

周期性机械应力对髓核细胞增殖和细胞外基质表达的影响

刘正宇 周 栋 朱瑞霞 农鲁明[△] 徐南伟[△]

(南京医科大学附属常州市第二人民医院骨科 江苏 常州 213000)

摘要 目的:探讨周期性机械应力对髓核细胞增殖和细胞外基质表达的影响。**方法:**对兔髓核细胞进行体外细胞培养,对细胞施加周期性机械应力(0.25Mpa,0.1Hz)。实验分为2组,不加压组和加压组,不加压组置于单纯旋转式生物反应器内,加压组每天置于周期性机械应力场内2小时。分别于3天,7天检测细胞数目以及聚集蛋白聚糖(aggrecan)和Ⅱ型胶原的基因表达。**结果:**髓核细胞的增殖和聚集蛋白聚糖、Ⅱ型胶原基因的表达水平与周期性压力密切相关,在周期性机械应力刺激下髓核细胞增殖明显,细胞外基质的分泌增加,组织工程髓核细胞的活性显著提高。**结论:**周期性机械应力能够显著促进髓核细胞增殖,同时上调聚集蛋白聚糖、Ⅱ型胶原的基因的表达。

关键词:髓核细胞;细胞增殖;聚集蛋白聚糖;Ⅱ型胶原;应力

中图分类号:Q95-3,R681.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)03-472-04

Cell Proliferation and Extracellular Matrix Expression in Nucleus Pulposus Cells under Cyclic Hyolrostatic Pressure

LIU Zheng-yu, ZHOU Dong, ZHU Rui-xia, Nong Lu-ming[△], XU Nan-nwei[△]

(Orthopedics, affiliated changzhou No.2 people's Hospital of Nanjing Medical University, 213000, Jiangsu, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of cyclic hyolrostatic pressure on cell proliferation and extracellular matrix expression in the Nucleus pulposus cells. **Methods:** The Nucleus pulposus cells of rabbits were cultured in vitro, and the cells underwent cyclic hydrostatic loading (0.25Mpa, 0.1Hz). Cells were divided into 2 groups, no pressure groups and pressure groups. the cells of no pressure groups were placed in a simple rotating bioreactor, while the cells of the pressure groups were placed on the cyclic mechanical stress 2 hours a day. The cell's number and the gene expression of aggrecan and type II collagen were detected at 3 days and 7 days. **Results:** The cell proliferation of nucleus pulposus and the expression of aggrecan and collagen type II in nucleus pulposus was associated with the cyclic hyolrostatic pressure. The cyclic hyolrostatic pressure of nucleus pulposus cells increased cell proliferation and secretion of extracellular matrix, and significantly increased the activity of nucleus pulposus cells of tissue engineering. **Conclusions:** The cyclic mechanical stress can significantly promote the cell proliferation of nucleus pulposus, and increased aggrecan and type II collagen gene expression.

Key words: Nucleus pulposus cells; Cell proliferation; Aggrecan; Collagen type II; Stress

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R681.5 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)03-472-04

前言

椎间盘退变引起的腰腿痛是骨科临床常见疾病,目前的治疗方法以保守治疗和手术治疗为主。但上述两种方法均难以逆转椎间盘的退变,因而制约了该病的疗效和预后。而近年来椎间盘组织工程学的发展为椎间盘退变疾病的治疗带来了光明而广阔的前景,然而构建优质的组织工程椎间盘制约了该项技术在临床的应用。近年来如何提高组织工程种子细胞的功能是当今研究的热点。Nakai T^[1]等人发现转化生长因子 β 1可以促进大鼠髓核细胞ECM的合成。Le Maitre CL^[2]等人也发现软骨源性形态发生蛋白(CDMP)可以增加聚集蛋白聚糖和Ⅱ型胶原等细胞外基质的表达但是通过物理力学刺激促进髓核细胞外基质合成,增强细胞活性的报道甚少。本文主要系统地探讨周期性机械应力对髓核细胞增殖和细胞外基质方面的影响,为构建符合生理力学特性的组织工程髓核细胞提供理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

新西兰兔(南京金陵种兔场),培养基DMEM/F-12(Gibco公司,美国),胎牛血清(Hyclone公司,美国),Ⅱ型胶原酶、胰蛋白酶、多聚赖氨酸、抗坏血酸(Sigma公司,美国),Ⅱ型胶原多克隆抗体SABC(武汉博士德公司),六孔细胞培养板(Gibco公司,美国),细胞培养箱(HereusBB 5060型,德国),往复式加压泵(泰兴实验仪器厂),阻隔式压力传感器(天津市塑料研究所),倒置显微镜(Olympus公司,日本),低速离心机(北京医用离心机LD5-10),荧光定量PCR循环仪(中山大学达安基因股份有限公司DA7600)。

作者简介:刘正宇,男,硕士研究生,主要研究方向:脊柱外科学。

[△]通讯作者:徐南伟,男,主任医师,副教授,主要研究方向:脊柱外科学,E-mail:aalzy@hotmail.com

[△]通讯作者:农鲁明,男,主治医师,主要研究方向:脊柱外科学,E-mail:nongluming@medmail.com.cn

(收稿日期:2010-11-06 接受日期:2010-11-30)

1.2 方法

1.2.1 髓核细胞分离培养 0.5%戊巴比妥钠 0.1mg/kg 体重肌注射处死 4 只 1 月龄新西兰大白兔, 无菌条件下剪取胸腰段脊柱, 取出椎间盘, 掏出髓核组织, 将髓核组织放入含 PBS 液培养皿中, 用 PBS 液漂洗、吹打 3 遍。将髓核切成 1 mm³ 大小, 经 0.25%胰酶消化 15 min 后加胎牛血清中和, 离心去上清,PBS 洗涤 2 次。加入 0.2%的 II 型胶原酶消化 4 h, 用 180 目滤网过滤消化液, 滤液经 800 r/min 离心 5 min, 弃上清, PBS 清洗再次离心, 白色沉淀中加入含 15%胎牛血清的 DMEM/F-12 培养基, 台盼蓝染色法细胞活性计数, 存活率 > 90%, 调整细胞密度, 以 1× 10⁵/ml 密度接种于培养瓶中, 加入含 15%胎牛血清的 DMEM/F-12 培养基, 置于 37℃, 5% CO₂ 细胞培养箱内培养。每 2~3 天换液 1 次, 当髓核细胞连片融合至 70-80%时进行传代。取原代细胞, 胰酶消化后接种到有小盖玻片的 6 孔板中, 培养贴壁后,0.01mol/L PBS 漂洗,4%多聚甲醛 4℃固定 30min, 常规 ABC 法进行 II 型胶原染色鉴定。取培养至第二代的髓核细胞, 以 1× 10⁵/ml 密度接种于 25mm× 25mm 的玻璃片上。当细胞生长至 70-80%融合时进行实验。

1.2.2 周期性机械应力场的构建 将往复式加压泵通过阻隔式压力传感器与 HFB-40 旋转式生物反应器相连接, 构成可进行压力强度和频率调控的 " 周期性应力场灌注式培养系统 "。该系统压力范围为 0~300KPa Kpa, 频率范围为 0~1 Hz。本次实验采用的压力为 0~250KPa, 频率为 0.1Hz。之前的实验发现, 髓核细胞在该系统置于 0~250KPa, 0.1Hz 时构建出的组织工程髓核质量较好^[3]。因而本次实验中采用压力为 0~250KPa, 频率为 0.1Hz。

往复式加压泵主要由加压动力装置、活塞和充满液体的密闭压力舱组成。加压动力装置与活塞相连接, 使其做往复式的机械运动, 从而挤压密闭压力舱中的液体产生周期性液压, 通过输入端作用于压力传感器。压力传感器由隔膜和压力监测仪组成。隔膜位于压力传感器的中部, 将输入端和输出端两侧的液体隔开, 通过受压变形将往复式加压泵产生的周期性液压几乎无损失地传导至充满细胞培养液的旋转式生物反应器中。压力监测仪位于压力传感器的输出端, 通过它可以实时监测和调节液压, 使之维持恒定的强度和频率。液压周期性地作用于旋转式生物反应器中接种于载玻片的第二代髓核细胞上。旋转式

生物反应器能够提供高氧传递率、高悬浮性及拟微重力的培养环境, 有助于排除其他力学刺激的影响, 同时尽可能模拟生物体内环境。

1.2.3 实验分组 当细胞培养至 70-80%融合时, 进行随机实验分组。实验分为 2 组, 不加压组和加压组, 不加压组置于单纯旋转式生物反应器内, 加压组每天置于周期性机械应力场内 2 小时。分别于 3 天, 7 天用直接细胞计数法计算细胞数目, 以及用 Real-time PCR 检测聚集蛋白聚糖(aggrecan)和 II 型胶原的基因表达。整个实验中各组均置于 5 % CO₂, 37 °C 的孵育箱中。

1.2.4 直接细胞计数法 髓核细胞在任何一种非压力条件或机械应力条件下培养 3 天和 7 天后, 分别进行直接细胞计数。细胞用胰酶消化并计数, 每块盖玻片上的细胞分别进行细胞计数。每组包括随机的六块盖玻片, 实验重复 5 次。

1.2.5 聚集蛋白聚糖 (aggrecan)mRNA 和 II 型胶原 mRNA 表达的检测 收集细胞后行全 RNA 提取, 六孔板每空中加入 0.5ml-TRIzol, 充分裂解, 加入 0.2ml 氯仿, 上下振荡 15s, 室温静置 3min; 12,000g/min, 4℃离心 15min; 吸取无色上清水相, 向得到的上清水相加入等体积的异丙醇, 轻轻混匀, 室温静置 10min; 12,000g/min, 4℃离心 10min; 去除上清, 加入 1ml75%的乙醇 (用 DEPC 处理过的水配制), 轻轻混匀。12,000g/min, 4℃离心 10min; 吸尽上清; 室温干燥沉淀 3min 加入 40μ L 的无 RNase 水溶解 RNA 沉淀, 待完全溶解后于 -70℃保存。RT 反应 (20μ L 体系): 依次加入 RNA 总量 5μ g, Oligo dT(10μ M) 1μ L , dNTPs (10mM) 1μ L, 无核酸酶的双蒸水至总体积 15.5μ L; 65℃保温 5min, 然后冰浴 5min; 往上述步骤中的 0.2ml PCR 管依次加入: RNase 抑制剂 (40u/μ L) 0.5 μ L, 10× AMV Reaction Buffer2μ L, DTT (1M) 1μ L, 逆转录酶(AMV) 1μ L, 轻轻混匀后, 然后 2000rpm 离心 20s; 先在 37℃保温 1 h, 然后 70℃保温 15min; RT 产物进行实时荧光定量检测。为保证结果的可信度, 每个样品做三个复孔。反应总体积为 25μ l: 2X 的 RTmix12.5μ l, 模板 (cDNA 稀释 10 倍) 1μ l, β -actin、聚集蛋白聚糖和 II 型胶原引物 F 和 R 5pmol/ul mix1μ l, 18.2mΩ 水 10.5μ l, 混合均匀。反应程序: 950C 5 分钟, (95℃15 秒, 60℃30 秒, 72℃30 秒此步骤做 40 个循环), 72℃10 分钟, 进行数据分析。参考顾海伦^[4]等使用的引物序列, 运用 oligo7 软件设计各基因的引物序列及产物片断长度 (Table 1)

Table 1 PCR primers

Primer	Forward Primer (5'- 3')	Reverse Primer(5'- 3')	Product Size(bp)
β -Actin	GCAGAAGGAGATCACCGCCCT	GCTGATCCACATCTGCTGGAA	136
Aggrecan	TGAGTTCCCTGGCGTGAGA	TGGCGACGTTGCGTAAAG	109
typeII collagen	CACGTGTGGTTTGGGGAGA	GTTGGCAGTGTGGGAGGC	81

1.3 统计学分析方法

应用 SPSS11.0 进行统计分析。数据以均数± 标准差表示。相同时间点亚组之间采用配对 T 检验分析。检验标准 α =0.05。

2 结果

2.1 髓核细胞增殖(直接计数法)

周期性机械应力刺激 (0.25Mpa, 0.1Hz) 后, 加压 3 天和加压 7 天后, 加压组的髓核细胞增值均高于对照组, 差异均有显著的统计学意义 (P<0.05, Fig1)

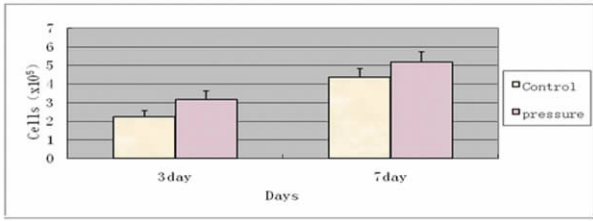


图 1 髓核细胞的增殖

Fig. 1 The proliferation of the Nucleus pulposus cells

2.2 Real-time PCR 检测髓核细胞中聚集蛋白聚糖 (aggrecan) 和 II 型胶原的基因表达

Real-time PCR 结果显示经周期性机械应力 (0.25Mpa, 0.1Hz) 刺激后, 加压 3 天和加压 7 天后, 加压组的聚集蛋白聚糖(Fig2) 和 II 型胶原(Fig3) 的表达均高于对照组, 差异均有显著的统计学意义(p<0.05)。

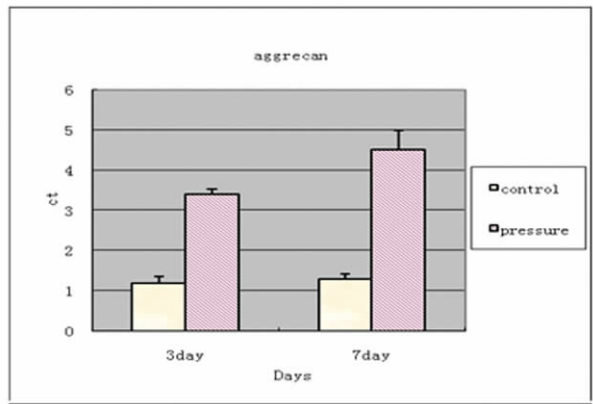


图 2 聚集蛋白聚糖的基因表达

Fig. 2 The gene expression of aggrecan

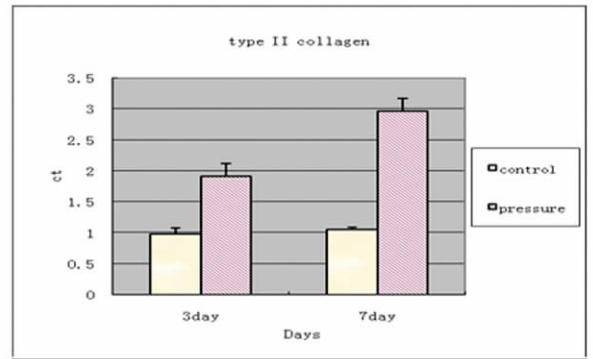


图 3 II 型胶原的基因表达

Fig. 3 The gene expression of collagen type II

3 讨论

髓核细胞常受到许多的物理力学刺激, 这些机械刺激能够维持髓核细胞的正常结构和功能^[9]。周期性机械应力作为一种特殊的机械刺激, 有利于模拟生物体内生理力学环境。本实验旨在探讨周期性机械应力对于髓核细胞增殖和细胞外基质合

成的影响。

髓核细胞为类软骨细胞, 生理环境下的细胞增殖和细胞外基质合成是髓核细胞的基本特性, 直接影响组织工程髓核细胞的质量。同时, 髓核细胞同软骨细胞表型相似, 合成分泌的细胞外基质主要为聚集蛋白聚糖和 II 型胶原^[6]。故本实验采用检测细胞增殖和聚集蛋白聚糖及 II 型胶原的 mRNA 水平作为主要指标能够直观地反映髓核细胞的活性和细胞外基质合成的水平。

细胞增殖是生物体的重要生命特征, 细胞以分裂的方式进行增殖。单细胞生物, 以细胞分裂的方式产生新的个体。多细胞生物, 以细胞分裂的方式产生新的细胞, 用来补充体内衰老和死亡的细胞, 所以细胞增殖是可以直观的反映细胞活性和特质的一个黄金指标, 在组织工程相关研究中被广泛应用。大量研究表明转化生长因子 β 1 可提高髓核细胞的增殖能力^[7]。Sha'ban M^[8]等也发现纤维蛋白可促进髓核细胞增殖, 稳定髓核体外组织形态。本实验的研究结果显示, 周期性机械应力能够提高髓核细胞的细胞增殖, 加压 3 天和加压 7 天后, 加压组均比对照组的细胞数明显增高。由此可以得出结论, 生理力学刺激能够显著提高髓核细胞的细胞增殖, 提高组织工程种子细胞的活性, 为最终提升组织工程椎间盘的质量提供了一条很好的途径。

聚集蛋白聚糖和 II 型胶原, 在椎间盘承受力学负荷中起重要作用, 椎间盘的稳固性很大程度上依赖于此^[9]。目前许多研究都在试图通过增加聚集蛋白聚糖和 II 型胶原的含量提高组织工程椎间盘细胞的质量。不论生长因子刺激或是氧含量控制, 均在一定程度上改善了聚集蛋白聚糖和 II 型胶原的含量^[10,11]。最近的研究证实生理活动形成的负荷促使髓核细胞合成分泌更多的聚集蛋白聚糖和 II 型胶原等细胞外基质, 而不负荷、过度的负荷或高频率的负荷则会使细胞基质中的聚集蛋白聚糖和 II 型胶原等重要基质受到抑制或丢失^[12,13]。而且有许多实验结果也似乎支持这种观点^[14]。本研究采用周期性机械应力, 大小频率适宜, 能够很好的模拟生理力学负荷。实验结果显示, 周期性机械应力能够促进细胞外基质的合成, 加压 3 天和加压 7 天后, 加压组均比对照组的聚集蛋白聚糖和 II 型胶原在髓核细胞中的表达量明显增高。这与 Hee HT^[15]等人的相关研究结果基本一致。由此可以认为生理力学刺激能够显著促进细胞外基质合成, 提高组织工程种子细胞的活性, 最终提升组织工程椎间盘的质量。这种近乎相反的差异主要是由于物理机械刺激下聚集蛋白聚糖和 II 型胶原含量的增加与髓核细胞所受到的机械刺激的大小和频率相关^[11]。但是, 这一实验结果和 Neidlinger-Wilke C 和 Hamilton DJ^[16,17]等的研究结论相悖, 他们认为机械刺激下细胞产生的聚集蛋白聚糖和 II 型胶原的含量有下降的趋势。

周期性机械应力促进椎间盘髓核细胞外基质合成的机制研究甚少。一般认为物理机械刺激通过激活信号通道, 将应力刺激信号传递给细胞, 直至细胞核内, 引起一系列生化反应, 最终出现细胞代谢和功能的改变。但是具体的信号传导通路还没有被完全阐明清楚。Setton LA^[18]等发现周期性机械刺激激活了细胞内 Ca^{2+} , 而活化的后者进入细胞核调控基因转录等, 最终

促进髓核细胞外基质合成。同时,髓核细胞为类软骨样细胞,鉴于本课题组之前在周期性机械应力促进软骨细胞增殖和细胞外基质合成相关机制方面的研究^[19,20],可以猜测两者机制方面的研究可能存在一定的相通性。这为我们后续的机制研究提供了广阔的思路和实验技术支持。

综上所述,周期性机械应力能够促进髓核细胞增殖和细胞外基质合成,显著提高组织工程髓核细胞的活性。本研究结果为进一步深入探讨周期性机械应力下髓核细胞生物力学和如何提高组织工程椎间盘的质量打下了基础,提供了更好的视角。

参考文献(References)

- [1] Nakai T, Mochida J, Sakai D. Synergistic role of c-Myc and ERK1/2 in the mitogenic response to TGF beta-1 in cultured rat nucleus pulposus cells[J]. *Arthritis Res Ther*, 2008,10(6):R140
- [2] Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. Expression of cartilage-derived morphogenetic protein in human intervertebral discs and its effect on matrix synthesis in degenerate human nucleus pulposus cells [J]. *Arthritis Res Ther*, 2009, 11(5):R137
- [3] Neidlinger WC, Würtz K, Urban JP, et al. Regulation of gene expression in intervertebral disc cells by low and high hydrostatic pressure [J]. *Eur Spine J*, 2006,15 Suppl 3:S372-378
- [4] 顾海伦,吕刚,王欢,等.人骨形态发生蛋白 2 促兔椎间盘细胞 aggrecan 和 II 型胶原的合成作用[J].*中国医科大学学报*.2007,36(5):551-553
Gu Hai-lun, Lu Gang, Wang Huan, et al. Effect of bone morphogenetic protein-2 on aggrecan and collagen type II in rabbit lumbar intervertebral disc cells [J]. *Journal of China Medical University*.Vol.36 No.5 Oct.2007
- [5] Le Maitre CL, Frain J, Fotheringham AP, et al. Human cells derived from degenerate intervertebral discs respond differently to those derived from non-degenerate intervertebral discs following application of dynamic hydrostatic pressure[J]. *Biorheology*, 2008,45(5):563-575
- [6] 谢其扬,叶君健,胡志坚,等.腰间盘髓核细胞体外培养及细胞生物学特性研究[J].*中国中医骨伤科杂志*,2006, 14: 85- 88
Xie Qi-yang, Ye Jun-jian, Hu Zhi-jian, et al. Culture of the Nucleus pulposus cells derived from Lumbar intervertebral disc and their biological properties in vitro [J]. *Chinese Journal of Traditional Medical Traumatology & Orthopedics*, 2006,14:85-88
- [7] Yang SH, Lin CC, Hu MH, et al. Influence of age-related degeneration on regenerative potential of human nucleus pulposus cells[J]. *J Orthop Res*, 2010, 28(3):379-383
- [8] Sha'ban M, Yoon SJ, Ko YK. Fibrin promotes proliferation and matrix production of intervertebral disc cells cultured in three-dimensional poly (lactic-co-glycolic acid) scaffold [J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2008, 19(9): 1219-1237
- [9] 张荣峰,张超,阮狄克,等.椎间盘细胞的细胞学特性与表型表达研究进展[J].*中国矫形外科杂志*, 2005, 13(19): 1502- 1504
Zhang Rong-feng, Zhang Chao, Ruan Di-ke, et al. Research progress on Cytological characteristics and the expression of lumbar intervertebral disc cells [J]. *The Orthopedic Journal of China*, 2005,13(19): 1502-1504
- [10] Risbud MV, Albert TJ, Guttapalli A, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells towards a nucleus pulposus-like phenotype in vitro: implications for cell-based transplantation therapy[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2004, 29(23):2627-2632
- [11] Steck E, Bertram H, Abel R, et al. Induction of intervertebral disc-like cells from adult mesenchymal stem cell [J]. *stem cell*, 2005, 23 (3): 403-411
- [12] Handa T, Ishihara H, Ohshima H, et al. Effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis and matrix metalloproteinase production in the human lumbar intervertebral disc[J]. *Spine*, 1997, 22(10):1085-1091
- [13] Illien-Jünger S, Gantenbein-Ritter B, Grad S, et al. The combined effects of limited nutrition and high-frequency loading on intervertebral discs with endplates [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2010, 35(19): 1744-1752
- [14] Ishihara H, McNally DS, Urban JP, et al. Effects of hydrostatic pressure on matrix synthesis in different regions of the intervertebral disk [J]. *Appl Physiol*, 1996,80(3):839-846
- [15] Hee HT, Zhang J, Wong HK. An in vitro study of dynamic cyclic compressive stress on human inner annulus fibrosus and nucleus pulposus cells[J]. *Spine J*, 2010,10(9):795-801
- [16] Neidlinger-Wilke C, Liedert A, Wuerzt K, et al. Mechanical stimulation alters pleiotrophin and aggrecan expression by human intervertebral disc cells and influences their capacity to stimulate endothelial migration[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2009, 34(7):663-669
- [17] Hamilton DJ, Pilliar RM, Waldman S, et al. Effect of circumferential constraint on nucleus pulposus tissue in vitro[J]. *Spine J*, 2010,10(2): 174-183
- [18] Setton LA, Chen J. Mechanobiology of the intervertebral disc and relevance to disc degeneration [J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2006,88 (2): 52-57
- [19] Kudirka JC, Panupinthu N, Tesseyman MA, et al. P2Y nucleotide receptor signaling through MAPK/ERK is regulated by extracellular matrix: involvement of beta3 integrins [J]. *J Cell Physiol*, 2007, 213 (1):54-64
- [20] De Croos JN, Dhaliwal SS, Grynblas MD, et al. Cyclic compressive mechanical stimulation induces sequential catabolic and anabolic gene changes in chondrocytes resulting in increased extracellular matrix accumulation[J]. *Matrix Biol*, 2006, 25(6):323-231