

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.11.001 [http://www.crter.org]

武海军, 银和平, 李树文, 白明, 杜志才, 曹振华. 不同代次兔髓核细胞的形态学特征和生物学性状[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(11):1901-1908.

## 不同代次兔髓核细胞的形态学特征和生物学性状\*\*

武海军, 银和平, 李树文, 白明, 杜志才, 曹振华

内蒙古医科大学第二附属医院, 内蒙古自治区呼和浩特市 010030

### 文章亮点:

- 1 课题首次在观察不同代次兔髓核细胞形态学变化的同时, 还对不同代次兔髓核细胞 II 型胶原和蛋白聚糖的表达程度进行测定, 同时研究不同代次兔髓核细胞的形态学变化与生物学性状的变化。
- 2 实验结果显示, 前 3 代的髓核细胞代谢旺盛, 表型一致, 聚集蛋白聚糖和 II 型胶原表达正常, 传第 4 代后髓核细胞开始出现衰老及退变。
- 3 实验证实了兔髓核细胞传到第 4 代及以后代数细胞发生了不同程度的退变, 不再适合作为种子细胞用于治疗椎间盘退变性疾病。证实的只是兔髓核细胞, 人类髓核细胞是否也和兔髓核细胞性质一样还有待进一步研究。

### 关键词:

组织构建; 软骨组织构建; 兔; 髓核细胞; 体外培养; 聚集蛋白聚糖; II 型胶原; 椎间盘退变; 细胞培养; 省级基金; 组织构建图片文章

### 摘要

**背景:** 椎间盘退变是个慢性、复杂的过程, 然而椎间盘退变其发生机制尚未完全阐明, 很难自行修复。近年来研究细胞移植治疗椎间盘退变性变尚处在实验室阶段。研究髓核细胞的生物学性状可为研究椎间盘退变机制、组织工程构建椎间盘、基因治疗等提供理论依据。

**目的:** 研究兔不同代次髓核细胞的生物学特性, 旨在找出合适的种子细胞去治疗椎间盘退变性疾病。

**方法:** 从新西兰大白兔椎间盘髓核组织中, 分离并培养髓核细胞同时进行培养传代, 对原代及第 3, 4 代髓核细胞进行苏木精-伊红染色观察细胞形态学变化; 甲苯胺蓝染色和免疫细胞化学法检测髓核细胞内聚集蛋白聚糖和 II 型胶原的表达; 反转录 PCR 法测定 II 型胶原和聚集蛋白聚糖 mRNA 的表达水平, 观察各代髓核细胞生物学特性的变化。

**结果与结论:** 兔椎间盘髓核细胞可以在体外培养并进行传代, 原代髓核细胞一般需 7 d 左右贴壁, 形状呈类圆形或多角形, 原代和第 3 代髓核细胞都呈圆形或多角形, 活力较强, 苏木精-伊红染色后细胞核被染成均一蓝黑色, 胞浆呈现淡粉色; 髓核细胞经过甲苯胺蓝染色后, 胞浆内呈现天蓝色, 通过 II 型胶原免疫组织化学染色后, 胞浆内表现为黄褐色沉淀。到第 4 代细胞出现退变, II 型胶原和聚集蛋白聚糖 mRNA 的表达水平较前几代细胞显著下降。前 3 代的髓核细胞代谢旺盛, 表型一致, 聚集蛋白聚糖和 II 型胶原表达正常, 传第 4 代后髓核细胞开始出现衰老、退变。

## Different generations of rabbit nucleus pulposus cells: Morphological and biological properties

Wu Hai-jun, Yin He-ping, Li Shu-wen, Bai Ming, Du Zhi-cai, Cao Zhen-hua

The Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010030, Inner Mongolia Autonomous Region, China

### Abstract

**BACKGROUND:** Intervertebral disc degeneration is a chronic and complicate procedure, but its mechanism is still unclear and difficult for self-repairs. Recent studies addressing stem cell transplantation

武海军★, 男, 1985年生, 汉族, 内蒙古自治区呼和浩特市人, 内蒙古医科大学在读硕士, 主要从事脊柱外科方面的研究。  
358280432@qq.com

通讯作者: 银和平, 硕士, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 内蒙古医科大学第二附属医院副院长兼微创脊柱外科主任, 内蒙古医科大学第二附属医院, 内蒙古自治区呼和浩特市 010030  
nmgyhp0471@126.com

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 2095-4344  
(2013)11-01901-08

收稿日期: 2012-12-10  
修回日期: 2012-12-26  
(20121029013/YJ·W)

Wu Hai-jun★, Studying for master's degree, the Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010030, Inner Mongolia Autonomous Region, China  
358280432@qq.com

Corresponding author: Yin He-ping, Master, Professor, Chief physician, Master's supervisor, the Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010030, Inner Mongolia Autonomous Region, China  
nmgyp0471@126.com

Supported by: the Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region, No. 2009MS1117\*

Received: 2012-12-10  
Accepted: 2012-12-26

in the treatment of disc degeneration disease are still limited to the laboratory study. Research on biological properties of nucleus pulposus cells can provide theoretical basis for studying the mechanism underlying intervertebral disc degeneration, construction of the intervertebral disc by tissue engineering, and gene therapy.

**OBJECTIVE:** To investigate the characteristics of different generations of rabbit nucleus pulposus cells, searching for the best suitable seed cells to treat degenerative disc diseases.

**METHODS:** Nucleus pulposus cells from New Zealand white rabbits were separated, cultured and then passaged. The morphological changes of primary, passages 3 and 4 nucleus pulposus cells were observed by hematoxylin-eosin staining under an inverted microscope. The biological properties of rabbit nucleus pulposus cells were observed. Aggrecan and type II collagen expressions were detected by toluidine blue and immunocytochemistry staining, respectively. Type II collagen and glycosaminoglycan mRNA expressions in the nucleus pulposus cells were detected by reverse transcription-PCR.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Rabbit nucleus pulposus cells were successfully cultured and passaged *in vitro*. Primary nucleus pulposus cells were round or polygonal, and the average adherence time was 7 days. The first and third generations of nucleus pulposus cells were round or polygonal, and have strong vitality. Hematoxylin-eosin staining showed that nuclei were in a uniform blue-black, and cytoplasm showed light pink. The cytoplasm of nucleus pulposus cells was sky blue stained for toluidine blue staining, and type II collagen immunohistochemical staining showed the cytoplasm of nucleus pulposus cells displayed yellowish-brown. Passage 4 nucleus pulposus cells appeared with degeneration, and type II collagen and glycosaminoglycan mRNA expression was significantly decreased compared with previous generations. The first three generations of nucleus pulposus cells were exuberant in metabolism and showed consistent phenotypes and normal expression of aggrecan and type II collagen. Passage 4 nucleus pulposus cells began to age and degenerate.

**Key Words:** tissue construction; cartilage tissue construction; rabbits; nucleus pulposus cells; *in vitro* culture; aggrecan; type II collagen; intervertebral disc degeneration; cell culture; provincial grants-supported paper; tissue construction photographs-containing paper

Wu HJ, Yin HP, Li SW, Bai M, Du ZC, Cao ZH. Different generations of rabbit nucleus pulposus cells: Morphological and biological properties. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(11): 1901-1908.

## 0 引言

腰椎退变性疾病主要是由于腰椎间盘突出引起<sup>[1]</sup>, 而事实上, 人类椎间盘最早在20岁左右即开始退变<sup>[2]</sup>。椎间盘的退变过程不仅仅表现为形态学上的变化, 同时伴随着组织学与生化性质的系统性改变, 现已发现许多分子生物学方面的机制与椎间盘退变密切相关, 如基质金属蛋白酶、金属蛋白酶组织抑制因子、生长因子及基因等是近年来兴起的研究。随着细胞生物学和分子生物学的不断发展, 细胞治疗在治疗椎间盘退变的实验研究中越来越受到人们的重视。促进椎间盘髓核细胞的再生是新兴的治疗方法之一<sup>[3-4]</sup>。因此, 在体外能否培养并获得高纯度、高活性的髓核细胞对于研究髓核细胞的功能和再生条件起到至关重要的作用<sup>[5]</sup>, 但在体外培养髓核细胞存在表型丢失问题, 对髓核细胞性质的研究产生了影响<sup>[6]</sup>。

为此, 实验拟应用II型胶原酶消化法分离、纯化和培养兔髓核细胞, 并观察和研究兔髓核细胞不同时段的形态学变化和生物学特性<sup>[7]</sup>, 为进一步研究椎间盘退变的机制提供可靠的实验依据。

## 1 材料和方法

**设计:** 细胞对比观察性实验。

**时间及地点:** 于2011年10月至2012年9月在内蒙古医科大学分子病理学实验室完成。

**材料:** 3月龄新西兰大白兔3只, 由内蒙古农业大学实验动物中心提供。实验过程中对动物的处置符合2006年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》<sup>[8]</sup>。

观察不同代次兔髓核细胞形态和生物学性状所使用的主要试剂和仪器:

Main reagents and instruments for observing morphological and biological properties of rabbit nucleus pulposus cells at different generations:

试剂及仪器	来源
胰蛋白酶, 胎牛血清, LG-DMEM 培养基	美国 HyClone 公司
II 型胶原酶	美国 Gibco 公司
免疫组化试剂盒	北京博奥生公司
甲苯胺蓝染剂	美国 Sigma 公司
凝胶成像系统	Gene 公司
电泳仪(DYY-6C 型)	北京市六一仪器厂
H6-1 微型电泳槽	上海精益有机玻璃制品仪器厂
PTC-200 型 PCR 仪	美国 MJ 公司

### 方法:

**兔髓核组织的获取:** 空气栓塞法处死新西兰大白兔后, 置于动物手术台上。取俯卧位, 络合碘及体积分数 75% 乙醇消毒背部皮肤, 从背部入路取出兔胸腰段脊柱。将脊柱立刻转移至无菌超净台上。以 D-PBS 反复清洗消毒, 组织剪仔细剔除附着组织。尖刀切开纤维环, 暴露髓核, 眼科镊小心夹取髓核组织, 置于装有 D-PBS 的培养皿中。

**髓核细胞的分离:** D-PBS 反复清洗, 用眼科剪将髓核组织剪成 1 mm×1 mm×1 mm 大小的小碎块, 加入 0.25% 胰蛋白酶, 室温下静置消化 5-10 min 后, 滴入低糖培养基(含体积分数 20% 胎牛血清, 低糖 DMEM 液, 青霉素 100 mg/L, 链霉素 100 mg/L) 约 1 mL 中止消化, 用移液管吸取组织液置 15 mL 离心管中。900×g 离心 5 min, 倒掉上清液。加入 0.25% II 型胶原酶混匀后, 放到摇床上消化 4 h 后, 中止消化。然后用 80 目筛网过滤, 将过滤液 900×g 离心 5 min, 倒掉上清液, 用 D-PBS 液反复清洗后再次 900×g 离心 5 min, 如此反复 3 次后, 加入培养基(含体积分数 20% 胎牛血清, 低糖 DMEM 液, 青霉素 100 mg/L, 链霉素 100 mg/L) 同时用移液管将细胞团吹打均匀, 使细胞悬液中细胞分布均匀。

**髓核细胞的计数与活性鉴定:** 移取 10 μL 细胞悬液入另一离心管中, 再加入 10 μL 0.4% 锥虫蓝液, 混匀, 放置 1.0-2.0 min, 用吸管将混匀好的 20 μL 液体加到细胞计数板中, 把计数板装入电脑的卡槽中, 打开细胞计数软件进行细胞计数, 细胞浓度为 1×10<sup>9</sup> L<sup>-1</sup>。

**髓核细胞的培养:** 调整细胞浓度至 1×10<sup>8</sup> L<sup>-1</sup> 后接种于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶中, 置于 37 °C, 体积分数 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。每日倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司)观察

细胞生长情况, 每 3 d 换液 1 次, 待细胞大部分融合后传代; 取每 1 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髓核细胞形态、贴壁时间和融合时间同时对每代髓核细胞进行苏木精-伊红染色、甲苯胺蓝染色及免疫组化检测 II 型胶原。

**苏木精-伊红染色观察髓核细胞形态:** 细胞爬片后用 PBS 清洗 5 min×3 次, 冷丙酮固定 15-20 min, 苏木精染色 10 min, 体积分数 1% 盐酸乙醇分化 60 s, 体积分数 0.1% 伊红乙醇染色 60 s, PBS 清洗 5 min×3 次, 乙醇分化至细胞胞浆呈桃红色后, 中性树脂封固后, 光镜下观察、拍照。

**甲苯胺蓝染色观察髓核细胞形态:** 细胞爬片 PBS 清洗 5 min×3 次, 冷丙酮固定 15-20 min, 1% 的甲苯胺蓝浸染 2.0-3.0 h 后, 乙醇洗去剩余的染液, 中性树脂封固后, 光镜下观察、拍照。

**免疫组化检测髓核细胞中 II 型胶原的表达:** 细胞爬片 PBS 清洗 5 min×3 次, 冷丙酮固定 15-20 min, 加体积分数 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 37 °C 孵育 10 min 阻断内源性过氧化物酶, PBS 清洗 5 min×3 次, 滴加 II 型胶原一抗(美国 Santa Cruz 公司), 37 °C 孵育 2 h, PBS 清洗 5 min×3 次, 滴加辣根过氧化物酶标记的二抗(北京博奥森公司), 37 °C 孵育 30 min, PBS 清洗 5 min×3 次, DAB 显色 15 min, PBS 清洗 5 min×3 次, 苏木精复染 1 min, 体积分数 1% 盐酸乙醇分化 60 s, 中性树脂封固后, 光镜下观察、拍照。

**反转录 PCR 法检测 II 型胶原蛋白与蛋白多糖的 mRNA 表达:** 采用反转录 PCR 法检测原代和第 3, 4 代髓核细胞的 II 型胶原和聚集蛋白聚糖 mRNA 的表达, 引物由上海生物工程技术有限公司设计, 引物序列如下:

引物序列:

Primer sequences:

基因名称	引物序列	序列登录号	产物长度(bp)
聚集蛋白聚糖	5'-GTC CAC CAT TCG	XM_002723376.1	98
	GCA TAA CT-3'		
	5'-CAG GTC AGG GAT TCT GTG TGT-3'		
II 型胶原	5'-CTC CCA GAA CAT	NM_001195671.1	194
	CAC CTA CCA-3'		
	5'-TGA CAG TCT TGC CCC ACT TAC-3'		
β-actin	5'-ACC GAC TAC CTC	AF404278.1	86
	ATG AAG ATC CT-3'		
	5'-TCC TTG ATG TCC CGC ACG AT-3'		

3 代细胞分别于培养第 7 天后离心收集细胞, 用 RNA 提取试剂盒抽提细胞总 RNA, 测定 RNA 浓度, 用 RT 试

剂盒将RNA反转录为cDNA, 然后以cDNA的第1链作为模板进行PCR扩增。PCR条件为: 95 °C 预变性4 min, 随后95 °C 变性40 s, 58 °C 退火30 s, 72 °C 延伸40 s, 共进行35个循环, 再72 °C 延伸10 min。PCR产物经电泳、DNA吸光度扫描检测; 凝胶成像系统(Gene公司)分析检测其积分吸光度值, 与内参 $\beta$ -actin条带的比值为mRNA表达水平参数。

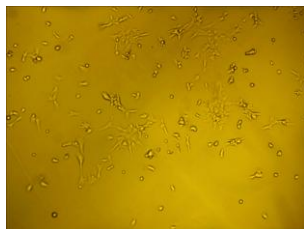
**主要观察指标:** 各代髓核细胞大体形态学的变化及细胞中II型胶原蛋白与聚集蛋白聚糖的表达。

**统计学分析:** 利用SPSS 13.0统计软件包统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析进行均数比较, 并进行组间比较。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

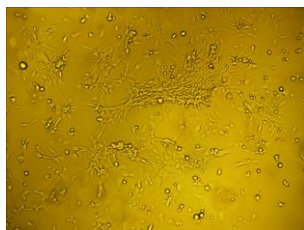
## 2 结果

### 2.1 原代及传代髓核细胞的形态

**2.1.1 原代细胞形态** 最初消化的髓核细胞需7 d左右时间贴壁, 刚贴壁后细胞呈圆形、短梭形、多边形, 胞质向外突出, 且突出逐渐延伸。10–14 d后80%–90%的细胞融合成细胞团, 形状呈火焰状或漩涡状, 胞质较多, 折光性好, 细胞核呈卵圆形、较大, 轮廓清楚, 可见多个核仁, 见图1。



A: 髓核细胞培养第7天时贴壁



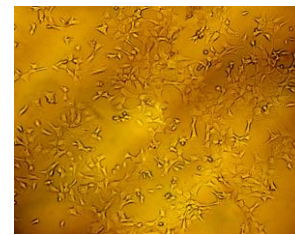
B: 髓核细胞培养第12天细胞融合

注: 原代培养的髓核细胞随培养时间的延长逐渐融合成火焰状或漩涡状细胞团。

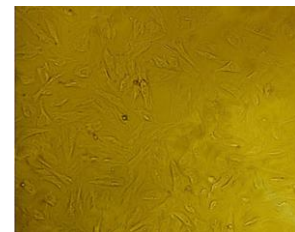
图1 原代培养7, 12 d的兔髓核细胞(倒置显微镜,  $\times 100$ )

Figure 1 Rabbit nucleus pulposus cells after 7 and 12 d of primary culture (Inverted phase contrast microscope,  $\times 100$ )

**2.1.2 传代细胞形态** 与原代细胞相比, 经过传代后的细胞贴壁时间明显缩短, 一般24 h左右大部分细胞已贴壁, 形态与原代细胞相似, 有明显的伪足, 有的细胞出现细长或者树根样足突, 但大部分细胞呈现短梭形。梭形细胞的突起数量, 明显低于类圆形和多角形细胞, 并且只有初级突起。髓核细胞传到第4代后, 大部分向梭形转化, 同时细胞突起变长, 胞质含量减少, 折光性消失, 见图2。



A: 第1代



B: 第2代



C: 第3代



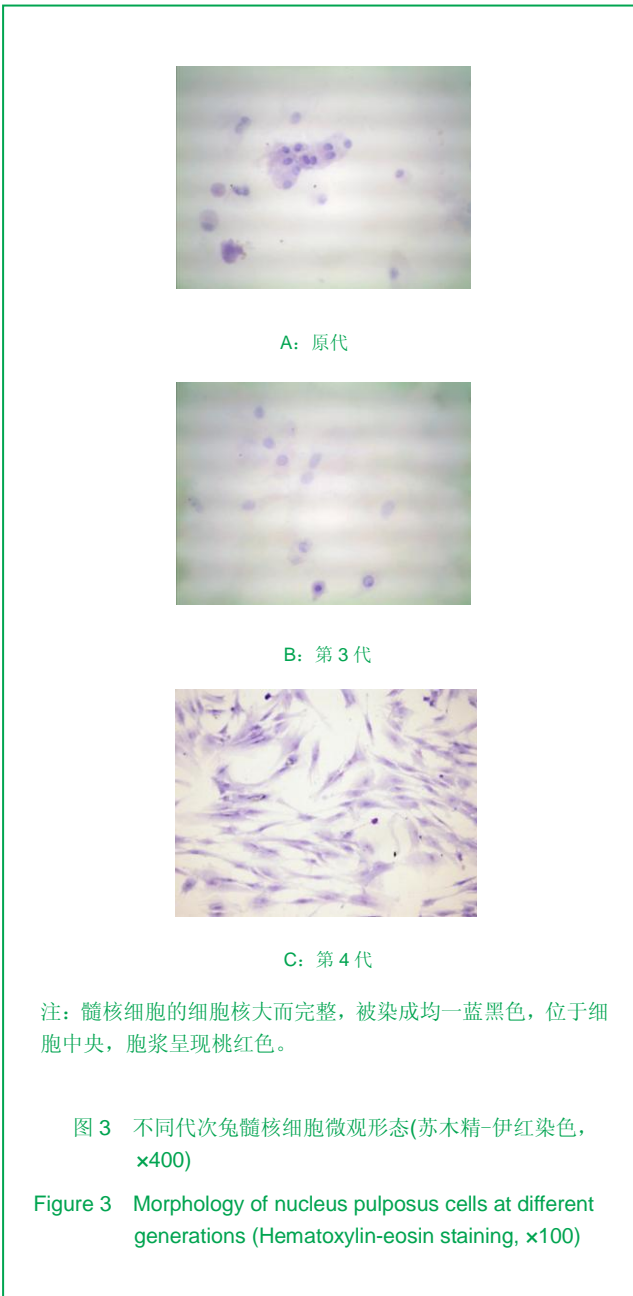
D: 第4代

注: 传代细胞形态与原代细胞相似, 经过传代后逐渐趋向梭形。

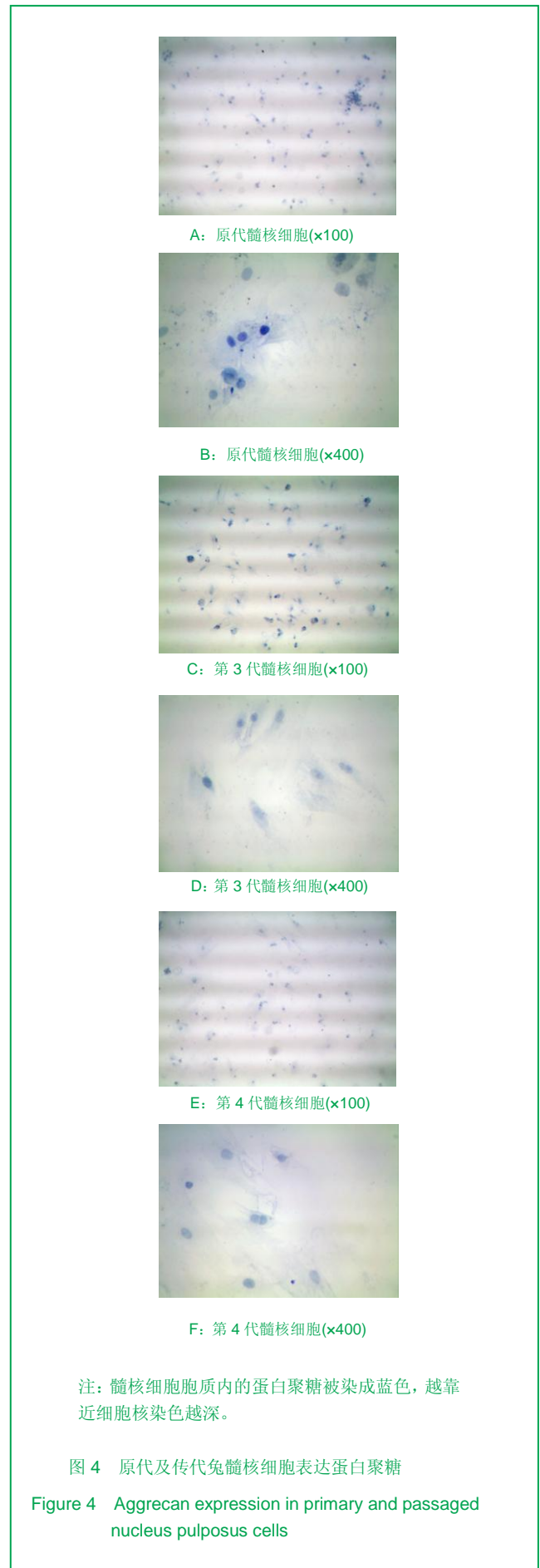
图2 传代培养的兔髓核细胞形态(倒置显微镜,  $\times 100$ )

Figure 2 Morphology of passaged rabbit nucleus pulposus cells (Inverted phase contrast microscope,  $\times 100$ )

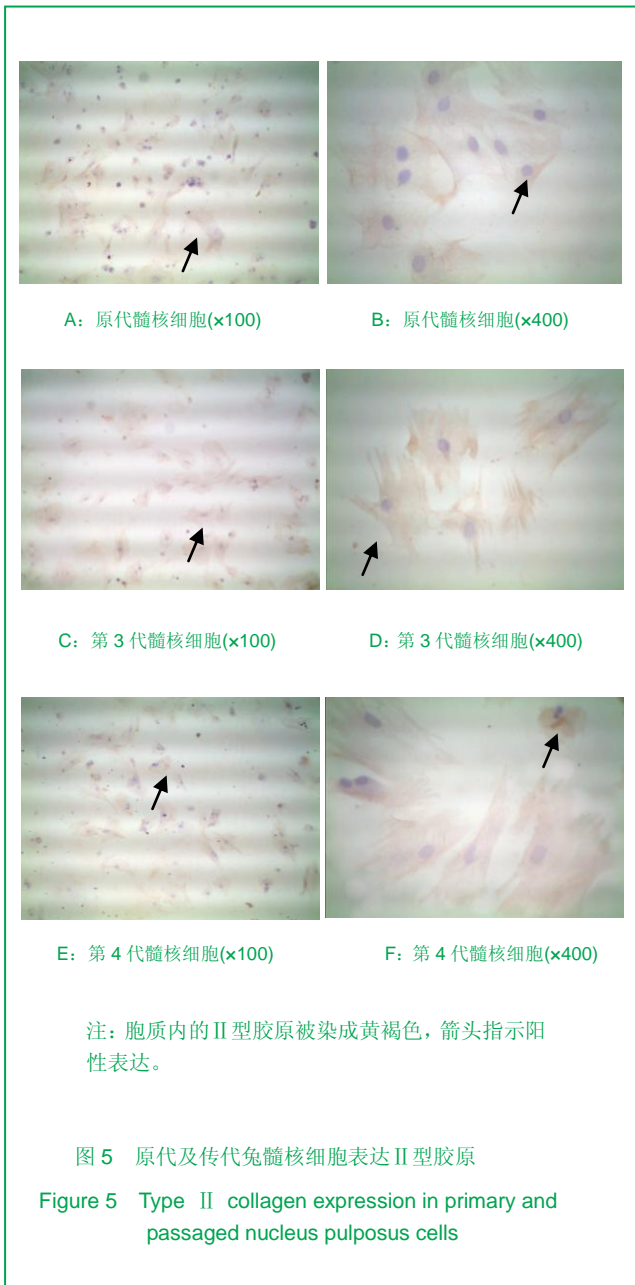
2.2 不同代次髓核细胞的微观形态及表型 苏木精-伊红染色结果显示, 髓核细胞细胞核大而完整, 被染成均一蓝黑色, 位于细胞中央, 胞浆呈现桃红色, 原代髓核细胞呈圆形、短梭形和多边形, 第3代髓核细胞大部分呈现短梭形和多角型, 以2-4个角为主, 原代细胞为典型的集落样生长, 传代后的细胞呈均匀分布的生长, 见图3。



甲苯胺蓝染色结果显示, 髓核细胞胞质内的蛋白聚糖被染成蓝色, 越靠近细胞核染色越深, 原代和第3代髓核细胞中有95%的细胞在胞浆内表达蛋白聚糖, 保持着类软骨细胞的表型, 从第4代细胞开始有大量细胞在胞浆内微量表达蛋白聚糖甚至不表达, 见图4。



细胞免疫细胞化学染色结果显示, 位于胞质内的 II 型胶原被染成黄褐色, 离核越近, 染色越深。原代和第 3 代髓核细胞中有 95% 的细胞在胞浆内表达 II 型胶原, 保持着类软骨细胞的表型, 从第 4 代细胞开始有大量细胞在胞浆内微量表达 II 型胶原甚至不表达, 见图 5。



2.3 不同代次髓核细胞中 II 型胶原和聚集蛋白聚糖 mRNA 的表达 反转录 PCR 检测发现原代和第 3 代髓核细胞中 II 型胶原、聚集蛋白聚糖 mRNA 的表达水平相近 ( $P > 0.05$ ), 同时均较第 4 代髓核细胞高 ( $P < 0.05$ ), 见图 6, 表 1。

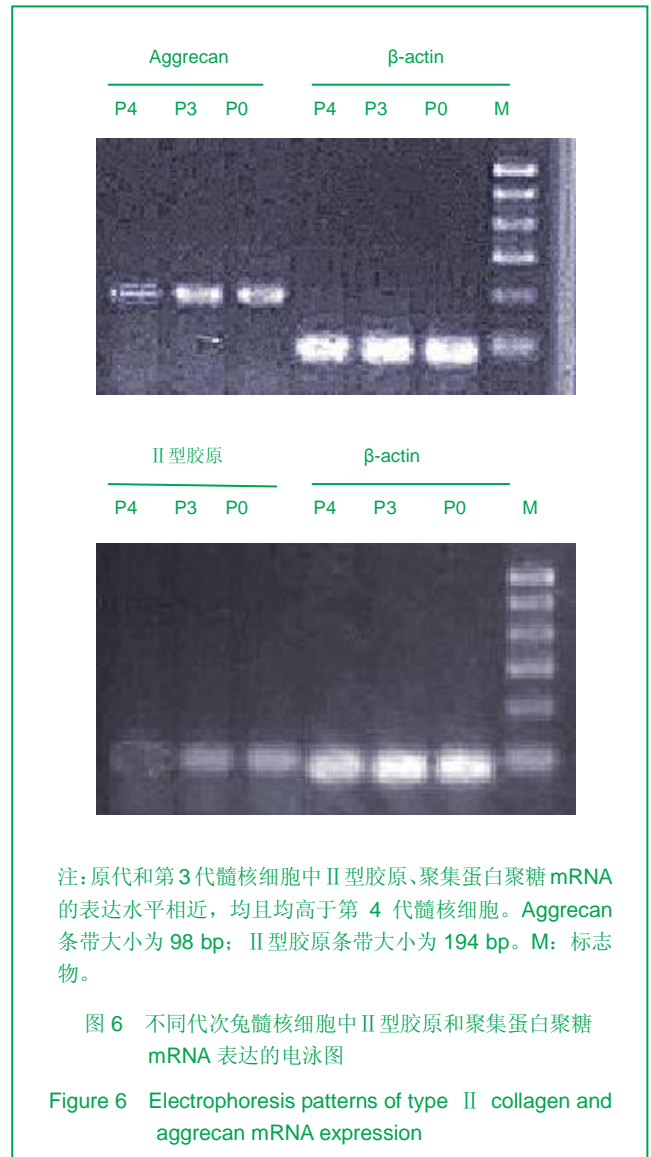


表 1 不同代次兔髓核细胞中 II 型胶原和聚集蛋白聚糖 mRNA 的表达水平

Table 1 mRNA expression of type II collagen and aggrecan in nucleus pulposus cells of different generations ( $\bar{x} \pm s, n=5$ , absorbance ratio to  $\beta$ -actin)

组别	II 型胶原	聚集蛋白聚糖
P0	0.846 8 $\pm$ 0.209 4 <sup>a</sup>	1.011 2 $\pm$ 0.283 4 <sup>a</sup>
P3	0.675 6 $\pm$ 0.238 2 <sup>a</sup>	0.753 9 $\pm$ 0.304 6 <sup>a</sup>
P4	0.213 0 $\pm$ 0.089 6	0.191 7 $\pm$ 0.142 6
F	20.778	19.057
P	0.000	0.000

与 P4 代细胞相比, <sup>a</sup> $P < 0.01$ 。

注: 原代和第 3 代髓核细胞中 II 型胶原、聚集蛋白聚糖 mRNA 的表达水平相近, 均且均高于第 4 代髓核细胞。

### 3 讨论

椎间盘退变的过程中, 遗传、生物和机械因素共同参与了复杂的过程, 其中髓核细胞减少导致椎间盘蛋白多糖含量下降, 是被公认的主要因素之一<sup>[9]</sup>。随着髓核细胞数量的减少和退变, 髓核细胞开始消失并在功能和形态上慢慢向成纤维细胞转化, 导致椎间盘开始退变<sup>[10]</sup>。因此了解椎间盘髓核细胞的生物学特性对阐明椎间盘退变的生物学机制具有重要的指导意义。

实验为了进一步的了解髓核细胞的生物学特性, 以便在指导和治疗椎间盘退变的过程中提供重要的理论依据。正常椎间盘中髓核细胞数量不断减少, 大量细胞衰老和新生细胞生成减少与椎间盘退变有着密切的关系<sup>[11]</sup>。椎间盘在退变的过程中, 髓核细胞经过了多次的变化, 即细胞表型的改变和退化, 包括 II 型胶原蛋白、聚集蛋白聚糖及 Sox-9 基因(是早期胚胎发育相关基因)等表达的下降, 髓核细胞从类软骨细胞逐渐向成纤维样细胞转化<sup>[12-13]</sup>。事实上, 椎间盘在早期退变的时候, 髓核细胞更新和再生速度加快, 以补偿细胞基质的缺失<sup>[14]</sup>。还有报道证实退变的细胞中其基因表达也发生改变<sup>[15]</sup>, 因此可以用髓核细胞表型基因的表达来区别正常椎间盘与退变椎间盘。通常髓核细胞没有特定的表型标记, 由于其细胞外基质与软骨细胞相似, 人们就认为髓核细胞本质是类软骨细胞<sup>[16-17]</sup>, 而 II 型胶原蛋白、聚集蛋白聚糖和 Sox-9 基因是类软骨细胞的重要表达基因, 是判断类软骨细胞的主要标准<sup>[18]</sup>, 随着年龄的增长椎间盘开始发生退变, 椎间盘中 I 型胶原蛋白的表达不断增加而 II 型胶原蛋白和聚集蛋白聚糖的表达不断减少<sup>[19]</sup>。如果可以在髓核细胞退变的早期对其进行有效的干预, 髓核细胞的退变就会减缓甚至发生逆转, 椎间盘退变就会被制止。随着细胞与分子生物学及组织工程学的快速发展, 为早期髓核细胞退变的治疗提供了很多潜在的方法, 但很多方法不是很成熟且都在实验阶段, 所以还需要对髓核细胞的生物学性状有更多的了解才能对其进行有效的治疗。

实验分离培养的髓核细胞贴壁后形态各异, 伪足明显, 有时会出现细长或者树根样的足突, 同时观察到, 髓核细胞的贴壁速度相当缓慢, 2 d 后刚有少量细胞贴壁, 5-7 d 甚至更长时间大部分细胞才贴壁, 但细胞分裂、增长极为缓慢, 细胞生长周期较长, 呈集落样生长。

经 0.25% 胰蛋白酶消化后, 把脱离培养瓶壁的细胞转移到一个新的培养瓶中重新分布, 生长速度明显加快。有学者认为可能是由于细胞分泌的物质限制了细胞的生长, 胰蛋白酶消化后, 消除了细胞周围的分泌物的影响, 使髓核细胞可以更适宜的生长<sup>[20]</sup>。在体外培养过程中随着细胞传代次数的增加, 髓核细胞发生显著的退变, 第 4 代后的髓核细胞倒置显微镜观察和苏木精-伊红染色均发现其从星形、多角形退变为纤维细胞样的梭形, 免疫细胞化学证实聚集蛋白聚糖和 II 型胶原的合成能力已开始降低, 反转录 PCR 法检测第 4 代髓核细胞的 II 型胶原和聚集蛋白聚糖基因的表达较前几代显著降低, 说明在 mRNA 的表达水平, 退变细胞产生 II 型胶原和聚集蛋白聚糖能力显著下降, 结合其形态学的改变说明退变髓核细胞已经开始向成纤维细胞转化。

实验研究证明, 经传代后的髓核细胞贴壁、生长速度均加快, 且第 1-3 代髓核细胞在增殖速度加快的同时, 髓核细胞仍保持着类软骨表型不变, II 型胶原和聚集蛋白聚糖的表达并未减弱。因此, 可应用原代髓核细胞进行细胞移植治疗, 或用原代髓核细胞建立一个细胞培养体系对髓核细胞进行大量的扩增, 以获得足够数量的髓核细胞, 然后对退变椎间盘进行细胞移植治疗, 从而为在临床上应用细胞移植治疗椎间盘退变提供可靠的实验依据。

**基金资助:** 内蒙古自治区自然科学基金项目资助 (2009MS1117)。

**作者贡献:** 银和平和李树文进行实验设计, 实验实施为武海军, 实验评估为银和平, 资料收集为武海军, 武海军成文, 银和平审校, 银和平对文章负责。

**利益冲突:** 课题未涉及任何关于经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理要求:** 实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。

**作者声明:** 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

### 4 参考文献

- [1] Pye SR, Reid DM, Smith R, et al. Radiographic features of lumbar disc degeneration and self-reported back pain. *J Rheumatol.* 2004;31(4):753-758.
- [2] Hadjipavlou AG, Tzermiadianos MN, Bogduk N, et al. The pathophysiology of disc degeneration: a critical review. *J Bone Joint Surg Br.* 2008;90(10):1261-1270.

- [3] Anderson DG, Risbud MV, Shapiro IM, et al. Cell-based therapy for disc repair. *Spine J.* 2005;5(6 Suppl):297S-303S.
- [4] Nerurkar NL, Elliott DM, Mauck RL. Mechanical design criteria for intervertebral disc tissue engineering. *J Biomech.* 2010;43(6):1017-1030.
- [5] Tsai TT, Guttapalli A, Oguz E, et al. Fibroblast growth factor-2 maintains the differentiation potential of nucleus pulposus cells in vitro: implications for cell-based transplantation therapy. *Spine (Phila Pa 1976).* 2007;32(5):495-502.
- [6] Sun HL, Li CD. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.* 2011;15(46):8569-8573.  
孙浩林,李淳德. 原代培养差速贴壁法分离纯化大鼠腰椎间盘髓核细胞[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(46): 8569-8573.
- [7] Wang F, Wu XT, Wang YT, et al. *Zhongguo Jizhu Jisui Zazhi.* 2010;20(4):300-304.  
王锋,吴小涛,王运涛,等. 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[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2010, 20(4): 300-304.
- [8] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.  
中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [9] Livshits G, Popham M, Malkin I, et al. Lumbar disc degeneration and genetic factors are the main risk factors for low back pain in women: the UK Twin Spine Study. *Ann Rheum Dis.* 2011;70(10):1740-1745.
- [10] Zhang RF, Ruan DK, Zhang C, et al. *Jizhu Waike Zazhi.* 2008; 3(6):137-140.  
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, 3(6):137-140.
- [11] Kepler CK, Anderson DG, Tannoury C, et al. Intervertebral disk degeneration and emerging biologic treatments. *J Am Acad Orthop Surg.* 2011;19(9):543-553.
- [12] Kluba T, Niemeyer T, Gaissmaier C, et al. Human annulus fibrosis and nucleus pulposus cells of the intervertebral disc: effect of degeneration and culture system on cell phenotype. *Spine (Phila Pa 1976).* 2005;30(24):2743-2748.
- [13] Hu MH, Hung LW, Yang SH, et al. Lovastatin promotes redifferentiation of human nucleus pulposus cells during expansion in monolayer culture. *Artif Organs.* 2011;35(4): 411-416.
- [14] Ciapetti G, Granchi D, Devescovi V, et al. Ex vivo observation of human intervertebral disc tissue and cells isolated from degenerated intervertebral discs. *Eur Spine J.* 2012;21 Suppl 1:S10-19.
- [15] Gruber HE, Hoelscher GL, Ingram JA, et al. Senescent vs. non-senescent cells in the human annulus in vivo: cell harvest with laser capture microdissection and gene expression studies with microarray analysis. *BMC Biotechnol.* 2010;10:5.
- [16] Sakai D. Future perspectives of cell-based therapy for intervertebral disc disease. *Eur Spine J.* 2008;17 Suppl 4: 452-458.
- [17] Alini M, Eisenstein SM, Ito K, et al. Are animal models useful for studying human disc disorders/degeneration? *Eur Spine J.* 2008;17(1):2-19.
- [18] Yang Z, Huang CY, Candiotti KA, et al. Sox-9 facilitates differentiation of adipose tissue-derived stem cells into a chondrocyte-like phenotype in vitro. *J Orthop Res.* 2011; 29(8): 1291-1297.
- [19] Zhao CQ, Wang LM, Jiang LS, et al. The cell biology of intervertebral disc aging and degeneration. *Ageing Res Rev.* 2007;6(3):247-261.
- [20] Ma K, Hu YG, Qi ZH. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.* 2009;13(2):229-232.  
马可,胡有谷,齐宗华. 退行性变椎间盘的细胞培养[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2009, 13(2):229-232.