

渗透压负荷对兔椎间盘器官培养模型的影响

牛朋彦,熊 伟,李 锋,周 松,陈文坚,霍喜卫

(华中科技大学同济医学院附属同济医院骨科 430030 武汉市)

【摘要】目的:建立一种可用于体外研究椎间盘退变的椎间盘器官培养模型,探讨渗透压负荷对模型椎间盘细胞活力和代谢的影响。**方法:**4~6 月龄新西兰大白兔 10 只,均分为两组,处死后立即手术切取胸腰段椎间盘,每只 9 个,分别在等渗(300mOsm/kg,等渗组)或高渗(410mOsm/kg,高渗组)培养基中进行整体器官培养,在培养前和培养后第 7、14、21、28 天,利用 Mitotracker Green 荧光探针、组织化学和生物化学方法评估两组椎间盘髓核细胞的活力、结构的完整性以及蛋白多糖含量的变化。**结果:**取材后培养前椎间盘髓核细胞的荧光强度为 11503 ± 402 ,在体外培养过程中,高渗组第 14 天荧光强度为 9202 ± 907 ,与培养前比较差异有显著性意义($P < 0.05$),第 7、21 和 28 天分别为 10504 ± 710 、 10860 ± 711 、 10713 ± 953 ,与培养前相比较无显著性差异($P > 0.05$);等渗组第 7、14、21、28 天分别为 11350 ± 351 、 11207 ± 385 、 10914 ± 300 、 10862 ± 229 ,与培养前比较无显著性差异($P > 0.05$);两组在第 7、21 和 28 天时无显著性意义($P > 0.05$)。在培养过程中,两组椎间盘髓核和纤维环的组织结构能够基本保持完整,髓核蛋白多糖含量在培养第 7 天高渗组和等渗组分别为 $3.33 \pm 0.28 \text{mg}/100 \text{mg}$ 和 $2.83 \pm 0.25 \text{mg}/100 \text{mg}$,均较培养前($5.03 \pm 0.37 \text{mg}/100 \text{mg}$)明显降低($P < 0.01$),第 14、21、28 天时与第 7 天相比下降不明显($P > 0.05$),两组相同时间点的差异无显著性意义($P > 0.05$)。**结论:**椎间盘器官培养模型可以在等渗或高渗环境中有效维持兔椎间盘结构的完整性和髓核细胞的活力至少 4 周。

【关键词】椎间盘退变;器官培养模型;渗透压;细胞活力;蛋白多糖;兔

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2009.10.05

中图分类号:Q813.1,R681.5 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2009)-10-0729-06

Influence of osmotic loading on organ culture model for rabbit intervertebral disc/NIU Pengyan, XIONG Wei, LI Feng, et al/Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2009, 19(10): 729~734

【Abstract】Objective: To develop an organ culture model of rabbit intervertebral disc in vitro and investigate effects of osmotic loading on cell viability and metabolism of the discs. **Method:** Thoracolumbar and lumbar intervertebral discs were harvested immediately after sacrifice from 10 New Zealand white rabbits (4~6 months old, $n=9/\text{animal}$), which were divided into two groups. The intervertebral discs were maintained in organ culture with iso-osmotic (300mOsm/kg, iso-osmotic group) or hyperosmotic (410mOsm/kg, hyperosmotic group) media. Cell viability, structural integrity and proteoglycan content were assessed using Mitotracker Green probe, histochemical and biochemical methods before culture and on 7, 14, 21, 28 days after culture. **Result:** The fluorescence intensity of fresh intervertebral disc was the maximum (11503 ± 402) before the culture. During organ culture in vitro, there was a significant decrease in fluorescence in the hyperosmotic group on 14 days (9202 ± 907) ($P < 0.05$) compared to that prior to culture, the fluorescence intensity of hyperosmotic group on 7, 21 and 28 days were 10504 ± 710 , 10860 ± 711 and 10713 ± 953 respectively. The fluorescence yield on 7, 14, 21 and 28 days of iso-osmotic group were 11350 ± 351 , 11207 ± 385 , 10914 ± 300 and 10862 ± 229 , and there was no significant difference compared to fresh intervertebral disc ($P > 0.05$). There was no significant change in fluorescence yield on 7, 21 and 28 days between two groups ($P > 0.05$). In the culture, the nucleus pulposus and annulus fibrosus maintained the structural characteristics of the intact tissue on the whole. There was a significant decrease of proteoglycans in both hyperosmotic group (3.33 ± 0.28) and iso-osmotic group (2.83 ± 0.25) on 7 days culture time compared to fresh intervertebral disc (5.03 ± 0.37) ($P < 0.01$). There was no additional loss of proteoglycans

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:30772206)

第一作者简介:男(1981-),硕士研究生,研究方向:脊柱外科

电话:(027)83663412 E-mail:jack291@yahoo.cn

通讯作者:李锋 E-mail:fengli@tjh.tjmu.edu.cn

was detected on 14, 21 and 28 days than on day 7 ($P>0.05$). No significant difference in proteoglycan content was found between two groups on the same period ($P>0.05$). **Conclusion:** Organ culture model of intervertebral discs could preserve organ integrity and cell viability at least 4 weeks under iso-osmotic or hyperosmotic loading.

【Key words】 Intervertebral disc degeneration; Organ culture model; Osmotic; Cell viability; Proteoglycan; Rabbit

【Author's address】 Department of Orthopaedics, Tongji Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, 430030, China

动物模型常被用于研究椎间盘退变的病理生理机制和探索相关的治疗方法。无论是活体动物模型^[1]还是离体的椎间盘细胞培养模型都面临着体内细胞和基质代谢的复杂级联反应或体外细胞分化、活力丧失等问题^[2]。在生物化学和生物力学调控方面, 体外培养模型更具有吸引力。许多体外研究都通过人工建立的三维环境来研究椎间盘细胞的生物学行为^[3]。在这些研究中, 细胞均被从椎间盘自身的三维环境中移出, 并进行传代培养。但这个过程对细胞生物学行为有何影响以及细胞对这些刺激有何反应仍然未知^[4]。本研究拟建立一种体外的椎间盘器官培养模型, 利用椎间盘自身的三维结构和可调控的培养条件, 将完整的椎间盘在体外进行整体培养, 并观察渗透压负荷对椎间盘细胞活力和代谢的影响, 为进一步研究椎间盘的代谢和退变提供条件。

1 材料与方法

1.1 实验动物及模型制作

4~6 月龄雌性新西兰大白兔 10 只, 体重 4~5 kg (同济医科大学实验动物中心提供), 随机分为两组 (每组 5 只)。麻醉后, 静脉给予 25000 IU 肝素钠。5 min 后静脉注射致死量的戊巴比妥钠 (100 mg/kg) 处死, 立即在无菌条件下将胸腰段脊柱整段取出, 在无菌台内完整切取椎间盘, 每只 9 个, 包括髓核 (nucleus pulposus, NP)、纤维环 (anulus fibrosus, AF) 及上下软骨终板 (endplate, EP)。用带有 18 号针头的无菌注射器吸取 D-Hank's 液冲洗椎间盘表面的碎屑及终板上的血凝块, 置于含 10% 青霉素-链霉素 (1000 U/ml 青霉素, 1 mg/ml 链霉素) 的 Hank's 平衡溶液 (HBSS 液) 中漂洗 2 min 后放入 6 孔细胞培养板。其中一组加入标准 DMEM/F12 培养基 (含 20% 胎牛血清、5 ng/ml TGF- β 1、25 μ g/ml 抗坏血酸以及 50 μ g/ml 庆大霉素) 后, 用 NaCl 将渗透压调整到 410 mOsm/kg (高渗组); 另一组加入 DMEM/F12 培

养基后调整渗透压为 300 mOsm/kg (等渗组)。两组均置于 5% CO₂、37℃ 恒温培养箱进行整体培养, 每天更换培养液。分别在培养前和培养后第 7、14、21、28 天, 两组各取相同节段的 3 个椎间盘分别进行髓核细胞活力测定、组织学观察和蛋白多糖含量测定。

1.2 细胞活力测定

在相应时间点两组各取 3 个椎间盘, 用 HBSS 液漂洗两次后, 放入已加入 Mitotracker Green (Molecular Probes, Eugene, OR) (5 μ mol/L) 的无血清培养基中, 37℃ 共孵育 1 h。然后, 将椎间盘放入不含荧光染料的新鲜培养基中孵育 1 h, 以除去未结合的荧光染料。尖刀切开椎间盘纤维环, 用无菌小刮匙将髓核刮出, 浸入载玻片上的 HBSS 液 (50 μ l) 中, 盖上盖玻片。用荧光显微镜进行观察, 椎间盘中有活力的髓核细胞因被 Mitotracker Green 染色而发出绿色荧光。

1.3 组织学观察

在相应时间点两组各取 3 个椎间盘, 将椎间盘用 4% 多聚甲醛固定过夜, EDTA 脱钙后行石蜡包埋、切片, 片厚 4 μ m, 脱蜡至蒸馏水。切片行阿利新蓝和苏木紫/伊红 (HE) 双重染色。脱水、透明、中性树胶封片, 倒置显微镜下观察拍片。

1.4 髓核蛋白多糖含量测定

在相应时间点两组各取 3 个椎间盘, 称重后用尖刀沿纤维环切开, 分离出髓核组织, 放入离心管中, 加入 3% NaOH 1.0 ml, 置于恒温振荡器中振荡 3 h, 温度控制在 40℃。用 HCl 调整溶液的 pH 值至 8~9。加入 100 μ l 胰蛋白酶 (100 mg/ml), 恒温振荡器中振荡酶解 2 h, 温度控制在 50℃。将酶解液用蒸馏水稀释至 10 ml, 摇匀后取 1 ml, 采用间苯三酚分光光度法^[5]测定光密度值, 转换为量值作为蛋白多糖含量。

1.5 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组数据之间比较用 t 检验, 多组数据两两比较采用 q 检验。 $P<0.05$ 为

差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞活力

Mitotracker Green 荧光测定显示, 培养前兔椎间盘髓核细胞数量较多、活力较好, 表现出较高的荧光强度(图 1a)。体外培养至第 7 天时, 两组髓核细胞的荧光强度较培养前变化均不是很明显。第 14 天时高渗组髓核细胞荧光强度出现降低(图 1b), 等渗组荧光强度也略有下降, 但不如高渗组那么明显(图 1c)。第 21 天时高渗组荧光强

度有所恢复, 而等渗组髓核细胞荧光强度下降仍不是很明显, 到第 28 天时两组的荧光强度相近(图 1d、1e)。两组髓核细胞不同时期 Mitotracker Green 荧光定量测定结果见表 1。其中高渗组在培养至第 14 天时荧光强度较培养前降低约 20%, 与培养前和等渗组相同时间点比较差异有显著性($P<0.05$)。培养至第 7 天、第 21 天和第 28 天时高渗组和等渗组荧光强度与培养前相比较无显著性差异($P>0.05$), 两组相同时间点比较无显著性差异($P>0.05$)。

2.2 组织学观察

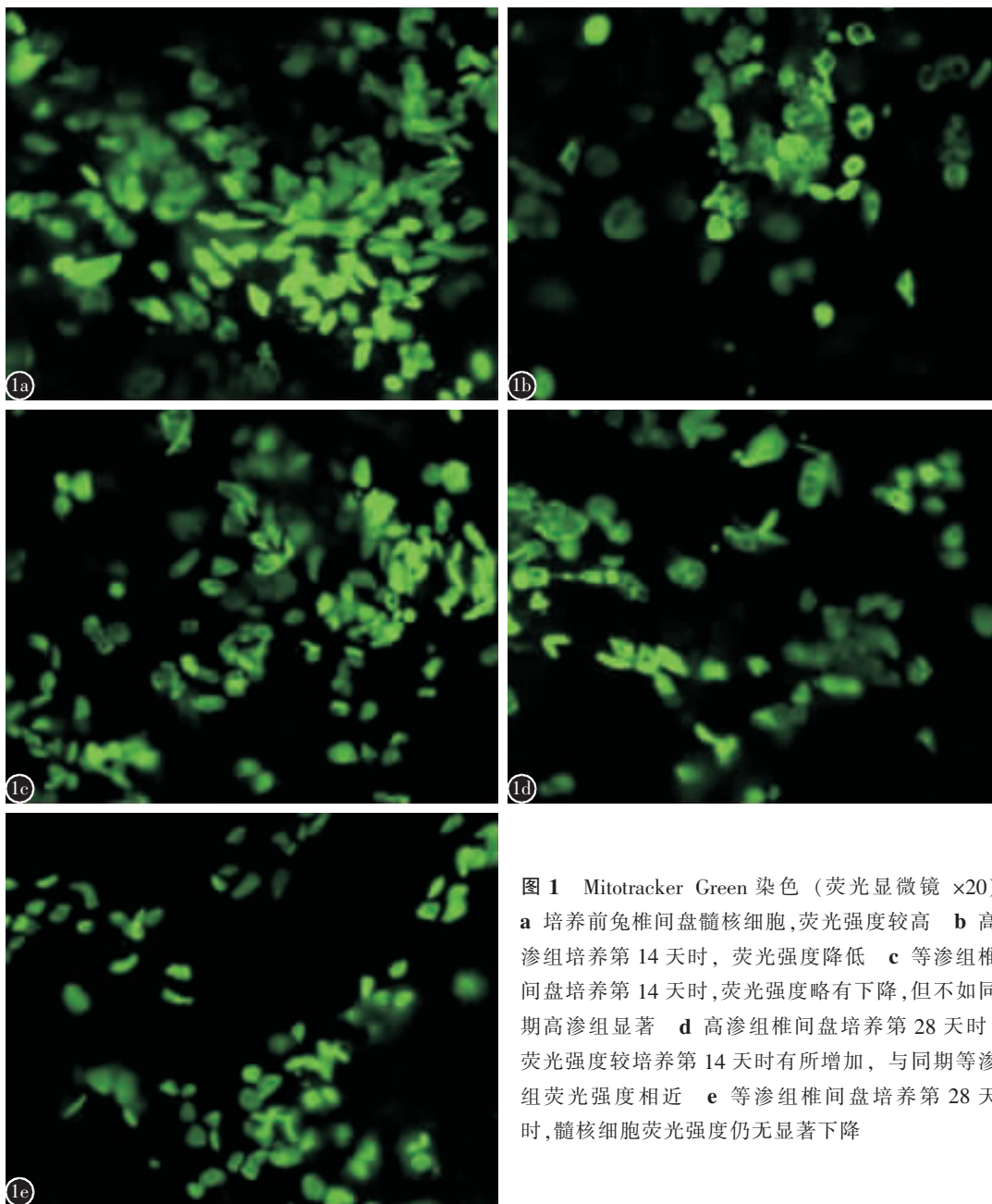


图 1 Mitotracker Green 染色 (荧光显微镜 $\times 20$)
a 培养前兔椎间盘髓核细胞, 荧光强度较高 b 高渗组培养第 14 天时, 荧光强度降低 c 等渗组椎间盘培养第 14 天时, 荧光强度略有下降, 但不如同期高渗组显著 d 高渗组椎间盘培养第 28 天时, 荧光强度较培养第 14 天时有所增加, 与同期等渗组荧光强度相近 e 等渗组椎间盘培养第 28 天时, 髓核细胞荧光强度仍无显著下降

阿利新蓝/HE 双重染色结果显示, 体外培养前椎间盘髓核和纤维环结构完整致密、分界清楚; 髓核细胞被苏木精-伊红复染, 胞核明显, 多呈“巢居”现象; 细胞周围的蛋白多糖被阿利新蓝染成蓝色(图 2a)。体外培养至第 28 天时和新鲜取材的椎间盘相比, 两组均基本有效维持了椎间盘髓核

和纤维环组织结构的完整性, 但纤维环结构在培养过程中出现了排列紊乱, 纤维环断裂或缺失, 髓核与纤维环分界模糊(图 2b、2c)。在体外培养至第 7、14、21 和 28 天时, 髓核细胞的数目较培养前有所减少(图 2d、2e、2f), 髓核阿利新蓝染色强度有所降低, 但两组间无明显差异。

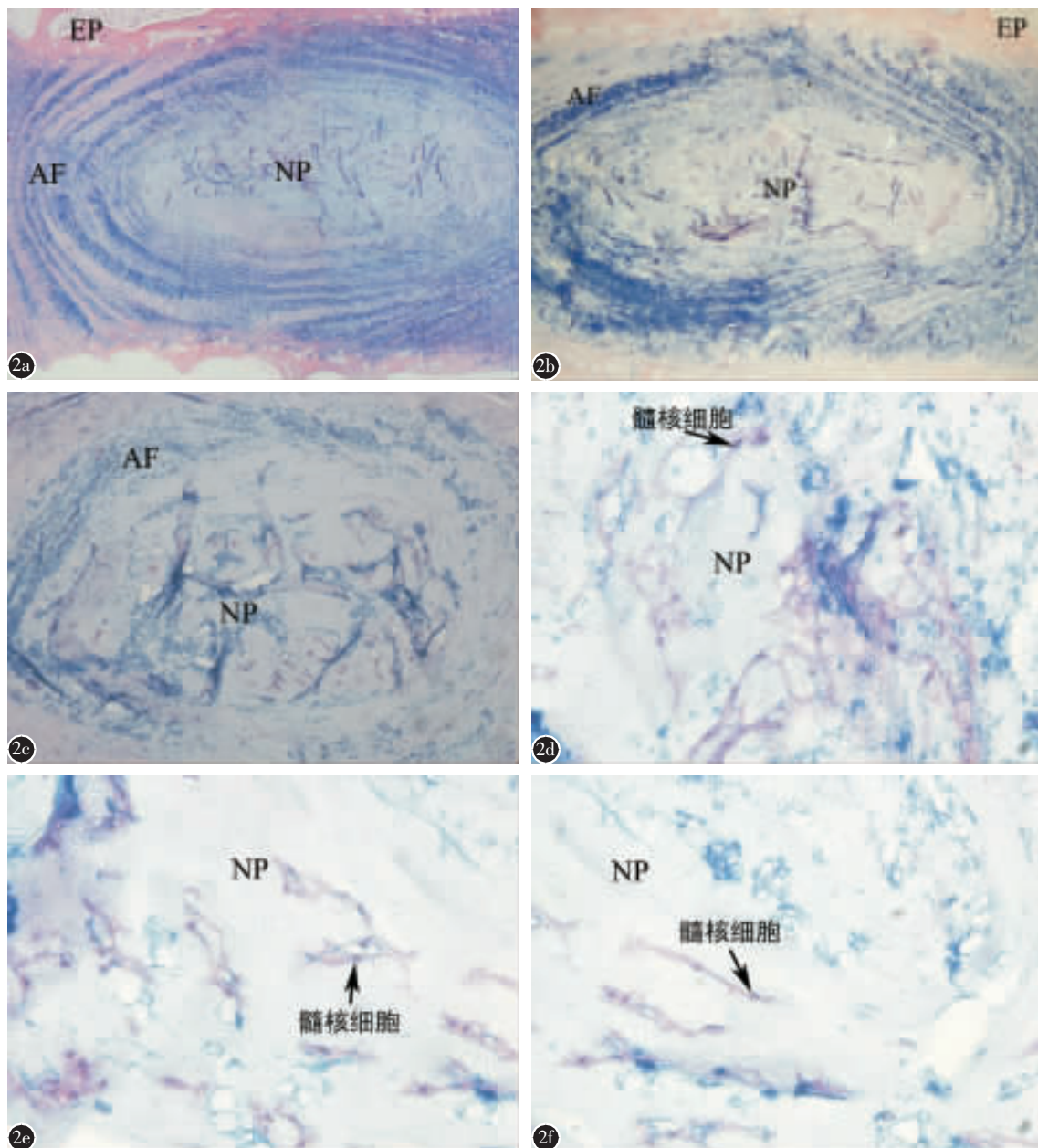


图 2 不同培养阶段兔椎间盘阿利新蓝/HE 双重染色结果(AF:纤维环;NP:髓核;EP:软骨终板) a 新鲜取材的兔椎间盘髓核和纤维环结构完整致密、分界清楚, 外围的软骨终板结构清楚 b 等渗组椎间盘培养第 28 天, 髓核和纤维环结构出现紊乱, 基本结构完整, 可见纤维环断裂或缺失, 髓核与纤维环分界不清 c 高渗组椎间盘培养第 28 天, 髓核和纤维环结构基本保持完整, 但纤维环纤维排列紊乱, 各环之间出现裂缝, 髓核与纤维环分界模糊 d 新鲜取材的兔椎间盘髓核细胞呈条索状“巢居”在一起, 细胞周围的蛋白多糖被阿利新蓝染成蓝色 e 等渗组椎间盘培养第 7 天, 髓核细胞的数量下降不太明显, 阿利新蓝染色强度也无显著下降 f 高渗组椎间盘培养第 7 天, 髓核细胞的数量略有减少, 阿利新蓝染色强度下降不太明显

2.3 髓核蛋白多糖含量

新鲜取材的椎间盘髓核细胞在体外培养前蛋白多糖的含量比较高,体外培养第 7 天,高渗组和等渗组蛋白多糖含量均较培养前下降,差异有显著性($P<0.01$);在第 14、21、28 天时蛋白含量没有进一步的显著丢失($P>0.05$)(表 2)。在培养过程中,高渗组和等渗组相同时间点的蛋白多糖含量无明显区别,差异无显著性($P>0.05$)。

表 1 不同培养时间点两组髓核细胞 Mitotracker Green 染色荧光强度值 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

	等渗组	高渗组
培养前	11503 $\pm$ 402	11503 $\pm$ 402
培养第 7 天	11350 $\pm$ 351 ^①	10504 $\pm$ 710 ^{①②}
培养第 14 天	11207 $\pm$ 385 ^①	9202 $\pm$ 907 ^③
培养第 21 天	10914 $\pm$ 300 ^①	10860 $\pm$ 711 ^{①②}
培养第 28 天	10862 $\pm$ 229 ^①	10713 $\pm$ 953 ^{①②}

注:①与同组培养前比较 $P>0.05$;②与等渗组同时时间点比较 $P>0.05$;③与同组培养前和等渗组同时时间点比较 $P<0.05$

表 2 不同培养时间点两组髓核蛋白多糖的含量 ($\bar{x}\pm s, \text{mg}/100\text{mg}, n=3$)

	等渗组	高渗组
培养前	5.03 $\pm$ 0.37	5.03 $\pm$ 0.37
培养第 7 天	2.83 $\pm$ 0.25 ^①	3.33 $\pm$ 0.28 ^{①②}
培养第 14 天	2.62 $\pm$ 0.46 ^{①③}	2.71 $\pm$ 0.31 ^{①②③}
培养第 21 天	2.74 $\pm$ 0.38 ^{①③}	3.09 $\pm$ 0.33 ^{①②③}
培养第 28 天	3.28 $\pm$ 0.24 ^{①③}	3.30 $\pm$ 0.23 ^{①②③}

注:①与培养前比较 $P<0.05$;②与等渗组相同时间点比较 $P>0.05$;③与同组前一时间点比较 $P>0.05$

3 讨论

椎间盘器官培养模型是利用椎间盘自身的三维结构和可调控的培养条件,将完整的椎间盘(包括髓核及其周围的纤维环和终板)在体外进行整体培养^[6],从而保留了重要的细胞-细胞和细胞-基质的相互作用^[7]。但椎间盘在体外培养基中进行培养时会出现显著的膨胀^[8],相关研究发现可以通过多种方法减轻或消除椎间盘膨胀,如保留软骨终板^[9]、包埋在藻酸钙微球中^[10]、培养基中添加高渗性溶液^[11]和/或应用外部负荷^[12]等。有研究表明可以利用聚乙二醇调整培养基的渗透压来克服椎间盘的膨胀^[11]。Chiba 等^[10]在藻酸盐凝胶中培养兔腰椎间盘,以使组织膨胀降到最低。本研究通过保留软骨终板来控制椎间盘膨胀。但是由于软骨终板一方面通过限制组织膨胀为髓核细胞保留了更

多的生理学环境,另一方面却阻碍了培养基为髓核细胞提供养分^[13]。因此,我们在动物死亡前对动物使用抗凝药物来防止动物死后毛细血管芽被血凝块堵塞而影响通过软骨终板对椎间盘的营养供应和液体流通,这对保持椎间盘的营养供应、机械力学性能和细胞活性可能是必需的^[9]。许多体内和体外的研究都表明 TGF- β 1 有助于增强髓核细胞合成蛋白多糖^[14],因此我们在培养基中添加了 TGF- β 1,并将血清的浓度增加到 20%,用来维持髓核细胞的生物合成活力。

本研究结果表明,椎间盘器官培养模型可以有效维持兔椎间盘结构的完整性和髓核细胞的活力至少 4 周。但无论是高渗组还是等渗组,椎间盘髓核组织蛋白多糖的含量在培养的第 7 天都出现了明显的下降,在随后 21d 的培养中没有发现蛋白多糖进一步显著丢失。高渗组的髓核细胞数量和活力在培养第 14 天时出现短暂性降低,这可能是由于取材过程对椎间盘调节渗透的能力产生了损害,从而导致了高渗组在培养开始阶段出现细胞死亡。随着细胞的增殖,新生细胞数量不断增加,高渗组髓核细胞的数量和活力出现了部分恢复。这也表明新生细胞对高渗透环境还是比较适应的。

活体动物模型研究表明,一定的力学负荷有助于预防椎间盘退变^[15]。Lee 等^[16]发现对体外培养的椎间盘施加静态压力负荷有助于维持细胞的活性和代谢。Korecki 等^[17]在对剥离软骨终板的肉牛椎间盘给予静态和循环负荷对比的研究中发现在维持细胞活性方面静态负荷要优于动态负荷。进一步的研究发现体外施加循环负荷可以改善软骨终板的渗透性^[9]。还有研究表明力学负荷对细胞基质代谢的影响部分是通过改变细胞外基质的渗透性来介导的,施加于椎间盘的力学负荷除了可以对细胞骨架产生直接影响外^[18],还可通过改变细胞外基质的渗透性来维持细胞基质代谢平衡^[19]。所以可以直接通过提高培养基的渗透压来模拟椎间盘在体内所处的力学环境^[20],从而维持髓核细胞基质的代谢平衡。尽管本研究中高渗组除了髓核细胞活力在培养第 14 天时出现短暂性降低外,与等渗组没有明显的区别,但由于高渗透性负荷所模拟的力学环境更接近于椎间盘在体内所处的生理环境,所以高渗性培养环境条件更适于对椎间盘器官培养模型的进一步研究。

椎间盘器官培养模型为在病理生理条件下研究髓核细胞的功能提供了一种新的体外实验模型,该模型可用于研究椎间盘代谢和退变的相关机制,以及不同力学负荷和渗透压等环境因素与椎间盘退变的相关性。此外,该模型在检验应用细胞因子、生长因子或蛋白酶抑制剂等治疗椎间盘退变的可行性、安全性、有效性等方面也具有独特的便捷性^[21]。但体外椎间盘器官培养模型的影响因素还需进一步研究,如渗透性负荷对蛋白多糖和胶原基因表达的影响等。我们在研究中采用的是静态高渗性负荷,动态高渗性负荷所模拟的力学环境以及单纯的机械力学负荷对椎间盘器官培养模型代谢的影响仍有待进一步研究。

4 参考文献

1. Masuda K, Aota Y, Muehleman C, et al. A novel rabbit model of mild, reproducible disc degeneration by an anulus needle puncture; correlation between the degree of disc injury and radiological and histological appearances of disc degeneration [J]. *Spine*, 2005, 30(1): 5-14.
2. 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(10): 1018-1028.
3. Kasra M, Goel V, Martin J, et al. Effect of dynamic hydrostatic pressure on rabbit intervertebral disc cells [J]. *J Orthop Res*, 2003, 21(4): 597-603.
4. Wang JY, Baer AE, Kraus VB, et al. Intervertebral disc cells exhibit differences in gene expression in alginate and monolayer culture [J]. *Spine*, 2001, 26(16): 1747-1751.
5. 高华, 刘坤, 于兹东, 等. 间苯三酚分光光度法测定硫酸软骨素的研究 [J]. *中国生化药物杂志*, 2000, 21(5): 247-248.
6. Risbud MV, Izzo MW, Adams CS, et al. An organ culture system for the study of the nucleus pulposus: description of the system and evaluation of the cells [J]. *Spine*, 2003, 28(24): 2652-2659.
7. Richardson SM, Walker RV, Parker S, et al. Intervertebral disc cell-mediated mesenchymal stem cell differentiation [J]. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 2006, 24(3): 707-716.
8. Urban JP, Maroudas A. Swelling of the intervertebral disc in vitro [J]. *Connect Tissue Res*, 1981, 9(1): 1-10.
9. Gantenbein B, Grunhagen T, Lee CR, et al. An in vitro organ culturing system for intervertebral disc explants with vertebral endplates: a feasibility study with ovine caudal discs [J]. *Spine*, 2006, 31(23): 2665-2673.
10. Chiba K, Andersson GB, Masuda K, et al. A new culture system to study the metabolism of the intervertebral disc in vitro [J]. *Spine*, 1998, 23(17): 1821-1827.
11. Oshima H, Ishihara H, Urban JP, et al. The use of coccygeal discs to study intervertebral disc metabolism [J]. *J Orthop Res*, 1993, 11(3): 332-338.
12. Hutton WC, Elmer WA, Boden SD, et al. The effect of hydrostatic pressure on intervertebral disc metabolism [J]. *Spine*, 1999, 24(15): 1507-1515.
13. Urban JP, Smith S, Fairbank JC. Nutrition of the intervertebral disc [J]. *Spine*, 2004, 29(23): 2700-2709.
14. Lee YJ, Kong MH, Song KY, et al. The relation between Sox9, TGF- β 1, and proteoglycan in human intervertebral disc cells [J]. *J Korean Neurosurg Soc*, 2008, 43(3): 149-154.
15. Stokes IA, Iatridis JC. Mechanical conditions that accelerate intervertebral disc degeneration: overload versus immobilization [J]. *Spine*, 2004, 29(23): 2724-2732.
16. Lee CR, Iatridis JC, Poveda L, et al. In vitro organ culture of the bovine intervertebral disc: effects of vertebral endplate and potential for mechanobiology studies [J]. *Spine*, 2006, 31(5): 515-522.
17. Korecki CL, MacLean JJ, Iatridis JC. Characterization of an in vitro intervertebral disc organ culture system [J]. *Eur Spine J*, 2007, 16(7): 1029-1037.
18. Chen J, Yan W, Setton LA. Static compression induces zonal-specific changes in gene expression for extracellular matrix and cytoskeletal proteins in intervertebral disc cells in vitro [J]. *Matrix Biol*, 2004, 22(7): 573-583.
19. Pritchard S, Guilak F. The role of F-actin in hypoosmotically induced cell volume change and calcium signaling in anulus fibrosus cells [J]. *Ann Biomed Eng*, 2004, 32(1): 103-111.
20. Ishihara H, Warensjo K, Roberts S, et al. Proteoglycan synthesis in the intervertebral disk nucleus: the role of extracellular osmolality [J]. *Am J Physiol*, 1997, 272(5 Pt 1): C1499-C1506.
21. Zhang Y, Phillips FM, Thonar EJ, et al. Cell therapy using articular chondrocytes overexpressing BMP-7 or BMP-10 in a rabbit disc organ culture model [J]. *Spine*, 2008, 33(8): 831-838.

(收稿日期: 2009-05-18 修回日期: 2009-08-27)

(英文编审 郭万首)

(本文编辑 卢庆霞)