

·技术研究·

改良组织块法培养细针活检滑膜组织成纤维样滑膜细胞

李婷¹, 戴冽^{1*}, 杨斌², 郑东辉¹, 朱浪静¹, 莫颖倩¹, 张白玉¹

(1. 中山大学孙逸仙纪念医院风湿免疫科, 广东 广州 510120; 2. 佛山市顺德区第一人民医院内五科, 广东 佛山 528300)

摘要:【目的】探讨体外分离培养细针活检滑膜组织成纤维样滑膜细胞(FLS)的方法。【方法】滑膜组织来自接受盲式细针滑膜活检术的活动期类风湿关节炎患者,分别采用消化酶培养法、组织块培养法和改良组织块培养法分离培养 FLS。采用台盼蓝染色进行细胞计数及活性鉴定,并应用倒置相差显微镜、透射电镜、免疫细胞化学染色、流式细胞术对第3~4代 FLS进行鉴定。【结果】3种原代分离培养的方法均可成功培养出 FLS。台盼蓝染色示 FLS 细胞计数约 $(8.30 \pm 1.65) \times 10^5$ /瓶,活细胞百分率 > 95%。传代可使 FLS 达到形态学上的纯化要求,倒置相差显微镜、透射电镜观察均符合 FLS 的形态结构特征,免疫细胞化学染色示 Vimentin 阳性、CD68 阴性、CK 阳性,流式细胞术检测示 CD55⁺ 细胞占 $(95.34 \pm 2.47)\%$ 。改良组织块法培养 FLS 成功率较高,细胞游出时间较早,所需传代时间较短。【结论】改良组织块法特别适合于细针滑膜活检标本 FLS 的培养,第3~4代细胞的数目、活性及纯度符合进一步实验的要求。

关键词: 成纤维样滑膜细胞; 细胞培养; 细针活检

中图分类号: Q33 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2010)04-0567-05

Modified Tissue Culture for Fibroblast-like Synoviocytes from Needle Biopsied Synovium Tissue

LI Ting¹, DAI Lie^{1*}, YANG Bin², ZHENG Dong-hui¹, ZHU Lang-jing¹, MO Ying-qian¹, ZHANG Bai-yu¹

(1. Department of Rheumatology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China;

2. The Fifth Department of Internal Medicine, The First People's Hospital of Shunde, Foshan 528300, China)

Abstract: 【Objective】 To explore the culture method for fibroblast-like synoviocytes (FLS) from needle biopsied synovium tissue. 【Methods】 Synovium tissue obtained from patients with active rheumatoid arthritis by blind needle synovium biopsy were cultured with three different methods (digestive enzyme culture, tissue culture and modified tissue culture). Cell count and the percentage of viable cells were observed by trypan blue staining. FLS were identified by morphology, immunocytochemical staining and flow cytometry. 【Results】 All three methods could culture FLS successfully, of which modified tissue culture method was better than the other two methods. FLS cell count was $(8.30 \pm 1.65) \times 10^5$ per flask with more than 95% viable cells by Trypan blue staining. FLS of the third or fourth generation showed typical morphological characters under inverted phase contrast microscope and transmission electron microscope with Vimentin⁺/CD68⁻/CK⁺ staining and $(95.34 \pm 2.47)\%$ CD55⁺ cells. Modified tissue culture method has higher successful rate with earlier and more quickly cell emigration from synovium tissue. 【Conclusion】 Modified tissue culture method is especially suitable for FLS culture in vitro from needle biopsied synovium tissue. The cell count, the percentage of viable cells, and purity of FLS of the third or fourth generation meet the requirement for molecular biology experiments.

Key words: fibroblast-like synoviocyte; cell culture; needle biopsy

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(4): 567-571; 576]

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是以
关节滑膜炎为特征的慢性自身免疫性疾病,滑

膜细胞增生并向周围组织侵袭形成血管翳在 RA
的发病、慢性炎症的维持及骨与软骨的破坏中起

收稿日期: 2010-04-01

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30972742); 广东省自然科学基金自由申请项目(9151008901000130); 中国科学院海洋生物资源可持续利用重点实验室(LMB)开放基金(LMB071010)

作者简介: 李婷, 硕士研究生, E-mail: jiazhutao1202@163.com; * 通信作者, 戴冽, 主任医师, E-mail: dailie2002@21cn.com

重要作用。成纤维样滑膜细胞 (fibroblast-like synovocyte, FLS) 是滑膜组织最活跃的组成细胞, 可通过自分泌或旁分泌方式产生大量的炎性细胞因子及免疫反应介质, 是参与 RA 发病的重要细胞^[1]。FLS 体外培养模型的建立对于研究 FLS 的功能、进一步探讨 RA 的发病机制及体外筛选治疗 RA 的药物具有重要意义^[2]。目前用于 FLS 体外培养的滑膜多来自关节开放性手术、关节镜手术、从滑液中分离及细针滑膜活检等方法, 其中细针滑膜活检局麻下操作, 技术简单, 并且获取的滑膜组织常较少混有其它成分, 有利于原代细胞培养的纯化和操作。然而, 细针活检获取的滑膜组织体积较小, 标本总量较开放手术少, 若采用经典的消化酶培养法或组织块培养法进行原代培养, 成功率偏低, 细胞生长速度缓慢。为此, 本实验探讨细针活检滑膜组织 FLS 体外培养的最佳方法, 为有效进行下一步实验做准备。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 滑膜组织 来自接受盲式细针滑膜活检术^[3]的确诊活动期 RA 患者, RA 诊断符合 1987 年美国风湿病协会 (American College of Rheumatology, ACR) 修订的诊断标准。

1.1.2 主要试剂 DMEM/F12 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、2.5 g/L 胰酶-0.2 g/L EDTA (美国 GIBCO 公司); I 型胶原酶、PBS 缓冲液、台盼蓝 (广州威佳生物有限公司); 鼠抗人 Vimentin 单克隆抗体、鼠抗人 CD68 单克隆抗体、生物素化羊抗鼠 IgG、DAB 反应显色试剂盒 (武汉博士德公司)、鼠抗人 CK 单克隆抗体 (北京中杉)、鼠抗人 CD55 单克隆抗体 (BD Pharmingen 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 消化酶培养法 ①将活检的滑膜组织剪碎, 加入 I 型胶原酶 (1 mg/mL) 并充分混匀, 置 37 °C、体积分数 5% CO₂ 细胞培养箱中消化 4 ~ 6 h; ②用 100 目细胞滤网过滤、离心, 弃上清, 加入含 200 mL/L FBS 的 DMEM/F12 培养液重悬细胞, 移入细胞培养瓶中培养; ③每 2 ~ 4 d 更换一次含 100 mL/L FBS 的 DMEM/F12 培养液。

1.2.2 组织块培养法 ①将活检的滑膜组织剪成

1 mm³ 大小, 以 5 mm 间距均匀排列在培养瓶的培养面, 加入含 200 mL/L FBS 的 DMEM/F12 培养液, 使培养面斜向上置细胞培养箱; ②孵育 4 h 待组织块贴附后, 将培养瓶缓慢翻转平放, 静置培养; ③每 2 ~ 4 d 更换一次含 100 mL/L FBS 的 DMEM/F12 培养液。待组织块周围 FLS 成片生长后, 去除组织块继续培养。

1.2.3 改良组织块培养法 ①将活检的滑膜组织剪成 1 mm³ 大小, 加入 I 型胶原酶并充分混匀, 置细胞培养箱中消化 4 ~ 6 h; ②细胞滤网过滤、离心, 弃上清, 加入含 200 mL/L FBS 的 DMEM/F12 培养液重悬细胞, 移入细胞培养瓶中培养; ③收集细胞滤网上的组织碎屑, 以 5 mm 间距均匀排列在另一培养瓶的培养面, 加入含 200 mL/L FBS 的 DMEM/F12 培养液 4 mL 及 I 型胶原酶 1 mL, 使培养面斜向上置细胞培养箱; ④孵育 4 h 待组织块贴附后, 将培养瓶缓慢翻转平放, 静置培养; ⑤24 h 后更换含 100 mL/L FBS 的 DMEM/F12 培养液, 以后每 2 ~ 4 d 更换一次培养液, 待 FLS 成片生长后, 去除组织块继续培养。

1.2.4 FLS 的传代培养 待细胞长至融合度约 70% ~ 80% 时进行细胞传代, 2.5 g/L 胰酶-0.2 g/L EDTA 消化, 待细胞突起逐渐收缩、细胞变圆、细胞间距增大时终止消化, 离心后按 1:3 进行传代培养。

1.2.5 台盼蓝染色 FLS 计数及活性鉴定 将第 3 ~ 4 代 FLS 消化离心重悬后, 取等体积细胞悬液和 5 g/L 的台盼蓝染液混匀, 静置染色 3 ~ 4 min 后计数。死细胞被染成淡蓝色, 活细胞拒染。根据以下公式进行细胞计数: 细胞总数/毫升 = (4 大格细胞总数/4) × 10⁴ × 稀释倍数。活细胞百分率 (细胞活性) = (4 大格活细胞总数/4 大格细胞总数) × 100%。

1.2.6 倒置相差显微镜 观察细胞原代及传代后的形态及生长状况。

1.2.7 透射电镜 第 3 ~ 4 代细胞消化离心后, 2.5 g/L 戊二醛、20 g/L 多聚甲醛混合液前固定, 10 g/L 锇酸后固定, 乙醇、丙酮梯度脱水, Epon 包埋剂包埋, 超薄切片, 乙酸双氧铀和枸橼酸铅染, Philips CM10 透射电镜观察。

1.2.8 Vimentin、CD68、CK 免疫细胞化学染色 将第 3 ~ 4 代细胞爬片用 40 g/L 多聚甲醛液固定, 加一抗 (鼠抗人 Vimentin 单克隆抗体、鼠抗人 CD68 单克隆抗体、鼠抗人 CK 单克隆抗体, 1:100 稀

释)、加生物素化羊抗小鼠 IgG, DAB 显色, 苏木素轻度复染, 乙醇梯度脱水, 中性树胶封片。PBS 作为阴性对照。

1.2.9 流式细胞术检测 CD55⁺ 细胞百分率 第

3 ~ 4 代细胞经消化重悬制成 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的单细胞悬液, 加入鼠抗人 CD55 单克隆抗体进行免疫荧光染色, 流式细胞术检测细胞表面 CD55 表达并计算其阳性率。

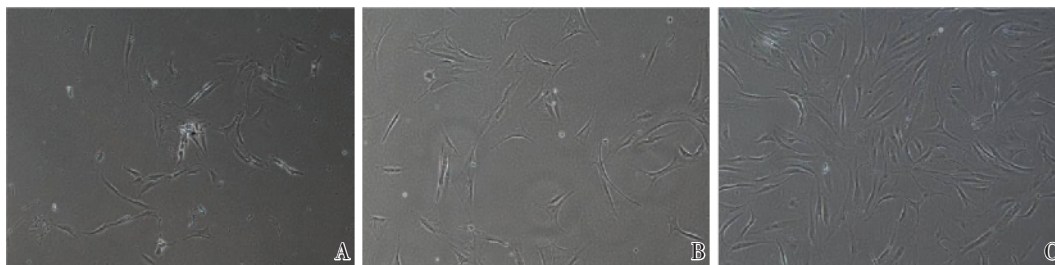


图 1 消化酶培养法培养的 FLS

Fig.1 FLS in vitro with digestive enzyme culture method under inverted phase contrast microscope

A: FLS on the 1st day; B: FLS on the 7th day; C: FLS on the 14th day; $\times 100$

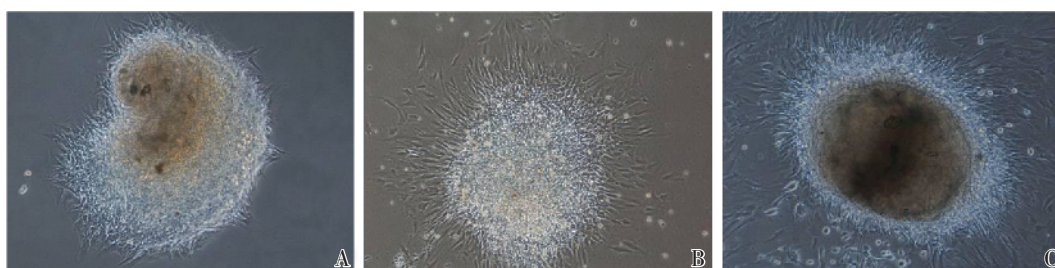


图 2 组织块培养法培养的 FLS

Fig.2 FLS in vitro with tissue culture method under inverted phase contrast microscope

A: FLS on the 2nd day; B: FLS on the 4th day; C: FLS on the 7th day; $\times 100$

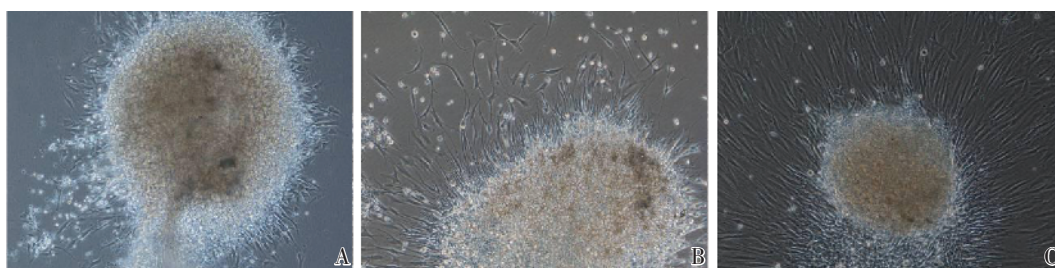


图 3 改良组织块培养法培养的 FLS

Fig.3 FLS in vitro with modified tissue culture method under inverted phase contrast microscope

A: FLS on the 1st day; B: FLS on the 4th day; C: FLS on the 7th day; $\times 100$

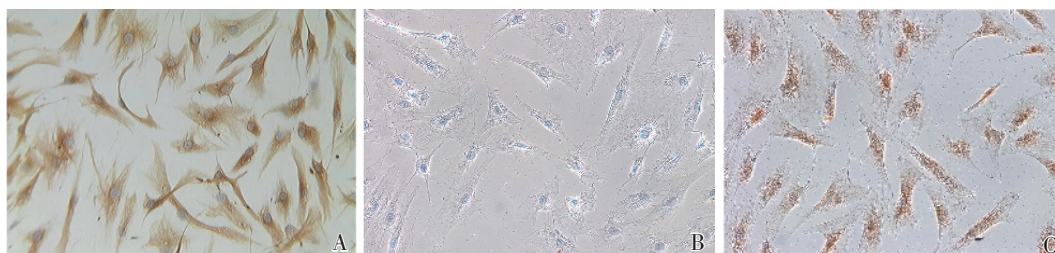


图 4 FLS 免疫细胞化学染色

Fig.4 Immunocytochemical staining of FLS

A: positive for Vimentin; B: negative for CD68; C: positive for CK; DAB method, $\times 200$

2 结 果

2.1 三种体外培养 FLS 方法的比较

共行 24 例次细胞培养,其中消化酶培养法 10 次,成功 6 次;组织块培养法 5 次,成功 4 次;改良组织块法 9 次,成功 9 次。采用消化酶培养法,FLS 约 24 h 贴壁,初期生长较慢,约 2 周长满瓶底 20% ~ 30%,之后生长较快,约 4 周长满瓶底的 70% ~ 80%(图 1)。采用组织块培养法,2 ~ 3 d 可见长梭型 FLS 从组织块边缘游走生长,并逐渐增多呈放射状,两周后细胞迅速生长,约 3 ~ 4 周长满瓶底的 70% ~ 80%(图 2)。采用改良组织块培养法,分为 2 瓶原代细胞,1 瓶为胶原酶所消化下来的细胞,其生长速度与消化酶法相近;另 1 瓶为组织块,1 ~ 2 d 后见长梭型 FLS 从组织块边缘游走生长,并逐渐增多呈放射状,1 周后细胞迅速生长,约 2 ~ 3 周长满瓶底的 70% ~ 80%(图 3)。

2.2 FLS 计数及活性鉴定

3 种方法培养出的 FLS 长满 25 cm² 培养瓶时细胞总数为 $(8.30 \pm 1.65) \times 10^5$ /瓶,活细胞百分率 > 95%。

2.3 FLS 的鉴定

倒置相差显微镜下观察可见 FLS 呈三角形、梭形,细胞核成卵圆形,位于细胞中央,核仁清晰,细胞周围可见分泌物聚集。Vimentin、CD68、CK 免疫细胞化学染色结果显示第 3 ~ 4 代 FLS Vimentin 染色阳性,胞浆内见大量棕黄色颗粒,CD68 染色阴性,CK 染色阳性,胞浆可见棕黄色颗粒(图 4)。透射电镜下观察可见 FLS 核染色质较疏松,呈细颗粒状分布在核周围,核仁明显,粗面内质网丰富,胞浆突起长而粗,胞浆中往往缺乏高尔基复合体,可见少量小泡和囊泡(图 5)。流式细胞术检测 3 ~ 4 代 FLS CD55⁺ 细胞百分率为 $(95.34 \pm 2.47)\%$ (图 6)。

3 讨 论

滑膜包括衬里层和衬里下层,衬里层主要有巨噬样滑膜细胞和 FLS,衬里下层为结缔组织,RA 尤其是病程长的患者其滑膜衬里下层含较多的纤维组织。FLS 在慢性炎症过程中被激活后,出现细胞表型的显著改变,具有不完全转化细胞的特性,

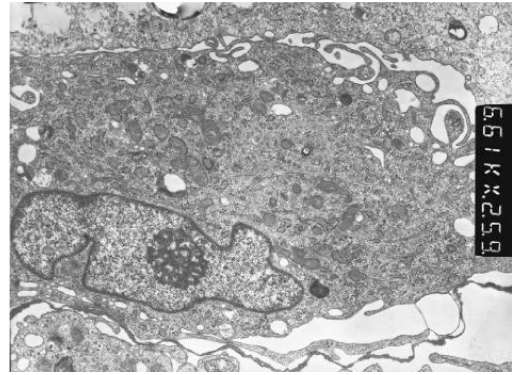


图 5 透射电镜下 FLS

Fig.5 FLS under transmission electron microscope
($\times 6600$)

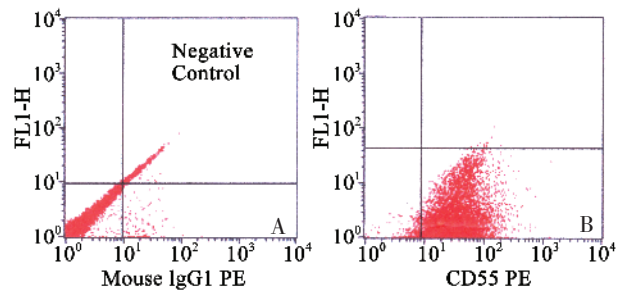


图 6 流式细胞术检测 FLS 细胞表面 CD55 表达
Fig.6 CD55 expression on FLS cell surface with flow cytometry

A: Negative control; B: The rate of positive CD55 cells $(95.34 \pm 2.47)\%$

即使脱离炎症环境仍持续活化,增殖能力升高,逃脱接触抑制,呈现肿瘤样增殖,并具有侵袭能力^[4]。FLS 体外培养模型的建立对于研究包括 RA 在内的多种滑膜关节病变的发病机制具有重要意义。

目前用于 FLS 体外培养的滑膜多来自关节开放性手术、关节镜手术、从滑液中分离及细针滑膜活检等方法。前两种方法所获取的滑膜组织较大,采用消化酶培养法或组织块培养法往往都能成功培养出 FLS^[5-6]。然而,开放手术对患者的创伤大,多用于晚期 RA 患者^[2],切取的滑膜组织可能混有较多其它组织成分;关节镜手术则实现了可视下滑膜活检,是目前获取滑膜标本的“金标准”^[7],但需专门设备、价格昂贵、技术难度高。从滑液中分离得到的滑膜或滑膜细胞数量有限,且脱落至关节腔的滑膜或滑膜细胞的生物学特性可能与关节表面的滑膜或滑膜细胞的生物学特性不完全一致。细针滑膜活检术操作安全、简便,成功率高^[3],

可用于早中期的 RA 患者。本实验采用盲式细针滑膜活检术获取滑膜组织,其体积往往较小,滑膜组织数量不如关节开放性手术及关节镜手术多。因此利用这种细针活检滑膜组织进行 FLS 体外培养较困难。

经典的细胞原代培养包括消化酶培养法和组织块培养法。消化酶培养法属于化学法,需要的滑膜标本量较多,且消化酶活性不够稳定,不利于有效消化分离滑膜纤维组织,细胞不易游离出来,加上所用的消化酶对细胞有一定的毒性,因此该方法 FLS 体外培养的成功率不高,细胞生长速度缓慢。组织块培养法虽然适合滑膜标本量较少的情况,细胞生长可定位观察,换液次数少,减少了污染的机会,但种植的组织块不易成活,簇状方式长出的细胞时间间隔较长,细胞生长缓慢。我们根据细针活检滑膜组织的特点,对上述传统的方法进行了改良,将消化酶法及组织块培养法有机地结合起来,既具有组织块培养法的优点,又避免了消化酶培养法的缺点,尤其适合滑膜标本量较少时。

在 FLS 体外分离培养过程中,可能同时混杂巨噬样滑膜细胞以及少量的内皮细胞、树突状细胞等。巨噬样滑膜细胞(A型滑膜细胞)呈卵圆形,胞周有短突起,核仁清晰;内皮细胞光镜下呈三角形或梭形,长满时呈铺路卵石状排列^[8];树突状细胞多为悬浮,光镜下细胞体积较大,形状不规则,并且有毛刺状突起^[9],这三种细胞的形态学及生长特性与 FLS 有差异。研究显示,第一代的滑膜细胞中约 40%~50%为巨噬样滑膜细胞,50%~60%为 FLS,而第三代则 99%以上为均一的 FLS^[10]。这主要是由于巨噬样滑膜细胞不具有增殖能力,随着培养时间的延长,细胞渐渐衰老至失去活性,在体外仅可存活约 10 d^[11]。FLS 在含 100 mL/L FBS 的 DMEM 培养液中培养的分裂增殖迅速,呈长梭状极向排列,能以传代培养的方式在体外培养较长时间。因此用自然纯化、酶消化及反复贴壁传代相结合对细胞进行分离和纯化,可逐步获得较纯的 FLS。

分离纯化 FLS 之后还必须对其进行鉴定,包括形态学和细胞表面标记物的检测。值得注意的是细胞表面标记物的检测。FLS 较特异的细胞表面标记有 UDPGD、VCAM-1/CD106、DAF/CD55、钙粘蛋白-11(Cadherin-11)、Vimentin、Thy-1/CD90、脯氨酸羟化酶、CD44 等^[12],其中 Vimentin、Thy-1/

CD90、脯氨酸羟化酶是各种成纤维细胞的标记,而 UDPGD、VCAM-1/CD106、DAF/CD55 是衬里层 FLS 的特异标记。其中 CD55 为补体衰退加速因子(DAF),在与血液接触的细胞中都有低表达,而在组织空腔衬里的间充质细胞、滤泡状树突状细胞有高表达^[13],在关节腔滑膜组织中 FLS 也有较高的表达,可与其它成纤维细胞相鉴别。CD68 是巨噬细胞的表面标志,巨噬样滑膜细胞阳性表达。

另外,本实验分离培养的 FLS 还可能同时混杂衬里下层的纤维母细胞或成纤维细胞。衬里层的 FLS 具有上皮样表型如 E-Cadherin 的表达^[14],而衬里下层的纤维母细胞或成纤维细胞来源于间充质细胞,Vimentin 阳性而不表达 DAF/CD55,说明衬里层和衬里下层的成纤维样细胞亚群之间表型及功能不同^[15]。新近研究发现,RA 滑膜衬里层的 FLS 不但具有成纤维细胞形态,而且具有不依赖支持物生长、细胞连接粘附分子消失、Vimentin 表达增高等间充质细胞特点,表明 RA-FLS 存在上皮间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)^[16]。EMT 不仅可能是 RA-FLS 大量增多的原因之一,而且还可能与 RA 滑膜浸润破坏软骨有关^[14,16]。本文体外分离纯化的细胞通过细胞表面标记检测发现其 Vimentin、DAF/CD55、CK 均阳性,CD68 阴性,表明分离纯化的细胞为衬里层同时具有上皮和间充质细胞特点的 FLS 而不是衬里下层仅有间充质细胞表型特点的纤维母细胞或成纤维样细胞。

本实验对 RA 滑膜体外培养的第 3~4 代细胞行形态学及细胞表面标记检测,结果显示,培养出的细胞为 FLS,纯度 > 95%。由于第 1~2 代 FLS 的纯度不够,而第 5 代之后的 FLS 出现老化现象,增殖活性明显降低,细胞形态变化较大,至第 8 代完全失去增殖活性,因此采用第 3~4 代 FLS 进行后续实验。

参考文献:

- [1] Noss EH, Brenner MB. The role and therapeutic implications of fibroblast-like synoviocytes in inflammation and cartilage erosion in rheumatoid arthritis [J]. Immunol Rev, 2008, 223: 252-270.
- [2] 戴冽,郑东辉,张白玉. 细针滑膜活检术的临床应用 [J]. 中华风湿病学杂志, 2009, 13(8): 566-568.
- [3] 戴冽,莫颖倩,郑东辉,等. 盲式细针滑膜活检及滑膜 (下转第 576 页 to page 576)