

大鼠尾椎髓核干细胞的分离与分化能力

沈 阳 徐宏光 张 屿 王 效 肖 良 刘 晨 金中行

(皖南医学院第一附属医院 弋矶山医院 脊柱外科 安徽 芜湖 241001)

【摘要】目的:分离大鼠尾椎髓核干细胞(NPSCs)并检测其多向分化的能力。方法:取4周龄大鼠10只,解剖显微镜下分离尾椎C₁~C₅的髓核,经I型胶原酶消化获得髓核原代细胞(NPCs),按照200个/cm²的细胞密度接种于10cm培养皿,获取细胞集落,观察集落细胞的形态特点,并与NPCs比较。并将获得的细胞集落按照50个/cm²的密度进行单克隆形成能力检测。进行成骨、成脂肪及成软骨方向分化诱导,分别用茜素红、油红O及番红染色鉴定。结果:髓核组织呈半透明的胶质状,质软。按照200个/cm²的细胞密度接种培养髓核细胞,在培养3~5d可见细胞集落形成,且集落内细胞的形态呈梭形,无“空泡”。而NPCs呈不规则性状,且细胞内含有较多“空泡”。获得的细胞集落仍然具有单克隆形成能力。且体外能进行成骨、成脂肪及成软骨方向分化诱导。结论:大鼠髓核组织中存在干细胞,按照200个/cm²的密度能够分离出NPSCs,且具有成骨、成脂肪及成软骨等多向分化的能力。

【关键词】髓核组织;干细胞;多向分化;I型胶原酶消化

【中图分类号】R-332;R 338.21 **【文献标志码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2018.06.002

Isolation of nucleus pulposus stem cells from the rat caudal vertebrae and determination of the cell differentiation

SHEN Yang, XU Hongguang, ZHANG Yu, WANG Xiao, XIAO Liang, LIU Chen, JIN Zhongxing

Department of Spinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, China

【Abstract】Objective: To isolate the nucleus pulposus stem cells (NPSCs) from caudal vertebrae of rats and determine the multidirectional differentiation of NPSCs. **Methods:** The nucleus pulposus was isolated from the caudal vertebra of rats aged 4 weeks (n = 10) under the dissecting microscope. Primary nucleus pulposus cells (NPCs) were obtained using type I collagenase digestion and incubated in a culture dish (10 cm in diameter) by cell density of 200 cells/cm² for harvesting the cell colonies. Then the morphology of the colony forming cells were observed and compared with NPCs. The colonies of the obtained cells were subjected to monoclonal formation assay by density of 50 cells/cm² and induced to differentiate into osteogenic, adipogenic and chondrogenic cells that were identified by staining with alizarin red, oil red O and safranin, respectively. **Results:** The nucleus pulposus was translucent colloid with soft texture. The colony formation was observed after 3 to 5 days of incubation, and the cells in the colony were fusiform in shaped without "vacuoles", whereas NPCs exhibited irregular traits with more "vacuoles". The cell colonies obtained still had the capacity of monoclonal formation and were induced to *in vitro* osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation. **Conclusion:** Stem cells are present in the nucleus pulposus of rats and can be isolated by cell density of 200 cells/cm². These cells have the capacity of osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation.

【Key words】 nucleus pulposus; stem cells; multidirectional differentiation; type I collagenase digestion

下腰痛与椎间盘退变密切相关,在人群中普遍存在。研究表明,超过半数以上的腰部疼痛是由椎间盘退变导致的^[1-2]。目前,对于椎间盘退变的治疗仍然以内科治疗为主,其远期疗效并不理想,而对于外科治疗,虽然能快速解决椎间盘退变带来的症状,但是并不能延缓椎间盘退变的病变进程。除此之外,椎间盘由位于中央区域的髓核、外围的纤维环

以及上下侧的软骨终板共同组成,作为人体内最大的无脉管结构,细胞主要通过扩散作用汲取邻近椎体血管内的氧气及营养物质,因此来自血液及骨髓的外源性干细胞难以到达椎间盘组织^[3]。故椎间盘在长期的上身负荷下易发生退变。也正是椎间盘持续的退变,导致椎间盘内组织水分降低,细胞外基质增加,细胞数目大幅度降低,组织钙化等病理改

基金项目:国家自然科学基金项目(81572185);安徽省自然科学基金项目(1708085MH185);安徽省科技厅对外科技合作项目(1704e1002229);安徽省自然科学基金青年项目(1708085QH205);2017安徽省高校学科(专业)拔尖人才学术资助项目(gxbjZD20)
收稿日期:2017-12-16

作者简介:沈 阳(1993-),男,2016级硕士研究生,(电话)15178621121,(电子信箱)2269140704@qq.com;

徐宏光,男,主任医师,教授,硕士生导师,(电子信箱)pumchxuhg@126.com,通信作者。

变^[4-5]。

随着干细胞与再生医学的兴起,人们对干细胞的生物特性的了解不断深入,给椎间盘退变的治疗带来了新的希望。如何有效获取干细胞,成为椎间盘退变生物治疗的关键。本文根据前期的研究,改进了髓核组织的消化方法,通过低密度接种培养,获取细胞集落,后通过多向分化及单克隆形成能力检测,验证该细胞集落具有干细胞特性。

1 材料与方法

1.1 实验动物 4 周龄 SD 大鼠 10 只,雌雄不限,体质量 100~200 g,由江苏省南京市青龙山动物研究中心提供。

1.2 实验试剂 0.25% EDTA-胰酶(Gibco), 0.2% I 型胶原酶(Sigma),青霉素-链霉素溶液(15070063, Gibco),磷酸盐缓冲液(PBS)(SH30256.01, hyclone), DMEM/F12 培养基(Gibco),干细胞胎牛血清(Gibco),干细胞成骨分化诱导培养基(A1007201, Gibco),干细胞成脂肪分化诱导培养基(A1007001, Gibco),干细胞成软骨分化诱导培养基(A1007101, Gibco),茜素红染色液(南京森贝伽生物科技有限公司),油红 O 染色剂(O0625, Sigma),番红染色液(南京森贝伽生物科技有限公司),结晶紫染色剂(C8407, 索莱宝),10 cm 培养皿。

1.3 实验方法

1.3.1 获取大鼠尾椎髓核原代细胞(nucleus pulposus cells, NPCs) 取 4 周龄 SD 大鼠幼鼠 10 只,给予颈椎脱臼法处死后,全部浸没于 75% 的酒精 10 min,无菌条件下分离大鼠尾椎 C₁~C₅ 节段,解剖显微镜下分离椎间盘中央部分的髓核组织,将髓核都浸泡在含有双抗的 PBS 中 10 min,取出后 PBS 冲洗 3 次,加入 0.25% EDTA-胰酶,置于 37℃ 温水浴箱中 40 min 后离心并弃上清,最后分别加入 0.2% I 型胶原酶和重新置于水浴箱中消化 1 h 左右,每 30 min 震荡 1 次以加速消化。待组织完全消化后用 200 目滤网过滤,1500 r/min 离心 5 min,弃上清,重新加入含有 10% 的 FBS 培养基吹打混匀,备用。整个获取过程在 2 h 内完成,以便于更好地保持髓核细胞的活性。

1.3.2 获取大鼠尾椎髓核干细胞(nucleus pulposus stem cells, NPSCs) 将得到的 NPCs 吹打混匀, chamber 计数板计数,按照 50、100、200 个/cm² 的密度接种于 10 cm 培养皿,每皿加入 6~8 mL 的含有 20% FBS 的 DMEM/F12 培养基,置于 37℃, 5% CO₂ 的培养箱,每 3 d 换液 1 次,培养 10 d。显微镜下观

察细胞集落的形态。用 4% 的多聚甲醛固定 30 min, PBS 冲洗 3 次后,再使用 0.1% 的结晶紫染色 10 min,观察集落形态,统计集落形成率,倒置相差显微镜下细胞数少于 20 个的集落忽略不计。

1.4 多向分化能力检测 将上述得到的细胞集落经 0.25% 的胰蛋白酶消化后进行体外扩增培养,取第 2 代细胞,按照每孔 2×10⁴ 的密度接种于 24 孔板,加入 1 mL 含有 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基,待细胞融合达 80%,按如下步骤进行诱导分化。

加入成骨分化诱导培养基,每 3 d 换液 1 次,诱导 21 d 后,4% 多聚甲醛固定细胞 15 min,加入适量茜素红染液染色 30 min 后, PBS 轻轻冲洗 2 遍,倒置相差显微镜下观察。

加入成脂肪分化诱导培养基,每 3 d 换液 1 次,每次换液时不要把原培养基全部吸出,诱导 21 d 后,如上方法进行细胞固定,油红 O 染液染色 30 min,然后苏木素复染 30 min, PBS 冲洗后置于显微镜下观察。

按照 micromass 法^[6]进行成软骨方向分化诱导,加入成软骨分化诱导培养基,每 3 d 换液 1 次,诱导 21 d,固定细胞,番红染色 30 min,冲洗后置于显微镜下观察。

1.5 单克隆形成能力检测 单克隆形成能力反映出细胞的强大增殖能力,据国外文献报道,在接种密度 < 50 个/cm² 时^[7],只有具有干细胞性质的细胞,才能得以生存下来。我们将获得的细胞集落使用 0.25% 的胰蛋白酶消化后,收集细胞悬液,按照 50 个/cm² 的密度接种于 10 cm 培养皿上,加入 8 mL 含 20% FBS 的 DMEM/F12 培养基,置于 37℃, 5% CO₂ 的培养箱,每 3 d 换液一次,培养 15 d 后,结晶紫染色,观察是否有细胞集落形成。

2 结果

2.1 NPCs 与 NPSCs 形态学比较 NPCs 接种后,大约 48 h 贴壁,形态多不规则,呈三角形或不规则四边形,倒置相差显微镜下可见细胞内部含有较多“空泡”(图 1A)。髓核细胞按照不同密度接种培养后,3 d 后可见细胞贴壁(图 1B),5 d 见贴壁细胞增殖形成细胞集落(图 1C)。随着培养时间的延长,10 d 时,可见较大形态的细胞集落形成。高倍镜下观察,细胞多呈梭形,内部无“空泡”结构(图 1D)。

2.2 多向分化能力 含钙基质可以被茜素红染液染成红色或者鲜红色。在诱导成骨分化 4 d,使用多聚甲醛固定细胞后,经茜素红染色,显微镜下可见视野大片被染成深红色含钙骨基质。油红 O 为脂溶

性染料,在脂肪内能高度溶解,可特异性的使组织内甘油三酯等中性脂肪着色。在成脂肪分化诱导 15 d 左右,轻轻吸取上清液,多聚甲醛固定,实验组加入适量油红 O 染色剂,显微镜下可见细胞内有较多透亮的红色脂肪滴。

番红染色原理在于嗜碱性的软骨与碱性染料番红结合呈现红色。在成软骨诱导 18 d 左右,经番红染色,可见实验组有软骨片被染成深红色。见图 2。

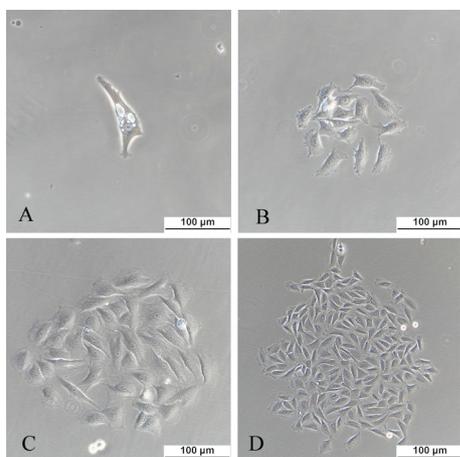


图 1 NPCs 与 NPSCs 形态比较
A.NPCs 呈不规则三角形,内部含有较多“空泡”结构; B~D.髓核细胞按照不同密度接种培养。不同时间内细胞集落的形态变化。B.接种 3 d 后,可见已经贴壁的细胞增殖形成较小的细胞集落; C.接种培养 5 d,细胞集落逐渐变大; D.接种培养 10 d,可见均一的呈圆形的细胞集落。

图 1 NPCs 与 NPSCs 形态比较

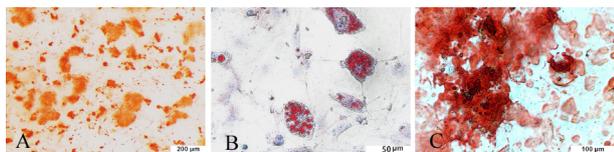


图 2 NPSCs 三系分化
A.成骨方向分化,含钙基质被茜素红染成鲜红色; B.成脂肪方向分化,细胞内脂肪滴被油红 O 染成亮红色; C.成软骨方向分化,可见大片的软骨基质被染成深红色。

图 2 NPSCs 三系分化

2.3 单克隆形成能力检测 在进行单克隆能力检测时,高倍显微镜下可见集落中的细胞形态大部分呈规则的梭形,细胞内部无“空泡”。结晶紫染色,肉眼可见被染成紫色的细胞集落。见图 3。

3 讨论

近几年随着组织工程学的兴起,干细胞及相关临床转化^[8-9]引起人们的高度重视,椎间盘缺乏血供,无神经支配,生理状态下处于长期封闭的腔隙内,因此椎间盘组织可以逃避细胞免疫及体液免疫,成为“免疫豁免”^[10-11]的组织之一。目前向发生退变的椎间盘移植干细胞有两种途径:移植技术及载体。正是椎间盘这种“免疫豁免”的特性,我们可

以向椎间盘内直接注射干细胞,在动物模型^[12]和人体模型^[13]中,这种方法已经被证实对于治疗椎间盘退变有明显作用。但是干细胞直接注射治疗也存在很多缺点,由于干细胞具有多向分化的特性,在注射时若发生泄露,在脊柱峡部会发生骨化而造成椎管狭窄^[14]。细胞载体很好地解决了这个问题,载体一方面可以防止细胞泄露,另一方面可以提供干细胞生长的微环境。包括凝胶载体和生物载体,前者包括胶原蛋白凝胶、透明质酸凝胶等,后者包括微球支架^[15]和其他生物增强支架^[16]等。

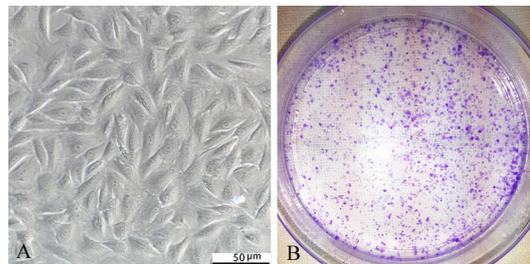


图 3 NPSCs 单克隆形成能力检测
A.高倍镜下集落中的细胞形态; B.单克隆形成能力检测,按照不同密度接种培养得到的细胞集落再次进行单克隆后,依然具有低密度形成细胞集落的能力。

图 3 NPSCs 单克隆形成能力检测

本实验将 NPCs 低密度接种于培养皿中培养,将获得的细胞集落进行了多向分化诱导和单克隆形成能力检测,可以初步判断通过该法获得的细胞具有干细胞特性,也符合干细胞鉴定标准。当然,本文也存在不足,未进行免疫学鉴定,但是目前关于成体干细胞的研究还属于初步阶段,很多成体干细胞表面的标记物还是未知的,需要我们进一步去完善。NPSCs 的分离与鉴定,经过进一步的研究与完善,将有望解决种子细胞来源问题,为今后的组织工程奠定良好基础。

【参考文献】

- [1] CHEUNG KM, KARPPINEN J, CHAN D, *et al.* Prevalence and pattern of lumbar magnetic resonance imaging changes in a population study of one thousand forty-three individuals [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2009, 34(9): 934-940.
- [2] SAMARTZIS D, KARPPINEN J, MOK F, *et al.* A population-based study of juvenile disc degeneration and its association with overweight and obesity, low back pain, and diminished functional status [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2011, 93(7): 662-670.
- [3] BRODIN H. Paths of nutrition in articular cartilage and intervertebral discs [J]. *Acta Orthop Scand*, 1955, 24(3): 177-1783.
- [4] 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]. *J Clin Invest*, 1996, 98(4): 996-1003.

(下转第 526 页)

本研究采用 PSD 大鼠来模拟成人的睡眠障碍, 通过观察各组大鼠一般情况, 检测血清和心肌组织中氧化及抗氧化指标, 分析心肌病理学变化来探讨黑果枸杞花色苷对 PSD 大鼠心肌损伤的保护作用。从以上的实验结果可知黑果枸杞花色苷对 PSD 大鼠心肌损伤具有保护作用, 呈剂量依赖性。LrM-H 组消减氧化自由基的能力优于 CDT 组, 未发现重要脏器的损害现象。其机制可能与黑果枸杞中的花色苷成分在部分睡眠剥夺过程中稳定心肌细胞的细胞膜, 延缓或抑制心肌细胞在急性应激损害的过程中释放炎性介质物所引发的心肌损伤, 稳定机体睡眠剥夺所引起的氧化应激、降低自由基水平有关, 其确切机制有待进一步研究。

【参考文献】

[1] 丁玉静, 刘俊秀, 李金红, 等. 黑果枸杞生理活性成分及作用研究进展[J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 33(13): 1280-1283.

[2] 加杨娥, 任立余, 燕华玲, 等. 黑枸杞水提物对中波紫外线辐射人永生角质形成细胞抗氧化的作用[J]. 中国皮肤性病学杂志, 2017, 31(3): 251-254.

[3] 杨明, 曾勇, 沈珠军, 等. 大动脉炎累及冠状动脉的临床特点及介入治疗效果分析[J]. 中华医学杂志, 2014, 94(24): 1874-1877.

[4] 张东, 单斌. 黑果枸杞中花色苷提取工艺研究[J]. 青海农林科技, 2015(4): 21-24.

[5] 林丽, 李进, 李永洁, 等. 黑果枸杞花色苷对氧化低密度脂蛋白损伤血管内皮细胞的保护作用[J]. 中国药理学杂志, 2013(8):

606-611.

[6] OZTURK I, KARAMAN S, BASLAR M, *et al.* Aroma, sugar and anthocyanin profile of fruit and seed of mahlab: optimization of bioactive compounds extraction by simplex lattice mixture design [J]. Food Analytical, 2015(241): 683-695.

[7] 郭兴道, 郝苗苗, 李婷婷, 等. 24 h 快速眼动睡眠剥夺大鼠血清的蛋白质组学初步研究[J]. 天津医药, 2016, 44(5): 577-581.

[8] MUELLER AD, POLLOCK MS, LIEBLICH SE, *et al.* Sleep deprivation can inhibit adult hippocampal neurogenesis independent of adrenal stress hormones [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008, 29(5): 1693-1703.

[9] 张如意, 游秋云, 王平, 等. 酸枣仁汤对慢性睡眠剥夺老年失眠大鼠心肌细胞凋亡及相关蛋白 Bcl-2、Bax 表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(4): 1691-1693.

[10] 谌剑飞. 睡眠障碍的现代病因病机探索[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(2): 151-152.

[11] FUJISAWA K, TAKAMI T, KIMOTO Y, *et al.* Circadian variations in the liver metabolites of medaka *Oryzias latipes* [J]. Sci Rep, 2015, 6(10): 209-216.

[12] CHAIX A, ZARRINPAR A, PANDA S. The circadian coordination of cell biology [J]. J Cell Biol, 2016, 215(1): 15-25.

[13] EVERSON CA, LAATSCH CD, HOGG N. Antioxidant defense response to sleep loss and sleep recovery [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005, 288: 374.

[14] 刘社星. 大豆异黄酮对糖尿病大鼠心肌损伤的保护作用[J]. 中医学报, 2017, 32(233): 1939-1942.

[15] LAUMBACH RJ, KIPEN HM, KO S, *et al.* A Controlled trial of acute effects of human exposure to traffic particles on pulmonary oxidative stress and heart rate variability [J]. Part Fibre toxicol, 2014, 11(1): 45-51.

(上接第 518 页)

[5] SCOTT JE, BOSWORTH TR, CRIBB AM, *et al.* The chemical morphology of age-related changes in human intervertebral disc glycosaminoglycans from cervical, thoracic and lumbar nucleus pulposus and annulus fibrosus [J]. J Anat, 1994, 184 (Pt 1): 73-82.

[6] MELLO MA, TUAN RS. High density micromass cultures of embryonic limb bud mesenchymal cells: an in vitro model of endochondral skeletal development [J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1999, 35(5): 262-269.

[7] SEKIYA I, LARSON BL, SMITH JR, *et al.* Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality [J]. Stem Cells, 2002, 20(6): 530-541.

[8] HANSRAJ KK. Stem Cells in Spine Surgery [J]. Surg Technol Int, 2016, 29: 348-358.

[9] GOLDSCHLAGER T, JENKIN G, GHOSH P, *et al.* Potential applications for using stem cells in spine surgery [J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2010, 5(4): 345-355.

[10] HUGHES SP, FREEMONT AJ, HUKINS DW, *et al.* The pathogenesis of degeneration of the intervertebral disc and emerging therapies in the management of back pain [J]. J Bone Joint Surg Br, 2012, 94(10): 1298-1304.

[11] HUANG S, TAM V, CHEUNG KM, *et al.* Stem cell-based approach

for intervertebral disc regeneration [J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2011, 6(4): 317-326.

[12] MIYAMOTO T, MUNETA T, TABUCHI T, *et al.* Intradiscal transplantation of synovial mesenchymal stem cells prevents intervertebral disc degeneration through suppression of matrix metalloproteinase-related genes in nucleus pulposus cells in rabbits [J]. Arthritis Res Ther, 2010, 12(6): R206.

[13] NORIEGA DC, ARDURA F, HERNÁNDEZ-RAMAJO R, *et al.* Intervertebral disc repair by allogeneic mesenchymal bone marrow cells: a randomized controlled Trial [J]. Transplantation, 2017, 101(8): 1945-1951.

[14] VADALÀG, SOWA G, HUBERT M, *et al.* Mesenchymal stem cells injection in degenerated intervertebral disc: cell leakage may induce osteophyte formation [J]. J Tissue Eng Regen Med, 2012, 6(5): 348-355.

[15] LI YY, DIAO HJ, CHIK TK, *et al.* Delivering mesenchymal stem cells in collagen microsphere carriers to rabbit degenerative disc: reduced risk of osteophyte formation [J]. Tissue Eng Part A, 2014, 20(9-10): 1379-1391.

[16] LIANG CZ, LI H, TAO YQ, *et al.* Dual release of dexamethasone and TGF-β3 from polymeric microspheres for stem cell matrix accumulation in a rat disc degeneration model [J]. Acta Biomater, 2013, 9(12): 9423-9433.