

# 实验兔腰椎间盘病理改变及软骨终板细胞的迁移凋亡规律 调查研究

Investigation and Study on Pathological Changes of Lumbar Intervertebral Disc and Migration and Apoptosis of Cartilage Endplate Cells in Experimental Rabbits

杨涛 陈举 桂大金 邓煜 杨春萍<sup>通讯作者</sup>

Yang Tao, Chen Ju, Gui Dajin, Deng Yu, Yang Chunping Corresponding Author

(重庆市中医骨科医院 400030)

(Chongqing Traditional Chinese Medicine Orthopedic Hospital 400030)

**摘要:**目的 探讨力学刺激和中药干预对软骨终板细胞增殖与生物活性的影响;方法 健康成年新西兰白兔 4 只。分成对照组及模型组两组,每组 2 只,利用 MTT 法衡量细胞的增殖能力及蛋白多糖与胶原的变化。结果 模型组腰椎间盘发生明显的病理学变化,而对照组未见明显改变;模型组腰椎间盘终板关节软骨区与纤维环区界限明显,未发现明显细胞迁移现象,但椎间盘终板生长软骨区细胞已明显向关节软骨区迁移;结论 腰椎肌性痉挛所致的异常应力,早期即可出现生长软骨层细胞明显向关节软骨层迁移,且椎间盘的软骨终板、纤维环区发生明显的细胞凋亡现象,可为研究椎间盘早期退变的病因机制提供实验证据。

Chinese medicine intervention on the proliferation and biological activity of cartilage endplate cells; Method: Four healthy adult New Zealand white rabbits. Divided into two groups, a control group and a model group, with two animals in each group. The cell proliferation ability and changes in proteoglycans and collagen were measured using MTT method. Results: The model group showed significant pathological changes in the lumbar intervertebral disc, while the control group showed no significant changes; In the model group, there was a clear boundary between the articular cartilage area and the fibrous ring area of the lumbar disc endplate, and no obvious cell migration was found. However, the cells in the growing cartilage area of the intervertebral disc endplate had significantly migrated to the articular cartilage area; Conclusion: Abnormal stress caused by lumbar muscle spasm, the growing cartilage layer cells can migrate to the articular cartilage layer in the early stage, and the obvious cell apoptosis occurs in the cartilage endplate and fibrotic ring area of the intervertebral disc, which can provide experimental evidence for the study of the etiology and mechanism of early intervertebral disc degeneration.

**关键词:**肌痉挛;椎间盘退变;终板;软骨细胞;凋亡

**Abstract:** Objective: To explore the effects of mechanical stimulation and traditional Keywords: muscle spasms; Degeneration of intervertebral discs; Endplate; Chondrocytes; Apoptosis

在对早期腰椎间盘机制的研究中,腰椎间盘退变一直被认为是腰椎间盘早期发病的主要原因<sup>[1]</sup>。青少年由于其腰椎间盘临床表现多以症状为主,X线、CT、MR等影像学检查均无法反映出腰椎的形态,不能显示腰椎的构造和腰椎间盘的严重损害。因此,从发病机理的角度,研究机械因素对早期腰椎间盘的影响,尤其是头倾等不良习惯的影响,具有重要意义<sup>[2]</sup>。

本课题组前期研究发现,以椎间盘为代表的动态组织,其形变、退行性改变可能是引起早期椎间盘突出的重要原因<sup>[3]</sup>。本项目拟在前期工作基础上,通过对腰椎间盘组织结构,从细胞层面上探讨在不同应力状态下腰椎间盘的退变,以分析早期无临床影像改变的腰椎间盘的病理变性过程。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** DMEM 培养液,胎牛血清、F12 培养基、青霉素、链霉素、II 型胶原酶、二甲亚砜、胰蛋白酶、甲苯胺蓝染液、碱性磷酸酶检测试剂盒、I 型胶原、骨桥蛋白、骨涎蛋白兔抗鼠单克隆抗体、I 型胶原免疫组织化学试剂盒等,相差倒置显微镜、CO2 培养箱、酶标仪、流式细胞分析仪器及软件、BioDynamic 全能三维组织培养与测试平台等。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 中药血清制备

新西兰大白兔给药前 1 小时采血,再给予中药水提液 10ml 灌胃,每天给药 2 次,连续给药 3 天,末次给药后 1 小时再采血,分离血清后低温保存备用。

### 1.2.2 软骨终板细胞的原代培养及纯化

#### (1) 软骨终板细胞的原代培养

软骨终板细胞的采集和分离方法与文献中的相同,新西兰大白兔 4 只,不分性别,体重为 2~2.5 公斤,将腰椎间盘上下软骨终板取下,将其切割成 1 毫米,然后用 0.25% 的胰蛋白酶和 0.2% II 型胶原酶将其分解后,取 600 g 上清液,离心 8 分钟,取软骨终板细胞,加入 DMEM/F12 培养基中,以  $3 \times 10^5/\text{ml}$  密度接种到  $25\text{cm}^2$  培养瓶中,在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养。每 2~3 d 换液 1 次,按时在倒置显微镜观察、拍照。细胞增殖至瓶底 80% 左右时进行细胞传代。

(2) 软骨终板细胞的纯化 采用消化传代法及细胞反复贴壁法进行纯化。

#### 1.2.3 成骨细胞的鉴定

在进行第三代细胞的传承之前,将数个灭菌的盖玻片放在一个无菌的培养皿中,让传代的细胞在上面生长,待细胞长满盖玻片后,用 PBS 液清洗,体积分数 95% 乙醇固定,进行钙-钴法 ALP 染色,I 型胶原免疫组化染色,HE 染色法鉴定细胞形态。取培养至第 7 代的细胞行茜素红矿化结节染色。

#### 1.2.4 软骨终板细胞的加载

分别取生长良好的第 3 代软骨终板骨细胞和以腰舒胶囊含药血清培养的第 3 代软骨终板细胞,接种于三维组织培养与测试平台的生物反应舱内,培养室密封后,施加压应力,整个培养室系统及加力过程保持  $37^\circ\text{C}$  恒温。对贴壁的成骨样细胞持续施加不同时段的压应力,测定不同时段软骨终板细胞的增殖情况。

#### 牵张应力加载方案

大小 5min 10min 15min 30min 60min 120min

0.3Pa

0.6Pa

0.9Pa

1.2Pa

1.5Pa

1.8Pa

应力时间  
应力强度 → 软骨终板细胞  
含药血清培养的软骨终板细胞

表1 不同时段的压力

1.2.5 细胞增殖测定 取培养至第3代的软骨终板细胞和以腰舒胶囊含药血清培养的第3代软骨终板细胞,用0.25%的质量浓度的胰酶进行消化,在培养基上以 $10 \times 10^3$ 的密度接种;待细胞大部贴壁后,在0.3Pa、0.6Pa、0.9Pa、1.2Pa、1.5Pa、1.8Pa下,分别加载5min、10min、15min、30min、60min、120min,用细胞增殖检测试剂(CellTiter96)检测,在标酶仪中,于595nm下测吸光度。

### 1.2.6 蛋白多糖及Ⅱ型胶原的测定

用RT-PCR法检测腰舒胶囊含药血清及应力作用后的软骨终板细胞的蛋白多糖及Ⅱ型胶原的表达。

### 1.3 检测和评价

图像采集显微镜下,每张腰椎间盘标本将阳性细胞集中区域作为核心区域,分纤维环区、生长软骨区、关节软骨区。随机抽取10个视场,应用影像学分析软件对视场内的凋亡核进行计数。细胞凋亡指数以400倍视野下计算细胞总数中凋亡细胞所占的百分比。

### 1.4 主要观察指标

①免腰椎间盘大体观察;②光镜观察;③椎间盘各结构细胞凋亡指数。

### 2 结果

#### 2.1 大体观察

模型组与对照组腰间盘纤维环平滑而完好。髓核亮如凝胶。肉眼观察无异常现象。

#### 2.2 光镜下的观察结果

对照组苏木精-伊红染色的纤维环平滑、完整,呈同心圆圈,内有淡红色的胶原蛋白纤维束,以髓核为中心,纤维环和髓核的边界清晰,有较好的一致性。

模型组中,苏木精-伊红染色纤维环粗糙,髓核收缩明显,内部纤维网结构消失,部分纤维聚集成粗纤维,髓核有轻微的突起倾向。

### 2.3 对照组和模型组的腰椎间盘结构细胞凋亡指数

两组均在腰间盘纤维环、生长软骨区和关节软骨区呈一定分布。结果表明,纤维环区的细胞凋亡分布明显多于关节软骨区。与对照组相比,模型组椎间盘纤维环区、生长软骨区和关节软骨区的阳性细胞数目明显增多,细胞凋亡指数明显增高。

### 3 讨论

已有研究表明,生物力学因素在椎间盘退变过程中起着关键作用。加速腰椎间盘退变的主要原因之一是长期腰椎间盘弯曲应力失衡的影响<sup>[4]</sup>。动物体内身高测量表明,正常腰椎的应力会受腰背肌肉损伤的影响,而腰背损伤会引起引起腰椎机械失衡、腰椎曲率改变以及骨质增生。腰背肌动力学分析表明,c4、c5肌力较弱,位于腰椎曲率弓的顶部,稳定性最低。本节段为长期腰椎屈曲所致腰椎间盘退变的研究对象。而骨骼肌是维持腰椎动态稳态的关键器官,

其病变的出现势必会影响到其正常的生理功能,进而引起退行性病变。

正常兔的腰椎间盘是由周边的纤维环和中心的髓核构成,上下边缘分别被一块透明的软骨终板所包围。对实验兔腰椎间盘进行了常规病理学观察,结果显示:模型组腰椎间盘表现为粗大纤维环,髓核褶皱,纤维网状结构消失,在髓核-纤维环交界点和纤维环层沿行走方向上均可见明显裂缝。髓核因脱水而萎缩,并有轻度后移的趋势,这可能是由于腰椎间盘弯曲时椎间盘前方的压力负荷较高,髓核容易向后移动所致。结合吕卫群等<sup>[5]</sup>对腰椎关节及腰椎软组织病理的观察,推测长期使用该动物模型后,腰椎间盘退变的程度将更加显著。但是,因为这一实验的初衷是为了制造一种与腰椎间盘相似的动物模型,实验时间相对较短。

目前,研究人员已开始重视关节盘组织的凋亡与其老化、退变的关系。Ding Q等人<sup>[6]</sup>发现大鼠椎间盘组织中出现了大量的凋亡细胞,尤其是软骨细胞的凋亡是导致椎间盘退变的主要原因。

椎间盘退变起重要作用。Ge Q等<sup>[7]</sup>建立了具有动静态失衡的椎间盘退变模型,在椎间盘退变过程中,出现了以软骨细胞为主的典型凋亡细胞,这一现象提示:软骨细胞凋亡的增加可能是椎间盘退变的一个重要机制。本文作者在此基础上,成功地构建了腰椎动态失衡的动物模型。在2个月,分别对模型组的退变,纤维环的粗糙性和髓核的收缩性进行了检测。采用tunel染色方法检测纤维环、生长软骨区及关节软骨区的细胞凋亡情况,结果显示:动物模型组的细胞凋亡数目较正常组显著增加。因此,有人认为在对腰椎动力不平衡的初步研究中发现,腰背肌群在维持椎体机械平衡和腰椎间盘病的各个阶段、各个环节中起着重要作用,是引起各种临床腰椎症状的主要原因。腰椎机械失衡和腰椎间盘细胞变性可能是急性和慢性腰肌损伤所致软组织损伤的结果。研究表明,腰椎软骨中的终板细胞凋亡,可导致腰间盘充质干细胞的失活,进而导致腰椎退行性病变,导致腰椎关节疼痛。因此,在临床上,作者发现早期腰椎间盘突出症患者常伴有腰背肌群的痉挛和压痛,同时影像学也可出现腰椎间盘退变、腰椎曲度,经临床力学刺激等治疗,前者如明显减少,则可出现腰椎间盘突出症。后者的异常通常会得到改善,也可以作为腰椎间盘突出症的临床证据。据此,提出通过机械刺激(推拿、扭转)等方法对腰背急、慢性损伤进行干预,以延缓椎间盘的退变,并验证该研究的临床价值。该项目的开展将为临床防治及修复腰椎间盘退变提供新的理论依据。

### 参考文献:

- [1]冯陈诚.人椎间盘内N--Ac--PGP的鉴定以及其对软骨终板干细胞迁移和分化影响的研究[D].第三军医大学,2017.
- [2]于栋,刘侃,时宗庭,et al.动力失衡模型兔腰椎间盘病理改变及软骨终板细胞的迁移凋亡规律[J].2022.
- [3]张丽勇. AKT-mTOR信号通路在大鼠椎间盘软骨终板细胞自然退变中的意义[J]. 中国老年学杂志,2016,36(15):3.
- [4]周年.退变椎间盘软骨终板细胞衰老及调控机制研究[D].重庆医科大学,2017.
- [5]吕卫群,李霞,袁凤来.酸敏感离子通道1a介导细胞内钙离子内流调节椎间盘软骨终板细胞凋亡[J].解剖学杂志,2016,39(1):4.
- [6]Ding Q, Ren Y, Hui C, et al. Cyclooxygenase-2 deficiency causes delayed ossification of lumbar vertebral endplates[J]. Am J Transl Res, 2018, 10(3):718-730.
- [7]Ge Q, Ying J, Shi Z, et al. Chlorogenic Acid retards cartilaginous endplate degeneration and ameliorates intervertebral disc degeneration via suppressing NF- $\kappa$ B signaling[J]. Life Sciences, 2021(38):119324.

项目名称:重庆市渝中区基础研究与前沿探索项目(应力下腰舒胶囊对椎间盘软骨终板细胞生物活性的影响)项目编号:(20210155)