

体外培养大鼠耻骨联合软骨细胞的生物学特性

葛 成^{1,2}, 张志光^{1,2}, 项 鹏²

(中山大学 1. 光华口腔医学院·附属口腔医院颌面外科, 2. 干细胞与组织工程研究中心, 广东 广州 510055)

摘 要:【目的】通过对大鼠耻骨联合软骨细胞的分离及体外培养, 观察其生长、表型等一般生物学特点。【方法】采用胰蛋白酶、型胶原酶序贯消化法, 从 SD 大鼠耻骨联合软骨组织中分离出软骨细胞, 用含 150 mL/L 胎牛血清的 DMEM/F-12 培养液原代和传代培养。分别以 2 g/L 胶原酶消化 2、6、12 h, 分析不同消化时间获取的细胞数量及生长情况。对 6 h 消化组细胞进行型胶原免疫组化染色, 并观察第 1、4、7 代的生长曲线。【结果】经胶原酶消化 2、6、12 h 后, 平均每 100 mg 耻骨联合软骨获取的原代细胞数之间有统计学显著差异 ($P < 0.01$)。消化 6 h 组可以获取数量丰富的原代细胞, 生长状态好。大鼠耻骨联合细胞原代呈短梭形、三角形或多角形, 有短细胞突起。型胶原免疫组化染色在第 1、4 代培养细胞均呈阳性, 第 7 代培养细胞呈阴性。第 7 代细胞生长增殖比第 1、4 代慢。【结论】耻骨联合软骨细胞体外培养时属于有限细胞系。培养初期(第 4 代之前, 含第 4 代)的细胞较好地保持了软骨细胞的表型, 且增殖能力强, 有可能作为软骨组织工程的种子细胞。

关键词: 耻骨联合; 软骨细胞; 细胞培养; 生物学特性

中图分类号: R329.28

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)04-0387-04

Biological Characteristics of Rat Pubic Symphysis Chondrocytes Cultured In Vitro

GE Cheng^{1,2}, ZHANG Zhi-guang^{1,2}, XIANG Peng²

(1. Guanghua Stomatological College, 2. Stem Cell and Tissue Engineering Research Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510055, China)

Abstract: 【Objective】 To observe biological characteristics including growth and phenotype of rat pubic symphysis chondrocytes cultured in vitro. 【Methods】 By trypsin-collagenase digestion, chondrocytes were isolated from SD rat pubic symphysis cartilage and cultured in DMEM/F-12 medium supplemented with 150 mL/L fetal bovine serum. Cells, derived from cartilage digested by 2 g/L collagenase for 2, 6, and 12 hours, respectively, were counted and cultured to observe their growth of population. Chondrocytes in 6-hour-collagenase-digested group were cultured for collagen type immunohistochemical staining and observation of growth curve of passage 1, 4, and 7. 【Results】 The counts of cells isolated from 100 mg pubic symphysis cartilage by different digesting time (2 h, 6 h, and 12 h, respectively) were different significantly ($P < 0.01$). Chondrocytes in 6 hours digested group were abundant and grew best. The primary passage cells were in short-fusiform, trigonal or polygonal shape with short process. Collagen type immunohistochemical staining was positive in cells of passage 1 and passage 4, but negative in cells of passage 7. Cells of passage 7 grew more slowly than cells of the other two passages. 【Conclusion】 Pubic symphysis chondrocytes cultured in vitro belong to limited cell line. The cells cultured in the early days (before passage 4, including passage 4) maintain phenotype of chondrocyte and grow quickly, which may be suitable for fibrocartilage tissue engineering as seed cells.

Key words: pubic symphysis; chondrocyte; cell culture in vitro; biological characteristics

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(4):387-390]

髌状突关节面、关节盘和半月板常因骨关节炎、创伤、肿瘤等原因而受损, 自身修复能力差, 临

收稿日期: 2005-12-20

基金项目: 广东省重大科技专项资助项目(2004A30201004)

作者简介: 葛 成(1972-), 男, 山东齐河人, 博士后. E-mail: gechengde@163.com

床上难以治愈。随着细胞生物学和材料学的发展, 软骨组织工程研究将成为一种可供选择的有效方法, 用于解决这一医学难题^[1]。鉴于髌状突软骨、关节盘和半月板都是纤维软骨组织, 耻骨联合软骨也属于纤维软骨组织^[2], 因此, 从耻骨联合软骨获取的软骨细胞, 有可能作为修复髌状突软骨、关节盘或半月板缺损的组织工程种子细胞。但是, 在作为种子细胞应用于软骨组织工程研究之前, 有必要对分离获取的耻骨联合软骨细胞进行体外培养及生长特性研究, 然而, 国内外尚未见此方面的报道。本研究即探讨耻骨联合软骨细胞在体外培养过程中的表型、生长等生物学特性, 以期为进一步的软骨组织工程研究做准备。

1 材料和方法

1.1 材料

SD 大鼠, 雄性, 30 只, 体质量 60~80 g (中山大学北校区动物实验中心), DMEM/F-12 培养基 (Gibco 公司), 胎牛血清 (FBS, 杭州四季青), 胰蛋白酶、Ⅰ型胶原酶 (Sigma 公司), 兔抗人Ⅰ型胶原多克隆抗体及 PowerVision™ 免疫组化试剂盒 (北京中杉金桥公司), 恒温气浴摇床 (Barnstead 公司), 培养箱 (Hereaus 公司)。

1.2 耻骨联合软骨细胞的分离

无菌条件下切取大鼠耻骨联合软骨组织, 解剖显微镜下仔细去除软骨周围的软组织及软骨膜后, 剪成约 0.5 mm×0.5 mm 大小碎块, 含双抗的磷酸盐缓冲液 (PBS, 含青霉素、庆大霉素各 100 U/mL) 冲洗 3 遍, 加入 10 倍体积的 2.5 g/L 胰蛋白酶, 置于 37℃ 恒温摇床内消化 30 min。静置 5 min 后, 弃去上清液, 加入含血清的培养液中中止胰蛋白酶, PBS 洗涤 2 次。然后再加入 5 mL 2 g/L 的Ⅰ型胶原酶 (以含 100 mL/L FBS 的 DMEM/F-12 培养液配制), 置于 37℃ 恒温摇床内分别消化 2 h、6 h、12 h。以 200 目筛网过滤去除未消化的软骨残渣, 1 000 r/min (radius = 17.3 cm) 离心 5 min。沉淀细胞以 PBS 洗 2 次, 洗去胶原酶。加入 DMEM/F-12 培养液制成细胞悬液。培养液含 150 mL/L FBS、维生素 C 50 μg/mL, 青霉素、庆大霉素各 100 U/mL。台盼兰拒染试验检查软骨细胞存活率。

1.3 耻骨联合软骨细胞原代及传代培养

将消化不同时间组 (2 h、6 h、12 h) 获取的细胞, 计数后移入 25 cm² 培养瓶中, 每瓶接种细胞

1×10⁶ 个, 加入 5 mL DMEM/F-12 培养液, 置于 37℃、饱和湿度、含体积分数 5%CO₂ 的细胞培养箱内培养, 每 3 d 换液 1 次, 于第 1、7 天时计贴壁生长的细胞数。根据预实验结果, 当胶原酶消化 6 h 获取的原代细胞长满瓶底约 80% 时, 用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化, 按 1:3 传代。

1.4 Ⅰ型胶原免疫组化染色

按消化 6 h 组方法分离获取耻骨联合软骨细胞体外培养。第 1 代软骨细胞经胰蛋白酶消化后接种于盖玻片上, 贴壁生长后, PBS 冲洗, 95% 酒精固定 15 min。PowerVision™ 两步法进行Ⅰ型胶原免疫组化染色。同样取第 4、7 代细胞接种于盖玻片, 行Ⅰ型胶原免疫组化染色。

1.5 生长曲线测定

按前述方法培养, 并以 2×10⁴/孔将细胞传代于 24 孔培养板, 分别观察第 1、4、7 代细胞的生长曲线, 计算细胞群体倍增时间: $t_D = (t - t_0) \log_2 / (\log N_t - \log N_0)$, 其中 t_0 、 t 分别代表细胞培养起、止时间, N_0 、 N_t 分别代表 t_0 和 t 时的细胞数。

1.6 统计学方法

用统计学软件 SPSS10.0 对酶消化不同时间组所获取的细胞量, 及在培养 1 d 和 7 d 时的贴壁细胞数进行 One-way ANOVA 和成组 t 检验。

2 结果

2.1 分离方式对细胞培养的影响

各个消化时间获取的原代细胞经台盼兰拒染试验检查, 软骨细胞存活率均在 90% 以上, 12 h 组略低。经Ⅰ型胶原酶消化 2 h、6 h、12 h 后, 平均每 100 mg 耻骨联合软骨获取的原代细胞数分别是 $(0.4 \pm 0.026) \times 10^6$, $(3.03 \pm 0.208) \times 10^6$, $(3.80 \pm 0.265) \times 10^6$, One-Way ANOVA 分析表明: 不同消化时间组获取的细胞数之间有统计学显著差异 ($F = 251.008$, $P = 0.000 < 0.01$); 通过 t 检验进行组间两两比较: 2 h vs 6 h, $t = 21.36$, $P = 0.000 < 0.01$; 2 h vs 12 h, $t = 22.148$, $P = 0.002 < 0.01$; 6 h vs 12 h, $t = 3.944$, $P = 0.017 < 0.05$ 。

各消化时间组获取的细胞按 1×10⁶/瓶接种培养 1 d 后, 相差显微镜下观察即已贴壁、伸展, 细胞呈短梭形、三角形或多角形。6 h 组细胞生长状态最好, 7~10 d 后达到 80% 汇合即可第 1 次传代, 传代细胞生长良好。12 h 组原代细胞接种 1 d 后未贴壁 (漂浮) 细胞较多, 贴壁细胞生长较 2、6 h

组慢。各组细胞在培养 1、7 d 时的贴壁细胞计数见表 1, 与 2 h、6 h 组比较, 12 h 组培养不同时间后细胞数量均显著少于前两组 ($P < 0.01$)。

表 1 酶消化不同时间获取细胞的增殖情况

Table 1 Cell proliferation of different enzymatic digestion time ($\bar{x} \pm s, 10^6/\text{flask}$)

Time	1 d	7 d
2 h	1.01 \pm 0.104	3.28 \pm 0.207
6 h	1.03 \pm 0.108	3.37 \pm 0.220
12 h	0.70 \pm 0.120	1.87 \pm 0.169
F	9.802	70.594
P	0.005	0.000

2.2 型胶原的表达

第 1 代软骨细胞 型胶原免疫组化染色可见细胞浆内分布有棕黄色颗粒, 染色呈阳性。第 4 代软骨细胞 型胶原免疫组化染色仍呈阳性。第 7 代细胞 型胶原免疫组化染色呈阴性(图 1)。

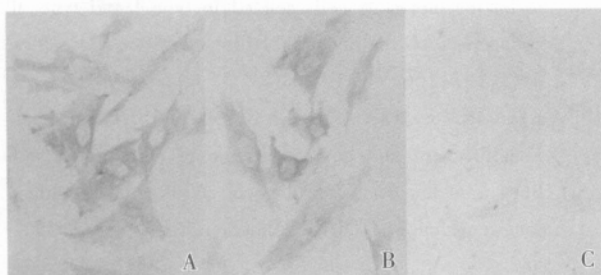


图 1 软骨细胞 型胶原免疫组化染色

Fig.1 Collagen type I immunohistochemical staining of chondrocytes ($\times 400$)

A: passage 1; B: passage 4; C: passage 7

2.3 培养细胞的生长特性

第 1 代细胞接种后 2 天生长缓慢, 为潜伏期。

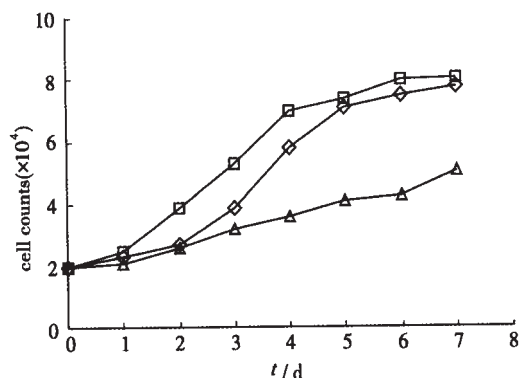


图 2 细胞生长曲线

Fig.2 Growth curve of different passages

□: passage 1; ◇: passage 4; △: passage 7

自第 3 天起呈快速生长, 开始构成生长曲线的对数生长期, 到第 5 天以后, 细胞生长曲线渐趋平缓, 进入平台期。第 4 代细胞生长曲线左移, 更快地进入对数生长期。第 1、4 代细胞倍增时间 t_D 分别为 55.5 h、56.9 h, 第 7 代细胞中梭形、肥大的细胞增多, 生长增殖速度明显减弱, 倍增时间 t_D 为 134.2 h(图 2)。

3 讨论

3.1 耻骨联合软骨细胞体外分离培养的目的和意义

临床上, 由于骨关节病、创伤等原因造成的关节面、半月板及关节盘缺损较常见, 软骨组织破坏后往往难以自行修复愈合, 这一直是医学界长期以来亟待研究解决的难题^[3]。组织工程研究为这一难题的解决带来了希望。在软骨组织工程种子细胞研究方面, 可以利用自体或异体关节软骨、肋软骨、成体干细胞(如骨髓来源的基质干细胞、脂肪干细胞)或胚胎干细胞等, 其中, 自体细胞具有多方面的优点, 尤其适于作为种子细胞^[4]。在修复半月板、关节盘、髌状突关节面等纤维软骨组织缺损时, 选择纤维软骨组织来源的种子细胞, 在细胞同质性方面是更合理的。然而, 鉴于髌状突关节面、半月板及关节盘的解剖特点、功能的重要性和独特性, 这些组织本身不能象膝关节那样提供充足的非负重区软骨以供获取足够的种子细胞。因此, 其他纤维软骨组织是否能作为细胞的供体组织, 值得探讨。从耻骨联合软骨组织中能否分离获取软骨细胞, 并在体外培养传代, 将是其作为种子细胞供体组织的前提条件, 而国内外这方面的研究尚空白。本研究即观察耻骨联合软骨细胞经酶消化法分离获取后, 在体外培养过程中的表型、生长等生物学特性, 为下一步用作组织工程的种子细胞作准备。

3.2 酶消化时间与获取细胞数量、活性的关系

本研究参考半月板细胞的分离方法^[5], 采用机械分离、胰蛋白酶和胶原酶联合消化的方法, 分离耻骨联合软骨组织中的细胞。结果发现, 相同软骨量情况下, 消化 2 h 组获取的细胞量最小, 原代无法正常生长传代, 在增加消化的软骨量、提高获取细胞的接种密度后, 细胞生长状态较好; 消化 12 h 组获取的细胞量最大, 但是接种后未贴壁细胞多, 贴壁率低, 增殖较慢, 培养 7 d 与 1 d 时的细胞量

之比是 2.67, 明显低于 6 h 组的 3.27。而胶原酶消化 6 h 组, 可以使耻骨联合软骨组织中的软骨细胞即能被充分分离下来, 又增殖较快, 表明细胞受到的损伤较小。

3.3 体外培养过程中的表型及生长变化

相差显微镜下观察见, 原代细胞形态为多形性, 以多角形为主, 有短梭形、三角形, 这可能是由于软骨组织中含有不同分化成熟阶段的软骨细胞, 将各个阶段的细胞都消化收集起来一同培养, 就表现出多形性。经过传代后, 细胞形态渐趋一致, 生长至汇合时排列呈铺路石样。Kitaoka 等^[6]在研究肋软骨来源的软骨细胞时也观察到了类似的现象。免疫组化染色显示, 第 1 代与第 4 代细胞的型胶原染色均为阳性, 提示耻骨联合软骨细胞可以合成软骨细胞特有的型胶原, 但是, 第 7 代细胞型胶原染色阴性。Darling 等学者^[7-9]曾提出, 软骨细胞在体外长期传代培养过程中, 会出现“反分化现象(dedifferentiation)”。然而, 有学者观察到, 反分化的细胞在特定条件下, 可以重新具有原来的表型特征^[10]。

体外培养过程中, 各代传代细胞的生长状态有所差异, 细胞增殖状况在逐渐发生变化。原代细胞经过潜伏期后, 才缓慢进入对数生长期。第 1 代细胞与原代类似, 而第 4 代细胞的生长曲线左移, 更快地进入对数生长期。这表明传代细胞对体外培养环境已经有较强的适应能力。然而, 第 7 代细胞没有明确的快速生长期, 7 天内的生长曲线一直较平缓, 细胞增殖缓慢, 群体倍增时间与第 1、4 代比较明显延长, 约为后者的两倍。这种在体外传代一定时间后, 即发生退变的现象, 表明耻骨联合软骨细胞属于有限细胞系。当被用作种子细胞时, 第 4 代及以前的传代细胞较好, 可以获得较多的细胞量, 又处于适应性较强的时期。

综上所述, 本实验观察到, 体外培养的耻骨联合软骨细胞有较强的适应性和增殖能力, 二维培养条件下, 第 4 代及以前的细胞保留了软骨细胞的表型特征, 增殖较快, 有可能作为髌状突关节面软骨、关节盘和半月板的组织工程修复的种子细胞。

参考文献:

- [1] AUFDERHEIDE A C, ATHANASIOU K A. Comparison of scaffolds and culture conditions for tissue engineering of the knee meniscus [J]. *Tissue Eng*, 2005, 11(7-8): 1095-1104.
- [2] NAQVI T, DUONG T T, HASHEM G, et al. Relaxin's induction of metalloproteinases is associated with the loss of collagen and glycosaminoglycans in synovial joint fibrocartilaginous explants [J]. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7(1): R1-11.
- [3] MOORE E E, BENDELE A M, THOMPSON D L, et al. Fibroblast growth factor - 18 stimulates chondrogenesis and cartilage repair in a rat model of injury-induced osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2005, 13(7): 623-631.
- [4] 时述山, 胥少汀. 实用骨与软骨移植[M]. 北京: 人民军医出版社, 2002: 131-135.
- [5] MUELLER S M, SCHNEIDER T O, SHORTKROFF S, et al. Alpha-smooth muscle actin and contractile behavior of bovine meniscus cells seeded in type I and type collagen-GAG matrices [J]. *J Biomed Mater Res*, 1999, 45(3):157-166.
- [6] KITAOKA E, SATOMURA K, HAYASHI E, et al. Establishment and characterization of chondrocyte cell lines from the costal cartilage of SV40 large T antigen transgenic mice [J]. *J Cell Biochem*, 2001, 81(4):571-582.
- [7] DARLING E M, ATHANASIOU K A. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations [J]. *J Orthop Res*, 2005, 23(2):425-432.
- [8] KINO-OKA M, YASHIKI S, OTA Y, et al. Subculture of chondrocytes on a collagen type I-coated substrate with suppressed cellular dedifferentiation [J]. *Tissue Eng*, 2005, 11(3-4): 597-608.
- [9] 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.
- [10] MALDA J, van BLITTERSWIJK C A, van GEFFEN M, et al. Low oxygen tension stimulates the redifferentiation of dedifferentiated adult human nasal chondrocytes [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2004, 12(4): 306-313.

(编辑 刘清海)