

基础研究

单纯Ⅱ型胶原酶消化法分离、培养人退变椎间盘髓核细胞的形态学观察

王 锋, 吴小涛, 王运涛, 邵建树, 张 明

(东南大学附属南京市中大医院骨科 210009 南京)

【摘要】目的:探讨单纯Ⅱ型胶原酶消化法体外培养扩增人退变椎间盘髓核细胞的可行性。**方法:**收集 20 例人退变椎间盘髓核, 单纯Ⅱ型胶原酶消化分离出髓核细胞并连续培养传代, 倒置相差显微镜和 HE 染色观察细胞形态学变化, 甲苯胺蓝染色检测髓核细胞内聚集蛋白聚糖的表达, 免疫细胞化学法行Ⅱ型胶原染色, 观察髓核细胞的类软骨表型表达情况。**结果:**单纯Ⅱ型胶原酶消化法可较好的分离培养人退变椎间盘髓核细胞, 20 例人退变椎间盘髓核, 培养成功 16 例; 原代髓核细胞平均 7d 贴壁, 呈类圆形或多角形, P1 代髓核细胞平均 12h 贴壁, 呈大梭形或多角形, 两代细胞融合 95% 所需时间分别为 30d 和 7d, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 聚集蛋白聚糖和Ⅱ型胶原主要表达于原代和 P1 代髓核细胞浆内, 被甲苯胺蓝染成天蓝色, 免疫细胞化学染色主要表现为黄褐色沉淀, 两代间聚集蛋白聚糖和Ⅱ型胶原的表达无统计学差异 ($P > 0.05$)。**结论:**单纯Ⅱ型胶原酶消化法可简化髓核细胞分离步骤, 提高培养效率; 传一代后髓核细胞增殖速率提高, 但仍维持类软骨表型, 表达聚集蛋白聚糖和Ⅱ型胶原。

【关键词】椎间盘退行性变; 髓核细胞; 胶原酶; 细胞培养; 甲苯胺蓝; 免疫细胞化学

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2010.04.10

中图分类号: Q813.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2010)-04-0300-05

Isolation and culturing of human degenerative intervertebral nucleus pulposus cells by solo collagenase Ⅱ and its morphology study/WANG Feng, WU Xiaotao, WANG Yuntao, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2010, 20(4): 300~304

【Abstract】Objective: To investigate the feasibility of isolating and culturing of nucleus pulposus (NP) cells from degenerated human intervertebral discs by solo collagenase in vitro. **Method:** Nucleus pulposus from 20 human degenerated intervertebral disc samples were collected to extract NP cells by 0.025% collagenase Ⅱ digestion. After culturing and generation, the morphological change of primary and passaged NP cells was noted by HE staining and continuous observation under inverted microscope. The proteoglycan and collagen Ⅱ expression were detected by toluidine blue and immunocytochemistry staining respectively, the chondrocyte like phenotype in different generations of NP cells was also noted. **Result:** Out of the 20 nucleus pulposus samples, 16 were successfully digested by 0.025% collagenase Ⅱ without extra trypsin and the extracted NP cells were cultured and generated to passage 1 (P1). The round or polygonal primary NP cell had an average adherence time of 7 days and took nearly 30 days to reach 95% confluence while the spindle-shaped P1 NP cell grew much faster with around 12 hours to adhere and 7 days to get 95% confluent ($P < 0.01$). The proteoglycan was stained as blue and collagen Ⅱ as brown respectively by toluidine blue and immunocytochemistry staining, both the proteoglycan and collagen Ⅱ were found dominantly expressed in the cytoplasm of primary and P1 NP cells without significant change in terms of grey scale between the two generations ($P > 0.05$). **Conclusion:** The solo collagenase digestion can simplify the isolation process of NP cells which can improve the culture efficiency and maintain the chondrocyte like phenotype in terms of proteoglycan and collagen Ⅱ expressions.

【Key words】 Intervertebral disc degeneration; Nucleus pulposus cell; Collagenase; Cell culturing; Toluidine

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目 (BK2007107); 东南大学国家自然科学基金预研项目 (XJ2008342)

第一作者简介: 男 (1983-), 住院医师, 医学硕士, 研究方向: 椎间盘退行性变和生物学修复

电话: (025) 83272207 E-mail: atlaswang072650@163.com

通讯作者: 吴小涛 E-mail: wuxiaotao@medmail.com.cn

blue; Immunocytochemistry

[Author's address] Department of Orthopaedics, Affiliated Zhongda Hospital of Southeast University, Nanjing Jiangsu, 210009, China

研究显示,髓核细胞在维持正常椎间盘内环境稳定以及在修复椎间盘退行性变(intervertebral disc degeneration, IVD)过程中发挥着核心作用^[1]。作为细胞移植逆转椎间盘退变的重要种子细胞,传统的序贯酶消化法过程繁琐且污染率高^[2],一定程度上制约了髓核细胞移植疗法的发展^[3]。本研究旨在探索单纯Ⅱ型胶原酶消化法分离、体外培养及扩增人退变椎间盘髓核细胞的可行性,同时多角度鉴定髓核细胞的类软骨表型,为拓展细胞移植修复椎间盘退行性变中髓核细胞的来源提供实验数据。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

倒置相差显微镜(德国 Zeiss 公司),细胞培养箱(德国 Heraeus 公司),低速自动平衡离心机(北京医用离心机厂),胰蛋白酶(美国 Sigma 公司),Ⅱ型胶原酶(美国 Gibco 公司),100%胎牛血清(杭州四季青生物研究所),HG-DMEM 培养基(美国 Gibco 公司),兔抗人Ⅱ型胶原抗体(美国 ADL 公司),免疫组化试剂盒(南京凯基生物公司),甲苯胺蓝染剂(美国 Sigma 公司)

1.2 髓核组织的获取

退变椎间盘纳入标准为:年龄大于 35 岁;因腰椎间盘突出症、脊柱滑脱、椎管狭窄症行手术治疗;术前 MRI 确诊椎间盘退变;病理证实为退变的椎间盘组织;无糖尿病、高血压和遗传性疾病等。经患者知情同意,收集退变椎间盘手术标本 20 例(男 12 例,女 8 例,平均年龄 40 岁);其中腰椎间盘突出症 15 例(7 例 L4/5, 8 例 L5/S1),腰椎滑脱 5 例(L4/5),退变椎间盘 Thompson 分级Ⅲ到Ⅳ级。标本置于含 20ml DMEM 高糖培养液的 50ml 无菌离心管内,低温保存并于 30min 内送至实验室。

1.3 髓核细胞的分离和培养

无菌条件下 PBS 反复冲洗标本,手术显微镜下去除残留的纤维环和软骨终板,将髓核组织剪成 1×1×1mm 大小组织块,置于 5 倍体积的 0.025% Ⅱ型胶原酶内 37℃消化 4~6h,每 30min 用吸管吹打直至髓核组织呈絮状,80 目筛网过

滤,过滤液 1000rpm×5min 离心,弃上清,培养液重混悬并计数,以 1×10^5 个/ml 接种于 35cm² 培养瓶,加 DMEM 高糖完全培养液(含 10% FBS, 100U/ml 青霉素 G 钠, 100μg/ml 硫酸链霉素),置于饱和湿度、5%CO₂、37℃培养箱内培养,第 3 天添加等体积完全培养液,第 7 天首次换液,以后每 3 天换液;另取一半原代细胞种于放有盖玻片的六孔板内作细胞爬片。倒置相差显微镜下观察原代髓核细胞形态、贴壁时间、融合时间。细胞达 95%融合后,用 0.25%胰蛋白酶(含 0.02% EDTA)消化传代,重复上述培养方法并于六孔板内行 P1 代细胞爬片。

1.4 髓核细胞爬片行常规 HE 染色法

细胞爬片 PBS 冲洗 2min, 4%多聚甲醛固定 30min, 苏木素浸染 10min, 1%盐酸酒精分化 50s, 0.5%伊红酒精浸染 60s, PBS 冲洗 1min, 95%酒精分色至胞浆呈桃红色,中性树脂封片后光镜下观察。

1.5 髓核细胞爬片行甲苯胺蓝染色

细胞爬片 PBS 冲洗 2min, 4%多聚甲醛固定 30min, 1%的甲苯胺蓝浸染 2h, 95%酒精洗去多余染液,中性树脂封片后光镜下观察。计算机图像分析系统检测光密度值(OD 值)

1.6 髓核细胞爬片免疫组化检测Ⅱ型胶原

细胞爬片 PBS 冲洗 2min, 4%多聚甲醛固定 30min, 加 3% H₂O₂ 室温孵育 10min 灭活内源性过氧化物酶, PBS 洗 3 次, 滴加兔抗人Ⅱ型胶原多克隆抗体(1:50), 37℃孵育 15min, PBS 洗 3 次, 滴加生物素标记二抗(鼠抗兔 IgG 多克隆抗体 1:500), 37℃孵育 15min, PBS 洗 3 次, DAB 显色 10min, PBS 冲洗, 苏木素复染 1min, 中性树脂封片后光镜下观察。计算机图像分析系统检测 OD 值。

1.7 统计分析

结果采用 SPSS 11.5 统计学软件分析,数据以均数±标准差表示,行两样本均数的 *t* 检验,设 *P* < 0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 髓核细胞分离和培养结果

有 16 例髓核组织成功分离培养出髓核细胞,

并连续培养,扩增至 P1 代,成功率为 80% (16/20);另有 4 例标本(皆为椎间盘突出症,2 例 L4/5,2 例 L5/S1)因原代细胞未能及时贴壁而培养失败,不贴壁的可能原因是培养瓶的取放和挪动次数过多;未出现细菌污染、消化过度等现象。髓核组织经 PBS 反复冲洗后呈白色或淡红色,剪成 $1\times 1\times 1\text{mm}$ 大小组织块(图 1a);单纯 0.025% II 型胶原酶 37°C 水浴消化 4~6h,可成功分离髓核细胞。尚未贴壁的髓核细胞呈圆形(图 1b)。

2.2 髓核细胞培养连续形态学观察

平均每例标本获取约 3×10^6 个原代髓核细胞,均分为 5 瓶按 1×10^5 个/ml 接种于 35cm^2 培养瓶内;原代髓核细胞贴壁效率低且生长缓慢,平均需 7d 贴壁($7\pm 1.5\text{d}$),最终能贴壁的细胞仅占接种细胞 10%,贴壁后髓核细胞伸出伪足,变成类圆形或多角型(图 2a),95%融合后细胞呈长梭形(图 2b);P1 代髓核细胞贴壁效率高且生长迅速(图 2c),12h 内有 99%的细胞贴壁,培养 7d 达到 95%融合。每例标本最终可收获 P1 代髓核细胞约 $1\sim 2\times 10^7$ 个)。P1 代髓核细胞的平均贴壁时间和融合时间皆短于原代髓核细胞,差异具有显著性($P<0.01$,表 1)。

2.3 髓核细胞的类软骨表型鉴定

HE 染色示髓核细胞核蓝染,位于细胞中央,胞浆淡红色,P0 代髓核细胞呈类圆形或多角形

(图 3a),P1 代髓核细胞呈明显的梭形和多角型,以 3~4 个角为主,并呈典型的集落样生长(图 3b)。甲苯胺兰染色示主要表达于髓核细胞胞质内的蛋白聚糖被染成天蓝色,越靠近细胞核染色越深(图 3c、3d)。免疫细胞化学染色示被染成黄褐色的 II 型胶原,主要位于胞质内,离核越近,染色越深(图 3e、3f)。95%的 P1 代髓核细胞于胞质内表达蛋白聚糖和 II 型胶原,维持了类软骨细胞表型。原代与 P1 代髓核细胞蛋白聚糖的 OD 值及 II 型胶原 OD 值差异无显著性($P>0.05$,表 2)。

3 讨论

下腰痛(low back pain, LBP)是骨科常见症状,约 80%的人一生中会经历 LBP^[4],最新统计显示 LBP 在美国的年经济负担达 196~1188 亿美元,其中约 20%的 LBP 归因于椎间盘退变^[5]。退变椎间盘病理表现为髓核细胞数量减少,II 型胶原、蛋白聚糖等基质大分子降解,随即椎间盘内渗透压下降和生物力学功能障碍,椎间盘退变加速^[6]。

当前临床主要采取椎间盘切除、脊柱融合等非针对退变病因本身的手术治疗,虽可缓解症状却难以扭转退变。近年来,随着生物治疗概念的提出和发展,通过细胞移植及时、早期干预退变诸多环节的治疗策略,为扭转和修复椎间盘退变带来希望^[7]。髓核细胞因其在维持椎间盘内环境稳定

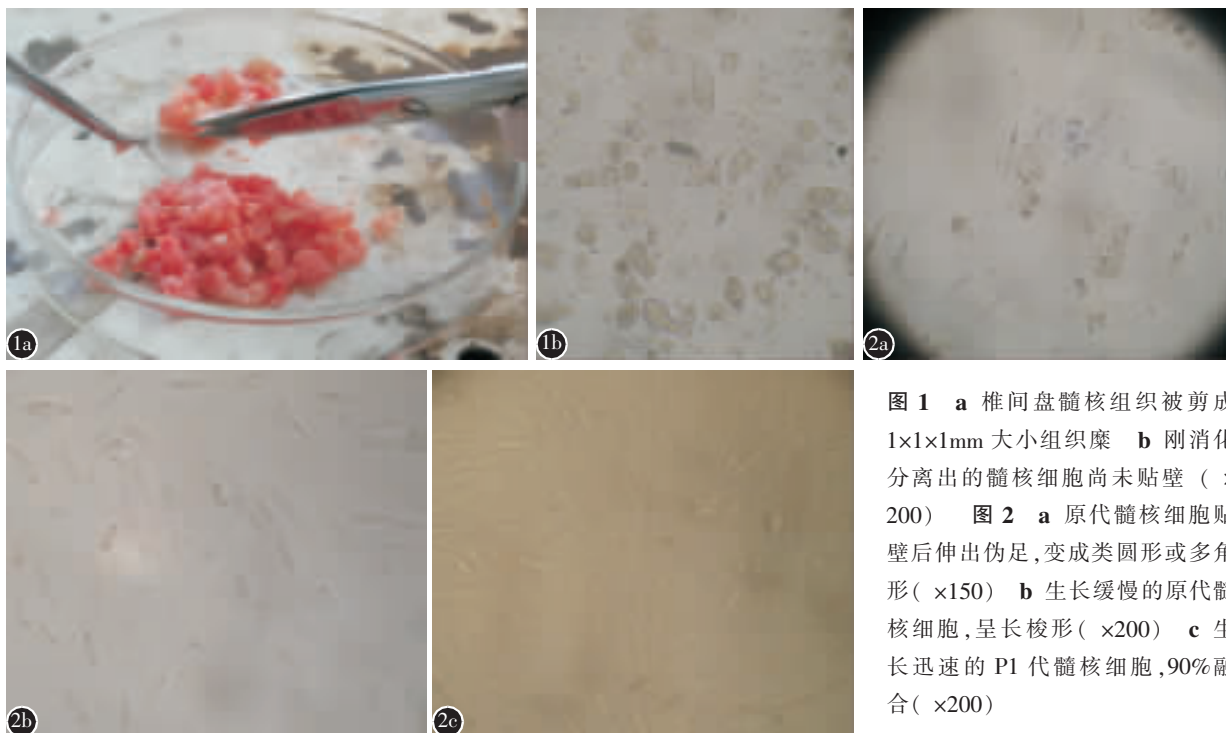


图 1 a 椎间盘髓核组织被剪成 $1\times 1\times 1\text{mm}$ 大小组织块 b 刚消化分离出的髓核细胞尚未贴壁 ($\times 200$) 图 2 a 原代髓核细胞贴壁后伸出伪足,变成类圆形或多角形 ($\times 150$) b 生长缓慢的原代髓核细胞,呈长梭形 ($\times 200$) c 生长迅速的 P1 代髓核细胞,90%融合 ($\times 200$)

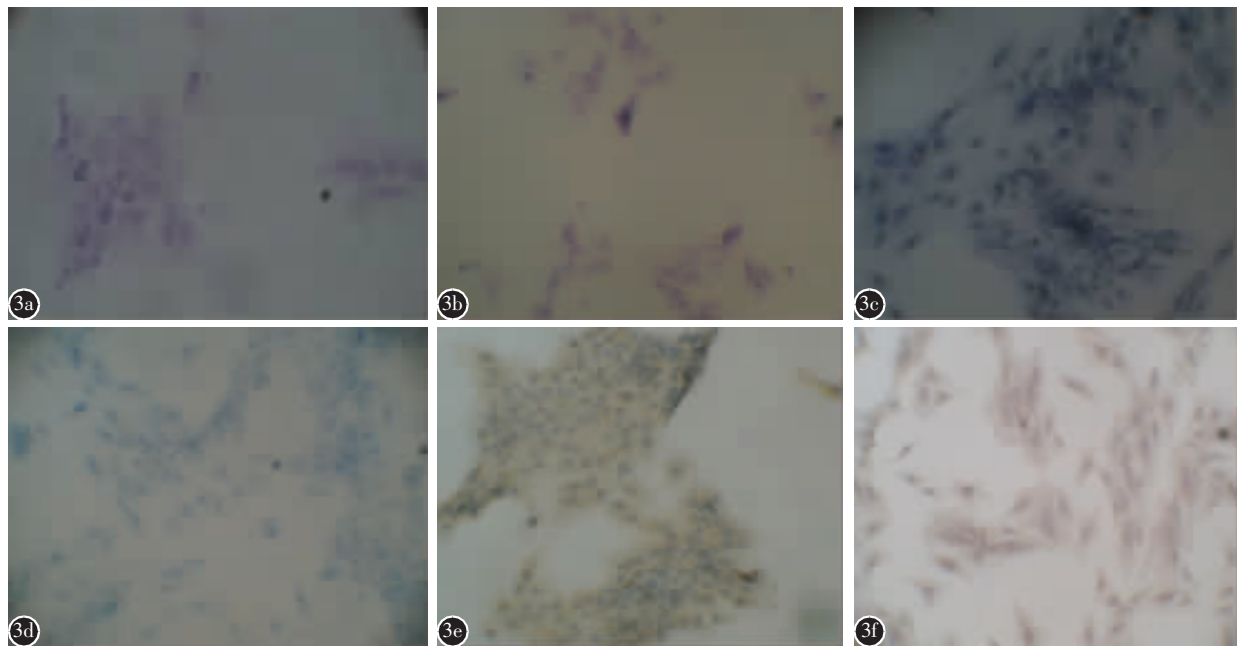


图 3 a P0 代髓核细胞呈类圆形或多角形(HE $\times 200$) b P1 代髓核细胞为梭形或多角型,呈集落样生长(HE $\times 200$) c P0 代聚集蛋白聚糖被染成天蓝色(甲苯胺蓝 $\times 200$) d P1 代聚集蛋白聚糖被染成天蓝色(甲苯胺蓝 $\times 150$) e P0 代 II 型胶原被染成天蓝色(II 型胶原免疫细胞化学 $\times 150$) f P1 代 II 型胶原被染成天蓝色(II 型胶原免疫细胞化学 $\times 200$)

表 1 原代(P0)和 P1 代髓核细胞贴壁与融合时间比较
($\bar{x} \pm s, n=16$)

	P0	P1
贴壁时间(d)	7.0 ± 1.5	0.5 ± 0.1^{①}
95%融合时间(d)	30.8 ± 10.4	7.6 ± 4.6^{①}

注:①表示与 P0 代相比 $P < 0.05$

表 2 原代和 P1 代髓核细胞 II 型胶原与聚集蛋白聚糖表达灰度值比较
($\bar{x} \pm s, n=16$)

	P0	P1
II 型胶原	153.69 ± 20.21	$150.76.97 \pm 17.40^{①}$
蛋白聚糖	90.16 ± 12.40	82.58 ± 13.85^{①}

注:①表示与 P0 代相比 $P > 0.05$

中的重要作用^[1],已成为组织工程细胞移植修复退变椎间盘的热点种子细胞;Meisel 等对 28 例行自体髓核细胞移植患者随访后发现,髓核细胞移植可阻止病变节段椎间隙高度进行性丢失,缓解 LBP^[8,9]。

髓核组织包含髓核细胞与细胞外基质两大部分,后者主要由胶原成分和聚集蛋白聚糖组成^[10]。传统的序贯酶消化法需用胰蛋白酶预处理髓核组织,然后加用胶原酶分离髓核细胞,步骤繁琐,污染率高,同时难以避免胰蛋白酶对细胞活力的毒损作用^[2,3];也有报道单纯通过高浓度的胶原酶

(0.25%~0.1%的 II 型胶原酶或加用 IV 型胶原酶)降解胶原成分,但成本较高^[11],难以提供高重复性和高效率的种子细胞来源^[2]。基于 II 型胶原是髓核组织细胞外基质的主要成分^[10],本研究对传统的髓核细胞提取方法进行简化,发现单纯利用低浓度(0.025%) II 型胶原酶可有效消化、分离出髓核细胞,除 4 例标本可能因培养瓶频繁取放及挪动而干扰细胞贴壁而培养失败外,余 16 例标本分离的髓核细胞成功地培养并传代,成功率 80%,减少细胞提取步骤的同时也降低了成本,整个过程中未发生细菌污染,易化了髓核细胞的获取。

髓核细胞本质上是类软骨细胞,目前尚无特异性的标志物^[7,12],主要通过 HE 染色形态学观察,或利用特殊染色检测细胞质内聚集蛋白聚糖和 II 型胶原的表达来鉴别^[11,13]。临床手术切除的椎间盘是获取髓核细胞的最主要来源,如何有效避免成纤维或血细胞的污染成为关键^[14,15]。本研究严格从椎间盘髓核区域取材,切除标本中的软骨终板和纤维环,反复的 PBS 冲洗尽量去除表面存在的成纤维细胞和血细胞,原代髓核细胞首次换液后仍残留近 20%的红细胞等杂质细胞,经过连续培养及传代后,P1 代细胞中表达聚集蛋白聚糖和 II 型胶原的细胞比例达 95%。本研究中将首次换液的时间延长到第 7 天以利于髓核细胞贴

壁;结果显示:髓核细胞呈集落样生长,髓核细胞胞质内表达聚集蛋白聚糖和Ⅱ型胶原,保持较好的类软骨表型^[11,13],同时证实低浓度单纯Ⅱ型胶原酶消化法可有效分离、培养人退变椎间盘髓核细胞,并且P1代细胞的类软骨表型不变。

体外培养过程中随着细胞连续传代次数的增加,端粒进行性缩短,DNA 积累损伤,使细胞不可逆地滞留在G1-S期,无法分裂增殖而老化^[16,17]。研究显示,P3代的人正常髓核细胞的生长动力学和聚集蛋白聚糖合成能力已开始降低^[18]。

大量研究试图通过髓核细胞与间充质干细胞共培养^[19]或加入IGF-1、TGFβ等生长因子来促进髓核细胞增殖^[11,20],并在三维立体培养支架及有一定周期性应力刺激的培养装置内提高髓核细胞的生长动力^[21,22]。本研究发现,传一代后的髓核细胞仅12h即可贴壁,且生长迅速,和张荣峰等^[18,23]的报道结果一致。P1代髓核细胞增殖速度增加的同时,髓核细胞的类软骨表型不变,蛋白聚糖和Ⅱ型胶原的表达并未降低,收获的细胞数可达 $1\sim 2\times 10^7$ 。因此,可利用P1代髓核细胞进行移植,或将P1代髓核细胞于三维培养体系等微环境内进一步扩增后对退变椎间盘进行生物学干预治疗。故该细胞培养体系可以提供足够数量的髓核细胞,为临床应用细胞移植促进椎间盘退变修复提供实验室保障。

5 参考文献

1. 王锋,王运涛,吴小涛.髓核细胞修复椎间盘退行性变的研究进展[J].中国修复重建外科杂志,2009,23(7):864-867.
2. 赛佳明,胡有谷,王德春.椎间盘髓核细胞组织块法原代培养[J].脊柱外科杂志,2006,4(5):315-316.
3. 张传志,周跃,李长青.兔髓核细胞体外最佳培养条件的探索[J].中国矫形外科杂志,2005,13(14):1093-1096.
4. 侯树勋.研究椎间盘源性腰痛的重要性[J].继续医学教育,2007,21(14):19-20.
5. Dagenais S, Caro J, Haldeman S. A systematic review of low back pain cost of illness studies in the United States and internationally[J]. Spine J, 2008, 18(1):8-20.
6. Zhao CQ, Wang LM, Jiang LS, et al. The cell biology of intervertebral disc aging and degeneration [J]. Ageing Res Rev, 2007, 6(3):247-261.
7. Sakai D. Future perspectives of cell-based therapy for intervertebral disc disease[J]. Eur Spine J, 2008, 17(S4):452-458.
8. Meisel HJ, Ganey T, Hutton WC, et al. Clinical experience in cell-based therapeutics: intervention and outcome [J]. Eur Spine J, 2006, 15(3):S397-S405.
9. Meisel HJ, Siodla V, Ganey T, et al. Clinical experience in cell-based therapeutics: disc chondrocyte transplantation A treatment for degenerated or damaged intervertebral disc [J]. Biomol Eng, 2007, 24(1):5-21.
10. Roberts S, Evans H, Trivedi J, et al. Histology and pathology of the human intervertebral disc [J]. J Bone Joint Surg Am. 2006, 88(S2):10-14.
11. 王磊,吴小涛,史志英,等.转化生长因子β1和胰岛素样生长因子1对体外培养人退变髓核细胞生物学活性的影响 [J].中国脊柱脊髓杂志,2007,17(3):218-221.
12. Alini M, Eisenstein SM, Ito K, et al. Are animal models useful for studying human disc disorders/degeneration [J]? Eur Spine J, 2008, 17(1):2-19.
13. 赵献峰,刘浩,丰干均,等.脊索细胞促进髓核软骨样细胞增殖及表型维持 [J].中国修复重建外科杂志,2008,22(8):939-943.
14. Iwashina T, Mochida J, Sakai D. Feasibility of using a human nucleus pulposus cell line as a cell source in cell transplantation therapy for intervertebral disc degeneration [J]. Spine, 2006, 31(11):1177-1186.
15. 邵建树,吴小涛,王运涛,等.兔骨髓间充质干细胞与髓核细胞共培养后的营养效应和类髓核分化效应[J].中国脊柱脊髓杂志,2009,19(5):381-387.
16. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains [J]. Exp Cell Res, 1965, 37:614-636.
17. d'Adda di Fagnana F, Reaper PM, Clay-Farrace L, et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence [J]. Nature, 2003, 426(6963):194-198.
18. 张荣峰,阮狄克,张超,等.不同代次成人正常髓核细胞的形态及生长动力学比较[J].脊柱外科杂志,2008,6(3):137-140.
19. Yang SH, Wu CC, Shih TT, et al. In vitro study on interaction between human nucleus pulposus cells and mesenchymal stem cells through paracrine stimulation [J]. Spine, 2008, 33(18):1951-1957.
20. Moon SH, Nishida K, Gilbertson LG, et al. Biologic response of human intervertebral disc cells to gene therapy cocktail [J]. Spine, 2008, 33(17):1850-1855.
21. Yang SH, Wu CC, Shih TT, et al. Three-dimensional culture of human nucleus pulposus cells in fibrin clot: comparisons on cellular proliferation and matrix synthesis with cells in alginate [J]. Artif Organs, 2008, 32(1):70-73.
22. Sowa G, Agarwal S. Cyclic tensile stress exerts a protective effect on intervertebral disc cells [J]. Am J Phys Med Rehabil, 2008, 87(7):537-544.
23. 张荣峰,张超,阮狄克.成人正常和突出椎间盘髓核细胞的形态及生长动力学比较 [J].第二军医大学学报,2006,27(5):479-483.

(收稿日期:2009-11-27 修回日期:2010-02-03)

(英文编审 蒋欣/郭万首)

(本文编辑 刘彦)