

# 脂肪干细胞复合壳聚糖支架移植对兔退变早期椎间盘内 肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、白介素 $1\beta$ 的影响

李进珍<sup>1,2</sup>, 李放<sup>1</sup>, 叶超群<sup>1</sup>, 任大江<sup>1</sup>, 万中元<sup>1,3</sup>, 吴坤<sup>1,2</sup>

**[摘要]** 目的 观察脂肪干细胞复合可注射温敏型壳聚糖支架移植对退变早期兔椎间盘内肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素  $1\beta$ (IL- $1\beta$ )含量的影响。方法 24 只新西兰大白兔,雌雄不限,随机分为髓核抽吸组、脂肪干细胞壳聚糖支架复合移植组、单纯支架移植组以及单纯椎间盘暴露组。术后 2、4、8 周分别将每组处死 2 只兔,使用 ELISA 方法检测 L<sub>2-3</sub>、L<sub>3-4</sub>、L<sub>4-5</sub>、L<sub>5-6</sub> 椎间盘内 TNF- $\alpha$ 、IL- $1\beta$  含量。结果 24 只动物均存活。髓核抽吸组与单纯椎间盘暴露组相比, TNF- $\alpha$ 、IL- $1\beta$  浓度升高( $P<0.05$ );复合移植组、单纯支架移植组与单纯椎间盘暴露组相比较, TNF- $\alpha$ 、IL- $1\beta$  浓度均降低( $P<0.05$ );复合移植组与单纯支架移植组相比, 8 周时 IL- $1\beta$  降低( $P<0.05$ )。结论 脂肪干细胞与温敏型壳聚糖支架在兔椎间盘退变早期能抑制 TNF- $\alpha$ 、IL- $1\beta$  表达,可能减轻炎症反应。

**[关键词]** 椎间盘退变;组织工程;脂肪干细胞;壳聚糖;肿瘤坏死因子  $\alpha$ ;白介素  $1\beta$

**Effect of Adipose-derived Stem Cells Compound Chitosan Transplantation on Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , Interleukin- $1\beta$  Content in Early Degenerate Intervertebral Disc of Rabbits** LI Jin-zhen, LI Fang, YE Chao-qun, et al. General Hospital of Beijing Military Area, Beijing 100700, China

**Abstract:** **Objective** To observe the effect of adipose-derived stem cells (ADSCs) compound injective thermo-sensitive chitosan scaffold transplantation on content of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) in early degenerate lumbar intervertebral disc of rabbits. **Methods** 24 white New Zealand rabbits (no limit of male or female) were randomly and equally divided into 4 groups: A. Degeneration model group; nucleus aspiration. B. ADSCs compound chitosan transplantation group. C. Cell-free chitosan transplantation group. D. Blank control group; only explore the target intervertebral disc. When aspirate pulposus with 21G needle, inject ADSCs-scaffold complex and chitosan scaffold respectively. The samples of L<sub>2-3</sub>, L<sub>3-4</sub>, L<sub>4-5</sub>, L<sub>5-6</sub> intervertebral disc were obtained from 2 rabbit in each group 2, 4, 8 weeks after operation. The contents of TNF- $\alpha$ , IL- $1\beta$  were measured with ELISA. **Results** All animals survived after the operation. Compare with the blank control group, the contents of TNF- $\alpha$ , IL- $1\beta$  in degeneration model group increased significantly ( $P<0.05$ ). It decreased significantly ( $P<0.05$ ) in ADSCs compound chitosan transplantation group and cell-free chitosan transplantation group compared to model group. IL- $1\beta$  decreased significantly ( $P<0.05$ ) 8 week after operation in ADSCs compound chitosan transplantation group compared to cell-free chitosan transplantation group. **Conclusion** ADSCs compound injective thermo-sensitive chitosan scaffold transplantation in early degenerate lumbar intervertebral disc could decrease the content of TNF- $\alpha$ , IL- $1\beta$ , and may regulate the inflammatory response.

**Key words:** intervertebral disc degeneration; tissue engineering; adipose-derived stem cells; chitosan; tumor necrosis factor- $\alpha$ ; interleukin- $1\beta$

**[中图分类号]** R681.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1006-9771(2011)03-0229-03

**[本文著录格式]** 李进珍,李放,叶超群,等.脂肪干细胞复合壳聚糖支架移植对兔退变早期椎间盘内肿瘤坏死因子  $\alpha$ 、白介素  $1\beta$  的影响[J].中国康复理论与实践,2011,17(3):229—231.

椎间盘退行性变是导致下腰痛的主要原因,一旦发生很难自行终止或逆转。现有研究表明,炎性反应介质是导致椎间盘退变的重要原因之一,虽然其具体机制尚不明。已有研究显示,炎性因子在椎间盘退变中起重要作用,部分炎性因子浓度增高明显,对细胞基质形成及代谢起调节作用<sup>[1]</sup>。随着组织工程学的发展,椎间盘退变的早期生物学治疗成为可能。本文通过组织工程学原理,观察脂肪干细胞(ADSCs)及可注射温敏型壳聚糖支架移植治疗兔椎间盘退变早期的肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素  $1\beta$ (IL- $1\beta$ )变化,对其在椎间盘退变修复早期炎性影响做出初步探讨。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂与仪器** 清洁级新西兰大白兔 24 只,4 月龄,雌雄不限;军事医学科学院动物中心;壳聚糖(脱

乙酰度 95%,黏度 40, pH7.8);济南海得贝海洋生物工程有限公;  $\beta$ -甘油磷酸钠(Gp):Sigma 公司,美国;鼠尾胶原蛋白 I 型;杭州生友生物技术有限公司;II 型胶原酶、胰酶、DMEM/F12 培养液、FBS:GIBCO 公司,美国;兔 TNF- $\alpha$ 、IL- $1\beta$  兔 ELISA 定量检测试剂盒:R&D 公司,美国;倒置相差显微镜:Olympus 公司,日本;BB5060UV 型恒温 CO<sub>2</sub> 孵箱:Heraeus 公司,德国;低温高速离心机、酶标仪:Bio-Rad 公司,美国。

## 1.2 方法

**1.2.1 ADSC 的分离培养、传代** 取 3 月龄新西兰白兔麻醉后,于肩胛区备皮、消毒,无菌条件下切取脂肪垫 5~10 ml,剔除血管、筋膜后,移入超净台,PBS 反复冲洗,进一步去除小血管及筋膜等结缔组织,剪成糜状,3 倍体积的 0.1% I 型胶原酶 37 °C 消化 60 min,加入等体积的含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基,吸管吹打混匀,以 200 目筛网过滤后,将滤液转移至离心管,1500 r/min 离心 5 min。将上层脂肪及上清液去除,用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基悬浮细胞,按  $5 \times 10^4$ /ml 细胞密度接种于细胞培养瓶

基金项目:北京市自然科学基金资助项目(5062039)。

作者单位:1. 北京军区总医院全军创伤骨科研究所,北京市 100700;2. 山西医科大学第二临床医学院,山西太原市 030001;3. 第四军医大学,陕西西安市 710032。作者简介:李进珍(1983-),男,山西晋城市人,研究生,主要研究方向:脊柱外科学。通讯作者:李放。

中,置于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱中静置培养。24 h 后首次换液,除去未贴壁细胞,之后每 2~3 d 换液,每日于倒置显微镜下观察记录细胞生长情况。待细胞生长融合至 80%~90%时,用 0.25%胰蛋白酶消化贴壁细胞,按 1:2 传代培养。

**1.2.2 可注射壳聚糖胶原支架的构建** 95%脱乙酰度壳聚糖粉末(C),高压灭菌,称取 2.2 g 溶于 0.1 mol/L 乙酸溶液 100 ml 中充分溶解,制成 2.2%(w/v)壳聚糖溶液。 $\beta$ -甘油磷酸钠(Gp)10 g 溶于 10 ml 双蒸水,制得 50%(w/w)Gp 溶液,过滤除菌后置于冰盒。取胶原(Co)溶液以 10×PBS 稀释至 2.5 mg/ml,置于冰盒。冰盒上将该 3 种液体按 C:Gp:Co=5:1:6 的比例混合,即可注射温敏型壳聚糖水凝胶支架<sup>[2]</sup>。4 ℃冰箱贮存备用。

**1.2.3 细胞支架复合体的制备** 与动物模型构建同时进行。室温条件下,将已配制好的液态支架与第 3 代 ADSCs 悬液(细胞终浓度为 2×10<sup>6</sup>/ml)充分混合,待动物手术时注入。

**1.2.4 实验动物分组** 采用随机数字表法将新西兰大白兔分配到 4 组,每组 6 只。A 组(标准对照组):髓核抽吸;B 组(实验 1 组):髓核抽吸后将细胞支架复合体注入;C 组(实验 2 组):髓核抽吸后单纯注入支架;D 组(空白对照组):单纯暴露椎间盘。

**1.2.5 手术操作** 动物称重,以 3%戊巴比妥钠 30 mg/kg 静脉麻醉,取右侧卧位,以 L<sub>4-5</sub> 为中心备皮,碘伏消毒、铺无菌巾。取腹部后外侧切口,经腹膜外入路钝性分离腰肌到达椎体侧方,将横突分离并切除,暴露 L<sub>2-3</sub>、L<sub>3-4</sub>、L<sub>4-5</sub>、L<sub>5-6</sub> 椎间盘,21G 注射器针头刺入椎间隙 5 mm,抽吸并停顿 15 s,可见吸出少量髓核组织。其中 D 组动物只暴露,不做髓核抽吸。对 B、C 组暴露的椎间盘,用 1 ml 注射器接 21G 针头分别注入细胞支架复合体和支架材料各 0.05 ml,停顿 10 min 后拔除针头。碘伏及生理盐水冲洗,缝合肌肉及皮肤等组织。

表 1 椎间盘组织匀浆中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  平均浓度 (ng/ml,n=8)

组别	TNF- $\alpha$			IL-1 $\beta$		
	2 周	4 周	8 周	2 周	4 周	8 周
A 组	43.18±3.84	52.86±5.15	66.34±8.01	41.10±7.89	53.17±7.98	66.43±10.55
B 组	28.88±6.66 <sup>a,b</sup>	31.61±7.05 <sup>a,b</sup>	33.18±7.36 <sup>a,b</sup>	25.71±6.10 <sup>a,b</sup>	30.06±5.07 <sup>a,b</sup>	33.24±10.56 <sup>a,b</sup>
C 组	31.85±3.49 <sup>a,b</sup>	31.14±4.34 <sup>a,b</sup>	38.33±6.79 <sup>a,b</sup>	32.75±7.59 <sup>a,b</sup>	36.41±7.17 <sup>a,b</sup>	44.98±5.44 <sup>a,b,c</sup>
D 组	23.50±6.82 <sup>a</sup>	22.85±3.77 <sup>a</sup>	25.41±5.65 <sup>a</sup>	20.46±6.58 <sup>a</sup>	19.86±5.85 <sup>a</sup>	22.17±4.38 <sup>a</sup>

注 a:与 A 组比较,P<0.05;b:与 D 组比较,P<0.05;c:与 B 组比较,P<0.05。

3 讨论

目前国内外研究已认识到,IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等炎症因子具有促进椎间盘蛋白多糖降解并抑制其合成,参与椎间盘炎症反应等作用,因而在椎间盘退变及其继发性疾病中起重要作用。TNF- $\alpha$  在椎间盘退变和椎间盘所致下腰痛发病过程中起重要作用<sup>[3]</sup>;并发现 TNF- $\alpha$  可引起疼痛行为改变,而且这种疼痛特征与髓核所产生的疼痛特征相似<sup>[4]</sup>。TNF- $\alpha$  能促进椎间盘细胞产生

**1.2.6 术后处理** 术后前 3 d 每天肌肉注射青霉素 8×10<sup>5</sup> U,1 次/d,伤口用碘伏消毒。常规喂食及饮水。每天观察记录动物一般情况。

**1.2.7 椎间盘标本的收集** 分别于术后 2、4、8 周使用空气栓塞法将各组兔子各处死 2 只。按原切口进入腹膜后部,游离脊柱腰段并截取 L<sub>2</sub> 上段至 L<sub>6</sub> 椎体间脊柱,去除脊柱附着肌肉及横突等附件,仅保留 L<sub>2</sub>~L<sub>6</sub> 椎体及椎间盘。对其编号后于-80 ℃冰箱中保存待测。

**1.2.8 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  含量测定** 将椎间盘组织与椎体分离并去除终板,尽快入液氮中处理 2 min。待其变脆后,用碾钵将椎间盘碾成粉末。在粉末中每 100 mg 加入磷酸盐缓冲液 2 ml,4 ℃匀浆 2 min。4 ℃条件下,匀浆液以 10000 r/min 离心 10 min,取上清液,按原对应椎间盘进行标记。IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的测定均采用酶联免疫吸附法,按试剂盒说明书进行,最后根据酶标仪在 450 nm 处测定的 OD 值,由标准曲线上查出相应样品的含量。

**1.3 统计学方法** 采用 SPSS 16.0 统计软件行统计数据行分析。所得 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  浓度数据以( $\bar{x}\pm s$ )表示,行 One-way ANOVA 分析,样本均数间两两比较采用 LSD-*t* 检验,显著性水平  $\alpha=0.05$ 。

2 结果

**2.1 一般情况** 术后 2 只兔子出现双后肢无力,不能站立,后逐渐好转,运动功能恢复;所有动物均存活,无伤口感染。

**2.2 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  含量** 在 3 个不同时点,A 组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  含量均明显高于细胞支架复合体移植 B、C、D 组,经组间两两比较,P<0.05;B、C 两组比较,TNF- $\alpha$  浓度无显著性差异(P>0.05),IL-1 $\beta$  浓度在 2、4 周时无显著性差异(P>0.05),8 周时有显著性差异(P<0.05);B、C 两组与 D 组比较,TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  含量均升高(P<0.05)。见表 1。

基质金属蛋白酶(MMPs),除可降解细胞外基质中的蛋白多糖和糖蛋白(如纤维粘连蛋白、层粘连蛋白和明胶)外,还可降解弹性蛋白和Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ、Ⅴ型胶原,从而加重椎间盘退变<sup>[5]</sup>。选择性 TNF- $\alpha$  抑制剂的临床应用研究已表明可减轻 TNF- $\alpha$  所致疼痛<sup>[6]</sup>。许多研究表明,IL-1 $\beta$  可增加椎间盘中前列素(PG)E<sub>2</sub> 的含量,诱导酪蛋白酶 mRNA 产生,从而减少椎间盘中蛋白多糖的含量,促进了椎间盘退变<sup>[7]</sup>。IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  在退

变和突出椎间盘中的表达情况发现,IL-1 $\beta$  及其受体在退变椎间盘髓核中高表达,并证实虽然两种因子都参与椎间盘退变,但与 TNF 相比 IL-1 $\beta$  可能在加速椎间盘退变过程中更有意义<sup>[8]</sup>。

椎间盘退行性变的生物学治疗研究中,运用组织工程学原理进行修复,体内外实验得到广泛研究,并取得显著效果的临床报道<sup>[9]</sup>。在椎间盘组织工程种子细胞的选取中,ADSCs 具有取材方便、创伤小、可提取数量较多等优势,与骨髓间充质干细胞相比,不易受到肿瘤细胞污染,且具有免疫抑制作用<sup>[10]</sup>。ADSCs 动物体内实验显示,可改善椎间盘高度并保持椎间盘内水分,其细胞基质的表达可抑制椎间盘退变<sup>[11]</sup>。脂肪来源的间充质干细胞在组织工程、细胞治疗、基因治疗中将具有广阔的应用前景<sup>[12]</sup>。壳聚糖支架与 ADSCs 具有良好的组织相容性<sup>[2]</sup>,其体内炎症反应轻微,且利于组织修复<sup>[13]</sup>。构建壳聚糖基于温敏型复合支架,可在植入体内后 37℃ 交联、凝胶化<sup>[14]</sup>。既能保证细胞生长的微环境、利于细胞定植,避免了单纯植入干细胞可能存在的细胞流失,又使植入过程改进为可注射化,达到微创的目的。目前在椎间盘组织工程中作为支架材料的研究显示壳聚糖有良好的体内应用价值。

本实验构建的支架材料,室温下呈可注射液态状,而在 37℃ 时逐渐转变为白色水凝胶状。胶原作为细胞基质的骨架不但为细胞提供抗张力和弹性,并在细胞的迁移和发育中起作用。胶原材料的加入使得壳聚糖甘油磷酸钠支架孔隙率更加均匀,从而其机械强度提高<sup>[2]</sup>。与细胞混合后其性状未见明显改变,仍呈可注射温敏性。

本实验表明,ADSCs 支架复合体与单纯支架植入均能降低椎间盘内 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  浓度;8 周时,植入细胞支架复合体较单纯支架组 IL-1 $\beta$  浓度降低。提示在椎间盘退变早期,ADSCs 与壳聚糖支架均有一定的炎症反应抑制作用;壳聚糖复合支架在肌袋内埋植降解实验显示,8 周后支架已大部分降解,其抑制炎症反应能力减弱,而 ADSCs 的存在使炎症抑制作用仍在继续。ADSCs 植入体内后可向髓核细胞分化,并通过旁分泌方式分泌胰岛素样生长因子(IGF-1)等生长因子,能改善髓核细胞的活性;同时 ADSCs 还可分泌抗炎因子、表皮生长因子(TGF- $\beta$ ),通过 TGF- $\beta$ /Smad 等信号通路调节 TGF- $\beta$ 、MMP-9、TNF- $\alpha$  等表达,起到降低炎症反应程度作用<sup>[15]</sup>。ADSCs 支架复合体移植早期,支架所提供的三维空间不但利于营养交换和细胞渗透,而且为细胞因子交流及信号转导提供便利。

ADSCs 体外实验表明可作为椎间盘组织工程的优良种子细胞<sup>[16]</sup>。大鼠体内实验亦显示能增加椎间盘 MRI 信号强度、II 型胶原和蛋白多糖含量增高<sup>[11]</sup>。尽管人们的初衷是把 ADSCs 等间充质干细胞(MSCs)作

为组织再生的研究重点,然而 MSCs 却逐渐在改善免疫反应的治疗方面表现出色,包括组织损伤、移植和自身免疫性疾病<sup>[17]</sup>。本研究初步表明,ADSCs 在椎间盘退变早期对 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  有抑制作用,可能改善炎症反应。

目前应用组织工程学原理对退变早期的椎间盘研究发现,间充质干细胞移植后,在椎间盘内可使胶原及蛋白多糖等细胞基质增加,椎间盘含水量增高,甚至能使椎间盘高度有所恢复,显示出椎间盘组织再生有美好的前景。椎间盘退变与炎症介质联系十分紧密,但于细胞移植后椎间盘内炎症反应的相关性研究较少,其椎间盘内炎症反应抑制机理仍未明了,有待今后继续深入研究。

## 参考文献

- [1] Seguin CA, Pilliar RM, Roughley PJ, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  modulates matrix production and catabolism in nucleus tissue [J]. Spine, 2005, 30(17): 1940-1948.
- [2] Song K, Qiao M, Lin T, et al. Preparation, fabrication and biocompatibility of novel injectable temperature sensitive chitosan/glycero-phosphate/collagen hydrogels [J]. J Mater Sci Mater Med, 2010, 21(10): 2835-2842.
- [3] Weiler C, Nerlich AG, Bachmeier BE, et al. Expression and distribution of tumor necrosis factor alpha in human lumbar intervertebral discs: a study in surgical specimen and autopsy controls [J]. Spine, 2005, 30(1): 44-53.
- [4] Wagner R, Myers RR. Endoneurial injection of TNF- $\alpha$  produces neuropathic pain behaviors [J]. Neuroreport, 1996, 7(18): 2897-2901.
- [5] 李进, 杨述华, 邵增务. 细胞因子与椎间盘退行性变的关系 [J]. 中国临床康复, 2003, 7(14): 2079-2080.
- [6] Karppinen J, Korhonen T, Malmivaara A, et al. Tumor necrosis factor  $\alpha$  monoclonal antibody, infliximab, used to manage severe sciatica [J]. Spine, 2003, 28(8): 750-754.
- [7] Rannou F, Corvol MT, Hudry C, et al. Sensitivity of annulus fibrosus cells to interleukin 1 beta. Comparison with articular chondrocytes [J]. Spine, 2000, 25(1): 17-23.
- [8] Christine LYN, Judith Alison Hoyland, Anthony J, et al. Catabolic cytokine expression in degenerate and herniated human intervertebral discs: IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  expression profile [J]. Arthri Res Ther, 2007, 9: 77-82.
- [9] Yoshikawa T, Ueda Y, Miyazaki K, et al. Disc regeneration therapy using marrow mesenchymal cell transplantation a report of two case studies [J]. Spine, 2010, 35(11): E475-480.
- [10] 赵春华. 干细胞原理、技术与临床 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 17-19.
- [11] Jeong JH, Lee JH, Jin ES, et al. Regeneration of intervertebral discs in a rat disc degeneration model by implanted adipose-tissue-derived stromal cells [J]. Acta Neurochir (Wien), 2010, 152(10): 1771-1777.
- [12] Sterodimas A, de Faria J, Nicaretta Bet al. Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): current and future applications [J]. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2010, 63(11): 1886-1892.
- [13] Wang W, Itoh S, Aizawa T, et al. Development of an injectable chitosan/marine collagen composite gel [J]. Biomed Mater, 2010, 5(6): 065009.
- [14] Kempe S, Metz H, Bastrop M, et al. Characterization of thermo-sensitive chitosan-based hydrogels by rheology and electron paramagnetic resonance spectroscopy [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2008, 68: 26-33.
- [15] Newman RE, Yoo D, LeRoux MA, et al. Treatment of inflammatory diseases with mesenchymal stem cells [J]. Inflamm Allergy Drug Targets, 2009, 8(2): 110-123.
- [16] 文天用, 李放, 叶超群, 等. 脂肪干细胞与温敏型支架构建人工髓核的体外研究 [J]. 中国康复理论与实践, 2010, 16(4): 335-338.
- [17] Singer NG, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation [J]. Annu Rev Pathol, 2011, 6: 457-478.

(收稿日期: 2011-01-17 修回日期: 2011-03-03)