

基础研究

深低温保存温度及时间对椎间盘生物活性的影响

王超锋, 阮狄克, 张 超, 辛洪奎, 徐 成

(海军总医院骨科暨全军腰椎间盘突出病诊治中心 100048 北京市)

【摘要】目的:探讨深低温保存温度及保存时间对椎间盘生物活性的影响。**方法:**取 1 岁龄 Beagle 犬新鲜椎间盘 72 个, 分为对照组(A 组, $n=8$)、 -80°C 保存组(B 组, $n=32$)和 -196°C 保存组(C 组, $n=32$)。B 和 C 组在冷冻保存液中分别保存于 -80°C 低温冰箱及 -196°C 液氮中, 在保存 2w、2m、6m 及 12m 时每组每个时间点取 8 个椎间盘, 通过溴化吡啶/二乙酸荧光素(EB/FDA)荧光染色法检测椎间盘组织中不同部位的细胞存活率, 以二甲基亚甲蓝(DMMB)染色法检测髓核组织蛋白多糖(PG)含量, 以羟脯氨酸检测法测定纤维环组织中的总胶原含量; 对照组取标本后直接进行以上检测。**结果:**B 和 C 组椎间盘在保存至 2w 时各部位细胞存活率较 A 组明显下降, 2m~12m 保存期间, B、C 两组椎间盘各部位的细胞存活率均维持在相对恒定的水平, 但均较 2w 时下降; B 组及 C 组外层纤维环细胞存活率在保存 2w 和 2m 时无明显差别($P>0.05$), 在保存 6m 及 12m 时 C 组明显高于 B 组($P<0.05$); C 组内层纤维环及髓核组织细胞存活率在各检测时间点均明显高 B 组($P<0.05$)。B、C 两组在各检测时间点 PG 含量均较 A 组明显降低, 在保存 2m~12m 期间, C 组 PG 含量均高于 B 组($P<0.05$)。B、C 两组总胶原蛋白含量在保存期间随时间逐渐降低, 但两组间未见明显差异($P>0.05$)。**结论:**利用 -196°C 保存椎间盘组织, 无论在细胞总的存活率及 PG 含量上均优于 -80°C 保存; -196°C 保存 12 个月时椎间盘细胞存活率及 PG 含量均维持在相对稳定的水平, 能满足同种异体椎间盘移植的要求。

【关键词】椎间盘; 深低温保存; 细胞活性; 细胞存活率

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2011.05.03

中图分类号: R318 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2011)-05-0365-05

Effects of storage temperatures and times on cell viability of cryopreserved intervertebral disc/WANG Chaofeng, RUAN Dike, ZHANG Chao, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2011, 21 (5): 365~369

【Abstract】 Objective: To investigate effects of different storage temperatures and times on cell viability of cryopreserved intervertebral disc and to obtain the optimal storage condition. **Method:** 72 fresh canine intervertebral discs were divided into control group (group A, $n=8$), -80°C group (group B, $n=32$) and -196°C group (group C, $n=32$). The intervertebral discs in group B and C were immersed into the freezing preservation medium and stored in -80°C low temperature refrigerator and liquid nitrogen respectively. At each time-point of the 2nd week, 2nd month, 6th month and 12th month, the survival ratio of different position at disc was detected by EB/FDA, the proteoglycans (PG) content of nucleus pulposus (NP) tissue was detected by DMMB, and the collagen content was detected by hydroxyproline. **Result:** The survival ratio of cell in group A was higher than that in group B and C at any time-points. Moreover, the survival ratios of cell in group B and C remained in a lower level. At 2th week and 2th month, the survival ratio in outer layer annulus fibrosus did not differ significantly in group B and C ($P>0.05$). At the 6th month and 12th month, the survival ratio in outer layer annulus fibrosus in group B was higher than that in group C ($P<0.05$). The survival ratio in inner layer annulus fibrosus and nucleus pulposus in group B was higher than that in group C at any time-point ($P<0.05$). The PG content reduced gradually in 2-month storage. While from the 2nd to 12th storage month, the PG content in group C was higher than that in group B ($P<0.05$). The collagen content in both groups showed no difference ($P>0.05$). **Conclusion:** Both the ratio of cell survival and PG content of intervertebral disc

基金项目: 国家自然科学基金(重点)资助项目(编号: 30730095)

第一作者简介: 男(1978-), 主治医师, 医学博士, 研究方向: 脊柱外科

电话: (010)68780323 E-mail: fengwcf2007@163.com

通讯作者: 阮狄克

stored in liquid nitrogen are higher than those in -80°C . During 1 year storage in liquid nitrogen, the ratio of cell survival and PG content maintain stably, which is suitable for allogenic transplantation.

【Key words】 Intervertebral disc; Cryopreserve; Cytoactive; Survival ratio of cell

【Author's address】 Department of Orthopaedic Surgery, Navy General Hospital, Beijing 100048, China

椎间盘退变是引起成人腰腿痛、颈肩痛的主要原因。目前的保守治疗和外科手术治疗均不能从根本上解决患者的病情。动物实验及临床初步应用证明,同种异体椎间盘移植后可以存活,虽然在生化代谢及组织学上有退行性改变,但就生物力学方面而言可满足生理活动需要^[1,2]。为了最大限度降低椎间盘移植后退变的发生,有必要明确深低温保存的温度及时间对椎间盘生物活性的影响,以获得对临床具有指导意义的保存温度及时间,为同种异体椎间盘的移植奠定基础。本研究拟将纯种 Beagle 犬的椎间盘在不同保存温度下及在不同的保存期之后,通过检测髓核及纤维环细胞的细胞存活率、髓核蛋白多糖(PG)及纤维环胶原含量等的改变,探讨深低保存时间及温度对椎间盘生物活性的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物及试剂

纯种 1 岁龄雄性 Beagle 犬 8 只,体重 $11.4 \pm 1.2\text{kg}$,由海军总医院实验中心提供。DMEM/F12 (1:1)培养基、胎牛血清(FBS)购自 Hyclone;二甲亚砜(DMSO)购自 Ameriscan 公司;溴化吡啶(EB)、二乙酸荧光素(FDA)购自索来宝公司;二甲基亚甲蓝(DMMB)、木瓜酶购自 Sigma 公司;蛋白质定量试剂盒购自南京建成生物有限公司。

1.2 椎间盘的采集与分组

无菌条件下处死 Beagle 犬,将胸椎及腰椎周围软组织剔除,咬除椎板及椎弓根,离断肋骨小头。自椎间盘上下两侧各约 2~3mm 处用钢锯截断,边锯边用 4°C 生理盐水冲洗,防止产生的热量损伤软骨终板。每一个合格的椎间盘标本包括:髓核、纤维环、软骨终板和两端约 0.5mm 软骨下板。共获得 72 个样本。椎间盘取出后用生理盐水反复冲洗,立即放入 50ml 离心管(Constar)中,加入含 10% FBS 和 DMSO 的 DMEM/F12(1:1)的培养基。取 8 个椎间盘样本直接进行相关指标检测作为对照组(A 组),剩余椎间盘立即置入 4°C 冰箱中过夜,过夜后依次置入 -20°C 、2h, -40°C 、2h, -80°C 、2h,之后将样本随机均分为两组,每组 32 个样本,

其中一组继续置入 -80°C 冰箱中保存(B 组),另一组置入 -196°C 液氮罐中保存(C 组)。

1.3 生物活性检测

A 组取样本后,B 组和 C 组在保存 2w、2m、6m 和 12m 时每组各 8 个样本于 37°C 水浴箱中复温后,将椎间盘一分为二,一半行冰冻切片检测细胞存活率;另一半取出髓核组织进行蛋白多糖(PG)检测,取纤维环部分进行胶原含量的检测。

1.3.1 细胞存活率检测 将椎间盘行横断面冰冻切片,片厚 $30\mu\text{m}$ 。每个标本取 3 张切片,加入 5mg/L 的 EB 和 50mg/L 的 FDA 各 $20\mu\text{l}$,加盖玻片,放入 37°C 恒温箱中避光孵育 10min。然后在荧光显微镜下观察细胞膜的完整性:胞膜完整的细胞被 FDA 染为绿色,胞膜破裂的细胞被 EB 染为橙红色。在荧光显微镜下计数每高倍视野内绿染及橙红染的细胞数。细胞存活率=绿染细胞数/(绿染细胞数+橙红染细胞数) $\times 100\%$ 。计数时将纤维环分为外层纤维环和与髓核相接的内层纤维环,每部分各计数 5 个视野,取均数;髓核组织选取 5 个视野计数。

1.3.2 髓核组织 PG 含量检测 采用 DMMB 染色检测法测定髓核组织中蛋白多糖含量:将髓核组织取出后定量,分为两等份,一份烤干后称重,另一部分用眼科剪剪成 1mm^3 大小组织,加不含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 浓度为 30mg/ml 的木瓜酶溶液 10ml,置于 60°C 孵箱中消化 12h,以 1500r/min 离心 5min。取上清 $150\mu\text{l}$,加入含有标准不同浓度硫酸糖胺多糖(S-GAG)的 96 孔板中,用多头加样枪同时加入 50mg/L 的 DMMB 显色 1min 后,立即在 650nm 的酶标仪上测吸光度。绘制标准曲线,并计算组织中的 PG 含量。换算为总量后,与另一部分干重组织相比,即为组织中 PG 含量,单位为 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (干重)。

1.3.3 纤维环胶原含量检测 采用羟脯氨酸检测法测定纤维环中的胶原含量,具体操作按羟脯氨酸检测试剂盒说明书进行:取定量纤维环组织,剪成 1mm^3 大小组织,加入碱性水解液,沸水中水浴 20min,调整 pH 值为 6~6.8,加入活性炭后,以 3500r/min 离心 20min,取上清,加入检测液后混

匀, 60℃ 水浴 15min, 冷却后 3500r/min 离心 10min, 取上清, 550nm、1cm 光径比色, 蒸馏水调零, 测吸光度(A)。根据所测吸光度值计算羟脯氨酸含量: 羟脯氨酸含量($\mu\text{g/ml}$) = $(A_{\text{测定管}} - A_{\text{空白管}}) / (A_{\text{标准管}} - A_{\text{空白管}}) \times \text{标准管含量} (5\mu\text{g/ml}) \times \text{水解液总体积}(\text{ml}) / \text{取样量}(\text{ml})$ 。由于胶原中羟脯氨酸含量为 13.4%, 所以总胶原蛋白 ($\mu\text{g/ml}$) = 羟脯氨酸/13.4%。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理, 多组间数据比较采用方差分析, 两组间数据比较采用 t 检验, 不同时间点间数据分析采用方差分析中的 q 检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 椎间盘细胞存活率

荧光显微镜下椎间盘各部位均有被 FDA 染为绿色和 EB 染为橙红色的细胞(图 1)。对照组椎间盘内、外层纤维环细胞存活率分别为 83% 和

81%, 髓核组织细胞存活率为 84%, 三个部位的细胞存活率无显著性差异($P > 0.05$)。B 和 C 组各时间点椎间盘不同部位的细胞存活率见表 1。两组椎间盘保存至 2w 时, 细胞存活率较对照组下降; 2m 时进一步下降, 6m 和 12m 时与 2m 时无显著性差异; B 组及 C 组外层纤维环细胞存活率在保存 2w 和 2m 时无显著性差异($P > 0.05$), 在 6m 及 12m 时, C 组明显高于相应时间点 B 组($P < 0.05$); C 组内层纤维环和髓核细胞存活率在各时间点均明显高于相应时间点 B 组($P < 0.05$)。

2.2 髓核组织 PG 含量和纤维环组织胶原含量

A 组髓核组织中 PG 含量为 $148 \pm 8 \mu\text{g/mg}$, 纤维环组织中胶原蛋白含量为 $22.0 \pm 1.4 \mu\text{g/mg}$; B、C 组不同时间点髓核组织中 PG 和纤维环组织中胶原蛋白含量见表 2。保存至 2w 时 B、C 组 PG 含量与 A 组无显著性差异($P > 0.05$), 在 2m 时, B、C 组与 A 组比较均出现明显下降($P < 0.05$), 2m~12m 时 B 和 C 组均较 2w 时降低, 但能维持在一个恒定含量。保存 2w 时 B 组与 C 组之间无显著性差

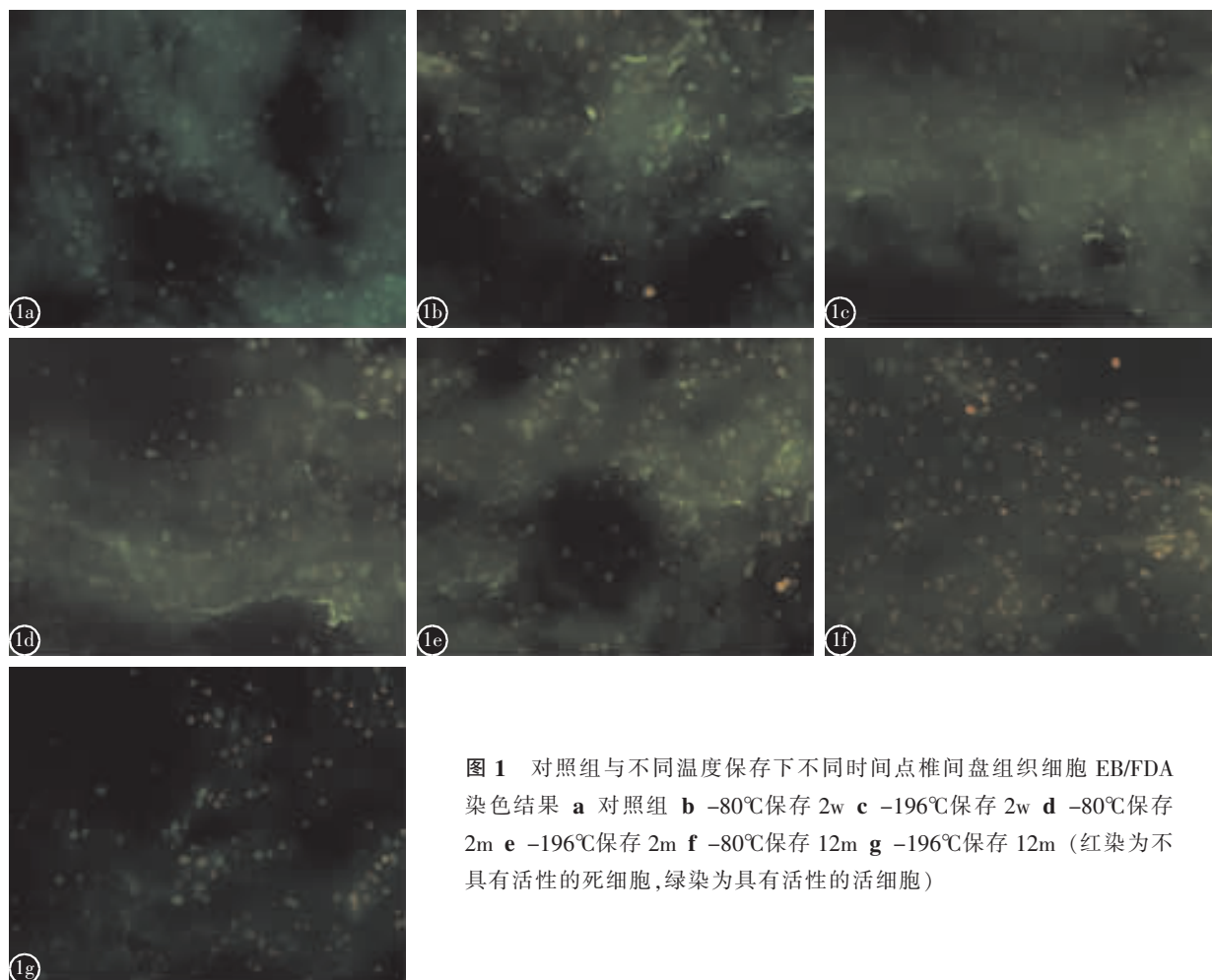


图 1 对照组与不同温度保存下不同时间点椎间盘组织细胞 EB/FDA 染色结果 a 对照组 b -80℃ 保存 2w c -196℃ 保存 2w d -80℃ 保存 2m e -196℃ 保存 2m f -80℃ 保存 12m g -196℃ 保存 12m (红染为不具有活性的死细胞, 绿染为具有活性的活细胞)

异($P>0.05$);保存至 2~12m 时,B 组 PG 含量与 C 组有显著性差异($P<0.05$),C 组高于 B 组。B、C 组保存 2w 和 2m 时纤维环胶原含量明显降低,与 A 组比较有统计学差异($P<0.05$),2m 时较 2w 有明显的降低($P<0.05$),保存至 6m 和 12m 时,与 2m 时比较无明显差异($P>0.05$);B 组与 C 组相同时间点比较无显著性差异($P>0.05$)。

表 1 -80℃与-196℃保存不同时间点椎间盘不同部位的细胞存活率 ($\bar{x}\pm s, n=8, \%$)

保存时间	-80℃保存组(B 组)			-196℃保存组(C 组)		
	外层纤维环	内层纤维环	髓核	外层纤维环	内层纤维环	髓核
2w	70±4	56±4	57±4	71±6	65±3 ^①	67±3 ^①
2m	61±2	41±2	42±3	63±3	45±3 ^①	46±3 ^①
6m	58±3	41±5	39±3	65±4 ^①	47±6 ^①	44±5 ^①
12m	54±4	38±4	40±3	63±1 ^①	44±3 ^①	43±5 ^①

注:①与-80℃保存组相同时间点相同部位比较 $P<0.05$

表 2 -80℃与-196℃保存不同时间点髓核组织蛋白多糖(PG)和纤维环胶原含量 ($\bar{x}\pm s, n=8, \mu\text{g}/\text{mg}$)

保存时间	髓核 PG 含量		纤维环胶原含量	
	-80℃组	-196℃组	-80℃组	-196℃组
2w	150±9	147±12	21.3±1.5	21.6±1.4
2m	118±4	126±5 ^①	19.3±1.0	19.2±1.4
6m	118±11	130±14 ^①	19.2±1.5	19.6±1.4
12m	112±8	124±6 ^①	18.9±1.5	18.8±1.6

注:与-80℃保存组相同时间点相同部位比较 $P<0.05$

3 讨论

随着人均寿命的延长,生活节奏的加快及工作压力的加大,脊柱退变性疾病的发病率明显升高,发病年龄趋于年轻化^[3]。由椎间盘退变所致的椎间盘突出症、椎管狭窄症以及腰椎滑脱症等是骨科临床常见、多发病,每年有数百万的患者因椎间盘退变性疾病而就诊。由于发病率高,对患者影响大,几十年来一直受到临床医师和基础医学研究者的广泛重视。

由于目前的治疗存在诸多问题,研究者试图找到更加有效的治疗方法。椎间盘的生物治疗是目前研究最多的新技术,包括生长因子、基因治疗及细胞治疗技术等^[4-6]。椎间盘移植治疗也是其中的一种。阮狄克等^[1-2]研究了新鲜椎间盘移植在恒河猴体内的存活及功能,发现自体椎间盘移植后可保留部分椎间盘的功能;进一步研究冷冻的新鲜异体椎间盘移植在恒河猴体内的存活及功能发现,保存温度及保存液对椎间盘的功能有很大影

响,且冷冻保存的椎间盘具有免疫保护作用。Convery 等^[7]的研究也发现新鲜移植的软骨组织免疫原性比冷冻后的要高。Matsuzaki 等^[8]也曾利用犬模型研究异体椎间盘移植,发现在-196℃保存的椎间盘细胞损害较-80℃保存下轻,且未发现免疫排斥的证据。Ruan 等^[9]在动物实验研究的基础上于 2000 年开始了人冷冻保存同种异体椎间盘移植的临床观察,Ⅰ期临床应用结果显示移植椎间盘保留了生理活动度和稳定性,但 MRI 检查仍然发现移植椎间盘有部分退变。针对长期随访中出现的移植椎间盘退变性问题,我们试图从椎间盘的保存条件方面进行优化,以最大限度延缓移植间盘的退变。

新鲜的椎间盘组织能最大程度地保留其生物活性,但同时也存在较高的免疫排斥反应,由于椎间盘供者不可能总是在受体需要时及时提供椎间盘,因此新鲜同种异体椎间盘移植在临床上难以开展;而将椎间盘预先保存,在患者需要时可以随时提供,将能解决供需不同步的问题。然而许多研究者^[8,10-13]发现,大块组织在低温保存后组织细胞的活性会明显减低,且保存时间越长,其活性降低越显著。由于椎间盘的冷冻保存研究较少,而且所采用的冷冻过程、保存温度都不尽相同,研究的时限也不一致,因此对于椎间盘的保存指导作用较小。为了能使椎间盘组织在椎间盘退变性疾病生物治疗中发挥更好的作用,从临床应用角度出发,找出相对适合的保存温度,及在多长的保存期内椎间盘的生物活性下降是临床应用可以接受的,成了亟须解决的问题。

本研究结果显示,无论在-196℃还是-80℃保存条件下,同对照组相比,细胞活性在前 2w 有明显降低,且在前 2m 的保存期内,外层纤维环的细胞活性在两组间没有明显区别,而在 6m 和 12m 时存在明显的差异。可见-196℃保存组椎间盘外层纤维环的细胞存活率明显高于-80℃低温保存组;在 12m 的保存期间,均可见到-196℃保存组的内层纤维环及髓核细胞存活率明显高于-80℃保存组。而每组间均可观察到外层纤维环细胞活性较同期内层纤维环及髓核组织高,内层纤维环同髓核组织细胞活性无明显差别。综合 PG 及总胶原蛋白含量变化可以发现,椎间盘的生物活性在保存至 2w 时,与对照组相比较-196℃保存组椎间盘生物活性迅速下降,而在 2m 时仍可观察

到生物活性缓慢降低,自 2m 至 12m 的保存期内生物活性比较稳定。在整个保存期间可观察到-196℃保存组的生物活性要高于-80℃保存组。

外层纤维环活性高于内层纤维环及髓核组织可能是因为冷冻保存液的作用。Matsuzaki 等^[8]的研究发现了同样的结果,即在冷冻保存时,有冷冻保存液的纤维环组织较没有保存液的纤维环组织活性明显提高,且活性提高部分仅限于冷冻保存液能浸及的部位。进一步实验发现冷冻保存时椎间盘浸入保存液后,保存液仅能渗透入外层纤维环表面层,远不能满足保存要求。提示在冷冻保存时可以通过提高冷冻保存液在椎间盘组织中渗透厚度,以最大限度地保存椎间盘组织的生物活性。

从 PG 检测结果发现,两组保存至 2w 时,PG 含量和对照组没有明显差异,两组之间也无差异,但是在保存至 2m 时,PG 含量明显下降,且-80℃组下降较-196℃组明显。如此的结果可能说明在保存的最初 2w,PG 含量未受到细胞存活率变化的影响,而在 2w 后,随着细胞的死亡,PG 的代谢与合成出现负平衡,导致 PG 含量随时间下降,但是当保存超过 2m 时,存活的细胞百分率基本恒定,PG 的合成与降解又在一个较低的水平重新达到平衡,而且-80℃组髓核细胞在前 2w 死亡率较高,这就导致了 PG 合成与降解在一个更低的水平达到平衡,也就导致了后期检测中观察到的-196℃组 PG 含量明显较高的现象,从而出现两组自 2m 起各检测时间点 PG 含量有明显差异的现象。

-196℃及-80℃保存组在 2w 至 2m 保存期间均可见纤维环总胶原蛋白含量明显降低,且呈逐渐降低趋势,而从 2m 至 12m 保存期间,总胶原蛋白含量各时间点未见明显变化。两组间各时间点总胶原蛋白含量均未见明显差别。由此可见,无论是-196℃保存还是-80℃保存,椎间盘内总胶原蛋白含量均有明显降低,但两种保存方法对胶原蛋白含量的影响却没有显著性差异。

综上所述,利用-196℃及-80℃低温保存椎间盘时,保存前 2m 椎间盘各组织的生物活性逐渐降低,但从 2m~12m,生物活性基本稳定;-196℃保存组无论在细胞总的存活率及 PG 含量上均优于-80℃保存组。在 12m 的保存期间,-196℃保存

的椎间盘细胞存活率及 PG 含量均维持在一个相对较低的恒定水平,可用于椎间盘移植。然而对于其在体内的生物学活性变化需要在体实验进一步深入研究。

4 参考文献

1. Luk KD, Ruan DK, Lu DS, et al. Fresh frozen intervertebral disc allografting in a bipedal animal model [J]. Spine, 2003, 28 (9): 864-869.
2. 阮狄克, 沈根标. 同种异体椎间盘移植的实验研究[J]. 中华骨科杂志, 1996, 16(8): 511-516.
3. 胡有谷. 腰椎间盘突出症[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 4.
4. Takegami K, Thonar EJ, An HS, et al. Osteogenic protein-1 enhances matrix replenishment by intervertebral disc cells previously exposed to interleukin-1 [J]. Spine, 2002, 27 (12): 1318-1325.
5. Sakai D, Mochida J, Yamamoto Y, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells embedded in atelocollagen gel to the intervertebral disc: a potential therapeutic model for disc degeneration [J]. Biomaterials, 2003, 24(20): 3531-3541.
6. Sakai D, Mochida J, Iwashina T, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells transplanted to a rabbit degenerative disc model: potential and limitations for stem cell therapy in disc regeneration [J]. Spine, 2005, 30(21): 2379-2387.
7. Convery FR, Akeson WH, Amiel D, et al. Long-term survival of chondrocytes in an osteochondral articular cartilage allograft [J]. J Bone Joint Surg Am, 1996, 78(7): 1082-1088.
8. Matsuzaki H, Wakabayashi K, Ishihara K, et al. Allografting intervertebral discs in dogs: a possible clinical application [J]. Spine, 1996, 21(2): 178-183.
9. Ruan DK, He Q, Ding Y, et al. Intervertebral disc transplantation in the treatment of degenerative spine disease: a preliminary study [J]. Lancet, 2007, 369(3): 993-999.
10. Flynn J, Rudert MJ, Olson E, et al. The effects of freezing or freeze-drying on the biomechanical properties of the canine intervertebral disc [J]. Spine, 1990, 15(6): 567-570.
11. Frick SL, Hanley EN, Meyer RA, et al. Lumbar intervertebral disc transfer: a canine study [J]. Spine, 1994, 19 (16): 1826-1834.
12. Katsuura A, Hukuda S. Experimental study of intervertebral disc allografting in the dog [J]. Spine, 1994, 19 (21): 2426-2432.
13. Olson EJ, Hanley EN, Rudert MJ, et al. Vertebral column allografts for the treatment of segmental spine defects: an experimental investigation in dogs [J]. Spine, 1991, 16(9): 1081-1088.

(收稿日期: 2011-01-26 修回日期: 2011-03-04)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 卢庆霞)