

不同静水压下人椎间盘髓核细胞的形态和活性

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.3036>刘志超^{1,2}, 张帆³, 孙旗³, 康晓乐³, 袁巧妹³, 柳根哲⁴, 陈江^{3,5}

2095-4344.3036

投稿日期: 2020-06-06

送审日期: 2020-06-12

采用日期: 2020-07-11

在线日期: 2020-08-31

中图分类号:

R496; R-33; R681.5

文章编号:

2095-4344(2021)08-01172-05

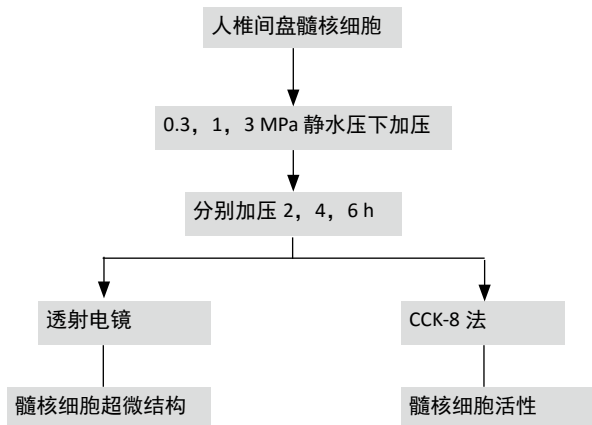
文献标识码: A

文章快速阅读:

文章特点一

△髓核细胞能够通过改变体积适应不同静水压力的作用, 而主级突起和次级突起的分离断裂代表髓核细胞回缩程度;

△通过研究不同静水压及作用时间下髓核细胞的形态和活性, 揭示静水压对椎间盘退变程度的影响。



文题释义:

髓核: 髓核在抵抗脊柱和椎间盘的负荷方面起着关键作用, 其作用是产生一个静水压力, 以均匀地分散圆盘内的负载。

静水压: 是在人体内某部位聚集的液体受到应力刺激时对周围组织形成的压强。而椎间盘在人体运动时受到压应力在髓核中形成静水压, 然后扩散至纤维环, 由压应力转变成张应力。人平卧休息时静水压最低约 0.3 MPa, 坐位时接近 1 MPa, 弯腰搬重物可达 3 MPa。

摘要

背景: 压应力能够引起细胞形态及活性的改变, 但静水压下髓核细胞的形态和活性是否改变仍需进一步研究。

目的: 研究体外静水压加载系统内人椎间盘髓核细胞形态和活性的变化。

方法: 将人椎间盘髓核细胞分离培养并传3代后, 在静水压加载系统0.3, 1, 3 MPa的静水压力环境下加压2, 4, 6 h后, 使用倒置相差显微镜观察人椎间盘髓核细胞加压前后的形态变化及生长状况; 采用透射电镜观察各组人椎间盘髓核细胞超微结构的变化及差异; 使用CCK-8法检测不同静水压下人椎间盘髓核细胞的增殖活性的变化。

结果与结论: ①细胞培养及传代: 第1, 2, 3代人椎间盘髓核细胞的生长曲线呈S形, 3-7 d时呈直线增殖, 此阶段细胞生长最快、活力最高; 第5, 6代人椎间盘髓核细胞的突起呈长梭形, 成长较慢, 出现退化; ②细胞形态: 在0.3, 1, 3 MPa的静水压下人椎间盘髓核细胞均缩小, 0.3, 1 MPa下细胞细微变小, 形态基本完整; 3 MPa静水压下细胞缩小最明显, 且细胞形态不完整, 说明人椎间盘髓核细胞在0.3, 1, 3 MPa的静水压下加压2, 4, 6 h后, 细胞形态在3 MPa静水压下改变最明显, 而相同静水压下作用不同时间后细胞形态无明显改变; ③细胞活性: 在0.3 MPa静水压下, 人椎间盘髓核细胞的增殖率随着时间的增加先升后降, 4 h时细胞增殖率最高; 在1, 3 MPa静水压下随着时间的增加人椎间盘髓核细胞增殖率逐渐下降, 且1 MPa静水压下细胞增殖率明显高于同一作用时间3 MPa静水压下($P < 0.05$), 说明适当的静水压力刺激有助于促进人椎间盘髓核细胞增殖, 而长期不当过高的静水压刺激能使人椎间盘髓核细胞增殖率下降, 导致椎间盘退变的发生。

关键词: 静水压; 椎间盘; 髓核细胞; 形态; 细胞活性; 生长动力学

缩略语: 人椎间盘髓核细胞: human nucleus pulposus cells, HNPC

Morphology and activity of human nucleus pulposus cells under different hydrostatic pressures

Liu Zhichao^{1,2}, Zhang Fan³, Sun Qi³, Kang Xiaole³, Yuan Qiaomei³, Liu Genzhe⁴, Chen Jiang^{3,5}

¹Department of Orthopedics, Southern Branch of Guanganmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 102600, China; ²Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; ³Department of Orthopedics, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China; ⁴Department of Orthopedics, Beijing Traditional Chinese Medicine Hospital, Capital Medical University, Beijing 100010, China; ⁵Hunan University of Chinese

¹中国中医科学院广安门医院南区骨一科, 北京市 102600; ²北京中医药大学, 北京市 100029; ³北京中医药大学东直门医院骨伤科一区, 北京市 100700; ⁴首都医科大学附属北京中医医院骨伤科, 北京市 100010; ⁵湖南中医药大学, 湖南省长沙市 410208

第一作者: 刘志超, 男, 1994年生, 河南省开封市人, 2019年北京中医药大学毕业, 硕士, 主要从事中医骨伤研究。

通讯作者: 陈江, 博士, 副主任医师, 北京中医药大学东直门医院, 北京市 100700; 湖南中医药大学, 湖南省长沙市 410208

<https://orcid.org/0000-0002-6713-9061> (刘志超)

基金资助: 国家自然科学基金项目(81603638), 项目负责人: 陈江; 中国博士后科学基金面上项目(2019M662791), 项目负责人: 陈江; 中央高校基本科研业务费专项资金资助(2018-JYB-XJQ010), 项目负责人: 陈江; 北京中医药大学2017年度基本科研业务费项目(2017-JYB-JS-085), 项目负责人: 张帆; 北京中医药大学2019年度基本科研业务费项目(2019-JYB-JS-042), 项目负责人: 康晓乐; 北京中医药大学东直门医院青苗人才项目(DZMYS-201702), 项目负责人: 陈江

引用本文: 刘志超, 张帆, 孙旗, 康晓乐, 袁巧妹, 柳根哲, 陈江. 不同静水压下人椎间盘髓核细胞的形态和活性[J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(8):1172-1176.



Medicine, Changsha 410208, Hunan Province, China

Liu Zhichao, Master, Department of Orthopedics, Southern Branch of Guanganmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 102600, China; Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Corresponding author: Chen Jiang, MD, Associate chief physician, Department of Orthopedics, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China; Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan Province, China

Abstract

BACKGROUND: Compressive stress can change the morphology and activity of cells, but whether the morphology and activity of nucleus pulposus cells change under hydrostatic pressure still needs further study.

OBJECTIVE: To study the morphology and activity of human nucleus pulposus cells *in vitro*.

METHODS: The human nucleus pulposus cells were separated, cultured and passed on for three generations, and pressurized for 2, 4 and 6 hours under the hydrostatic pressure of 0.3, 1, and 3 MPa. Then, the morphological changes and growth of the cells before and after pressurization were observed by inverted phase contrast microscope. Transmission electron microscope was used to observe the ultrastructural changes and differences of the cells. Cell counting kit-8 was used to detect the proliferation activity, morphology and activity of the cells under different hydrostatic pressures.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Cell culture and passage: The growth curves of the first, second and third generations of human nucleus pulposus cells were S-shaped, and the cells proliferated fastest in a straight line from 3 to 7 days. The protuberances of the 5th and 6th generation cells were long shuttle shaped, grew slowly and degenerated. (2) Cell morphology: the human nucleus pulposus cells were shrunk under hydrostatic pressures of 0.3, 1, 3 MPa. At 0.3 and 1 MPa, the cells became slightly smaller and the morphology was basically complete; at 3 MPa, the cells were most obviously shrunk and the morphology was incomplete. The results showed that when the human nucleus pulposus cells were pressurized for 2, 4 and 6 hours under 0.3, 1 and 3 MPa hydrostatic pressures, the change of cell morphology was the most obvious under 3 MPa hydrostatic pressure, but there was no obvious change under the same hydrostatic pressure for different time. (3) Cell viability: Under 0.3 MPa hydrostatic pressure, the proliferation rate of human nucleus pulposus cells first increased and then decreased with the increase of time, and the cell proliferation rate reached the peak at 4 hours. Under 1 and 3 MPa hydrostatic pressures, the proliferation rate of the cells gradually decreased with the increase of time, and the cell proliferation rate under 1 MPa hydrostatic pressure was significantly higher than that under 3 MPa hydrostatic pressure at the same action time ($P < 0.05$). These findings indicate that proper hydrostatic pressure stimulation helps to promote the proliferation of human nucleus pulposus cells, and long-term improperly high hydrostatic pressure stimulation can reduce the proliferation rate of human nucleus pulposus cells, leading to the occurrence of intervertebral disc degeneration.

Key words: hydrostatic pressure; intervertebral disc; nucleus pulposus cells; morphology; cell viability; growth kinetics

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81603638 (to CJ); General Program of China Postdoctoral Science Foundation, No. 2019M662791 (to CJ); Fundamental Research Funds for the Central Universities, No. 2018-JYB-XJQ010 (to CJ); 2017 Basic Scientific Research Business Expenses Project of Beijing University of Chinese Medicine, No. 2017-JYB-JS-085 (to ZF); 2019 Basic Scientific Research Business Expenses Project of Beijing University of Chinese Medicine, No. 2019-JYB-JS-042 (to KXL); Beijing Youth Talent Project of Dongzhimen Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, No. DZMYS-201702 (to CJ)

How to cite this article: LIU ZC, ZHANG F, SUN Q, KANG XL, YUAN QM, LIU GZ, CHEN J. Morphology and activity of human nucleus pulposus cells under different hydrostatic pressures. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(8):1172-1176.

0 引言 Introduction

人椎间盘主要由纤维环和髓核组成, 胶冻样的髓核在椎间盘受压应力刺激时通过产生形变维持脊柱的稳定^[1-2]。而静水压就是在人体内某部位聚集的液体受到应力刺激时对周围组织形成的压强, 在人体发生运动时(如行走、弯腰、弯腰提重物等), 静水压是椎间盘承载最多的力学形式^[3-4]。研究显示, 动态静水压加载可以调节髓核细胞代谢, 适宜静水压刺激有助于人椎间盘髓核细胞(human nucleus pulposus cells, HNPC)代谢, 长期不当过大的压力将导致 HNPC 凋亡, 引起椎间盘退行性变, 导致下腰痛的发生^[5]。因此流行病学调查显示重体力劳动者及肥胖人群椎间盘承受压力大, 下腰痛发生率高^[6]。课题组既往对 HNPC 的研究显示在高静水压下其体积缩小, 形态不完整; 最新有研究显示 HNPC 形态和活性与细胞骨架蛋白介导的信号调控相关, 而 HNPC 体积及超微结构的改变是否是其适应不同静水压力做出的改变尚无明确研究^[7]。因此, 该研究在体外静水压加载系统中观察不同静水压下 HNPC 形态、活性的变化, 从体外静水压加载角度认识 HNPC 的生物力学特性。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学实验。

1.2 时间及地点 实验于 2019-06-15 在中国中医科学院医学实验中心完成。

1.3 材料 HNPC 由 ScienCell Research Laboratories 提供; DMEM/F12 培养基(GIBCO, C11330500BT); 生长因子 SMCGS(美国

Sciencell 公司, Cat No.1152, Lot No.16437); 胎牛血清(美国 Sciencell 公司, Cat No.0010, Lot No.16360); DPBS 溶液(美国 Sciencell 公司, Cat No: 0303, Lot No: 14093); CCK-8 细胞增殖试剂盒(上海东仁公司, Lot No: FP653)。

体外静水压加载系统由柳根哲教授设计, 专利号: ZL 20 152 010 8857.5(北京世纪森朗实验仪器有限公司), 医用恒温静水压压力罐由压力容器、气压源、压力显示仪器、智能温控以及活塞装置和细胞爬片等组成。将培养基及传代的椎间盘髓核细胞一起放入压力罐中, 通过压力显示仪可以调节压力罐内压力, 范围 0-5 MPa, 见图 1。

1.4 方法

1.4.1 HNPC 的分离培养及鉴定传代 HNPC 用 PBS 清洗后加入 0.25% 胰酶消化 30 min, 1 000 r/min 离心 5 min(离心半径 15 cm), 弃上清, PBS 洗涤后加入 0.3% II 型胶原酶 37 °C 浴箱中消化 3 h, PBS 洗涤后以 100 μm 滤网滤过, 1 000 r/min 离心 5 min(离心半径 15 cm), 弃上清, 加入培养液吹打成细胞悬液接种于细胞培养瓶中培养, 培养液为 DMEM/F12(含体积分数 15% 优质胎牛血清、抗坏血酸 30 mg/L、青霉素 10 万 U/L、链霉素 0.1 g/L, pH 7.0), 置于 37 °C、饱和湿度、体积分数 5%CO₂ 孵箱中培养, 5 d 首次换液, 此后每 3 d 换液 1 次, 倒置相差显微镜下观察 HNPC 生长, HNPC 生长至瓶底 90% 左右时传代, 取第 3 代 HNPC 进行实验。

1.4.2 显微镜观察不同静水压下 HNPC 模型的形态变化 将 HNPC 进行传代、铺片: 对 HNPC 株体外培养进行传代, 当第 3 代 HNPC 融合达 90% 时用胰蛋白酶消化, 将细胞悬液置

于 EP 管中，离心后弃上清液，培养液悬浮细胞，接种在细胞玻片上，待细胞生长达 80% 融合后，即可进行实验。

将传 3 代 HNPC 和培养基一起装入 10 mL 注射器中，在静水压加载装置中通过注入氮气加压，静水压设定为 0.3, 1 和 3 MPa，每个静水压分别作用时间 2, 4, 6 h，智能温控装置使容器内温度保持在 37 °C 左右。造模结束后，将气体放掉，打开装置盖子，取出注射器，用 PBS 冲洗玻片 3 遍，然后用 40 g/L 多聚甲醛 (Paraformaldehyde) 固定 30 min，利用倒置显微镜观察 HNPC 的成长及其形态变化。

1.4.3 电镜观察不同静水压下 HNPC 模型的超微结构变化 制作不同静水压下 HNPC 电镜样本，观察静水压加压前后 HNPC 的超微结构。分别于 0.3, 1 和 3 MPa 静水压下作用 2, 4, 6 h。取出细胞玻片后用 2.5% 戊二醛 (Glutaric dialdehyde) 溶液固定，电镜下观察。

1.4.4 CCK-8 法测定不同静水压下 HNPC 活性 加压结束后，取出 HNPC 玻片，消化离心收集 HNPC，在 96 孔板将细胞按 6×10^3 个 / 孔接种，每组 5 个复孔，第 2 天待 HNPC 贴壁后开始检测，更换培养基后加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液，37 °C 下反应 2 h，应用酶标仪 (450 nm 波长) 测定各组的吸光度值。

1.5 主要观察指标 倒置相差显微镜观察 HNPC 加压前后的形态变化及生长状况；采用透射电镜观察各组 HNPC 超微结构的变化及差异；使用 CCK-8 法检测不同静水压下 HNPC 的增殖活性的变化。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计学处理，各项指标均独立重复测定 3 次，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用重复测量资料的方差分析，检验加载强度和加载时间对 HNPC 活性的影响，差异有显著性意义以 $P < 0.05$ 表示。

2 结果 Results

2.1 常压下 HNPC 的培养、鉴定及传代 第 1, 2 及 3 代 HNPC 的生长曲线呈 S 形，第 3-7 天时呈直线增殖，此阶段 HNPC 生长最快、活力最高，进入第 8 天后 HNPC 生长停止，呈水平线，此时 HNPC 必须进行传代，不然细胞出现变形，从而衰亡。第 5, 6 代 HNPC 突起呈长梭形，边缘“触手”状结构增多，生长缓慢，出现老化现象，因此实验最好采用第 1, 2 及 3 代 HNPC，光镜观察见图 2, 3。

2.2 光镜观察不同静水压及作用时间下 HNPC 形态和生长状况变化 ①细胞体积：HNPC 在 0.3, 1, 3 MPa 静水压下作用 4 h 后，细胞体积均缩小，3 MPa 下 HNPC 体积缩小最明显，0.3 MPa 和 1 MPa 压力下 HNPC 体积缩小差别不明显；②突起：0.3, 1, 3 MPa 静水压下 HNPC 突起均变短，3 MPa 下 HNPC 突起短缩最明显，0.3 MPa 和 1 MPa 压力下 HNPC 突起短缩差异不明显，部分 HNPC 突触不显著，呈皱缩状改变；③同一压力环境下，不同压力加载时间下 HNPC 的形态学差异不明显。见图 4。

2.3 电镜观察不同静水压及作用时间下 HNPC 超微结构变化 ① HNPC 在 0.3, 1, 3 MPa 静水压下作用 4 h 后突起均有断裂；② 0.3, 1 MPa 静水压下 HNPC 主级突起完整，次级突起断裂；

3 MPa 静水压下 HNPC 主级突起与次级突起均有断裂；③ 相同静水压不同作用时间下，HNPC 在电镜下的结构无明显变化。见图 5。

2.4 CCK-8 法检测不同静水压及作用时间下 HNPC 活性 在 0.3 MPa 静水压下，HNPC 的增殖率随着时间的增加先升后降，4 h 时细胞增殖率最高；在 1, 3 MPa 静水压下随着时间的增加 HNPC 增殖率逐渐下降，且 1 MPa 静水压下细胞增殖率明显高于同一作用时间下 3 MPa 静水压下 HNPC 的增殖率，差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。见表 1, 图 6。

表 1 | 人椎间盘髓核细胞在不同静水压下培养 2, 4, 6 h 后的活性比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$, A_{450})

Table 1 | Comparison of the viability of human nucleus pulposus cells cultured under different hydrostatic pressures for 2, 4, and 6 hours

静水压力	作用时间		
	2 h	4 h	6 h
0.3 MPa	1.08±0.05	1.15±0.06	1.10±0.09
1 MPa	1.21±0.07 ^a	1.09±0.08 ^a	0.84±0.06 ^a
3 MPa	1.02±0.11	0.95±0.07	0.82±0.18

表注：与同时间点 3 MPa 组比，^a $P < 0.05$

3 讨论 Discussion

椎间盘髓核在抵抗脊柱和椎间盘的负荷方面起着关键作用^[8-9]。髓核的作用是产生一个静水压力，以均匀地分散圆盘内的负载，这种能力取决于椎间盘的水合作用，它受年龄、健康状况甚至先前的负荷历史的影响^[10-11]。静水压导致髓核细胞形态改变与增殖活性降低：一方面，静水压导致胞内和胞外交通的变化，细胞出现短缩、塌陷或因压力增加而凝结；另一方面动态静水压负荷可调节髓核细胞代谢和细胞外基质组成，诱导脊索髓核细胞向成熟表型转化^[12-13]。课题组既往研究得出高静水压下 HNPC 的体积发生缩小，形态不完整，尚未明确静水压下 HNPC 形态的改变是否与其适应不同静水压做出的改变相关，而且动态静水压水平对髓核细胞代谢的影响目前尚不清楚，因此该实验研究不同静水压下 HNPC 形态和超微结构的变化以及不同静水压下 HNPC 的活性。实验中体外静水压加载系统不仅具有普通液态加载装置的优点，而且能够在不改变细胞加压环境中水分含量、离子组成、渗透压等条件下自由改变静水压的大小。

根据 NACHEMSON 等^[14]的经典实验，证实人体椎间盘内的静水压随着体位和活动量的改变而发生改变 (范围在 0-3 MPa)：人平常最多的状态平卧及坐位，而间盘压力最大的体位为弯腰搬重物。平卧休息位时最低约 0.3 MPa，坐位时接近 1 MPa，弯腰搬重物可达 3 MPa，故在此次实验中压力值的选择上，也参考以上数据，分别为 0.3, 1 和 3 MPa，以模拟人体不同体位下椎间压力环境，每个静水压分别作用 2, 4, 6 h，对不同静水压下 HNPC 进行形态学观察及活性检测。课题组前期研究发现在静水压干预下 HNPC 体积均变小，而此次实验对不同静水压下 HNPC 的形态学观察发现，HNPC 形态在 0.3, 1 MPa 下轻微缩小，形态基本完整而在 3 MPa 静水压下缩小最明显，且形态不完整，且这种细胞形态变化随时间变化不太

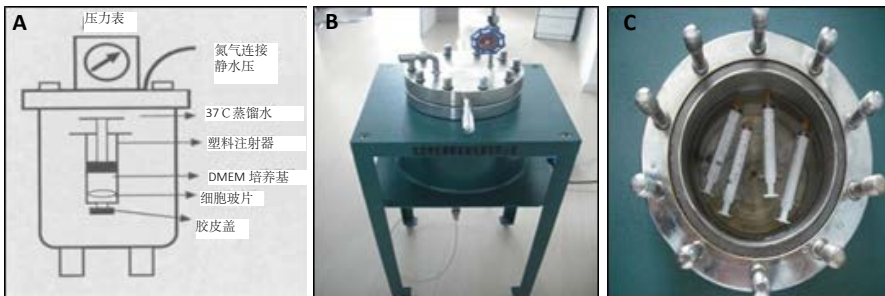


图 1 | 体外静水压加载系统示意图 (A) 及细胞加载 (B, C)
Figure 1 | Schematic diagram of *in vitro* hydrostatic pressure loading system (A) and cell loading (B, C)

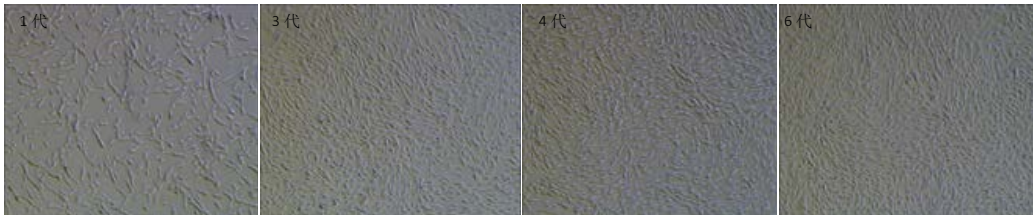


图 2 | 不同代次人椎间盘髓核细胞显微镜下形态变化 (x40)
Figure 2 | The morphological changes of human nucleus pulposus cells at different generations under microscope (x40)

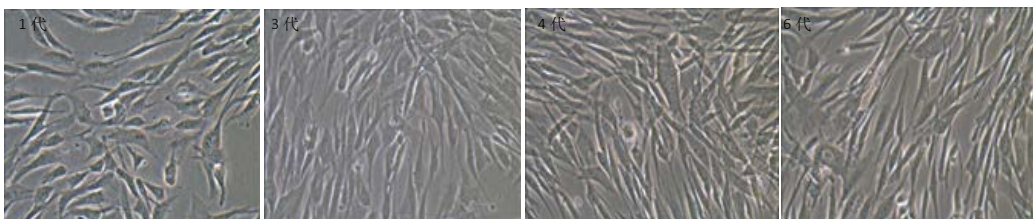


图 3 | 不同代次人椎间盘髓核细胞显微镜下形态变化 (x400)
Figure 3 | The morphological changes of human nucleus pulposus cells at different generations under microscope (x400)

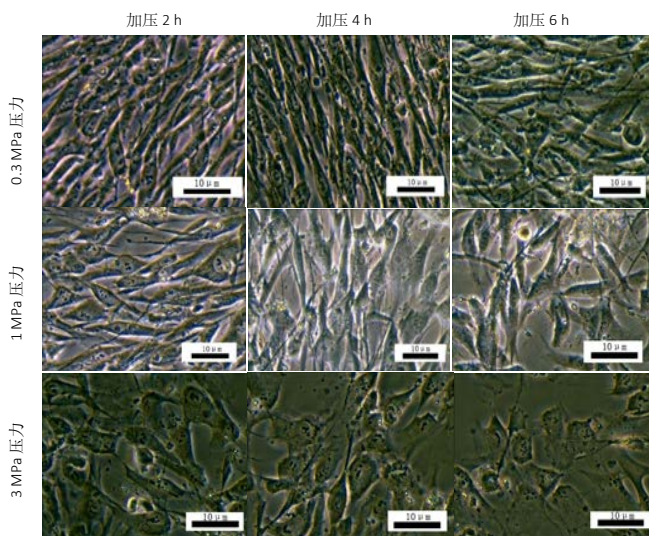


图 4 | 不同静水压及作用时间下人椎间盘髓核细胞形态和生长状况变化 (光镜, x400)
Figure 4 | Changes in the morphology and growth of human nucleus pulposus cells under different hydrostatic pressures for different time (light microscope, x400)

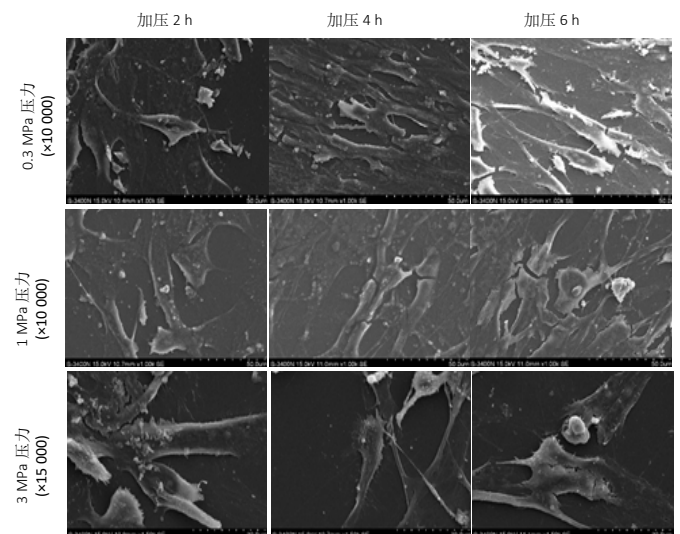
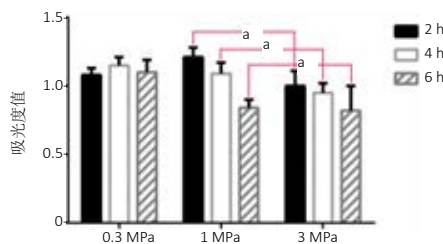


图 5 | 不同静水压及作用时间下人椎间盘髓核细胞形态和生长状况变化 (电镜)
Figure 5 | Changes in the morphology and growth of human nucleus pulposus cells under different hydrostatic pressures for different time (electron microscope)



图注: 同时间点 1 MPa 组与 3 MPa 组比, ^a $P < 0.05$

图 6 | 不同静水压及作用时间下人椎间盘髓核细胞的活性
Figure 6 | The viability of human intervertebral disc nucleus pulposus cells under different hydrostatic pressures for different time

明显, 这说明 HNPC 对于高静水压作用敏感度高, 且不同静水压下 HNPC 形态可短时间发生形变, HNPC 形态变化成为其适应不同静水压刺激的重要表现。另一方面, 透射电镜下观察 HNPC 在不同静水压作用下形态的变化, 发现 HNPC 表面有许多突起, 这些突起在 HNPC 受到静水压作用时出现不同程度的断裂分离, 在低静水压力刺激时 HNPC 主级突起完整, 出现次级突起的断裂; 在高静水压力刺激时 HNPC 主级突起和次级突起均断裂。

细胞外力如何影响细胞形态及细胞膜运输的经典研究是膀胱移行细胞, 它在哺乳动物膀胱的内表面, 膀胱作为一个

压力室以生理方式增加静水压,同时监测膀胱移行细胞形态及细胞顶表面积,结果表明静水压力会导致细胞形态和细胞顶表面积的变化,从大致立方到鳞状,细胞顶表面积增加,以允许膀胱移行细胞维持它们的屏障功能同时适应增加尿量^[15]。因此,HNPC体积缩小是其适应不同静水压力作用时做出的改变,而主级突起和次级突起的分离断裂代表HNPC回缩程度的大小。

在0.3 MPa低静水压下,HNPC的增殖率随着时间的增加而增加,表明适宜的静水压有助于髓核细胞的生长,4 h时HNPC增殖率最高,表明HNPC的增长在4 h时达到高峰,超过4 h后HNPC增殖率逐渐下降。而在1, 3 MPa静水压下,随着时间的增加HNPC增殖率逐渐下降,说明随着HNPC承受静水压力的增加,超过HNPC的正常生理范围,HNPC增殖率趋于下降,且1 MPa静水压下HNPC的增殖率明显高于同一作用时间下3 MPa静水压下HNPC的增殖率,说明在高静水压的作用下细胞增殖率下降更快,HNPC总体数量减少更多。因此该研究结果显示,适当的静水压力刺激有助于HNPC代谢,促进HNPC增殖率,而长期不当过高的静水压力刺激能够使HNPC增殖率下降,导致椎间盘退变的发生。

目前生物力学是椎间盘退变相关性研究的热点,生物力学不仅能诱发椎间盘退变,而且可影响椎间盘营养途径^[16-17],因此构建一种科学有效的HNPC应力加载模型将有助于在微观层次上更加客观、简便地研究压力载荷对HNPC的影响,弥补在体模型的不足^[18-19]。但是,因为实验的独立性、细胞的来源等因素的不同以及体外生物力学加载装置的不同,使HNPC对应力负荷的应答存在差异,但生物力学对HNPC的作用显而易见^[20-21]。生物力学不仅影响着HNPC的代谢,而且也调节其生理、病理变化^[22-23]。生物力学的作用已成为HNPC体外培养的相关研究不可或缺的部分,后期预设研究不同静水压对细胞骨架蛋白的影响及其信号调控的效应机制^[24-25]。

然而,此次研究存在一些不足之处:实验所用体外静水压装置尚不能完全模拟椎间盘的体内环境,后期还需行动物体内实验进行佐证。总之,在该研究中收集了不同静水压下HNPC的形态改变,给出了不同静水压下HNPC活性的状态,实验的新发现有助于充分了解HNPC的功能,为椎间盘形变的生物力学开创新的研究思路和方法。

作者贡献: 实验设计为陈江、柳根哲,实验实施为刘志超,实验评估为张帆、孙旗,资料收集为康晓乐、袁巧妹。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金项目(81603638)、中国博士后科学基金面上项目(2019M662791)、中央高校基本科研业务费专项资金资助(2018-JYB-XJQ010)、北京中医药大学2017年度基本科研业务费项目(2017-JYB-JS-085)、北京中医药大学2019年度基本科研业务费项目(2019-JYB-JS-042)及北京中医药大学东直门医院青苗人才项目(DZMYS-201702)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

伦理问题: 研究用细胞的实验方案符合相关伦理学要求。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。
文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 文章统计学方法已经通过北京中医药大学生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- WANG XQ, TU WZ, GUO JB, et al. A Bioinformatic Analysis of MicroRNAs' Role in Human Intervertebral Disc Degeneration. *Pain Med.* 2019;20(12):2459-2471.
- 庞胤,尹帅,赵长义,等. 脊柱腰段三维有限元模型的构建与椎间盘应力分析[J]. 河北医科大学学报, 2019,40(12):1368-1371.
- MOLLADAVOODI S, MCMORRAN J, GREGORY D. Mechanobiology of annulus fibrosus and nucleus pulposus cells in intervertebral discs. *Cell Tissue Res.* 2020;379(3):429-444.
- ARAÚJO ARG, PEIXINHO N, PINHO A, et al. The intradiscal failure pressure on porcine lumbar intervertebral discs: an experimental approach. *Mech Sci.* 2015,6(2):255-263.
- SHAH BS, CHAHINE NO. Optimization of Hydrostatic Pressure Loading on Nucleus Pulposus Cells using a High-throughput Bioreactor. *J Biomech Eng.* 2017;140(2):5-9.
- 陈栋,陈春慧,胡志超,等. 中国人腰痛流行病学的系统评价[J]. 中国循证医学杂志, 2019,19(6):651-655.
- 张聪. 细胞骨架蛋白介导 Hippo 信号调控对椎间盘髓核细胞形态及增殖活性的效应机制研究[D]. 南京:东南大学,2019.
- ZHANG H, ZHU WP. Dynamic response of stresses in lumbar vertebrae during getting up. *J Med Biomech.* 2017;32(4):348-354.
- LEE T, LIM TH, LEE SH, et al. Biomechanical function of a balloon nucleus pulposus replacement system: A human cadaveric spine study. *J Orthop Res.* 2018;36(1):167-173.
- NEWELL N, CARPANEN D, EVANS JH, et al. Mechanical Function of the Nucleus Pulposus of the Intervertebral Disc Under High Rates of Loading. *Spine.* 2019;44(15):1035-1041.
- BRENT S. The Role of the Nucleus Pulposus in Human Intervertebral Disc Mechanical Function Quantified by Mechanical Loading and Non-Invasive Imaging. *Penn Dissertations.* 2015;1(1):1135.
- SHAH BS, CHAHINE NO. Dynamic Hydrostatic Pressure Regulates Nucleus Pulposus Phenotypic Expression and Metabolism in a Cell Density-Dependent Manner. *J Biomech Eng.* 2018;140(2):310.
- 谢华. 周期性应力通过 G 蛋白耦联受体激酶结合蛋白 1 调控髓核细胞细胞外基质的表达[J]. 中华实验外科杂志, 2015,32(5):1116-1118.
- NACHEMSON A, ELFSTRÖM G. Intravital dynamic pressure measurements in lumbar discs. A study of common movements, maneuvers and exercises. *Scand J Rehabil Med Suppl.* 1970;1(1):1-40.
- WANG E, TRUSCHEL S, APODACA G. Analysis of hydrostatic pressure-induced changes in umbrella cell surface area. *Methods.* 2003;30(3):217.
- 韩聪,赵耀东,朱玲,等. 基于椎间盘退变生物力学探讨腰间盘突出症发病机制[J]. 中医临床研究, 2020,12(1):47-50.
- 王鹏,伍骥,郑超. 生物力学对椎间盘营养及其退变的影响[J]. 中国矫形外科杂志, 2015,23(3):260-262.
- 海宝,祝斌,刘晓光. 椎间盘退变动物模型的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2019,27(3):374-379.
- 史新瑞,徐海栋,刘晓伟,等. 椎间盘退变模型的研究进展[J]. 临床与病理杂志, 2017,37(2):429-434.
- WANG SJ, SUN ZY, LIU C, et al. High mechanical stretch stress promotes degeneration of the human nucleus pulposus cells through NF- κ B signaling pathway. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2017;97(25):1964-1969.
- 徐浩翔,王文强,张泽佩,等. 腰椎间盘生物力学体内外研究的新进展[J]. 中国组织工程研究, 2020,24(15):2425-2432.
- 陈敏,赵凯. 椎间盘退变的机制及其治疗方法的研究进展[J]. 按摩与康复医学, 2019,10(18):58-60.
- KARAARSLAN N, YILMAZ I, ÖZBEK H, et al. Are Specific Gene Expressions of Extracellular Matrix and Nucleus Pulposus Affected by Primary Cell Cultures Prepared from Intact or Degenerative Intervertebral Disc Tissues?. *Turk Neurosurg.* 2018;29(1):43-52.
- MASNI-AZIAN, TANAKA M. Biomechanical investigation on the influence of the regional material degeneration of an intervertebral disc in a lower lumbar spinal unit: A finite element study. *Comput Biol Med.* 2018;98(1):26-38.
- 陈江,刘志超,张帆,等. 身痛逐瘀汤对人髓核细胞模型 PI3K/Akt 信号通路 Bad、Caspase-9、GSK-3 β 表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2019,26(9):48-54.