

TGF- β 1 对人髓核细胞 CD24 及细胞外基质表达的调节作用

关晓明 马迅 张丽 冯皓宇 满孝续

【摘要】 目的 采用流式细胞术和荧光定量 PCR 观察 TGF- β 1 因子对人髓核细胞表型 CD24 表达变化及细胞外基质合成的调节作用,为进一步了解髓核细胞特性提供支持。方法 采用机械酶消化法分离培养人髓核细胞,利用流式细胞术联合免疫组化方法鉴定髓核细胞。TGF- β 1 持续刺激髓核细胞 24 h、72 h、6 d 后,流式细胞术观察 CD24 表达变化;RT-PCR 检测不同作用时间 CD24、SOX9、II 型胶原、蛋白多糖 mRNA 表达变化。结果 体外分离培养的第 2 代髓核细胞表现为多边形或三角形,此类细胞 II 型胶原免疫组化染色阳性,比例为 33%~60%,部分细胞表现为梭形,其 II 型胶原免疫组化染色为弱阳性,流式细胞术检测 CD24 表达比例介于 25%~56%,两种鉴定方法比较无统计学差异($t=27, P>0.05$);TGF- β 1 刺激人髓核细胞 24 h 后 CD24 阳性细胞比例为 33.9%,刺激 72 h 后 CD24 阳性细胞比例为 76.2%,刺激 6 d 后阳性细胞比例为 99%;RT-PCR 结果显示 TGF- β 1 刺激后 CD24、SOX9、II 型胶原、蛋白多糖 mRNA 表达量较对照组明显增加,并且存在时间依赖性。结论 采用流式细胞术检测成熟髓核细胞 CD24 表达,在鉴定髓核细胞和检测成熟髓核细胞比例时,具有快速,操作简单,细胞需求量少,结果可靠的优点;TGF- β 1 可上调 CD24 基因表达和基质蛋白的合成,促进髓核细胞成熟。

【关键词】 转化生长因子 β 1; CD24; 流式细胞术; 髓核细胞

TGF- β 1 regulate the cells phenotype marker CD24 and extracellular matrix of nucleus pulposus *in vitro*

GUAN Xiao-ming, MA Xun, ZHANG Li, FENG Hao-yu, MAN Xiao-xu. Department of Orthopaedics, The Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Corresponding author: MA Xun, Email: maxun2532@sina.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of TGF- β 1 regulated on CD24 expression and extracellular matrix synthesis of nucleus pulposus cells with flow cytometry and RT-PCR, which will provide a novel insight to further understand the characteristics of nucleus pulposus cells. **Methods** The human nucleus pulposus cells were isolated and cultured with enzyme digestion. Flow cytometry and immunohistochemical were combined to identify the nucleus pulposus cells. After the nucleus pulposus cells was stimulate by TGF- β 1 in 1 day, 3 days, 6 days, the percentage of postive antigen CD24 expression change were detected by flow cytometry. The quantification of CD24, SOX9, collagen II, Aggrecan genes was assessed using RT-PCR in different groups. **Results** In all cases, the morphology of nucleus pulposus cells were polygons or triangle which the immunohistochemical stains of II collagen type was positive, the proportion was 33%-60%; some cells were spindle, the immunohistochemical stains of II collagen type was weak positive. The percentage of postive antigen expresstion of CD 24 was 25%-56%, there was no statistical difference between the two methods ($t=27, P>0.05$). In the lasting sitmulating nucleus pulposus cells 24 hours, 72 hours and 6 days later by TGF- β 1, the percentage of CD24 positive cells was respectively 33.9%, 76.2% and 99%; RT-PCR results showed that CD24, SOX9, collagen II, aggrecan mRNA express increased significantly than control group after TGF- β 1 stimulated. **Conclusions** Flow cytometry is a novel method which has advantage of rapid, simple, reliable and less demand for cells to identify mature nucleus pulposus cells by detected CD 24 expression. TGF- β 1 can stimulate CD24 gene expression and protein synthesis, adjusting nucleus pulposus cell to mature.

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.17.017

基金项目: 山西省自然科学基金(2011011042-3);山西医科大学第二医院青年基金(20100101)

作者单位: 030001 太原,山西医科大学第二医院骨科(关晓明、满孝续);山西医学科学院 山西大医院骨科(马迅、张丽、冯皓宇)

通讯作者: 马迅, Email: maxun2532@sina.com

【Key words】 Transforming growth factor beta 1; CD24; Flow cytometry; Nucleus pulposus cells

髓核细胞是椎间盘组织中重要的细胞成分,其体外鉴定主要以细胞形态学或者免疫组织化学方法验证该细胞是否表达 II 型胶原、SOX9 等细胞外基质为主^[1]。Fujita 等^[2]发现髓核细胞高表达 CD24,并认为其可以作为成熟髓核细胞特异性标志物。本研究小组前期证明以 CD24 为指标,采用流式细胞术可对髓核细胞进行快速鉴定^[3]。目前髓核细胞的分离培养大多采用酶消化法,往往混杂有其他细胞,而采用流式细胞术结合细胞形态学来鉴定髓核细胞,并测定细胞纯度报道较少。另外生长因子对 CD24 表达及促髓核细胞成熟是否存在调节作用亦不清楚。本次研究通过采用 CD24 联合免疫组化方法鉴定髓核细胞,然后利用流式细胞术,RT-PCR 检测观察 TGF-β1 对髓核细胞表型 CD24 及细胞外基质的调节作用。

材料与方 法

一、材料

经患者及家属同意,手术获取 25~30 岁腰椎间盘突出症或腰椎滑脱症患者的椎间盘组织 5 例。II 型胶原酶(Sigma 公司,英国);CD24、SOX9、II 型胶原、蛋白多糖引物由上海生工生物工程公司合成;TaKaRa RT-PCR 试剂盒购自大连宝生工程有限公司。PE 标记 IgG1,CD24(Beckman Coulter,美国);FC 500 流式细胞仪(Beckman Coulter 公司,美国)。

二、方法

1. 人髓核细胞分离培养:无菌条件下取出髓核组织,眼科剪分离剪碎,用 0.2% II 型胶原酶 37℃ 水浴箱中消化 1~2 h, PBS 洗涤 3 次,用 0.25% 的胰蛋白酶溶液 37℃ 水浴箱中消化 15 min, PBS 洗涤 3 次,200 目滤网过滤,用添加 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养完全培养液终止消化,冲洗 3 次,加入培养液均匀吹打,调整细胞浓度 10⁴/ml 接种于底面积为 25 cm² 的培养瓶中,置于 37℃,体积分数 5% CO₂、100% 湿度条件下培养,以后每隔 3 d 换液 1 次。每天在倒置光学显微镜下观察细胞生长状态,达到 90% 融合时,消化传代,进行后续实验。

2. 流式细胞术检测 CD24 表达:取第 2 代髓核细胞用胰酶消化后,调整细胞浓度为 1 × 10⁵/ml,每管取 1 ml 细胞, PBS 清洗后弃上清用于标记。每管中分别加入荧光单克隆抗体 CD24-PE,混匀后室温避光孵育 30 min,2 ml PBS 清洗,重悬于 500 μl PBS(含 1% 多聚甲醛)后,流式细胞仪上机检测。根据同型对照的荧光强度设定阴性细胞群阈值,观察两种细胞每一种单抗

的阳性细胞表达率及荧光强度。

3. 免疫组织化学法检测 II 型胶原表达:取第 2 代细胞,待细胞增殖达 80%,胰酶消化、按细胞浓度为 10⁴/ml 接种至铺有 6 孔板中培养;待细胞铺满时,取出盖玻片, PBS 洗涤,用 4% 多聚甲醛固定 30 min。0.3% H₂O₂ 室温孵育 10 min,蒸馏水洗涤 3 次,3 min/次。加入兔抗人 II 型胶原多克隆抗体,4℃ 冰箱过夜, PBS 洗涤,加入二抗(生物素化山羊抗兔 IgG,1:400),37℃ 40 min, PBS 洗涤 3 次,3 min/次。DAB 显色,苏木素轻度复染。脱水、透明、常规封片。结果判断:呈现棕黄色为阳性,无着色为阴性。

4. TGF-β1 刺激髓核细胞:(1)取第 3 代髓核细胞,胰酶消化、按细胞浓度为 10⁴/ml 接种至 6 孔板和铺有 6 孔板中培养,待细胞增殖达 80%,每孔细胞中添加 10 ng/ml TGF-β1,分别在 24 h、72 h、7 d 进行流式细胞术 CD24 检测,RT-PCR 检测。(2)流式细胞术 CD24 检测:胰酶消化细胞,调整细胞浓度为 1 × 10⁵/ml,每管取 1 ml 细胞, PBS 清洗后弃上清用于标记。每管中分别加入荧光单克隆抗体 CD24-PE,混匀后室温避光孵育 30 min,2 ml PBS 清洗,重悬于 500 μl PBS(含 1% 多聚甲醛)后,流式细胞仪上机检测。(3)反转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)检测 CD24、SOX9、II 型胶原、蛋白多糖 mRNA 表达:检测目的基因引物设计见表 1,以 β-actin 作为内参对照,委托上海生工生物有限公司合成。每组采用 Trizol 试剂盒提取各组髓核细胞 mRNA;取 5 μl RNA 反转录,得到 cDNA 产物用于扩增目的基因;PCR 扩增条件:95℃ 30 s,95℃ 5 s,60℃ 34 s,40 个循环。重复 6 组。所得各组 Ct 值用 2^{-ΔΔCt} 表示。

表 1 CD24、SOX9、II 型胶原、蛋白多糖引物序列

引物		引物序列(5'→3')
CD24	上游	CCCACGCAGATTTATTCCAG
	下游	GACTTCCAGACGCCATTG
SOX9	上游	TCCTCAGGCTTTGCGATTT
	下游	TGCTCGGGCACTTATTGG
II 型胶原	上游	GCTGCGACCTGCAGACCTG
	下游	GTCCACACCGAATTCCTGCTCG
蛋白多糖	上游	ATGCCCAAGACTACCAGTGG
	下游	TCCTGGAAGCTCTTCTCAGT
β-actin	上游	GGACTCGTCATACTCCTGCTTG
	下游	GGAAATCGTGCCTGACATTAAG

三、统计学分析

使用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析,计量资料

表2 各组 CD24、SOX9、II型胶原、蛋白多糖 mRNA 表达情况($2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	CD24	SOX9	II型胶原	蛋白多糖
对照组	0.655 ± 0.015	0.856 ± 0.113	1.042 ± 0.128	1.044 ± 0.05
实验组 24 h	1.052 ± 0.025 ^{ab}	1.092 ± 0.042 ^{ab}	1.475 ± 0.034 ^{ab}	1.481 ± 0.053 ^{ab}
72 h	1.795 ± 0.105 ^{ab}	1.795 ± 0.015 ^{ab}	1.807 ± 0.035 ^{ab}	1.860 ± 0.022 ^{ab}
6 d	1.990 ± 0.081 ^a	1.891 ± 0.067 ^a	1.985 ± 0.024 ^a	1.995 ± 0.055 ^a

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与6 d比较,^b $P < 0.05$

均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间资料比较主要使用单因素方差分析,多个样本均数两两之间的比较采用 LSD-*t* 检验;计数资料采用两个独立样本秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 髓核细胞鉴定结果:(1)髓核细胞形态及免疫组化染色结果:倒置相差显微镜观察原代髓核细胞主要以多边形和三角形为主,部分细胞形态以短梭形为主(图 1A)。传代后髓核细胞大多数以多边形为主,部分梭形细胞呈簇生长(图 1B)。多边形细胞其 II 型胶原免疫组化染色呈强阳性(图 1C),短梭形细胞 II 型胶原免疫组化染色表现为弱阳性(图 1D)。(2)髓核细胞流式鉴定(图 2):流式细胞术检测髓核细胞表型 CD24 表达,5 例样本 CD24 比例分别为 25%、39%、42%、53%、56%。

2. TGF- β 1 刺激髓核细胞后 CD24 表达变化(图 3):TGF- β 1 作用髓核细胞后,细胞表面 CD24 表达随着因子作用时间延长而逐渐增高,尤其是在作用 72 h 后,CD24 表达明显增高。

3. RT-PCR 检测髓核细胞 CD24、II 型胶原、蛋白多糖、SOX9 mRNA 表达:见表 2。半定量分析各实验组 CD24、II 型胶原、蛋白多糖、SOX9 mRNA 的表达量均高于对照组,其中 6 d 组显著高于其余各组,72 h 组基因表达量明显高于 24 h 组和对照组。说明 TGF- β 1 可上调髓核细胞表面 CD24 表达,并且随着作用时间延长其基因表达量增加,同时 II 型胶原、蛋白多糖基因表达量也逐渐增高。

讨 论

椎间盘退变是脊柱退行疾患病理基础。一般的手术或保守治疗虽然能够取得一定的疗效,但是不能阻止椎间盘的退变^[4-5]。退变椎间盘共同表现为髓核细胞数量和功能减少,细胞外基质大分子降解,随即椎间盘内营养渗透压下降和生物力学功能障碍,最终进一步恶化和加速退变^[6]。尽管确切的退变机制尚存争议,但占椎间盘体积仅 1% 的细胞成分,尤其是髓核细胞,在维持椎间盘结构、功能完整性方面所起的核心作

用已被公认^[7]。目前髓核细胞的分离培养方法为机械法结合酶消化,对于正常椎间盘组织,其髓核区域和纤维环区域分界相对明显,获得的髓核细胞纯度可以保证,但是对于退变椎间盘组织,由于髓核组织纤维化,交界区域不明显,分离后髓核细胞纯度受到影响,往往需要进行髓核细胞鉴定。

由于髓核细胞是类软骨细胞,其主要产生软骨细胞标志基因 SOX9、II 型胶原与蛋白多糖,故对于髓核细胞的鉴定还主要以细胞形态结合组织学方法为主,但此方法存在着细胞需求量大,耗时长,操作复杂,假阳性率高,并且人为主观因素干扰等缺点。

流式细胞术(flow cytometer)是一种在功能水平上对单细胞或其他生物粒子进行定量分析和分选的检测手段,与传统的荧光镜检查相比,具有速度快、精度高、准确性好等优点,成为当代最先进的细胞定量分析技术。目前在研究髓核细胞特性方面也有应用,Flagler 等^[8]利用流式细胞术分析牛椎间盘细胞内细胞外基质的表达情况,发现采用流式细胞术无论对于新鲜分离细胞还是体外培养细胞,检测其细胞大小和胞内特异性胶原蛋白表达水平可以将来源髓核和纤维环区域的细胞鉴别,所以利用流式细胞术检测细胞内特异性胶原表达水平来区分细胞来源有很大的潜力。本研究小组^[3]前期采用免疫组织化学染色,RT-PCR 测定 II 型胶原及 SOX9 的表达,流式细胞仪检测其 CD24 阳性表达率,分析三者之间的相关性,发现髓核细胞分泌胞外基质 II 型胶原与 SOX9 的表达与 CD24 阳性率结果有相关性。认为采用流式细胞仪测定 CD24 表达可以快速、简便地鉴定髓核细胞。本研究中,髓核细胞均来源于 5 例存在不同程度退变的椎间盘组织,因此髓核细胞纯度不高,我们通过形态学观察,发现部分细胞以多边形或者三角形为主,此类细胞被认为是髓核细胞典型的表现^[9],本实验中部分细胞也呈现多边形或者三角形生长,免疫组化染色发现此类细胞 II 型胶原表达阳性,其他部分呈梭形的细胞表达相对较弱,并且流式细胞术检测 CD24 阳性细胞表达比例与免疫组化染色结果一致。由于 CD24 被认为是成熟髓核细胞的标志物,那么在分离细胞中除了存在纤维环或者软骨终板细胞外,可能部分髓核细胞还处于未成熟状态或者是干细

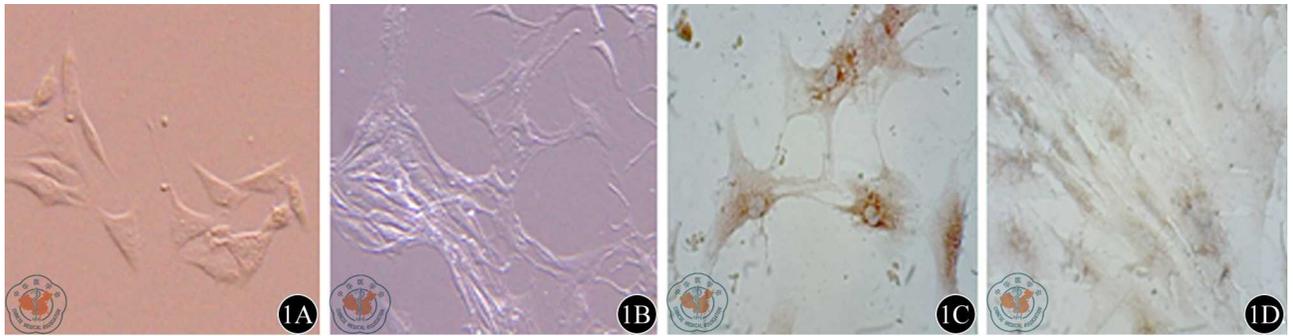


图1 1A: 髓核细胞原代培养形态以多边形和三角形为主, 部分短梭形细胞(×100); 1B: 第2代髓核细胞以多边形为主, 部分细胞呈短梭形(×100); 1C: 多边形及短梭形细胞Ⅱ型胶原免疫组化染色呈阳性, 细胞质中大量棕黄色颗粒(×100); 1D: 短梭形细胞Ⅱ型胶原免疫组化染色呈弱阳性(×100)

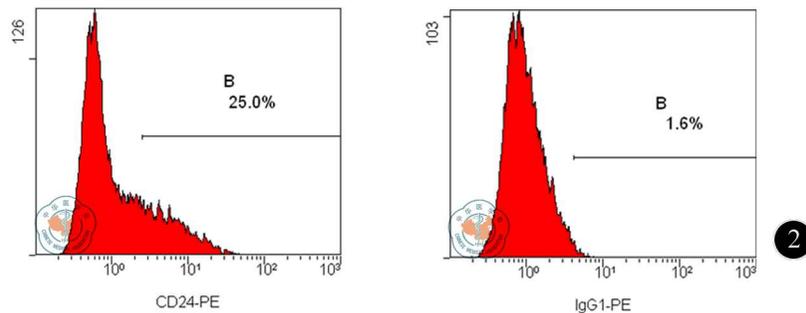


图2 流式细胞术检测CD24表达

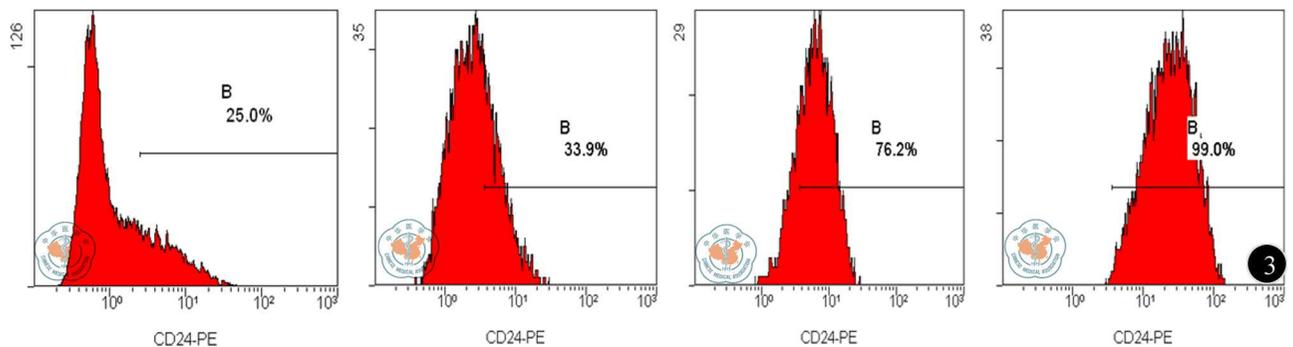


图3 TGF-β1刺激髓核细胞后CD24表达变化

胞^[10]。因此认为利用流式细胞术,以成熟髓核细胞标志物 CD24 为指标,可以快速鉴定分离出髓核细胞。髓核细胞的增殖、分化及成熟,除了需要充足营养外,还需要大量的生长因子刺激^[11]。研究证实 TGF-β1 对于一些特定的间充质干细胞(骨髓间充质干细胞)^[12]、软骨细胞^[13-14]和成骨细胞^[15]有促增殖作用。Zhang 等^[16]通过利用 MTT 检测方法观察 TGF-β1 与胰岛素样生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)对髓核细胞增殖作用的影响,发现在含 1% 胎牛血清的培养基中, TGF-β1 作用强于 IGF-1, 在含 10% 胎牛血清的培养基中, TGF-β1 与 IGF-1 均有较强的促进增殖作用,但是 TGF-β1 作用更强, TGF-β1 与 IGF-1 对体外培养的髓核细胞促增殖作用存在着剂量和时间依赖关系, TGF-β1 在 10 ng/ml 时作用最强, 并且作用 3 d 后促增殖作用明显。而 CD24 作为成熟髓核细胞标志物, 生

长因子对其是否也有调节作用呢? 本实验中, 髓核细胞给予 TGF-β1 (10 ng/ml) 刺激后, 分别在作用 24 h、72 h、6 d 后进行检测, 流式细胞术检测结果发现, CD24 表达明显增高, 作用 24 h 后, CD24 表达比例有增高趋势, 而在 72 h 时 CD24 表达比例是对照组的 2 倍左右, 6 d 时几乎可以达到 100%。RT-PCR 检测结果显示在 TGF-β1 刺激髓核细胞后, CD24 基因表达水平逐渐升高, 并且与流式细胞术检测结果变化趋势一致, 同时细胞外基质 SOX9、Ⅱ型胶原、蛋白多糖 mRNA 表达水平也逐渐升高。

采用流式细胞术检测成熟髓核细胞 CD24 表达, 此方法在鉴定髓核细胞和检测成熟髓核细胞比例时, 具有快速简单、细胞需求量少、结果可靠的优点。而 TGF-β1 不但可促进髓核细胞增殖和提高细胞外基质合成, 还可促进髓核细胞成熟, 上调 CD24 基因表达和基质蛋

白的合成, 这为 TGF- β 1 诱导间充质干细胞向髓核细胞或者类软骨细胞分化后, 在鉴定分化状态时提供了新的检测指标。而 CD24 表达与细胞外基质合成之间是否存在关联, 还需要进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 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. *Spine*, 2004, 29: 2627-2632.
- [2] 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.
- [3] 张丽, 马迅, 关晓明, 等. 应用流式细胞术测定 CD24 表达鉴定人髓核细胞. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15: 8583-8586.
- [4] Colombini A, Lombardi G, Corsi MM, et al. Pathophysiology of the human intervertebral disc. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 5: 837-842.
- [5] An HS, Thonar EJ, Masuda K. Biological repair of intervertebral disc. *Spine*, 2003, 28: S86-S92.
- [6] Roberts S, Evans H, Trivedi J, et al. Histology and pathology of the human intervertebral disc. *J Bone Joint Surg (Am)*, 2006, 88 Suppl 2: 10-14.
- [7] 王锋, 王运涛, 吴小涛. 髓核细胞修复椎间盘退行性变的研究进展. *中国修复重建外科杂志*, 2009, 23: 864-867.
- [8] Flagler DJ, Huang CY, Yuan TY, et al. Intracellular Flow Cytometric Measurement of Extracellular Matrix Components in Porcine Intervertebral Disc Cells. *Cell Mol Bioeng*, 2009, 2: 264-273.
- [9] Chou AI, Reza AT, Nicoll SB. Distinct intervertebral disc cell populations adopt similar phenotypes in three-dimensional culture. *Tissue Eng Part A*, 2008, 14: 2079-2087.
- [10] Blanco JF, Graciani IF, Sanchez-Guijo FM, et al. Isolation and Characterization of Mesenchymal Stromal Cells From Human Degenerated Nucleus Pulposus: Comparison With Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells From the Same Subjects. *Spine*, 2010, 35: 2259-2265.
- [11] 满孝旭, 马迅, 关晓明, 等. 肝细胞生长因子对体外培养的人退变髓核细胞生物学活性影响[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2011, 5: 7226-7231.
- [12] Longobardi L, O'Rear L, Aakula S, et al. Effect of IGF-1 in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF-signaling. *J Bone Miner Res*, 2006, 21: 626-636.
- [13] Tsukazaki T, Usa T, Matsumoto T, et al. Effect of transforming growth factor on the insulin-like growth factor-I autocrine/paracrine axis in cultured rat articular chondrocytes. *Exp Cell Res*, 1994, 215: 9-16.
- [14] Rousche KT, Ford BC, Praul CA, et al. The use of growth factors in the proliferation of avian articular chondrocytes in a serum-free culture system. *Connect Tissue Res*, 2001, 42: 165-174.
- [15] Richmon JD, Sage AB, Wong VW, et al. Tensile biomechanical properties of human nasal septal cartilage. *Am J Rhinol*, 2005, 19: 617-622.
- [16] Zhang R, Ruan D, Zhang C. Effects of TGF-beta1 and IGF-1 on proliferation of human nucleus pulposus cells in medium with different serum concentrations. *J Orthop Surg Res*, 2006, 26: 1-9.

(收稿日期: 2012-04-05)

(本文编辑: 张岚)

关晓明, 马迅, 张丽, 等. TGF- β 1 对人髓核细胞 CD24 及细胞外基质表达的调节作用[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2012, 6(17): 5039-5043.

中 华 医 学 会