文章编号: 1001-0580(2009)09-1098-03 中图分类号: R 681.5 文献标志码: A 【论 著】

后纵韧带骨化患者脊柱韧带细胞表型分析*

颜廷宾[1], 王修文[2], 张佐伦[3], 林琳[4]

摘 要: 目的 检测后纵韧带骨化(OPLL)患者脊柱韧带细胞体外培养的生物学特性。方法 分离并体外培养后纵韧带骨化患者非骨化部位和非后纵韧带骨化患者的脊柱韧带组织, 建立 8个骨化细胞系(OL1-OL8)和 7个非骨化细胞系(NL1-NL7), 观察其体外培养条件下的细胞表型。结果 8个 OL细胞系中, 有 4个 OL细胞系表达成骨细胞表型, 具有较高的碱性磷酸酶(ALP)活性[(1.05±0.43)U/mL], 可形成骨小结节, 阿尔新兰及茜素红染色呈阳性, 可分泌骨钙素(OC)(OL1: 3.7 ng/mL, OL3: 3.5 ng/mL, OL7: 2.9 ng/mL, OL8: 2.6 ng/mL)。而 7个 NL细胞系的 ALP活性均低(0.47±0.05)u/mL), 未测到 OC分泌, 不形成骨小结节, 钙盐染色阴性, 表现典型的成纤维细胞表型。结论 成功建立脊柱韧带细胞系; 后纵韧带骨化患者脊柱韧带细胞体外培养可表达成骨细胞表型。

关键词: 后纵韧带骨化; 成纤维细胞; 成骨细胞; 表型; 骨钙素

Phenotype of spinal ligament cells from patients with ossification of posterior longitudinal ligament

YAN Ting-bin, WANG Xiu-wen, ZHANG Zuo-lun, et al. Orthopaedic Department of Qilu Hospital, Shandong University (Ji'nan 250012, China)

Abstract Objective To study the biological characteristic of the cultured ligament cells derived from patients with ossification of posterior longitudinal ligament of the spine (OPLL). **Methods** The ligamental tissue of the spine was separated from OPLL patients and non-OPLL patients. Eight ossified cell lines (OL1-OL8) and seven non-ossified cell lines (NL1-NL7) were built. The phenotype of all the cell lines were observed. **Results** Four of eight OL cell lines expressed osteoblast phenotype with high alkaline phosphatase (ALP) activity (1.05±0.43 μ/mL). The forming of bony tubercle, secretion of glycosaminoglycans, calcium deposit were observed and osteocalcin (OC) was detected (OL1: 3.7 ng/mL, OL3: 3.5 ng/mL, OL7: 2.9 ng/mL, OL8: 2.6 ng/mL). However, all NL cell lines expressed fibroblast phenotype with low ALP activity (0.47±0.05 μ/mL) and no bone tubercle formation and OC secretion. **Conclusion** Spinal ligament cell line was established successfully. Cultured ligament cells from OPLL patients can express osteoblast phenotype in vitro.

Key words: ossification of the posterior longitudinal ligament; fibroblast; osteoblast; phenotype; osteocalcin

后纵韧带骨化(Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament of the Spine, OPLL)属于脊柱韧带异位骨化性疾病, 局部机械应力异常、椎间盘突出、遗传因素、全身内分泌因素及生长因子等多种因素与后纵韧带骨化有关, 但迄今尚未得到肯定的结论[1]。成纤维细胞是脊柱韧带的主要成分, 研究表明, 成纤维细胞在骨折愈合和骨关节炎的发生过程中具有成骨潜能[2]。为观察成纤维细胞在后纵韧带骨化中的作用, 探讨后纵韧带骨化的发病机制, 本研究建立后纵韧带的体外培养成纤维细胞系, 观察脊柱后纵韧带骨化及骨化细胞表型特点。结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

胎牛血清(杭州四季青生物制剂公司); 盐酸四环素(华美生物工程公司); 碱性磷酸酶(ALP)测定试剂盒(广州标佳科技有限公司); 骨钙素测定试剂盒(北京东亚免疫技术研究所); ZEISS型荧光显微镜(德国蔡司公司); G2倒置相差显微镜(日本 Olympus公司); LS-3801型全自动γ闪烁计数仪(美国 Beckman公司); 超净工作台(苏州净化设备公司)。

1.2 方法

1.2.1 标本来源 OPLL患者非骨化部位标本, 取自颈前路手术中切除的非骨化部位的后纵韧带或此种病患者后路开门减压手术中切除的棘间或棘上韧带; 非 OPLL患者标本(对照组), 取自脊髓型颈椎病患者或颈椎外伤患者手术中切除的脊柱韧带。标本获取均经患者同意以及山东大学齐鲁医院、第二医院伦理学委员会批准。

1.2.2 脊柱韧带细胞分离、培养与观察 以组织块培养法建立脊柱韧带细胞系, 收集第 3代以后的细胞用于实验。细胞以 1×10^5/mL的密度接种于铺有盖玻片的 6孔培养板内, 用于免疫组织化学实验; 细胞以 5×10^4/孔的密度接种于 24孔培养板中, 每组设 3个复孔, 用于检测细胞增殖。共建立 8个后纵韧带骨化细胞系(OL1~OL8)及 7个非后纵韧带骨化细胞系(NL1~NL7)。逐日在倒置相差显微镜下观察原代与传代培养细胞的贴壁生长、产生分泌物并形成骨小结节的情况。

1.2.3 胶原、粘多糖及钙盐检测 (1)采用甲苯胺蓝染色显示胶原的分泌; 细胞浆及结节呈蓝色异染为胶原分泌阳性; (2)采用阿尔新兰(AB)染色显示粘多糖分泌, 不透光结节呈蓝色为粘多糖分泌阳性; (3)采用茜素红 S(ARS)染色显示钙盐沉积情况, 细胞中出现橘红色颗粒为钙盐沉积阳性; (4)采用趋骨性荧光四环素标记钙盐沉积, 细胞长满玻片后, 向培养板内加入四环素, 使其终浓度为 50 mg/L, 将培养板放入 CO_2 培养箱中继续培养 40 min, 换新鲜培养液后继续培养 30 min, 标本经磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗, 冷丙酮固定后做落射荧光观察, 经四环素标记的钙盐呈金黄色荧光反应。

1.2.4 碱性磷酸酶(ALP)及骨钙素(OC)检测 采用 Gomori氏改良钙钴法进行 ALP染色, 胞浆内有黑色颗粒为 ALP阳性; ALP活性测定及骨钙素(OC)的分泌测定参照文献[3]进行。

1.3 统计分析

采用 SPSS 13.0软件进行两组间的单因素方差分析。

* 基金项目: 山东省科技攻关计划资助项目(2007GG30002019)

作者单位: 1. 山东大学齐鲁医院骨创科, 山东 济南 250012; 2. 山东大学第二医院骨科; 3. 山东省立医院脊柱外科; 4. 山东省疾病预防控制中心

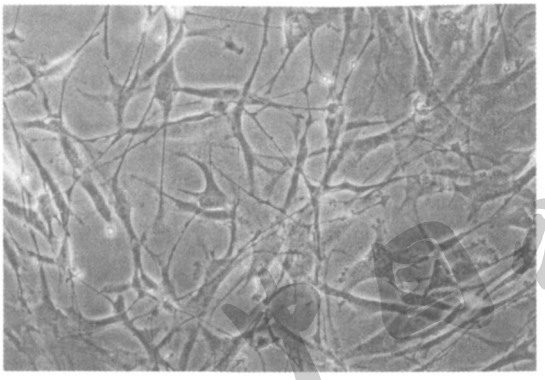
作者简介: 颜廷宾(1973-), 男, 山东潍坊人, 主治医师, 博士, 主要从事脊柱脊髓疾病研究。

通讯作者: 王修文

中国公共卫生 CPH

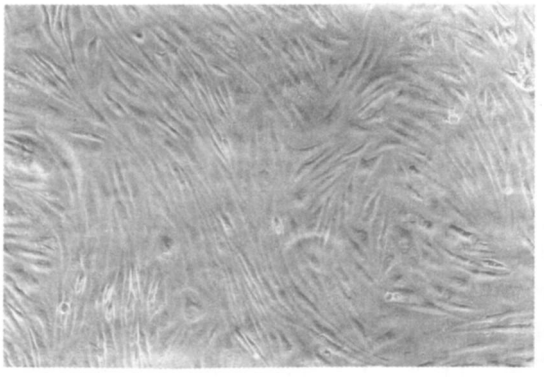
2 结　果

2.1 显微镜观察比较 (图 1, 2)　OPLL标本原代培养第 13 d, 韧带小块边缘开始有细胞萌出, 培养第 24 d, 韧带间已长满细胞; 细胞系 OL1、OL3、OL7、OL8细胞形态以多角形为主, 呈分层生长 (图 1)。消化传代培养 2.5 h, 细胞粘附贴壁, 24 h后细胞伸展为方形或多角形, 传代培养第 7 d, 细胞内可观察到黑色颗粒和透亮小泡及不透亮的小结节, 结节逐步融合扩大, 将多个细胞的一侧突起相连接。细胞系 OL2、OL4、OL5、OL6的细胞形态以长梭形为主, 呈放射状分布, 呈现成纤维细胞的表型。NL细胞系的形态呈梭形, 呈放射状、螺旋状 (指纹状) 生长分布 (图 2), 细胞内分泌颗粒较少, 不产生分泌结节。



注: OL 细胞形态以多角形为主, 呈分层生长

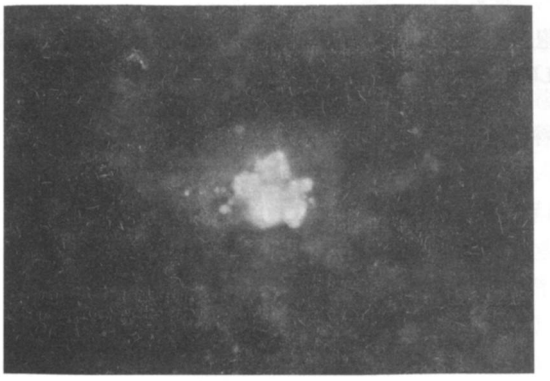
图 1　OL 细胞形态 (倒置显微镜, 200 ×)



注: NL 细胞为梭形, 呈螺旋状

图 2　NL 细胞形态 (倒置显微镜, 100 ×)

2.2 韧带细胞表型特征比较　(1)胶原分泌: OL细胞传代培养第 6 d, 甲苯胺蓝染色显示, 细胞及周围结节均呈阳性反应, 细胞在结节周围呈放射状分布, 传代培养后期少数结节呈蓝染的强阳性反应, 细胞周围不透光结节及蓝黑色结节比例增大。对照组传代第 12 d, 细胞胞浆及分泌物中胶原分泌均呈弱阳性。(2)粘多糖分泌: OL细胞传代培养第 6 d, 阿尔新兰染色显示, 不透光结节呈蓝色阳性反应, 而 NL细胞系结节染色呈阴性。(3)钙盐沉积: OL细胞传代第 6 d, ARS染色显示, 部分细胞及分泌物呈弱阳性反应, 大部分结节呈阴性; 随培养时间延长, 阳性比例增加。对照组的细胞胞浆及分泌结节均呈阴性反应。四环素荧光标记结果显示, OL细胞传代培养第 6 d, 由细胞分泌物堆积形成的小结节仅有部分呈较弱的金黄色荧光反应; 传代培养中后期大部分结节呈对比度较强的金黄色荧光反应, 且金黄色荧光部位与 ARS染色阳性部位一致 (图 3); 对照组细胞染色呈弱阳性。



注: 钙盐结节呈金黄色荧光

图 3　趋骨性荧光四环素标记钙盐沉积 (落射荧光, 400 ×)

2.3 碱性磷酸酶 (ALP) 反应　OL细胞传代培养第 5~8 d, 细胞胞浆及培养液中均检测出 ALP阳性反应的黑色小颗粒 (图 4); 对照组细胞 ALP染色反应则呈阴性。8个 OL细胞系的 ALP活性分别为 (1.28 ± 0.04), (0.64 ± 0.07), (1.13 ± 0.06), (0.87 ± 0.05), (0.83 ± 0.05), (0.56 ± 0.09), (1.97 ± 0.15), (1.08 ± 0.04) U/mL, 平均值为 (1.05 ± 0.43) U/mL。7个 NL细胞系的 ALP活性分别为 (0.47 ± 0.05), (0.49 ± 0.02), (0.46 ± 0.03), (0.56 ± 0.03), (0.47 ± 0.04), (0.44 ± 0.02), (0.42 ± 0.03) U/mL, 平均值为 (0.47 ± 0.05) U/mL, 2组平均值差异有统计学意义 ($t = 6.45$, $P < 0.01$)。

注: 胞浆呈黑色

图 4　OL细胞 ALP染色 (钙钴法, 400 ×)

2.4 骨钙素 (OC) 分泌　培养 3周后, 8个 OL细胞系中有 4个 OL细胞系 (OL1、OL3、OL7、OL8) 可检测到 OC的分泌, 分别是 OL1为 3.7 ng/mL, OL3为 3.5 ng/mL, OL7为 2.9 ng/mL, OL8为 2.6 ng/mL。OL2、OL4、OL5、OL6及 7个 NL细胞系未检测到 OC的分泌。

3 讨　论

正常的成纤维细胞具备分泌胶原、粘多糖等功能, 但正常人脊柱韧带一般不发生骨化。本研究结果显示, 4个 OL细胞系表现为成骨细胞表型, 而 NL细胞系细胞形态表现为成纤维细胞表型。两者在细胞学形态上表现出不一致性, 说明脊柱韧带的成纤维细胞处于一种稳定状态, 在损伤部位和某些病理状态下, 某些促成骨细胞因子可能发生异常分泌, 或韧带成纤维细胞的成骨因子受体表达增加, 成纤维细胞作为某些因子的靶细胞, 在这些细胞因子的作用下, 向成骨细胞发生转化, 成纤维细胞可演变转化为成骨细胞[4]。

OC分泌及高 ALP活性可作为成骨细胞成熟阶段的标志[5]。本研究中 4个 OL细胞系呈现高的 ALP活性并分泌 OC, 说明 OPLL患者的脊柱韧带具有全身骨化倾向。Iwasaki

等[6-7]研究发现,机械应力刺激可诱导 OPLL患者脊柱韧带细胞成骨基因 ALP、OC表达增强,提示颈椎不稳可能在 OPLL发病中起重要作用。骨化的启动机制需进一步探讨。

参考文献

〔1〕 Inamasu J, Guiot BH, Sachs DC. Ossification of the posterior longitudinal ligament an update on its biology, epidemiology, and natural history[J]. Neurosurgery, 2006, 58(6): 1027-1039.
〔2〕 毕军花,朱太咏,石印玉. 成纤维细胞的成骨能力[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 14: 2733-2736.
〔3〕 王修文,颜廷宾,张佐伦,等. 骨形态发生蛋白-2对后纵韧带骨化作用[J]. 中国公共卫生, 2008, 24(8): 977-978.
〔4〕 Sato R, Uchida K, Kobayashi S, et al. Ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine: histopathological findings around the calcification and ossification front[J]. Journal of Neurosurg Spine, 2007, 7(2), 174-183.
〔5〕 侯建霞,曹采方,孟焕新. 成牙骨质细胞中骨相关标志物的表达[J]. 口腔医学研究, 2002, 18(3): 149-151.
〔6〕 Iwasaki K, Furukawa K, Tanno M, et al. Uniaxial cyclic stretch induces Cbfa1 expression in spinal ligament cells derived from patients with ossification of the posterior longitudinal ligament[J]. Calcif Tissue Int, 2004, 74(5): 448-457.
〔7〕 Tanno M, Furukawa K, Ueyama K, et al. Uniaxial cyclic stretch induces osteogenic differentiation and synthesis of bone morphogenetic proteins of spinal ligament cells derived from patients with ossification of the posterior longitudinal ligaments[J]. Bone, 2003, 33(4): 475-484.

收稿日期: 2008-12-31 (孔繁学编辑 郑新校对)

文章编号: 1001-0580(2009)09-1100-02 中图分类号: R 379 文献标志码: A 【综 述】

玉米赤霉烯酮检测方法研究进展*

王元凯[1], 王君[1], 严亚贤[1,2]

关键词: 玉米赤霉烯酮; 检测方法

研究者通过对世界上不同国家的谷物及动物饲料中的真菌毒素含量调查发现,许多国家的谷物和动物饲料均不同程度地受到玉米赤霉烯酮毒素(zeralenone, ZEN)的污染并已导致对家畜的毒害。ZEN是一种真菌毒素,雌性激素类物质,是一种稳定的化合物,其主要衍生物为α-玉米赤霉烯醇(α-zearalenol)和β-玉米赤霉烯醇(β-Zearalenol)。被污染的粮食如果被人或其他动物摄入,就可能造成危害。根据中国《GB 13078.2-2006饲料卫生标准饲料中赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的允许量》要求,配合饲料、玉米中的 ZEN含量应≤500 μg/kg。因此,准确检测其含量则对保障食品安全有重要作用。为了解不同检测方法的应用情况及可行性,本研究对 ZEN检测方法包括化学检测方法、免疫学检测方法及其他检测方法,特别是以免疫胶体金为基础的检测方法研究进展作一综述。

1 检测方法

ZEN及其衍生物可通过很多方法检测,包括薄层色谱法(thin layer chromatography, TLC),气相色谱-质谱联用法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS),高效液相色谱法(high-performance liquid chromatography, HPLC),高效液相色谱-质谱联用法(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)和免疫学检测法。其中免疫学检测法较为方便、实用,适合于大规模样品的快速检测。

1.1 化学检测方法

(1)薄层色谱法: TLC因其简单、成本低所以被广泛使用,但灵敏度较其他方法低。美国官方分析化学师协会(Association of Analytical Communities, AOAC)规定的 TLC法[1]为:样品用三氯甲烷提取,用色谱硅胶柱层析净化,甲醇-三氯甲烷洗脱 ZEN,其检出限为 300 ng/g灵敏度不高。(2)气相色谱-质谱联用法: GC-MS可同时检测不同的毒素,包括己烯雌酚(Diethylstilbestrol, DES)和 ZEN等,且具有较高的灵敏度。Rupp等[2]利用 GC-MS检测果汁中的 ZEN,最低检测限为30 ng/mL,该方法现为 AOAC官方检测方法。Blokland等[3]用一种新的 GC-MS检测了欧盟范围内牛尿及牛肉中的 ZEN、α-zearalenol、β-zearalenol,检测效果较好,并发现与 LC-MS/MS的实验结果有很好的相关性。但是设备的实用性问题使其不能作为常规检测方法。(3)高效液相色谱法:由于 ZEN本身具有较强的荧光特性,所以 HPLC经常使用荧光检测。朱孟丽等[4]利用 HPLC测定饲料中玉米赤霉烯酮的方法,样品经乙腈-水提取,提取液通过净化柱、浓缩,色谱柱分离,荧光检测器检测,外标法定量。对添加 3个浓度玉米赤霉烯酮的玉米样品进行加标回收实验,平均回收率为 88.5% ~ 93.1%,变异系数为 1.5% ~ 3.9%,最低检测限为 10 μg/kg。叶蔚云等[5]使用高效液相色谱法检测 ZEN,最低检测限为 0.31 μg/kg,最低检出量为 0.03 ng此方法检测效果较为灵敏。(4)液谱和质谱联用法: LC-MS是一种非常灵敏的检测方法。Martina等[6]饲喂牛含 ZEN的饲料,一段时间后采牛的尿液及组织,并利用 LC-MS对其中的 ZEN进行分析。为了提高回收率和检测灵敏度,一些研究者采用减少净化程序的方法[7]。但 LC-MS(LC-MS/MS, LC-MS/MS/MS)缺点是设备昂贵,不适合广泛使用。化学检测方法虽然复杂,但却是精确、可信的检测方法。

1.2 免疫学检测方法

(1)酶联免疫吸附测定法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA): ELISA是一种准确、可靠、快速、特异的检测方法,适合于大批样品的快速筛选。世界范围内已有较多研究者使用 ELISA检测 ZEN[8]。王玉平等[9]

* 基金项目: 国家高科技研究发展计划"863"项目(2007AA10Z424)
作者单位: 1. 上海交通大学农业与生物学院动物科学系, 上海 200240; 2. 上海市兽医生物技术重点实验室
作者简介: 王元凯(1986-),男,安徽灵璧人,硕士在读,研究方向:真菌毒素检测。
通讯作者: 严亚贤

中国公共卫生 CPH