

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.28.009

[http://www.crter.org]

张子言, 佟 琄, 颜华东, 姜 睿, 武汉. 人类髓核细胞分离培养方法的优化选择[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(28):5151-5156.

## 人类髓核细胞分离培养方法的优化选择\*\*

张子言, 佟 琄, 颜华东, 姜 睿, 武汉(吉林大学中日联谊医院, 吉林省长春市 130033)

### 文章亮点:

1 退变椎间盘的退变程度不一对实验结果具有巨大影响, 而从正常人体中摘除完整椎间盘的可能性极低。为避免从退变的椎间盘摘除髓核组织, 文章中采用的间盘均取自创伤致脊柱爆裂性骨折、间盘突出至椎管内压迫脊髓、出现下肢神经症状需手术治疗的患者, 患者从受伤到进行手术的时间较短, 均进行急诊手术, 可认为极为接近正常人体椎间盘。

2 根据实验结果, 确定了酶消化法获取人类髓核细胞的优化实验条件, 使得细胞更有利于贴壁、附着、延伸, 从而缩短培养时间, 提高培养效率。同时考虑酶消化作用、效率以及成本问题, 以通过更短的时间获取更多的髓核细胞。

3 不足之处在于实验要求样本条件较高, 临床上获取困难, 样本量难以达到动物实验取材的数量级, 同时限于时间及技术水平, 实验未深入到分子水平, 深度不足。

### 关键词:

组织构建; 软骨组织构建; 髓核细胞; 人类; II型胶原酶; 胰酶; 消化; 分离培养; MTT; 国家自然科学基金

### 摘要

背景: 关于人类髓核细胞的分离培养方法不一, 所用消化酶组分及消化时间差异较大, 如何提高人类髓核细胞获得效率的问题尚未解决。

目的: 优选人类髓核细胞获取的消化酶组分和消化方法。

方法: 髓核组织标本取自吉林大学中日联谊医院骨科成人椎间盘 3 例。无菌条件下取出至椎管内的急性创伤后椎间盘组织, 可见到外周白色的纤维环和中心胶冻样的髓核组织。按不同混合酶组分划分为 2 组, I 组成分为 0.2% II 型胶原酶; II 组成分为先用 0.25% 胰酶消化 30 min, 再用 0.2% II 型胶原酶。每组再按消化时间分为 2, 4 h, 过夜 3 个亚组。最后重悬细胞终体积均定位 2 mL 并计数, 采用含胎牛血清的 DMEM 培养液体外培养细胞。观察不同组分酶对分离所得髓核细胞数量、活性及增殖能力的影响, 采用锥虫蓝染色计数细胞总数及活细胞比值, MTT 法测定髓核细胞生长曲线。

结果与结论: 采用 2 种不同酶组分进行消化, 发现消化时间 2, 4 h 时, II 组消化细胞较 I 组多, 但差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。孵育过夜时, I 组和 II 组的存活细胞率较消化 2, 4 h 明显降低, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。在作用 4 h 时, 组织块消失, 计数细胞数量最多。提示以 II 型胶原酶为主要成分的 I 组对分离髓核细胞有利, 消化时间以 4 h 为宜, 该条件具有操作简单, 效率较高, 成本较低等优点, 可以认为 0.2% II 型胶原酶消化髓核组织块 4 h 为获取髓核细胞的最佳条件。

## Optimized method for isolating and culturing human nucleus pulposus cells

Zhang Zi-yan, Tong Shen, Yan Hua-dong, Jiang Rui, Wu Han (China-Japan Union Hospital of Jilin University, Changchun 130033, Jilin Province, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** There are different methods to isolate and culture human nucleus pulposus cells, and the differences in digestive enzymes components and digestion time quite are significant. So how to rapidly and efficiently harvest human nucleus pulposus cells has become a research hotspot.

**OBJECTIVE:** To optimize the digestive enzymes components and digestion methods for the preparation of human nucleus pulposus cells.

**METHODS:** Nucleus pulposus tissue specimens were selected from three adult discs in the Department of Orthopedics, China-Japan Union Hospital of Jilin University. The acute traumatic disc tissues that outstanding to the spinal canal were taken under aseptic conditions, and then the peripheral white annulus and jelly-like nucleus pulposus in the center could be seen. According to different mixed enzyme concentration ratio, the samples were divided into two groups. The enzyme I group was treated with 0.2% II collagenase; and the mixed enzyme II group was digested with 0.25% trypsin for 30 minutes, and then treated with 0.2% II collagenase. According to digestion time, each group was divided into three subgroups: 2 hours group, 4 hours group, and overnight group. Finally, suspended cell volume was decided as 2 mL to count cells. Dulbecco's modified Eagle's medium containing fetal bovine serum was used for cell culture *in vitro*. Trypan blue staining was performed to count

张子言★,男,1985年生,吉林省长春市人,汉族,吉林大学中日联谊医院在读硕士,主要从事脊柱疾病及椎间盘组织工程研究。

464086811@qq.com

通讯作者: 武汉,教授,主任医师,硕士生导师,吉林大学中日联谊医院骨科,吉林省长春市 130033

drwuhan@163.com

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2013)28-05151-06

收稿日期:2013-01-14

修回日期:2013-03-12

(20121126009/G-C)

Zhang Zi-yan★, Studying for master's degree, China-Japan Union Hospital of Jilin University, Changchun 130033, Jilin Province, China 464086811@qq.com

Corresponding author: Wu Han, Professor, Chief physician, Master's supervisor, China-Japan Union Hospital of Jilin University, Changchun 130033, Jilin Province China drwuhan@163.com

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30772209\*

Received: 2013-01-14

Accepted: 2013-03-12

total cell number and ratio of living cells. Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide assay was used to detect the growth curve of nucleus pulposus cells.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Based on the two digestion enzyme concentration, the number of digested cells in the enzyme I group was larger than that in the enzyme II group after digested for 2 and 4 hours, but the difference was not significant ( $P > 0.05$ ). Overnight, cell survival rate was decreased in the enzyme I group after digested for 2 and 4 hours when compared with the enzyme II group, and the difference was significant ( $P < 0.05$ ). After digested for 4 hours, tissue blocks disappeared, and the number of cells reached maximum. The results indicate that enzyme I group composite with II collagenase is benefit for the separation of nucleus pulposus cells, and the digestion time is appropriate to 4 hours. This condition has the advantages of simple operation, high efficiency and low cost, and it considered that digestion of nucleus pulposus tissues with 0.2% II collagenase for 4 hours is the best condition to obtain nucleus pulposus cells.

**Key Words:** tissue construction; cartilage tissue construction; nucleus pulposus cells; human; II collagenase; trypsin; digestion; isolation and culture; methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide; National Natural Science Foundation of China

Zhang ZY, Tong S, Yan HD, Jiang R, Wu H. Optimized method for isolating and culturing human nucleus pulposus cells. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(28):5151-5156.

## 0 引言

腰痛构成了一个可观的流行病学和经济学问题, 尽管目前医学的诊断和及治疗技术不断进步, 但仍表现为上升趋势<sup>[1]</sup>。在所有疾病的研究中它造成最大的经济负担, 在英国每年导致花费 120 亿英镑<sup>[2]</sup>, 在美国为 900 亿美元<sup>[3]</sup>, 尽管腰痛的原因有许多, 但是一个很明显的原因为是与椎间盘的退变极大相关。

椎间盘的解剖包括 3 个部分: 纤维环、髓核和终板, 纤维环, 髓核像三明治一样位于 2 块软骨终板之间, 使相邻椎体成为一个整体<sup>[4-5]</sup>, 外侧纤维环承受张力(圆周的, 轴向的和旋转的), 髓核承受压缩力, 内侧纤维环则受二者的混合作用<sup>[4-5]</sup>。软骨终板在维持髓核细胞活性上起关键作用<sup>[6-7]</sup>, 它可防止髓核突出至相邻椎体。这些结构组合起来能够承受比单一组织更大的负荷, 体现了保持完整复合结构的重要性。因此这 3 种组织结构对保持椎间盘的正常功能是十分重要的。

椎间盘随年龄增长经历明显的变化, 创伤或疾病导致椎间盘退变。椎间盘在任何时刻都受不同的机械力影响。长时间暴露于重机械压力被认为是导致椎间盘退变的一个因素<sup>[8]</sup>。椎间盘的完整依赖于基质合成和退变的恰当平衡。当在基质合成和基质损坏中出现不平衡时, 基质构成和组织改变和细胞修复反应是不足的。水合物含量降低, 组织逐渐越来越纤维化, 失去了有效传导椎体间力的能力。这导致周围纤维环传递更多的负荷, 最终出现明显的退变性改变。

退变影响椎间盘的所有区域, 但是有证据指出在髓核组织中存在最明显的改变, 早期退变存在基质的破坏, 特别是蛋白聚糖和胶原蛋白都有明显的退化。随着退变的持续, 基质长时间的退变导致纤维环的裂隙形成和基质去组织化的不断发展。终板常受创伤性损伤, 增生的血管和神经可进入内侧纤维环组织, 在退变晚期, 可进入髓核组织区域中。椎间盘是大型无

血管组织, 细胞依赖于营养物质如葡萄糖和氧气从邻近毛细血管向终板软骨的弥散。有证据显示, 营养供应的下降导致椎间盘退变, 但是对营养缺乏对椎间盘细胞的效应所知甚少<sup>[9-10]</sup>。椎间盘的退变速度远比其他组织要快, 从而改变了脊柱的力学。这种损伤极难自我修复, 退变从而导致腰部疼痛和脊柱正常生理功能的下降<sup>[11]</sup>。

目前椎间盘退变的治疗包括非手术治疗和手术治疗。非手术治疗包括生活方式改变(例如降低体质量、戒烟), 物理康复治疗(例如锻炼、物理治疗如热/冷刺激、电刺激、针灸和牵引)以及使用止痛药物。当非手术方法不能缓解疼痛时, 融合术仍旧是外科的标准疗法<sup>[12]</sup>, 这种治疗具有巨大创伤, 目的在于消除关节位置的活动, 从而阻止疼痛。尽管临床上经常应用这种疗法, 但是融合术常常达不到缓解疼痛的目的, 还可能加速邻近椎间盘的退变性改变<sup>[13-14]</sup>。

全椎间盘人工置换是近来得到应用的一种外科治疗方式, 目的在于维持节段的活动性, 但是, 它的远期效果尚未得到证实, 人工椎间盘结构的磨损对于该治疗的远期效果来说具有挑战性和风险性<sup>[15-16]</sup>, 考虑到人工椎间盘移植手术有大量的临床禁忌证以及有可能造成灾难性的并发症, 这一方式有效性的证实仍需长期随访得来的数据支持。

组织工程提供了恢复已退变椎间盘的功能的一条有前景的方法。大多数研究直接指向了髓核组织工程, 因为椎间盘退变被认为起源于髓核组织区域, 在过去 10 年中已取得了相当大的进展。目前, 关于人类髓核细胞的分离培养方法不一, 所用消化酶组分(胶原酶、胰蛋白酶、DNA 酶、链霉菌蛋白酶等单独或混合使用)及消化时间(20 min, 45 min, 1 h, 2-4 h, 4-6 h, 6-8 h、过夜)差异较大<sup>[17-24]</sup>, 如何提高人类髓核细胞获得效率的问题尚未解决。

文章分离了多份椎间盘髓核组织标本, 比较不同酶组分及消化时间分离髓核细胞的效果, 优化筛选出

了一种高效酶组分, 以期为髓核细胞的高效获取奠定基础。

## 1 对象和方法

**设计:** 细胞学水平, 体外观察实验。

**时间及地点:** 于2012年10月在吉林大学中日联谊医院中心实验室完成。

**对象:** 髓核组织标本取自吉林大学中日联谊医院骨科成人椎间盘3例。

入选3例病例均为创伤致脊柱爆裂性骨折、间盘突出至椎管内压迫脊髓、出现下肢麻木、感觉减退或消失、肌力下降、运动障碍等神经症状的患者, 均为男性, 平均年龄30岁。其中L<sub>1-2</sub>椎间盘2例, L<sub>3-4</sub>椎间盘1例, 均为同一术者操作, 手术均为后侧入路减压, 较完整取出椎间盘, 根据Gries评分标准<sup>[25]</sup>, 均未见退变。3例患者从受伤到进行手术的时间较短, 均进行急诊手术, 可认为极为接近正常人体椎间盘。

排除未出现下肢神经症状, 不需要行间盘摘除, 椎管减压的病例。

患者均已签署知情同意书, 并经过医院伦理委员会答辩通过。

**人类髓核细胞分离培养方法的优化实验的主要试剂及仪器:**

试剂及仪器	来源
DMEM 基础培养基、II型胶原酶、胰蛋白酶	美国 Gibco 公司
胎牛血清	美国 Hyclone 公司
二甲基亚砷、MTT	美国 Sigma 公司
倒置相差显微镜	日本奥林巴斯公司
超净工作台	苏州净化仪器设备厂
CO <sub>2</sub> 恒温孵育箱	日本三洋公司

**方法:** 手术摘取突出至椎管内的急性创伤后椎间盘组织, 可见到外周白色的纤维环和中心胶冻样的髓核组织。

用含双抗(青-链霉素)的生理盐水浸泡椎间盘10 min, 用刮匙轻轻将髓核组织从椎间盘中分离, 双抗生理盐水浸泡冲洗三四次, 直至无明显血迹为止。用眼科剪将髓核组织剪成1 mm×1 mm×1 mm大小, 剪碎过程中滴加DMEM培养液保持组织湿润。

**酶处理及分组:** 根据酶成分分为2组, I组为0.2% II型胶原酶, II组为预先0.25%胰酶消化30 min, 再用0.2% II型胶原酶。加入2倍体积的不同组酶溶液, 37 °C 恒温水箱中震荡消化; 参考国内外文献<sup>[17-24]</sup>及预实验中消化过程与结果, 选定消化时间为2, 4 h, 过夜。分别于消化后2, 4 h, 孵育过夜, 用含体积分数10%胎牛血清、100 U/mL青霉素, 0.1 g/L链霉素的DMEM培

养基终止消化, 1 000 r/min 离心6 min; 弃上清(主要作用为去除残存的消化酶), 用2 mL含体积分数10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和100 U/mL链霉素的DMEM重悬细胞。

**细胞计数:** 采用锥虫蓝染色计数细胞总数及活细胞比值<sup>[26]</sup>。取混匀后细胞悬液10 μL滴入血球计数板上, 加入等体积锥虫蓝染液, 混匀, 染色4 min。血球计数板计数, 镜下计数死细胞、活细胞数, 计算细胞总数并计算活细胞比值。每个样本计数3次。

**细胞培养及传代:** 将各酶组处理所得原代细胞接种到50 mL培养瓶中, 置于37 °C、体积分数5%CO<sub>2</sub>、95%湿度的培养箱中培养3 d, 3 d后第1次换液, 倒置相差显微镜观察细胞贴壁生长情况, 去除未贴壁细胞, 以后隔天换液。

当细胞接近90%汇合时进行传代: ①洗涤: 弃掉培养液, 用0.01 mol/L PBS洗涤细胞2次, 弃掉液体。②镜下消化: 沿瓶壁加入数滴含0.25%胰蛋白酶和0.01%EDTA混合消化液, 轻晃动培养瓶, 镜下观察消化情况。③终止消化: 镜下见细胞皱缩、间隙加大、个别细胞变圆漂浮时立即用含体积分数10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素和100 U/mL链霉素的DMEM的培养液3 mL终止消化; 用滴管轻轻吹打细胞数次制成细胞悬液。④接种: 悬液1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 培养液混悬细胞后按1:2接种。

培养条件同原代培养。

**细胞增殖能力检测:** MTT法测定髓核细胞生长曲线<sup>[27]</sup>, 待细胞接近汇合时, 按前述细胞传代方法制备细胞悬液, 计数后以细胞浓度 $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 接种于96孔培养板, 每孔总液量为200 μL, 以接种时间记为0 d, 每48 h加5 mg/L MTT溶液20 μL。继续培养4 h后, 轻轻吸去培养液, 加入150 μL的DMSO液, 振荡摇匀10 min, 酶标仪上波长490 nm检测吸光度(A)值, 设置6个复孔, 取平均值。

以培养时间为横轴, A值为纵轴作曲线图。分别于2, 4, 6 d进行细胞活力检测。

**主要观察指标:** ①不同组分酶对分离所得髓核细胞数量的影响。②不同组分酶对髓核细胞活性的影响。③不同组分酶对髓核细胞增殖能力的影响。

**统计学分析:** 由第一作者采用SPSS 16.0软件进行两独立样本的t 检验, MTT法测得A值以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 不同组分酶分离细胞的数量** 在2 h及4 h的作用时间内, II组酶获取的细胞数多于I组酶, 经统计学分析, 差异无显著性意义。

孵育过夜时, II组酶获取的细胞数少于I组酶, 经统计学分析, 差异无显著性意义( $t=2.28, P=0.150$ ), 见表1。

表1 I组及II组酶获取髓核细胞数量的比较

Table 1 Comparison of the number of nucleus pulposus cells between enzyme I group and enzyme II group ( $\bar{x}\pm s, n=3, \times 10^5$ )

组别	2 h	4 h	过夜
I组	2.10±0.07	3.15±0.08	2.80±0.07
II组	2.20±0.11	3.20±0.09	2.65±0.09
<i>t</i>	1.33	0.71	2.28
<i>P</i>	0.310	0.540	0.150

注: I组为0.2%II型胶原酶, II组为预先0.25%胰酶消化30 min+0.2%II型胶原酶。结果显示, 作用2, 4 h及过夜时, I, II组酶获取的细胞数量差异无显著性意义。

**2.2 不同组分酶对细胞存活率的影响** 在消化酶作用2 h及4 h时, I, II组酶获取的细胞中活细胞比值差异无显著性意义。

孵育过夜时, I组酶获取的细胞中活细胞比值高于II组, 差异有显著性意义; 与孵育4 h相比较, 活细胞比值明显降低, 差异有显著性意义(I组:  $t=4.32, P=0.049$ ; II组:  $t=6.79, P=0.020$ ), 具体结果见表2所示。

表2 I组及II组酶获取髓核细胞存活率的比较

Table 2 Comparison of the survival rate of nucleus pulposus cells between enzyme I group and enzyme II group ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	2 h	4 h	过夜
I组	0.99±0.05	0.98±0.04	0.80±0.06
II组	0.98±0.09	0.97±0.08	0.60±0.05
<i>t</i>	0.16	0.17	4.43
<i>P</i>	0.880	0.870	0.047

注: I组为0.2%II型胶原酶, II组为预先0.25%胰酶消化30 min+0.2%II型胶原酶。结果显示, 孵育过夜时, I组酶获取的细胞中活细胞比值高于II组( $P<0.05$ ); 孵育过夜与2, 4 h比较, I, II组活细胞比值明显降低, 差异有显著性意义( $P=0.049, 0.020$ )。

**2.3 不同组分酶液对细胞增殖能力的影响** 见表3。

如表3所示, MTT结果显示, I组酶获取的细胞增殖活性与II组酶相比, 差异无显著性意义( $P>0.05$ )。

表3 I组及II组酶获取髓核细胞增殖活性的比较

Table 3 Comparison of proliferative activity of nucleus pulposus cells between enzyme I group and enzyme II group ( $\bar{x}\pm s, n=3, A_{490\text{ nm}}$ )

组别	2 h	4 h	过夜
I组	0.50±0.11	1.03±0.15	0.88±0.13
II组	0.53±0.13	1.02±0.14	0.78±0.11
<i>t</i>	0.31	0.08	1.02
<i>P</i>	0.790	0.940	0.410

注: I组为0.2%II型胶原酶, II组为预先0.25%胰酶消化30 min+0.2%II型胶原酶。MTT实验结果显示, I, II组酶获取的细胞增殖活性差异无显著性意义。

### 3 讨论

髓核细胞主要为脊索残留细胞, 随着个体的发育成熟而逐渐消失, 最终被软骨样细胞所替代。髓核由富含胶原和蛋白聚糖的半流体性胶状物质组成, 占椎间盘的50%-60%, 含有很多水分, 借以调节椎间盘压力, 并能将所受压力传递至纤维环, 在维持椎间盘的弹性作用和缓冲外力中起着重要作用。有研究表明, 椎间盘退行性变是最先从髓核的退行性变开始, 过去10年中对干细胞研究的进展, 显示将成人间充质干细胞用于髓核组织工程是很有前景的<sup>[28-32]</sup>。髓核细胞增殖能力较一般细胞弱, 其分离及培养过程要求严格, 且数量较少。

为避免从退变的椎间盘摘除髓核组织, 而退变椎间盘的退变程度不对实验结果具有巨大影响, 而从正常人体中摘除完整椎间盘的可能性极低, 本次实验中的间盘均取自外伤致脊柱爆裂性骨折、间盘突出至椎管内压迫脊髓、出现下肢神经症状的患者, 此3例手术患者从受伤到进行手术的时间较短, 均进行急诊手术, 可认为极为接近正常人体椎间盘。这次实验对组织来源要求较高, 导致组织来源困难, 符合条件的只有3例。手术均由同一手术者取出, 术中仔细分离, 确定为胶冻样髓核组织, 与纤维环组织区别明显, 可认为单纯人体髓核组织。

成功的组织工程髓核移植应该有近似天然组织的功能。特定的细胞标记物如CD24、缺氧诱导因子1、葡萄糖输送因子1、基质金属蛋白酶2、雕刻蛋白3和角蛋白19被认为是有益的参考<sup>[33-36]</sup>。由于目前缺乏关于髓核细胞表面标记物的足够认识, 髓核细胞的特征仍需进一步明确。鉴于目前缺乏对髓核细胞进行鉴定的统一标准, 实验未进行髓核组织消化后及增殖后对髓核细胞的鉴定。

在分离髓核细胞过程中, 基于II型胶原是髓核组织

细胞外基质的主要成分<sup>[37]</sup>, 酶处理起重要作用。目前使用的主要有组织块贴壁法和酶消化法, 酶消化法是当前实验的主流选择。采用单纯组织块贴壁法的报道较少<sup>[22]</sup>。对于酶消化法, 即对剪碎后的髓核组织块加入单纯胶原酶、胰酶液或二者联合应用进行消化, 直接获取单个髓核细胞。虽然酶消化法可以快速分离出髓核细胞, 但酶体系中可能会降解细胞外膜蛋白, 甚至会导致细胞无法贴壁。因此, 把握好酶的用法、用量及消化的时间是分离髓核细胞的关键所在。

目前, 关于人类髓核细胞的分离培养方法不一, 文献显示常用消化酶组分为 II 型胶原酶、胰蛋白酶、DNA 酶、链霉菌蛋白酶等单独或混合使用, 而文献报道的消化时间为 20 min, 45min, 1 min, 2-4 min, 4-6 min, 6- 8 h、过夜等, 差异较大, 国内外说法各异<sup>[17-24]</sup>, 获取人类髓核细胞是对其进行研究的第一步, 查阅国内外文献, 尚无髓核细胞消化分离的统一方法, 文章对这一问题进行了实验研究, 根据实验结果, 确定了消化酶种类、浓度及作用时间, 使得髓核细胞更有利于贴壁、附着、延伸, 从而缩短培养时间, 提高培养效率。同时综合考虑了酶消化法分离髓核细胞的效率以及分离成本问题, 从而实现在单位时间内获取人类髓核细胞的数量与活性的最优化。

文章比较了以 II 型胶原酶为主要成分的 I 组、以胰酶、II 型胶原酶为主要成分的 II 组对髓核细胞分离效果的影响。以胰酶、II 型胶原酶为主要成分的 II 组可提高从人体髓核组织酶解获取的总细胞数, 但与 II 型胶原酶为主要成分的 I 组对比差异无显著性意义, 2 组酶消化后所获髓核细胞活性差异无显著性意义, 消化过夜时存活细胞数量明显下降, 考虑为消化酶对细胞的毒性作用。而 II 组酶操作较 I 组复杂, 增加了获取髓核细胞操作过程所需要的时间, 增大了污染的可能性以及增加了实验成本, 鉴于此, 本文认为以 II 型胶原酶为主要成分的 I 组对分离髓核细胞有利, 消化时间以 4 h 为宜, 该条件具有操作简单, 效率较高, 成本较低等优点, 可以认为 0.2% II 型胶原酶消化髓核组织块 4 h 为获取髓核细胞的最佳条件。

文章优化了人类髓核细胞分离条件, 为髓核细胞的基础实验和今后的临床应用奠定了基础。

**致谢:** 感谢吉林大学中日联谊医院中心实验室张主任及杜博士对实验的支持和帮助。

**基金资助:** 国家自然科学基金资助项目(30772209)。

**作者贡献:** 实验设计者为通讯作者, 实施与评估者为全部作者, 均经过系统培训, 未采用盲法评估。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理要求:** 文中涉及的标本采集及处理均在患者及家属知

情同意的情况下进行, 文献中所涉及实验均符合伦理学准则, 并得到吉林大学中日联谊医院伦理委员会批准。

**学术术语:** 髓核细胞-髓核细胞主要为脊索残留细胞, 随着个体的发育成熟而逐渐消失, 最终被软骨样细胞所替代。髓核由富含胶原和蛋白聚糖的半流体性胶状物质组成, 占椎间盘的 50%-60%, 含有很多水分, 借以调节椎间盘压力, 并能将所受压力传递至纤维环, 在维持椎间盘的弹性作用和缓冲外力中起着重要作用。有研究表明, 椎间盘退行性变是最先从髓核的退行性变开始, 将成人间充质干细胞用于髓核组织工程是很有前景的。髓核细胞增殖能力较一般细胞弱, 其分离及培养过程要求严格, 且数量较少。

**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] Anderson DG, Albert TJ, Fraser JK, et al. Cellular therapy for disc degeneration. *Spine*. 2005;30(9): 14-19.
- [2] Maniadakis N, Gray A. The economic burden of back pain in the UK. *Pain*. 2000;84(1):95-103.
- [3] Phillips FM, An H, Kang JD, et al. Biologic treatment for intervertebral disc degeneration: summary statement. *Spine*. 2003;28:99.
- [4] Hukins DW. Disc structure and function. In: Ghosh P (ed) *Biology of intervertebral disc*. CRC Press, Boca Raton, 1988: 2-37.
- [5] Simon SR. Kinesiology. In: Simon SR (ed) *Ortho-pedic Basic Science*. Am Academy of Orthopedic Surgeons, USA, 1994: 558-568.
- [6] Mizuno H, Roy AK, Zaporozhan V, et al. Biomechanical and biochemical characterization of composite tissue-engineered intervertebral discs. *Biomaterials*. 2006;27(3):362-370.
- [7] Horner HA, Urban JP. Volvo Award Winner in Basic Science Studies: effect of nutrient supply on the viability of cells from the nucleus pulposus of the intervertebral disc. *Spine*. 2001; 26(23):2543-2549.
- [8] Stokes IAF, Iatridis JC. Mechanical conditions that accelerate intervertebral disc degeneration: Overload versus immobilization. *Spine*. 2004;29(12):2724-2732.
- [9] Bibby SR, Urban JP. Effect of nutrient deprivation on the viability of intervertebral disc cells. *Eur. Spine J*. 2004;13(12): 695-701.
- [10] Richardson SM, Mobasher A, Freemont AJ, et al. Intervertebral disc biology, degeneration and novel tissue engineering and regenerative medicine therapies. *Histol Histopathol*. 2007;22: 1033-1041.
- [11] Gan JC, Ducheyne P, Vresilovic EJ, et al. Intervertebral disc tissue engineering I: characterization of the nucleus pulposus. *Clin Orthop Relat Res*. 2003; 411(6): 305-314.
- [12] Deyo RA, Gray DT, Kreuter W, et al. United States trends in lumbar fusion surgery for degenerative conditions. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2005;30:1441-1447.
- [13] Harrop JS, Youssef JA, Maltenfort M, et al. Lumbar adjacent segment degeneration and disease after arthrodesis and total disc arthroplasty. *Spine*. 2008;33:1701-1707.

- [14] Levin DA, Hale JJ, Bendo JA. Adjacent segment degeneration following spinal fusion for degenerative disc disease. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2007;65:29-36.
- [15] Resnick DK, Watters WC. Lumbar disc arthroplasty: a critical review. *Clinic Neurosurg.* 2007;54:83-87.
- [16] van Ooij A, Kurtz SM, Stessels F, et al. Polyethylene wear debris and long-term clinical failure of the charite disc prosthesis: a study of 4 patients. *Spine.* 2007;32:223-229.
- [17] Pan Y, Chu T, Dong S, et al. Cells scaffold complex for Intervertebral disc Anulus Fibrosus tissue engineering: in vitro culture and product analysis. *Mol Biol Rep.* 2012;39: 8581-8594.
- [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] 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.
- [20] Korecki CL, MacLean JJ, Iatridis JC. Characterization of an in vitro intervertebral disc organ culture system. *Eur Spine J.* 2007;16:1029-1037.
- [21] 李锋生,梁伟国,叶冬平. 体外培养人退变髓核细胞的生物学性状[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(28):9.
- [22] 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.
- [23] Johnson WE, Wootton A, El Haj A, et al. Topographical guidance of intervertebral disc cell growth in vitro : towards the development of tissue repair strategies for the anulus fibrosus. *Eur Spine J.* 2006;15:S389-396.
- [24] Chen J, Baer AE, Paik PY, et al. Matrix protein gene expression in intervertebral disc cells subjected to altered osmolarity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;293: 932-938.
- [25] Poiraudreau S, Monteiro I, Anract P, et al. Phenotypic characteristics of rabbit intervertebral disc cells: Comparison with cartilage cells from the same animals. *Spine (Phila Pa 1976)*. 1999;24(9):837-844.
- [26] Ishige I, Nagamura-Inoue T, Honda MJ, et al. Comparison of mesenchymal stem cells derived from arterial, venous, and Wharton's jelly explants of human umbilical cord. *Int J Hematol.* 2009;90(2):261-269.
- [27] 叶冬平,梁伟国,戴丽冰,等. 正常椎间盘髓核细胞体外不同培养代次的生物学性状分析:适应于组织工程椎间盘种子细胞的选择[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(24): 4376-4379.
- [28] Richardson SM, Walker RV, Parker S, et al. Intervertebral disc cell-mediated mesenchymal stem cell differentiation. *Stem Cells.* 2006;24(5):707-716.
- [29] Kandel R, Roberts S, Urban JP. Tissue engineering and the intervertebral disc: the challenges. *Eur Spine.* 2008;17(Suppl 4):480-491.
- [30] Richardson SM, Hughes N, Hunt JA, et al. Human mesenchymal stem cell differentiation to NP-like cells in chitosan-glycerophosphate hydrogels. *Biomaterials.* 2008; 29:85-93.
- [31] Sobajima S, Vadala G, Shimer A, et al. Feasibility of a stem cell therapy for intervertebral disc degeneration. *Spine.* 2008; 8:888-896.
- [32] Huang B, Li CQ, Zhou Y, et al. Collagen II/hyaluronan/chondroitin-6-sulfate tri-copolymer scaffold for nucleus pulposus tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010;92(2):322-331.
- [33] Fujita N, Miyamoto T, Imai J, et al. CD24 is expressed specifically in the nucleus pulposus of intervertebral discs. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;338:1890-1896.
- [34] Lee CR, Sakai D, Nakai T, et al. A phenotypic comparison of intervertebral disc and articular cartilage cells in the rat. *Eur Spine.* 2007;16:2174-2185.
- [35] Rajpurohit R, Risbud MV, Ducheyne P, et al. Phenotypic characteristics of the nucleus pulposus: expression of hypoxia inducing factor-1, glucose transporter-1 and MMP-2. *Cell Tissue Res.* 2002;308:401-407.
- [36] Risbud MV, Guttapalli A, Stokes DG, et al. Nucleus pulposus cells express HIF-1 alpha under normoxic culture conditions: a metabolic adaptation to the intervertebral disc microenvironment. *J Cell Biochem.* 2006;98:152-159.
- [37] Roberts S, Evans H, Trivedi J, et al. Histology and pathology of the human intervertebral disc. *J Bone Joint Surg Am.* 2006; 88(S2):10-14.