

兔颞下颌关节盘纤维软骨细胞分离培养的实验研究

匡世军, 张志光, 何一青, 廖明庭, 苏 凯, 张 娟

(中山大学光华口腔医学院·附属口腔医院口腔颌面外科, 广东 广州 510055)

摘 要:【目的】探讨兔颞下颌关节盘纤维软骨细胞的分离及体外扩增的条件, 观察关节盘纤维软骨细胞体外培养的生物特性。【方法】在无菌条件下, 切取 2 周龄新西兰白兔颞下颌关节盘, 剪至 1.0 mm² 的碎块, 0.5 g/mL 胰酶消化 30 min、胶原酶消化 4 h, 200 目筛网过滤, 获得关节盘纤维软骨细胞。在倒置显微镜下连续观察细胞的形态变化及贴壁率, 甲苯胺蓝染色、胶原免疫组化染色鉴定, 测定其生长曲线。透射电镜观察细胞超微结构。【结果】原代培养的关节盘纤维软骨细胞 12 h 可观察到贴壁细胞, 48 h 贴壁细胞逐渐增多, 大部分细胞为短梭形, 小部分为多角形, 第 4 天可见多个细胞克隆形成, 第 8 天时细胞彼此相连, 铺满平底, 细胞以梭形为主, 部分多角形。传代后 12 h 贴壁率达 90%, 大部分为多角形, 4-5 d 即可张满瓶底。甲苯胺蓝染色可见异染颗粒、胶原免疫组化染色胞浆内可见棕黄色颗粒。细胞内线粒体、内质网发达、高尔基体发达。【结论】体外分离培养的兔颞下颌关节盘纤维软骨细胞具有较强的增殖能力。

关键词: 纤维软骨; 细胞培养; 组织工程; 关节盘

中图分类号: R329.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)03-0318-04

Experimental Study of Isolation and Cultivation of Rabbit Temporomandibular Joint Disc Fibrochondrocytes

KUANG Shi-jun, ZHANG Zhi-guang, HE Yi-qing, LIAO Ming-ting, SU Kai, ZHANG Juan

(Department of Oral & Maxillofacial Surgery, Guanghua School of Stomatology,
SUN Yat-sen University, Guangzhou 510055, China)

Abstract: 【Objective】 This study were to explore a practical method of the separation and culture of fibrochondrocytes from rabbit temporomandibular joint (TMJ) disc, and to observe the biological characteristics of cultured fibrochondrocytes. 【Methods】 The small pieces (1.0 mm² in size) of isolated and chopped Rabbit TMJ disc, which was dissected from a 2-week-old New Zealand white rabbits under sterile conditions, were digested with 0.5% trypsin for 30 minutes followed by a four-hour digestion with collagenase. The solution was filtered (with 200 mesh filter) and collected. Morphological changes and the rate of adherence were constantly observed with phase-contrast microscope. Immunohistochemical staining for type I and type III collagen as well as glycosaminoglycans were performed in order to plot the growth curve. Ultrastructures of fibrochondrocytes were observed under transmission electron microscope. 【Result】 At 12th hour of incubation, primary fibrochondrocytes began to be adhesive. At 48th hour of incubation, the increased number of adhesive fibrochondrocytes was noticed. Most of them presented in short spindle-shaped while the rest were polygon-shaped. On day 4, the formation of colonies could be seen. Then most of the cells were spindle-shaped. On day 8, the periferating fibrochondrocytes, which most of them were spindle-shaped and some were polygon-shaped, started to meet (or: contact) each other to form a monolayer of fibrochondrocytes covering the bottom of the incubation disc. At 12th hour after passage, the rate of adherence of the fibrochondrocytes was 90%. Most of them were polygon-shaped. At 5th day after passage, these adhesive cells filled with the bottom of the incubation disc. Immunohistochemical staining of type I and III collagen as well as glycosaminoglycans exhibited positive results. The fibrochondrocytes cytoplasm were rich in mitochondria, endoplasm reticulum and Golgi apparatus. 【Conclusion】 The fibrochondrocytes of isolated rabbit TMJ disc presented proliferous ability in culture.

收稿日期: 2005-11-08

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(20010754)

作者简介: 匡世军(1969-), 男, 湖南衡阳人, 博士生; 张志光, 教授, 博士生导师. E-mail: kuangj2003@163.com

Key words: fibrochondrocyte; cell culture; tissue engineering; disc

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(3):318- 321]

颞下颌关节骨关节盘穿孔是颞下颌关节骨关节病中较常见的一种类型,关节盘组织缺乏血运,穿孔后难以愈合^[1]。应用组织工程学原理,修复关节盘穿孔,成为目前研究的热点^[2]。颞下颌关节盘与膝关节半月板都是纤维软骨细胞,目前对膝关节半月板纤维软骨细胞的生物学特性已有深入的研究^[2,3],而对颞下颌关节盘纤维软骨细胞的分离培养及生物学特性研究尚未见报道。本实验研究了关节盘纤维软骨细胞的体外分离、培养及部分生物学特性,为组织工程修复关节盘提供种子细胞奠定基础。

1 材料与方法

1.1 关节盘软骨细胞的分离

取2周龄新西兰白兔8只(中山大学实验动物中心提供),质量约0.5 kg,于耳缘静脉空气栓塞处死,在无菌条件下切取双侧颞下颌关节盘,修剪去周围组织,用含200 U/mL青霉素、200 mg/mL链霉素的PBS冲洗3次,放入盛有无血清的高糖DMEM灭菌培养皿中,将关节盘纤维软骨组织剪成1 mm³大小的碎块,移入离心管,加5 g/L胰蛋白酶5 mL,37℃恒温摇床中振荡30 min,离心后去除胰蛋白酶,用含血清的DMEM清洗2次,加3 g/L的型胶原酶4 mL(用含150 mL/L胎牛血清的DMEM培养基配制),移入恒温摇床中消化4 h,以1 500 r/min离心5 min,弃上清液,DMEM清洗2次,在4 mL含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养液中将细胞团吹打均匀^[3]。

1.2 关节盘软骨细胞的原代培养

将上述细胞悬液接种于25 mL细胞培养瓶中,于5% CO₂、饱和湿度、37℃恒温箱下培养,48 h后半量换液,以后隔日换液并逐日在相差显微镜下观察细胞生长情况。

1.3 关节盘细胞的传代培养

用2.5 g/L胰蛋白酶3 mL将上述基本长满的原代细胞消化分离(37℃,2 min),然后按1:3的比例传代接种培养。

1.4 细胞生长曲线的测定

取生长良好的第2~4代纤维软骨细胞,以1×10⁴/mL的细胞浓度接种于96孔培养板,每个时相

点细胞接种4孔,每孔200 μL细胞悬液。置于5% CO₂、饱和湿度、37℃恒温箱下培养。从第2天起,每天上午同一时间开始加入浓度为5 mg/mL的四唑氮蓝20 μL混匀,孵育4 h后弃培养液,加入150 μL二甲基亚砷,用酶联免疫检测仪上检测每个孔的吸光度(A),取平均值,绘制生长曲线。

1.5 甲苯胺蓝染色

取第1代培养细胞,固定后加入10 g/L甲苯胺蓝染液,室温下染色4 h,体积分数95%酒精洗去多余的染液。

1.6 型胶原免疫组化染色

第1代作细胞爬片,培养第5天时取出,PBS冲洗2次,用40 g/L多聚甲醛固定,按常规S-ABC法对培养细胞进行型胶原免疫组化染色。

1.7 透射电镜观察

取生长良好的第1代纤维软骨细胞,接种于75 cm²培养瓶,待细胞长满后,以PBS 10 mL清洗2次,细胞刮刀刮取贴壁的纤维软骨细胞,1 500 r/min离心5 min,以PBS漂洗2次,加入血清,4 000 r/min离心15 min,25 g/L戊二醛固定,脱水、包埋,超薄切片,透射电镜观察。

1.8 扫描电镜观察

第1代纤维软骨细胞爬片,长满后,用25 g/L的戊二醛固定24 h,用扫描电镜观察。

2 结果

2.1 倒置显微镜观察细胞形态

刚分离的关节盘纤维软骨细胞为小圆形,呈悬浮状,具折光性。12 h后可观察到贴壁细胞,细胞为圆形。24 h后可见有稀疏分布的单个细胞开始伸展生长,细胞外形为扁圆性。第4天时可发现多个细胞克隆形成,至第5天时,细胞克隆扩大,多角形细胞多见。第8天时细胞彼此相连,互相融合,铺满整个培养瓶底面,细胞以长梭形为主,部分为多角形。

2.2 纤维软骨细胞的传代细胞

传代后1 h细胞即开始贴壁。2 h后开始伸展,贴壁细胞形态为多角形,短梭形。6 h已经能适应体外培养条件(图1A),增殖速度加快,4~5 d

铺满培养瓶(图 1B)。细胞传至 10 代,细胞形态,增殖速度尚无明显变化。

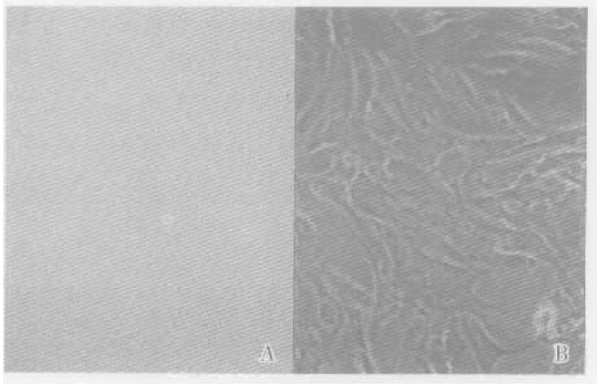


图 1 P₁ 纤维软骨细胞 7 h

Fig.1 Fibrochondrocytes of passage one (100 ×)

A: The fibrochondrocytes were displayed trigon and polygon (7 h); B: The fibrochondrocytes were displayed polygon (3 d)

2.3 纤维软骨细胞生长情况

纤维软骨细胞第 2 ~ 4 代细胞生长曲线基本相同,传代后 1 d 有的细胞数稍有减少,经过 24 ~ 48 h 的潜伏适应期后,细胞大量增加,进入对数生长期,第 5 天进入平台期(图 2)。细胞形态为长梭形细胞,三角形、多角形。

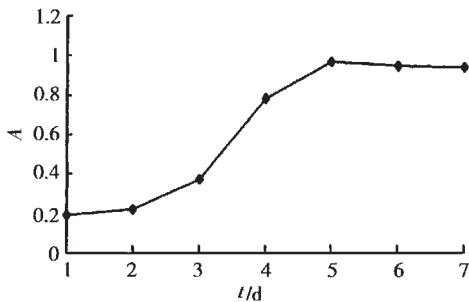


图 2 P₃ 细胞生长曲线

Fig.2 Growth curve of passage three was like "S" shape

2.4 软骨细胞鉴定

甲苯胺蓝染色胞浆呈紫蓝色。Ⅰ、Ⅱ型胶原免疫组化染色显示胞浆染成黄色,而胞核不染色。

2.5 透射电镜观察结果

细胞胞浆丰富,细胞质中有大量的线粒体及丰富的粗面内质网,存在许多糖原颗粒和分泌泡,高尔基体发达,并有许多分泌小泡,中间纤维有规律的排列在胞浆中。细胞核形态不规则,有大量的指状突起,核膜清晰,核周边有散在异染色质,常染色质占胞核的绝大部分,核仁明显(图 3)。

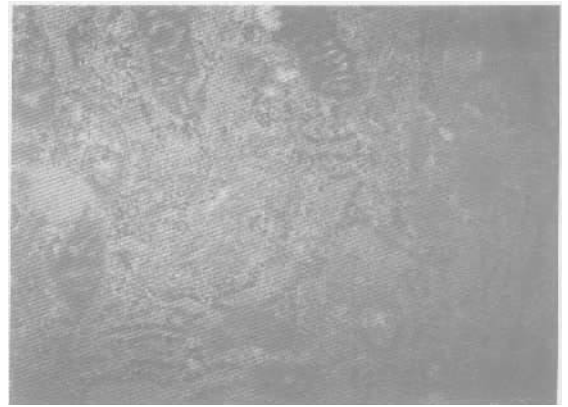


图 3 P₁ 透射电镜观察

Fig.3 Passage 1 observed by TEM (×70 000)

The fibrochondrocytes were abundant endoplasmic reticulum and mitochondrion

2.6 扫描电镜观察

可见细胞呈长梭形或多角形,伸出数目不等的伪足紧贴于玻片上,伸展的细胞可见 3 ~ 4 个核仁,可见核分裂,细胞相互交联(图 4)。



图 4 P₁ 扫描电镜观察(500 ×)

Fig.4 Passage 1 observed by SEM (500 ×)

The fibrochondrocytes stretched many pseudopodia

3 讨论

关节盘由纤维软骨细胞和致密的细胞间基质组成,为使纤维软骨细胞能够从胶原基质中游离出来,必须用酶消化法去除基质才能获得游离的细胞。在消化过程中,通过胰蛋白酶的水解细胞间基质蛋白质的作用,使纤维软骨松软。由于颞下颌关节盘胶原以Ⅰ型胶原纤维为主,因而本实验采用Ⅰ型胶原酶消化法。由于胶原酶消化时间长,本实验的胶原酶采用含 150 mL/L 胎牛血清的

DMEM, 这样既能消化 I 型胶原又有利于保存细胞的活力。作者经过反复实验, 认为以 3 g/L 的 I 型胶原酶 4 mL 消化 4 h 可获得数量多、活力强的细胞。

传代后的纤维软骨细胞贴壁时间缩短, 增殖速度加快, 在体外可以实现快速大量扩增。在体外培养条件下, 每代纤维软骨细胞的生长曲线与其它细胞一样经历滞留期、对数生长期和平台期。本实验对第 2~4 代细胞进行研究发现潜伏期 1~2 d, 对数生长期 2~4 d, 不同代次的纤维软骨细胞生长曲线基本一致。同时发现, 传至第 10 代以后, 纤维软骨细胞增殖速度并不减缓, 这与膝关节半月板纤维软骨细胞的生物学特性不完全相似^[3]。超微结构观察表明: 细胞内具有丰富的线粒体和粗面型内质网, 说明分泌蛋白质的合成较旺盛, 细胞质的高尔基体发达, 说明分泌蛋白的加工与修饰功能活跃。这提示细胞具有较强的基质合成能力。胞浆中排列有序的中间纤维在提供细胞机械强度方面起重要作用。

颞下颌关节盘的生化成分包括黏多糖 (glycosaminoglycans, GAG) 和胶原, 纤维软骨黏多糖的含量少于透明软骨, 而 I 型胶原为纤维软骨所独有^[4]。Almarza 等^[5]认为猪颞下颌关节盘的黏多糖的平均含量为干重的 0.96%, 胶原的平均含量为干重的 68.2%。软骨细胞无特异性标志物, 通过其分泌的黏多糖基质的甲苯胺蓝染色和 I 型胶原的免疫组化染色, 结合取材部位和培养观察可以鉴定^[7]。本实验甲苯胺蓝染色阳性, I 型胶原免疫组化染色显示胞浆染成黄色, 提示分离的细胞为软骨细胞而非成纤维细胞。颞下颌关节盘及膝关节半月板纤维软骨细胞与透明软骨细胞不同, 透明软骨分泌的胞外基质成分主要是 I 型胶原, 而纤维软骨细胞以 I 型胶原为主^[6,7]。实验中, I 型胶原

的表达强于 II 型胶原, 表明为纤维软骨而非透明软骨细胞。

本研究表明, 体外的关节盘纤维软骨细胞能够适应体外培养环境。关节盘纤维软骨细胞培养的成功, 为研究纤维软骨组织工程和基因工程以及关节盘板损伤后原位修复, 提供了实验依据。

参考文献:

- [1] DETAMORE M S, ATHANASIOU K A. Effects of growth factors on temporomandibular joint disc cells [J]. Arch Oral Biol, 2004, 49(7): 577-583.
- [2] ARAUJO V G, FIGUEIREDO C A, JOAZEIRO P P, et al. In vitro rapid organization of rabbit meniscus fibrochondrocytes into chondro-like tissue structures [J]. J Submicrosc Cytol Pathol, 2002, 34(3):335-343.
- [3] 祝云利, 荆鑫, 缪志和, 等. 人半月板纤维软骨细胞培养及生物学特性研究[J]. 解放军医学杂志, 2002, 27(5):432-433.
- [4] DETAMORE M S, ATHANASIOU K A. Motivation, characterization, and strategy for tissue engineering the temporomandibular joint disc[J]. Tissue Eng, 2003, 9(6): 1065-1087.
- [5] ALMARZA A J, BEAN A C, BAGGETT L S, et al. Biochemical analysis of the porcine temporomandibular joint disc [J]. Br J Oral Maxillofac Surg, 2006, 44(2): 124-128.
- [6] 张志光, 郑卫平, 苏凯, 等. 兔关节软骨细胞的分离、培养和形态学特征[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2004, 25(1):63-66.
- [7] ALMARZA A J, ATHANASIOU K A. Design characteristics for the tissue engineering of cartilaginous tissues [J]. Ann Biomed Eng, 2004, 32(1): 2-17.

(编辑 刘清海)