

兔关节软骨细胞的分离、培养和形态学特征

张志光¹, 郑卫平², 苏凯¹, 许跃¹

(1. 中山大学光华口腔医学院·附属口腔医院, 广东 广州 510055;

2. 广东省人民医院口腔科, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨兔关节软骨细胞的分离、培养方法, 观察单层高浓度培养时细胞表型表达情况。【方法】无菌条件下, 从2周龄新西兰白兔的颞颌关节及四肢关节髌突面削取软骨片, 采用机械-酶消化法分离软骨细胞, 经台盼蓝拒染计数, 将细胞按 1×10^6 个/孔接种于6孔培养板, 传代培养, 描绘生长曲线。利用相差显微镜及透射电镜观察细胞形态。应用甲苯胺蓝及Ⅱ型胶原免疫组化对细胞进行鉴定。【结果】每克软骨能获得 1.5×10^6 个软骨细胞, 活性率为95%。培养2~3 d, 细胞贴壁、变形, 呈多角形; 8 d左右, 细胞融合成层。透射电镜观察显示细胞核圆形, 有丰富的粗面内质网、高尔基体及分泌的基质成分。甲苯胺蓝及Ⅱ型胶原染色阳性。细胞传至5代后, 出现“成纤维细胞样”。【结论】本研究建立了简单易行的软骨细胞分离、培养方法; 初代、第2代细胞生长良好, 适合于实验研究; 软骨细胞5代培养后, 细胞表型发生改变。

关键词: 关节, 软骨/细胞学; 细胞培养; 软骨细胞/超微结构

中图分类号: R782

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2004)01-0063-04

Isolation, Culture and Morphological Characteristics of Rabbit Articular Chondrocyte

ZHANG Zhi-guang¹, ZHENG Wei-ping², SU Kai¹, XU Yue¹

(1. Guanghua School of Stomatology, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510055, China;

2. Department of Stomatology, People's Hospital of Guangdong Province, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To study the methods for isolation and culture of articular chondrocyte and to observe the phenotypic expression of the monolayer cultured cells at a high density. 【Methods】Cartilage was harvested in small slices with a sharp knife under sterile conditions from temporomandibular joint and other synovial joints of 2 New Zealand white rabbits. The slices were cut into small pieces and digested in enzyme solution. After suspension, viable cells were counted in a hemocytometer after trypan blue dye exclusion. Chondrocytes (cell density of 1×10^6 /dish) were placed in DMEM containing NCS in 6-well culture plate. The cells were subcultured, when they became confluent. The cultures were maintained for up to 6 weeks. Cell number was counted on day 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 d, and the growth curve was depicted. Cultured cells were indentified with toluidine blue staining and Type II collagen immuno-histochemistry reaction, and observed by phase-contrast microscope and TEM. 【Results】The yield of isolated chondrocytes obtained from one gram of sectioned cartilage was 1.5×10^6 . The number of viable cells with trypan blue staining was 95%. Cultured cells became polygonal on day 2 or 3. Cells formed a cohesive multiplayer on plastic surface on day 8. When stained with toluidine blue and anti-type II collagen antibody, the results were positive. The cells displayed a round, eccentrically located nucleus, clusters of mitochondria, rough endoplasmic reticulum, and a prominent golgiosome. 【Conclusion】The methods for isolation and culture of chondrocytes is simple

收稿日期: 2003-06-08

基金项目: 香港杨震基金资助课题(9706)

作者简介: 张志光(1955-), 男, 广东博罗人, 教授, 博士生导师. E-mail: drzhangzg@163.com

and feasible. The growth of passage one and passage two cells are quite well and suitable for experiments.

Key words: cartilage, articular/cytology; cell culture; chondrocyte/ultrastructure

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2004, 25(1):63-66]

关节疾患的发生发展总伴随着关节软骨的破坏。关节软骨缺乏再生功能,难以自愈,致使关节疾患迁延不愈。应用组织工程学原理,体外再造软骨移植修复软骨缺损,成为目前研究的热点^[1,2]。本实验研究了软骨细胞的分离、培养方法,观察单层高浓度培养时细胞的表型表达情况,为组织工程软骨的临床应用打下基础。

1 材料与方 法

1.1 软骨细胞的分离

2 周龄新西兰兔 2 只(中山大学实验动物中心提供),于耳缘静脉注射空气处死。在严格消毒的条件下剪开颞下颌关节(temporomandibular joint, TMJ)及四肢关节,用 11 号刀片削取关节表面软骨,放入盛有 DMEM 培养基(高糖型, GIBCO)的培养皿中,清除表面血污及附着的其他组织。用含青霉素钠/庆大霉素双抗液的 PBS 冲洗数次后,剪切软骨至 1 mm³ 大小的碎块,移入消化室内。加入 2.5 g/L 的胰蛋白酶 5 mL,磁力棒摇荡消化 40 min,轻轻吹打弃去;再加入质量分数 0.1% 的 II 型胶原酶 5 mL,将消化瓶放置恒温摇箱中,消化 4~6 h。大部分细胞游离时,200 目不锈钢筛网过滤,用 5 mL 离心管收集细胞,在 LD4-2A 型离心机(北京医用离心机厂)上离心(离心半径为 5 cm, 1 000 r/min, 5 min),弃上清液,DMEM 液清洗两次。4 mL DMEM 培养液溶解细胞团,使细胞悬液均匀分布。

1.2 软骨细胞的计数、活性鉴定

移取 9 滴悬液入一离心管中,加 1 滴 10 g/L 的台盼蓝液,混匀,置 2~3 min,取 1 滴均匀分散于计数板,根据下式计算每毫升 DMEM 培养液中活细胞数:细胞 = 4 大格细胞总数 ÷ 4 × 10⁴ × 稀释倍数。细胞活性率 = 4 大格活细胞总数 ÷ 4 大格细胞总数。

1.3 细胞的培养、传代培养

按 1 × 10⁶ 个/孔细胞浓度接种于 6 孔培养板,加入 2 mL DMEM 培养液,置于 37 ℃、饱和湿度、5% CO₂ 的孵箱中培养,每 3 d 换液 1 次,倒置显微

镜下观察并照相。细胞长满单层后,用酶消化法消化并收集、计数并传代。

1.4 绘制生长曲线

随机取培养细胞,分别于 1、2、3……8 d 取 3 孔细胞进行计数,绘制曲线,并计算其倍增时间[按下列公式计算: $t_D = (t - t_0) \lg 2 / (\lg N - \lg N_0)$],其中 t_0 、 t 分别代表细胞培养起止时间, N_0 、 N 分别代表 t_0 、 t 细胞数。

1.5 甲苯胺蓝染色

随机抽取初代培养细胞,采取 10 g/L 甲苯胺蓝法进行基质异染(pH2.5)。

1.6 II 型胶原染色

按常规 ABC 法进行 II 型胶原免疫组化染色,腱细胞作为阴性对照。

1.7 透射电镜观察

按常规制备细胞爬片、固定,以日立 S-450 型透射电镜观察,照相。

2 结 果

2.1 软骨细胞获取量及活性检测

本试验取两周龄新西兰兔关节软骨,经酶消化每克软骨可获得软骨细胞量 1.5 × 10⁶ 个,台盼蓝拒染测得活性率为 95%。

2.2 软骨细胞的原代培养

接种细胞为小圆形,悬浮于培养液中。静置 24 h 后,大多数细胞开始贴壁,圆形增大,伸长形成突起。早期细胞一般呈多角形。胞核为圆形或椭圆形,位于胞体中心,核浆着色淡。核仁为 1~3 个,致密程度和大小不等(图 1)。胞体越大,核和核仁越清晰。胞核较稳定,不像胞膜和胞浆,易受外界因素影响而发生改变。培养 4 d,可见细胞成簇现象。细胞多见于培养孔壁边缘密集,保持圆形或椭圆形生长状态,且出现重叠生长现象。8 d 左右,细胞增殖逐渐融合形成单层,呈不规则立体“铺路石”样(图 2)。长期培养可形成肉眼观的白色“类软骨样”物质。



图 1 P1 代软骨细胞 2 d

Fig. 1 The chondrocytes of passage one (2 d)

The chondrocytes were displayed polygonal shape. (×100)



图 2 P1 代软骨细胞 8 d

Fig. 2 The chondrocytes of passage one (8 d)

The chondrocytes formed a cohesive multilayer. (×100)

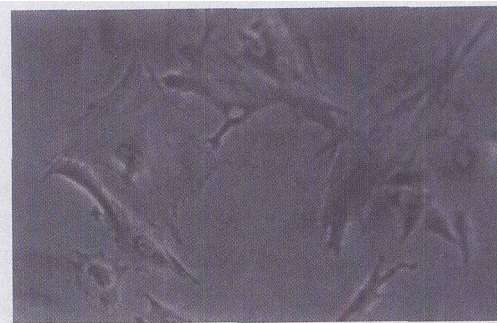


图 3 P5 代软骨细胞

Fig. 3 The chondrocytes of passage five (2 d)

The chondrocytes seemed to be fibroblast. (×100)



图 4 P1 代软骨细胞甲苯胺蓝染色

Fig. 4 Toluidine blue staining (P1)

The chondrocytes showed strong positive. (×100)

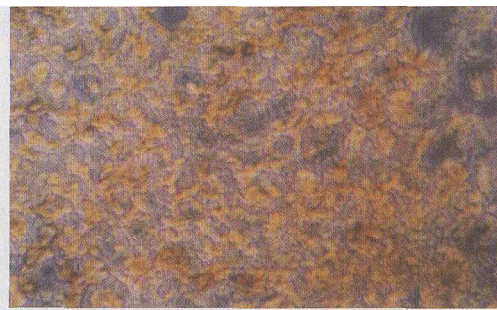


图 5 P1 代软骨细胞 II 型胶原免疫组化染色

Fig. 5 Immunohistochemical stain with anti-type II antibody (P1)

The chondrocytes showed strong positive. (×100)

2.3 传代培养

初代、第 2 代细胞生长良好,增殖、分化及分泌基质的能力强,细胞扩增率明显高于其它代。当培养至第 5 代,体积开始变大,边缘出现一些指状突起,核也变大,胞膜和胞浆不清晰,增殖速度减慢,细胞呈纤维细胞样(图 3)。甲苯胺蓝及 II 型胶原染色淡,提示细胞分泌基质能力明显下降。

2.4 软骨细胞鉴定

甲苯胺蓝染色: 软骨细胞内见篮紫色异染颗粒;细胞周围有少量异染颗粒出现(图 4)。II 型胶原免疫组化染色: 软骨细胞胞浆被染成棕黄色,胞核不着色(图 5)。借此并结合形态学观察可予认定。

2.5 透射电镜观察结果

细胞核较大,多为圆形,形态不规则,核仁边聚,常染色质明显。细胞质胞浆丰富,核糖体、线粒体较多,有丰富的粗面内质网及分泌小泡,泡内为合成的基质成分,胞浆中还可可见大量成团的糖原颗粒(图 6)。

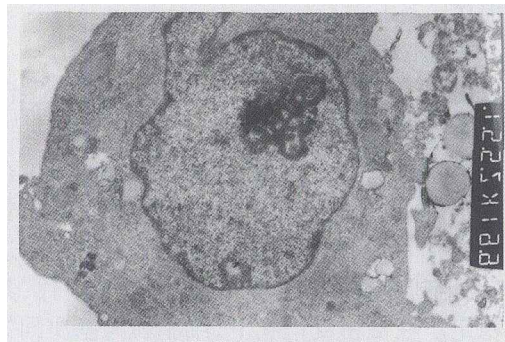


图 6 P1 代软骨细胞透射电镜显示

Fig. 6 Passage 1 Observed by TEM (×6 610)

The chondrocytes were displayed abundant organelles

3 讨 论

3.1 软骨细胞取材的实验动物

选择取材的实验动物,主要考虑是否能提供足量的关节软骨细胞,同时也考虑动物遗传背景的一致性和实验结果的可重复性。软骨组织工程研究,要求种子细胞浓度要足量,否则难以形成软骨。国外学者多采用近交系大鼠,用同基因细胞代替自体细胞来解决细胞量问题,但细胞量也十分有限,需进行多个动物取材和细胞培养扩增,工作程序复杂化;猪、羊等杂种动物的实验结果可重复性较差。新西兰白兔是近交系动物,基因型基本相同,遗传背景一致,实验质量高于杂交动物,且满足组织工程细胞需要量^[3]。

3.2 软骨细胞的分离方法

关节软骨由软骨细胞和细胞基质组成,不含纤维血管组织,用酶把基质消化后就可分离出大量高纯度的软骨细胞。综合相关文献,应用最多的是低质量浓度的胰蛋白酶和 II 型胶原酶顺序染色消化法。胰蛋白酶对软骨细胞外周基质有较强的消化能力,可见大部分的蛋白多糖分解;II 型胶原酶可将胶原降解成低分子多肽短链物。但胰酶和胶原酶的浓度和作用时间应严格控制,避免造成软骨细胞的损伤^[4,5]。

关节软骨的表面为一层纤维膜组织,取材时应仔细剥离,可保证分离的细胞单一。本实验用质量百分数为 0.25% 的胰蛋白酶消化 40 min,去除滑膜组织和其他成分,此时肉眼可见组织松散迹象。弃去胰酶,用 0.1% II 型胶原消化软骨细胞。最初 1~2 h,镜下只有游离的细胞;2~4 h,组织块变小松散,镜下见大量游离细胞。消化 5~6 h 后经过过滤、染色、计数,获得大量(5×10^6)、高活性(95%)、高纯度的细胞。实验证明:振荡、37℃ 恒温、使用新配置的消化液有助于缩短消化时间,减少对软骨细胞的损伤。

3.3 软骨细胞的体外培养

软骨细胞属低氧、低代谢细胞,它适合在 pH7.4、体积分数 5%~60% 的 CO₂、6%~91% 的 O₂ 浓度和低钙环境中生长。胎牛血清对细胞的生存和增殖是不可或缺的,其他成分如维生素 C、生长因子、BMP-7 等对软骨细胞的增殖、分化又促进作用。软骨细胞长期单层培养或经过反复传代,其分化不稳定。在低密度情况下,细胞易与基质间失去联系,细胞因子无法提供反馈调节,细胞出现反分化,呈成纤维细胞样,合成 II、XI 型胶原的能力下

降,I、III 型胶原增加^[6];高密度培养时,大多数细胞能保持正常形态,有助于自分泌因子维持其表型和基质的新陈代谢^[7],阻止或减缓细胞的反分化。

本实验结果还表明,在进行组织工程或其他实验研究时,选用初代或第 2 代细胞实验质量更高。

3.4 培养细胞的鉴别

软骨细胞无特异性标志物,通过对其分泌的基质成分氨基多糖(GAGs)的甲苯胺蓝染色^[8]和 II 型胶原的免疫组化染色,结合取材部位和培养观察,可以鉴别。GAGs 为碱性糖聚合物,与甲苯胺蓝反应时异染。软骨细胞分泌 GAGs 的含量不同,着色深浅不一。II 型胶原免疫组化染色是应用 ABC 法原理,即将特异性 II 型胶原单抗体与组织细胞相应抗原结合后,通过生物素化桥抗体与其结合,借助卵白素与生物素的天然亲和性将生物素化辣根过氧化物酶连接为复合物,通过酶促反应显示组织细胞相应的抗原。由于关节软骨胶原主要为 II 型胶原,通过免疫组化染色可特异性地反应软骨细胞的表达 II 型胶原的含量。本实验观察到,甲苯胺蓝染色时,软骨细胞内见篮紫色异染颗粒,细胞周围有少量异染颗粒出现;而 II 型胶原免疫组化染色时,软骨细胞胞浆被染成棕黄色,胞核不着色。证实了本实验所观察的细胞为软骨细胞。

参考文献:

- [1] Hunziker E. Biological repair of articular cartilage: defect models in experimental animals and matrix requirements [J]. Clin Orthop, 1999, 367s: 135-40.
- [2] 郑卫平,张志光,郑有华,等. 兔关节软骨细胞在几丁糖中培养的生物特性 [J]. 中山医科大学学报, 2000, 21(4): 277-9.
- [3] 苗明三. 实验动物和动物实验技术 [M]. 北京, 中国中医药出版社, 1997. 8-9.
- [4] Freshney R I. Animal cell culture: a practical approach [M]. London: Oxford IRL Press, 1986. 1-5.
- [5] Kuettner K E, Bendicht U P, Gall G, et al. Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes *in vitro*. isolation, culture characteristics, and morphology [J]. J Cell Biol, 1982, 93(3): 743-6.
- [6] Ishizaki Y, Julia F B, Martin C R. Autocrine signals enable chondrocytes to survive in culture [J]. J Cell Biol, 1994, 26(4): 1069-73.
- [7] 沈是铭. 关节软骨的自分泌调节 [J]. 中国矫形外科杂志, 2000, 7(2): 173-4.
- [8] Lillich J D, Bertone A L, Malesud C J. Biochemical, histochemical and immunohistochemical characterization of distal tibial osteochondrosis in horses [J]. Am J Vet Res, 1997, 58(1): 89-98.

(编辑 刘清海)