

大鼠椎间盘软骨终板软骨细胞 体外自然退变模型的建立

石继祥, 王拥军, 施 杞, 周 泉, 孙 鹏, 卞 琴, 周重建

(上海中医药大学龙华医院, 上海中医药大学脊柱病研究所, 上海 200032)

[摘要] 目的: 建立大鼠椎间盘软骨终板软骨细胞体外自然退变模型, 为椎间盘退变的机制研究提供载体。方法: 酶消化及自然传代法分离培养大鼠椎间盘软骨终板软骨细胞, 观察其形态学变化。采用 MTT 法测定第 1 代软骨细胞的生长曲线。采用免疫细胞化学法检测其特征性 I 型胶原的表达情况, 对该模型进行鉴定。结果: 大鼠椎间盘软骨终板软骨细胞表达特征性 I 型胶原。第 1 代细胞培养在生长第 13 天后, 细胞分裂能力明显下降, 核仁不清, 细胞变形明显, 以梭形为主, 折、旋光性弱, 细胞间隙变大, 轮廓增强, 胞浆内可见空泡、脂滴; I 型胶原合成明显下降, 细胞增殖率显著降低; 呈现自然退变过程。结论: 建立椎间盘软骨终板软骨细胞体外自然退变模型, 为椎间盘退变机制研究提供较好的细胞学基础。

[关键词] 椎间盘; 软骨终板软骨细胞; 退行性变; 动物模型

[中图分类号] R556.7 [文献标识码] A [文章编号] 1672-1977(2006)03-0293-05

An in vitro natural degeneration model of chondrocytes derived from endplate of intervertebral discs of rats

Ji-Xiang SHI, Yong-Jun WANG, Qi SHI, Quan ZHOU, Peng SUN, Qin BIAN, Chong-Jian ZHOU

(Institute of Spinal Diseases, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

ABSTRACT Objective: To set up a natural degeneration model of chondrocytes derived from endplate of intervertebral discs of rats in order to offer an appropriate carrier for the study on mechanism of intervertebral disc degeneration. Methods: The method of enzyme digestion combined with natural subculture was used to set up the in vitro natural degeneration model of chondrocytes derived from the endplate of intervertebral disc of rats. The morphological appearances and microstructures of the chondrocytes of different generations were observed. The expression of collagen I in chondrocytes was detected by immunocytochemical method. Results: The chondrocytes derived from the endplate of intervertebral disc expressed collagen I. After 13 days of culture, the chondrocytes of generation 1 showed that the ability of cell division descended, the nucleoli became unclear, the cells deformed obviously, fusiform shape with weak optical activity appeared, and the intercellular space was enlarged. There were vacuoles and lipid droplets in cytoplasm. The synthesis of collagen I, as well as the cell proliferation rate, descended notably. All results showed the natural degeneration process of the chondrocytes. Conclusion: The in vitro natural degeneration model of chondrocytes derived from endplate of intervertebral discs of rats was successfully established. This can offer the cytological basis for study on the mechanism of intervertebral disc degeneration.

KEY WORDS Intervertebral disc; chondrocyte of the endplate; degeneration; animal models

Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao / J Chin Integr Med, 2006, 4(3): 293-297 www.jcimjournal.com

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 30371794 & No. 30572398); 国家自然科学基金重点资助项目 (No. 0330700); 上海市科技“启明星”跟踪计划资助项目 (No. 05QMH1412); 上海市医学重点学科建设资助项目 (No. 05027); 上海市重点学科建设资助项目 (No. T0303)

Correspondence to: Prof. Yong-Jun WANG. E-mail: yjwang88@hotmail.com

椎间盘退变(intervertebral disc degeneration, IVDD)是一系列脊柱退行性疾病的根本病理基础,导致椎管狭窄、骨赘形成、脊柱节段不稳等,从而压迫或刺激神经根、脊髓等组织,引起腰腿痛甚至脊柱病变。但目前尚无理想的可供研究的体外 IVDD 模型。本实验拟建立大鼠椎间盘软骨终板软骨细胞体外自然退变模型,为椎间盘退变机制研究提供细胞学基础。

1 材料与方 法

1.1 大鼠椎间盘软骨终板软骨细胞的培养

1.1.1 主要试剂和仪器 达氏改良依氏培养基(Dulbeco's modified Eagle's Medium, DMEM),美国 Gibco 公司产品; 型胶原酶,美国 Sigma 公司产品;胰蛋白酶,美国 Promega 公司产品;5.6% NaHCO₃ 和小牛血清,杭州四季青生物工程材料有限公司产品;四氮唑蓝 [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, MTT], 上海思吉生物制品有限公司产品;兔抗鼠 型胶原多克隆抗体,英国 Novocastra Laboratories Ltd. 公司产品;免疫组化试剂盒,丹麦 DAKO 公司产品。CD-120 Biotwin 透射电子显微镜,荷兰飞利浦公司产品;倒置相差显微镜,日本 Olympus 公司产品;培养瓶,丹麦 Nunclon 公司产品;CSB-1 超净工作台,上海净化设备厂产品;B-5060 EK-CO₂ 细胞培养箱和 Megafuge 1.0 R 低温离心机,德国 Heraeus 公司产品;6 孔和 96 孔培养板,美国 Corning-Costar 公司产品;法国 Millex 0.22 μm 一次性过滤器。

1.1.2 实验动物 40 只雄性 SD 大鼠,清洁级,一月龄,体质量(100 ± 20)g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司(中国科学院上海分院)提供,合格证号:沪动合证 1548 号。

1.1.3 细胞培养方法 采用连续酶消化及自然传代法。大鼠常规麻醉、消毒,无菌术下取脊柱并分离椎间盘;标本离体后立即用 Hanks 液冲洗 3 次,将血污全部洗净;然后将椎间盘组织中的软骨终板置于容器内,加入适量 Hanks 液,用眼科剪将组织剪碎,使组织块体积 < 1 mm³, 并放入锥形瓶中;加入 0.25% 胰蛋白酶溶液,37 ℃ 搅拌预消化 15 min; 1 000 r/min, 离心 5 min, 去上清液;加入 0.02% 型胶原酶,37 ℃ 搅拌消化 30 min; 消化后过滤离心, 1 000 r/min, 离心 5 min, 去上清液;加入含小牛血清的培养液后清洗离心(1 000 r/min, 5 min), 去上清液,重复 3 次;取离心沉淀的细胞,吹打后在光镜下计数,按 2 × 10⁴ 密度接种于 25 ml 培养瓶中,加入适量含 20% 小牛血清的 DMEM 培养液 2 ~ 3 ml; 将

培养瓶置于含 95% 空气、5% 二氧化碳的 37 ℃ 细胞培养箱中培养,定期在倒置显微镜下观察细胞贴壁及生长情况。每隔 2 ~ 3 d 更换培养液。以上各步骤均在无菌超净工作台中进行操作。原代细胞形成单层后进行传代,用 0.25% 胰蛋白酶消化,收集细胞制成单个细胞悬液,按 2 × 10⁴ 密度接种于 25 ml 培养瓶中及 6 孔或 96 孔板中。

1.2 观测指标及方法

1.2.1 MTT 法观察细胞生长曲线 将代细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化后分为 5 组,每组各设 10 个复孔,按 2 × 10⁴/ml 细胞密度接种于 96 孔培养板,每隔 2 d 更换 1 次培养液。细胞种植后第 2 天起,每隔 1 d 随机取 1 组,加入 50 mg/ml MTT 20 μl/孔,孵育 4 h 后,吸去上清液,加入二甲亚砷 200 μl/孔,10 min 后在酶标仪上测光密度(optical density, OD)值,波长 492 nm。

1.2.2 软骨细胞形态学观察 分别将原代、代、代、代细胞按 2 × 10⁴/ml 密度接种于预置有盖玻片的 6 孔板中,待细胞 80% 融合后,取出玻片,置于 4% 多聚甲醛溶液中,4 ℃ 固定 20 min,分别做 HE 和甲苯胺蓝染色,常规封片。

1.2.3 软骨细胞超微结构观察 将原代细胞刮下,4 000 r/min,离心 10 min,去上清液,用琼脂预包埋,2.5% 戊二醛前固定,2% 锇酸后固定,常规漂洗,脱水,渗透,环氧树脂包埋,超薄切片,铅盐染色,在透射电子显微镜下进行观察。

1.2.4 型胶原免疫细胞化学染色 采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法(streptavidin-biotin-peroxidase method, SP)。取原代 80% 融合的软骨终板和关节软骨细胞玻片,PBS 洗涤,4% 多聚甲醛固定 30 min,PBS 洗涤 3 次,3 min/次;85%、95% 和 100% 乙醇脱水,用中性树脂将盖玻片无细胞面贴于玻片上,风干;0.3% H₂O₂ 室温孵育 20 min,PBS 洗涤 3 次,3 min/次;0.1% Triton × 100 20 min,PBS 洗涤 3 × 3 min;加入兔抗鼠 型胶原多克隆抗体;4 ℃ 冰箱过夜,PBS 洗涤 3 次,3 min/次;加入二抗(生物素化羊抗兔 IgG,1:400),37 ℃ 30 min,PBS 洗涤 3 次,3 min/次;加入 HRP 结合链霉亲和素(streptavidin-HRP,1:400),37 ℃ 40 min,PBS 洗涤 3 次,3 min/次;0.05% 二氨基联苯氨(diaminobenzidin, DAB)和 0.03% H₂O₂, 12 min;苏木素衬染,常规封片。结果判断:呈现棕黄色为阳性,无着色为阴性。

1.3 统计学分析 计量资料数据采用 SPSS 10.0 进行统计学处理,采用组间比较 *t* 检验。

2 结果

2.1 倒置显微镜下软骨细胞形态学观察 刚分离的终板软骨细胞呈球形,具折、旋光性,24 h 后细胞逐渐开始贴壁,呈梭状,后逐渐伸展为多角形,胞核大而圆,2~3 个核仁,胞浆丰富,内含分泌颗粒。1 周左右,细胞间开始有突起相连接,周围有基质样物质沉积。细胞保持单层生长,经过约 15~20 d 铺满培养瓶; 代细胞贴壁时间较原代细胞短,约 12 h,其增殖速度加快,经过约 10 d,软骨终板细胞铺满培养瓶。随着传代次数的增加,细胞增殖速度开始减慢,当传至 、 代后,细胞分裂能力明显下降,核仁不清,细胞变形明显,梭形为主,边沿模糊,折、旋光性弱,细胞间隙变大,轮廓增强,胞浆内可见空泡、脂滴,表现出细胞老化趋势。见图 1、2。

2.2 软骨细胞 HE 染色结果 HE 染色见软骨细胞呈多角形,核为圆形或椭圆形,有时见有双核,胞浆内可见空泡;培养至第 13 天,细胞核仁不清,变形

明显,以梭形为主,边缘模糊,折、旋光性弱,细胞间隙变大,胞浆内可见空泡、脂滴,表现出细胞老化趋势。见图 3。

2.3 软骨细胞甲苯胺蓝染色结果 甲苯胺蓝染色可见胞浆及细胞周围有紫红色或红色异染出现;培养至第 13 天,细胞变形,以梭形为主,折、旋光性弱,细胞间隙变大,胞浆内可见空泡、脂滴,呈现出老化趋势。见图 4。

2.4 第 代椎间盘软骨细胞生长曲线 培养第 13 天后,细胞增殖率明显下降($OD=0.4261$),与第 7 天(增殖高峰)相比,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 5。

2.5 软骨细胞透射电镜下观察结果 镜下见细胞为圆形或梭形,胞浆内有丰富的粗面内质网及线粒体,核呈圆形或椭圆形,核膜明显,有时可见核仁,细胞膜下及胞浆中有较多的无界膜空泡。见图 6。

2.6 软骨细胞免疫细胞化学染色结果 软骨终板软骨细胞表达 型胶原,与关节软骨细胞表达相同。见图 7。

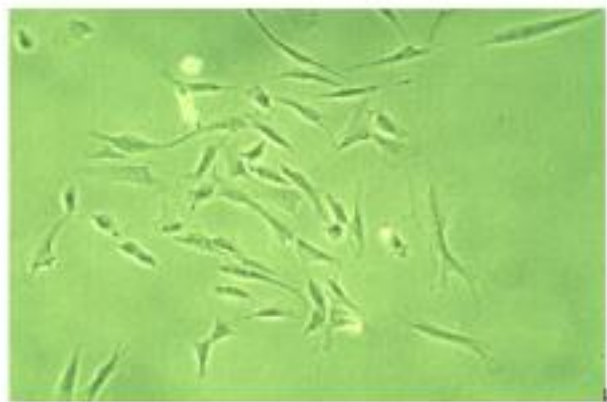


图 1 倒置显微镜下第 代椎间盘软骨细胞生长第 8 天形态学表现($\times 100$)

Figure 1 Morphological appearance of generation chondrocytes of intervertebral disc on the 8th day of growth under vertical microscope ($\times 100$)



图 2 倒置显微镜下第 代椎间盘软骨细胞生长第 13 天形态学表现($\times 100$)

Figure 2 Morphological appearance of generation chondrocytes of intervertebral disc on the 13th day of growth under vertical microscope ($\times 100$)

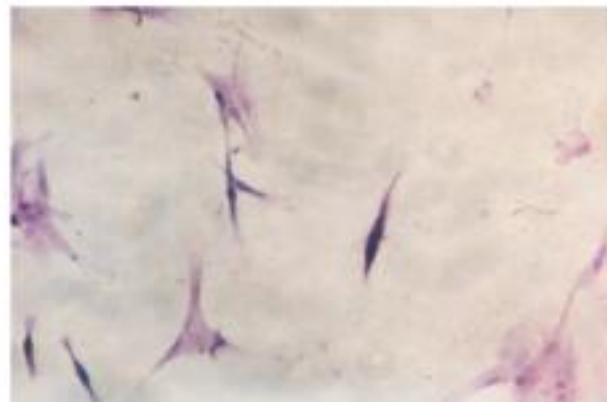


图 3 第 代椎间盘软骨细胞贴壁生长第 13 天形态学表现(HE 染色, $\times 200$)

Figure 3 Morphological appearance of generation chondrocytes of intervertebral disc on the 13th day of adherent growth (HE staining, $\times 200$)

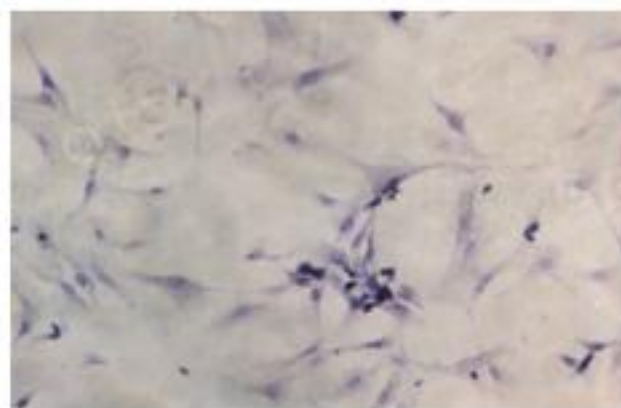


图 4 第 代椎间盘软骨细胞贴壁生长第 13 天形态学表现(甲苯胺蓝染色, $\times 200$)

Figure 4 Morphological appearance of generation chondrocytes of intervertebral disc on the 13th day of adherent growth (toluidine blue staining, $\times 200$)

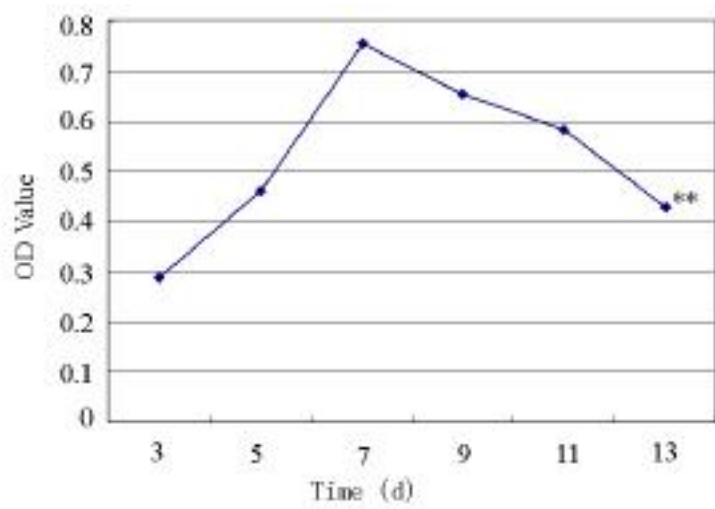


图 5 第 代椎间盘软骨细胞生长曲线

Figure 5 Growth curve of generation chondrocytes of intervertebral disc

** P < 0 .01, vs the 7th day .

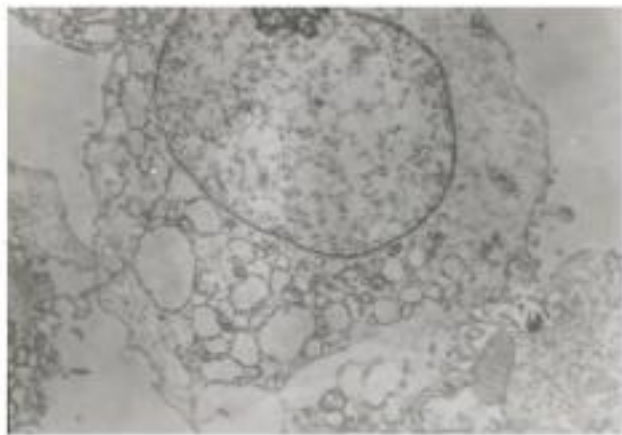


图 6 椎间盘软骨细胞透射电镜下超微结构的观察(×4 200)

Figure 6 Microstructure of chondrocytes of intervertebral disc under transmission electron microscope (×4 200)

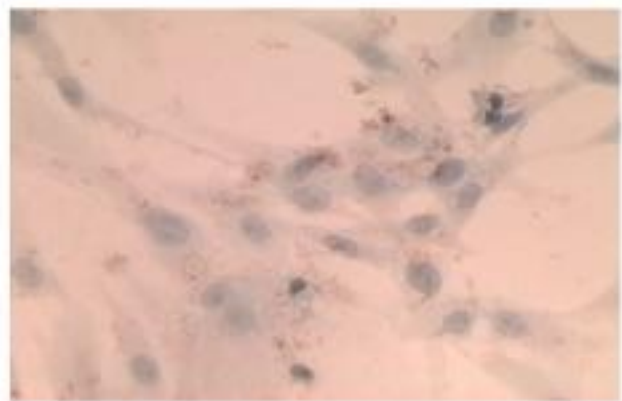


图 7 椎间盘软骨细胞 型胶原的表达(SP 染色法, × 200)

Figure 7 Expression of collagen in chondrocytes of intervertebral disc (SP staining, × 200)

3 讨 论

椎间盘为人体最大的无血管组织,由纤维环、髓核及上、下软骨终板组成,其中纤维环又可分为外层、中层及内层透明区。组织学构成包括细胞及细胞外基质。细胞外基质主要包括胶原、蛋白多糖、水分及少量非胶原蛋白和弹性蛋白等。胶原提供弹性,蛋白多糖通过与水结合具有黏弹性,可对抗压力,分散和吸收负荷^[1]。

椎间盘的营养通路主要有两条^[2]:一是终板途径,椎体内血管的营养物质通过骨髓腔-血窦-软骨终板界面扩散到椎间盘,营养髓核和纤维环内层;二是纤维环途径,即纤维环表面血管营养纤维环外层。软骨终板既有屏障功能,又具有营养中介的作用,Ogata 等^[3]证实其为主要途径;同时软骨终板又是维持脊柱生物力学的重要结构之一^[4]。Lotz 等^[5]和王拥军等^[6]证实,IVDD 形成的关键因素之一是软骨细胞的过度增生、钙化和骨化,导致椎间盘营养供应减少、代谢产物滞留,从而形成椎体骨赘。因此,软骨终板的异常变化在椎间盘退变性疾病的发病过程中具有重要作用。

既往研究发现,椎间盘细胞外基质表达软骨细胞的特征产物——蛋白多糖和 型胶原^[7]。但是,对该特征产物具体的分泌部位尚存在争议。一般认为,髓核细胞在胚胎时期为脊索细胞,随着年龄的增长,脊索细胞消失。纤维环含有类软骨样细胞和类纤维样细胞。软骨终板的细胞表型被普遍认为是软骨细胞。本实验采用免疫组化方法,发现 1 月龄大鼠椎间盘软骨终板细胞表达 型胶原,与同种动物不同部位的关节软骨细胞一致。

软骨细胞的表型与细胞形态之间有着密切的联系,只有圆形、多角形的细胞才具有合成软骨特异性细胞外基质的功能^[8]。通过 HE 和甲苯胺蓝染色发现,软骨终板细胞在原代和第 、 代时绝大部分呈圆形或多角形,随着传代次数的增加,圆形、多角形细胞数量减少,出现梭形细胞。通过透射电镜观察培养细胞的超微结构,发现细胞核仁明显,线粒体、内质网、高尔基体发达,表明培养的细胞具有旺盛的活力。本研究通过 MTT 法,发现椎间盘软骨细胞在生长第 5 天起开始增殖,于第 7 天达到增殖顶峰,与相关研究报道相似^[9],亦与本课题组既往的研究结果相符。

王拥军等^[10]通过实验发现,由椎体骨髓腔血窦发出的血管芽可伸入软骨终板内,大鼠颈椎间盘退变模型的血管芽分布不匀,管壁粗糙不平。由此推测在大鼠颈椎间盘退变模型椎体与软骨终板交界面血管芽内有瘀血存在,阻碍了椎间盘的营养通路。随着年龄和异常应力的施加,软骨终板逐渐变薄,出现椎间盘结构的紊乱和细微的裂纹^[11];进一步发展则出现软骨终板钙化,并逐渐为骨组织所取代^[12],而软骨终板的退变可以加速椎间盘的退变过程^[13,14]。根据上述研究,王拥军等^[15,16]建立了椎间盘退变的动静力失衡性体内模型,并已得到了广泛的应用。

本实验发现,当第 代椎间盘软骨终板软骨细

胞培养至第 13 天后,细胞分裂能力明显下降,核仁不清,细胞变形明显,以梭形为主,边缘模糊,折、旋光性弱,细胞间隙变大,轮廓增强,胞浆内可见空泡、脂滴; 型胶原含量明显下降;细胞增殖率显著降低;呈现自然退变过程。因此,通过体外细胞培养建立其自然退变模型,同时研究软骨终板内软骨细胞的生长、增殖、分化等过程,对于进一步探讨软骨终板的组织、细胞结构变化,以及开展针对性的延缓或抑制椎间盘软骨终板退变的研究,具有重要意义。

(致谢:感谢上海市瑞金医院伤骨科研究所邓廉夫教授、冯伟副教授、王君老师和许福平老师提供的帮助。)

[参考文献]

- 1 安胜军,李恩.人类椎间盘退变与年龄的关系.中国矫形外科杂志,2000,7(4):379-381.
- 2 许理忠,王拥军,施杞.成人颈椎间盘退变机理研究.辽宁中医杂志,2002,29(9):526-528.
- 3 Ogata K, Whiteside LA. 1980 Volvo award winner in basic science. Nutritional pathways of the intervertebral disc. An experimental study using hydrogen washout technique. Spine, 1981, 6(3): 211-216.
- 4 Urban JP, Holm S, Maroudas A, et al. Nutrition of the intervertebral disc: An in vivo study of solute transport. Clin Orthop Relat Res, 1977, (129): 101-114.
- 5 Lotz JC, Chin JR. Intervertebral disc cell death is dependent on the magnitude and duration of spinal loading. Spine, 2000, 25(12): 1477-1483.
- 6 王拥军,施杞,沈培芝,等.芪麝颈康方对兔退变颈椎骨赘形成部位碱性磷酸酶活性的影响.中国中西医结合杂志,2000,20(3):199-201.
- 7 Antoniou J, Steffen T, Nelson F, et al. The human lumbar intervertebral disc: evidence for changes in the

biosynthesis and denaturation of the extracellular matrix with growth, maturation, ageing, and degeneration. J Clin Invest, 1996, 98(4): 996-1003.

- 8 Von der Mark K, Gauss V, von der Mark H, et al. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. Nature, 1977, 267(5611): 531-532.
- 9 刘斌,瞿东滨,金大地,等.软骨终板细胞生物学特性及体外退行性变的机制研究.中国临床康复,2003,7(29):3690-3692.
- 10 王拥军,施杞,周重建,等.益气化痰方对大鼠颈椎间盘软骨终板内血管的影响.中国中医骨伤科杂志,2002,10(4):1-4.
- 11 Modic MT, Steinberg PM, Ross JS, et al. Degenerative disk disease: assessment of changes in vertebral body marrow with MR imaging. Radiology, 1988, 166(1 Pt 1): 193-199.
- 12 Bernick S, Walker JM, Paule WJ. Age changes to the annulus fibrosus in human intervertebral discs. Spine, 1991, 16(5): 520-524.
- 13 Oda J, Tanaka H, Tsuzuki N. Intervertebral disc changes with aging of human cervical vertebra: from the neonate to the eighties. Spine, 1988, 13(11): 1205-1211.
- 14 Pritzker KP. Aging and degeneration in the lumbar intervertebral disc. Orthop Clin North Am, 1977, 8(1): 66-77.
- 15 王拥军,施杞,沈培芝,等.动静力失衡性大鼠颈椎间盘退变模型的动态观察.中国中西医结合杂志,2001,21(1):199-202.
- 16 王拥军,施杞,李家顺,等.大鼠退变颈椎间盘组织基因表达谱的研究.第二军医大学学报,2002,23(12):1335-1338.

[收稿日期] 2006-01-25

博士后招聘启事

上海中医药大学附属龙华医院及上海中医药大学脊柱病研究所博士生导师王拥军教授目前承担国家自然科学基金(2项)、国家教育部“新世纪优秀人才支持计划”、上海市领军人才计划等12项科研项目,并与美国、英国、香港地区开展科研合作,主要从事退变性脊柱病和代谢性骨病的发病机制及中医药防治作用的研究。现计划招收博士后1~2名。

应聘条件:中医学、医学、生物学或相近专业。有较强分子生物学、生物化学、免疫学及病理学理论基础及实验经验者优先。

应聘手续:(1)提交本人简历、简短自我介绍、博士学位答辩论文摘要。(2)博士生导师在内的推荐信2封。(3)报名截止日期:2006年6月30日。

联系方式:来信请寄上海市徐汇区宛平南路725号77信箱脊柱病研究所王拥军收。邮编:200032; E-mail: yjwang88@hotmail.com; 电话/传真:021-54232267。