.636±0.047	0.620±0.026	0.275	0.765
F	38.103	50.571	64.506		
P	0.000	0.000	0.000		

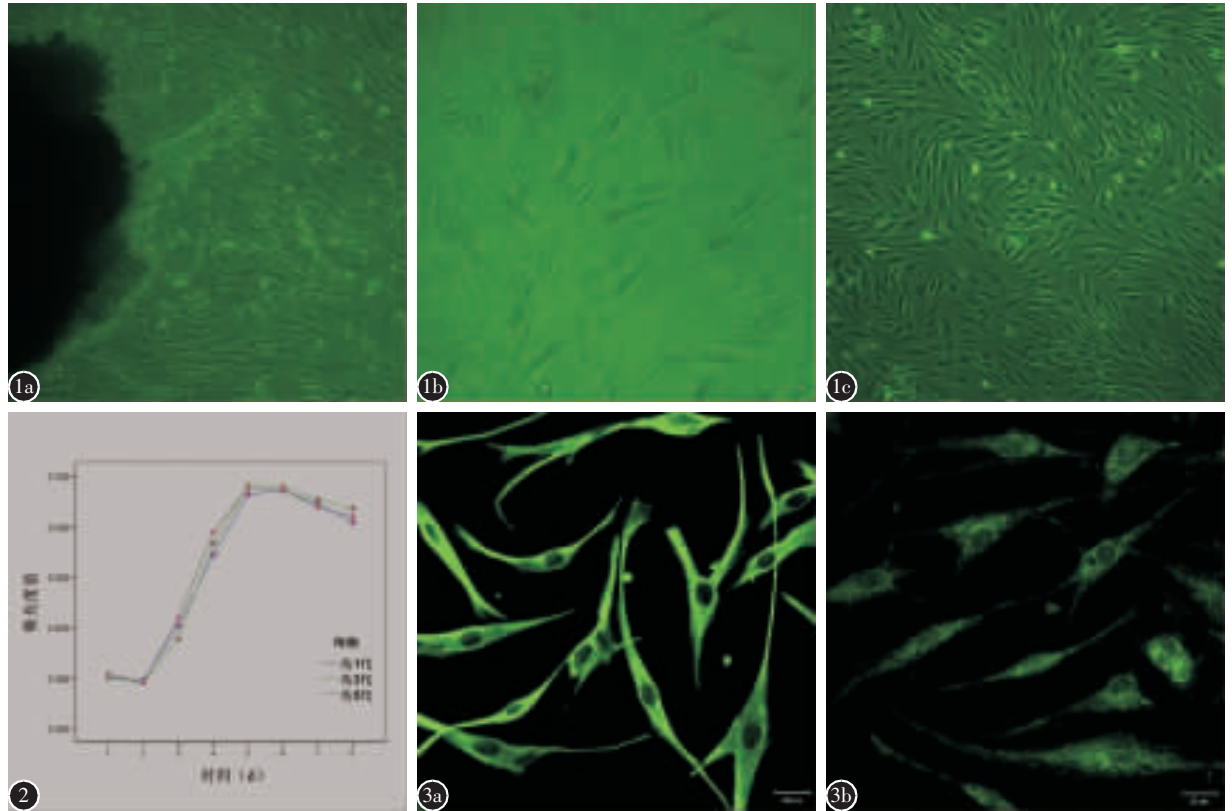


图 1 黄韧带细胞相差显微镜观察 a 黄韧带组织块培养 10~14d,细胞从组织块迁出(×10) b 传 3 代细胞形态多样化,主要为梭形和多角形(×20) c 细胞接近融合时呈漩涡样生长(×10) 图 2 传 1、3、5 代人黄韧带细胞的生长曲线 图 3 传 3 代黄韧带细胞免疫荧光染色(×400) a 波形蛋白免疫荧光染色阳性(绿色荧光) b I 型胶原阳性免疫荧光染色阳性(绿色荧光)

3 讨论

黄韧带是以弹性纤维为主的致密结缔组织,其结构特点是弹性纤维粗大,平行排列成束,胶原纤维夹杂其中,而细胞成分相对较少。黄韧带退行性变引起韧带肥厚、钙化或骨化,常导致椎管狭窄和神经压迫症状^[1,2]。黄韧带细胞的适应性和损伤性变化是黄韧带疾病发生的病理基础^[2]。体外细胞培养是研究黄韧带退变机制的重要实验手段之一。

原代培养是获取细胞的主要手段,其方法较多,最基本和最常采用方法包括酶消化法和组织块培养法。最近 20 年来,黄韧带退变疾病逐渐受到国内、外学者重视,采用体外培养黄韧带细胞的实验研究逐渐增加。Nakatani 等^[5]介绍了用胶原酶消化黄韧带组织获取黄韧带细胞的经验。然而,与酶消化法比较,组织块培养法在黄韧带细胞培养中的应用更为广泛^[3,6-8]。传统组织块培养方法是将剪碎的组织块直接贴附在培养瓶或培养皿上进行原代培养。黄韧带是致密结缔组织,其间质结构丰富,影响组织块贴附和细胞迁出,传统组织块培养方法易使黄韧带组织块漂浮失活。本研究采用改良的酶预消化组织块培养法,即将剪碎的组织块用酶短时间预消化,然后再植块培养。酶预消化组织块培养法可去除部分间质成分,使其结构松散,有利于细胞从组织块迁出^[4]。在我们的实验中观察到 I 型胶原酶预消化有利于组织块贴附,细胞迁出时间 10~14d,有利于人黄韧带细胞的分离与培养。

在原代培养过程中,我们观察到细胞在组织块培养大约 10~14d 开始迁出,形态多样化。传代细胞生长加快,细胞胞体增大,呈漩涡状走行。本研究采用 MTT 法检测传 1、3、5 代细胞增殖状况并绘制生长曲线,发现细胞生长曲线呈 S 型,符合正常细胞的生长特性。各传代细胞在各个时间点的 OD 值的重复测量数据的方差分析表明,细胞代次主效应和细胞代次与时间的交互效应均无统计学差异。说明原代培养的成人黄韧带细胞在传 5 代以内的细胞生物学特征稳定。传 5 代以后是否发生细胞表型和生物学特性改变需要进一步研究。

黄韧带起源于中胚层间叶组织,其细胞形态与其他中胚层间叶组织起源的细胞类似,有梭形、扇形或者多角形,这些细胞形态与成纤维细胞类似^[4]。波形蛋白是间充质细胞和中胚层来源细胞(如成纤维细胞)中的标记物。I 型胶原是成纤维细胞的主要细胞外基质。本研究使用免疫荧光染色方法对黄韧带细胞进行波形蛋白和 I 型胶原表达的检测,所有细胞均呈阳性染色。细胞形态和免疫荧光的结果提示黄韧带源细胞主要呈成纤维细胞样表型。

总之,胶原酶预消化组织块培养法能成功分离人黄韧带细胞。成人黄韧带细胞主要呈成纤维细胞样表型,在细胞传 5 代以内,其生物学特性稳定。建立体外培养的黄韧带细胞模型,为深入研究黄韧带退变的相关病理机制奠定了基础。

4 参考文献

1. 周方,党耕町.胸椎黄韧带骨化的基础与临床研究进展[J].中国脊柱脊髓杂志,2004,14(10):626-629.
2. Yoshida M,Shima K,Taniguchi Y,et al.Hypertrophied ligamentum flavum in lumbar spinal canal stenosis:pathogenesis and morphologic and immunohistochemical observation [J].Spine, 1992,17(11):1353-1360.
3. Specchia N,Pagnotta A,Gigante A, et al. Characterization of cultured human ligamentum flavum cells in lumbar spine stenosis[J].J Orthop Res,2001,19(2):294-300.
4. 程宝鸾.动物细胞培养技术[M].广州:华南理工大学出版社,2000.70-132.
5. Nakatani T,Marui T,Hitora T, et al. Mechanical stretching force promotes collagen synthesis by cultured cells from human ligamentum flavum via transforming growth factor-beta1 [J].J Orthop Res,2002,20(6):1380-1386.
6. 王哲,许汉鹏,王全平,等.退行性变黄韧带细胞的体外培养及初步鉴定[J].中国脊柱脊髓杂志,2004,14(4):237-240.
7. Fan D,Chen Z,Chen Y,et al. Mechanistic roles of leptin in osteogenic stimulation in thoracic ligament flavum cells [J].J Biol Chem,2007,282(41):29958-29966.
8. Moon SH,Park SR,Kim H,et al. Biologic modification of ligamentum flavum cells by marker gene transfer and recombinant human bone morphogenetic protein-2 [J].Spine,2004,29(9):960-965.

(收稿日期:2009-10-09 修回日期:2009-11-04)

(英文编审 蒋欣)

(本文编辑 李伟霞)