

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.07.002

文章编号: 1005-8982(2016)07-0004-05

论著

兔软骨细胞的分离及其与 I / II 型 复合胶原膜共培养实验研究*

丛波¹, 张加廷², 韩龙², 丁一², 徐训安¹, 姚旺林¹, 张仲文²

(1. 锦州医科大学武警总医院研究生培养基地, 北京 100039; 2. 武警总医院 骨四科, 北京 100039)

摘要:目的 探讨体外分离兔软骨细胞的方法并观察其与 I / II 型复合胶原膜共培养时的生物活性。**方法** 取 4 周龄的新西兰大耳兔, 处死后在无菌条件下取关节软骨。通过胰蛋白酶和 II 型胶原酶消化软骨细胞。倒置相差显微镜下观察软骨细胞特点, 制作细胞爬片行甲苯胺蓝染色。将第 3 代兔软骨细胞与 I / II 型复合胶原膜共培养, 噻唑蓝(MTT)法和糖胺聚糖含量测定法检测软骨细胞在胶原膜上的细胞活性, 扫描电镜观察软骨细胞在复合胶原膜上的生长情况。**结果** 分离出的原代软骨细胞初为卵圆形, 贴壁后变成三角形或多边形, 可被甲苯胺蓝染色。软骨细胞在 I / II 型复合胶原膜上生长良好。**结论** 两部酶法可获得大量软骨细胞, MTT 法和扫描电镜证实软骨细胞可在复合胶原膜上正常扩增。

关键词: 软骨细胞; 复合胶原膜; 胰蛋白酶; II 型胶原酶; 细胞活性; 软骨缺损

中图分类号: R329

文献标识码: A

Isolation of rabbit chondrocytes and their co-culture with type I / II collagen membrane*

Bo Cong¹, Jia-ting Zhang², Long Han², Yi Ding², Xun-an Xu¹,
Wang-lin Yao¹, Zhong-wen Zhang²

(1. Postgraduate Training Base, General Hospital of Armed Police Forces, Jinzhou Medical University, Beijing 100039, China; 2. The Fourth Department of Orthopaedics, General Hospital of Armed Police Forces, Beijing 100039, China)

Abstract: Objective To explore the method of isolating rabbit chondrocytes *in vitro* and observe their bioactivity when co-cultured with type I / II collagen membrane. **Methods** Articular cartilage was taken under aseptetic conditions after the New Zealand rabbits at 4 weeks of age were sacrificed. Chondrocytes were digested by trypsin and type II collagenase. The features of the chondrocytes were observed under inverted phase contrast microscope. The slides of cells were stained by toluidine blue. The third-generation rabbit chondrocytes were co-cultured with type I / II collagen membrane. The growth of the chondrocytes on type I / II collagen membrane was observed by the method of MTT, test of glycosaminoglycan and scanning electron microscopy. **Results** The original-generation chondrocytes were oval in the beginning, then they were triangle or polygan. The chondrocytes could be stained by toluidine blue. They grew well on the type I / II collagen membrane. **Conclusions** A large number of chondrocytes can be obtained by two-enzyme method. Chondrocytes can amplify normally on the type I / II collagen membrane, which can be demonstrated by MTT method and scanning electron microscopy.

Keywords: chondrocyte; type I / II collagen membrane; trypsin; type II collagenase; co-culture; bioactivity

收稿日期: 2016-01-07

* 基金项目: 首都临床特色应用研究项目(No: Z161100000516013); 武警总医院一类课题(No: WZ2012016)

[通信作者] 张仲文, E-mail: zhang6816151@163.com; Tel: 13716151868

软骨缺损在临床上比较常见,发病率高达 5%。关节腔清理术、微骨折术等方法治疗效果并不理想。因此,以软骨细胞移植为代表的组织工程技术越来越受重视。软骨细胞作为种子细胞的重要来源,历来备受关注^[1-3]。本研究采取两步酶法获取原代兔软骨细胞,通过显微镜观察、细胞爬片染色等途径了解其生物特点。将第 3 代兔软骨细胞接种到 I/II 型复合胶原膜上,噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)法和糖胺聚糖含量测定法检测其细胞活性,扫描电镜观察其生长情况,为日后软骨细胞移植提供了一定的实验基础^[4]。

1 材料与方法

1.1 实验材料与试剂

4 周龄新西兰大耳兔 1 只,由北京市昌扬西山养殖场提供,许可证号为 SCXK(京)2011-0010。磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)(北京雷根生物技术有限公司),改良 Eagle 培养液达尔伯克必需基本培养基(dulbecco's minimum essential medium, DMEM)/F12(美国 Hyclone 公司),胎牛血清(美国 Gibco 公司),青霉素-链霉素混合溶液(北京雷根生物技术有限公司),0.25%胰蛋白酶(北京雷根生物技术有限公司),0.2% II 型胶原酶(美国 Sigma 公司),MTT(北京雷根生物技术有限公司),二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)(北京索莱宝公司),4%多聚甲醛、1%甲苯胺蓝染液(北京雷根生物技术有限公司),无水乙醇(北京化工厂)。

1.2 实验方法

1.2.1 兔关节软骨细胞的分离、培养、传代 取 4 周龄新西兰大耳兔 1 只,耳缘静脉注射水合氯醛致死,剪除四肢毛发,碘伏浸泡 0.5 h。常规铺单,取出四肢放入无菌弯盘中,无菌敷料包裹。在超净工作台上仔细分离肩、髌、膝关节处的软骨,注意分离表面肌肉、肌腱、半月板、滑膜等组织。用眼科剪将软骨剪成碎片, PBS 缓冲液冲洗 3 次后,置入装有等体积 0.25%胰蛋白酶的小烧杯中,与磁力搅拌器一起置于培养箱中 37℃ 恒温消化 0.5 h。向烧杯内加入等体积培养液终止消化。取出后放入 15 ml 离心管中, 1 300 r/min 离心 5 min,弃上清液。将软骨碎片取出放入装有等体积 0.2% II 型胶原酶的烧杯中,置于培养箱中 37℃ 恒温消化 2 h。向烧杯内加入等体积培养液终止消化。取出后放入 15 ml 离心管中, 1 300 r/min 离心 5 min,吸取上清液。将上清放入 15 ml 离心

管中, 1 800 r/min 离心 8 min。弃上清,加 6 ml 培养液(89%DMEM/F12+10%胎牛血清+1%双抗)于离心管中,小心吹打,使细胞均匀分散在培养液中,之后将其一起移入 25 ml 细胞培养瓶中,放于培养箱培养(5%二氧化碳 CO₂, 37℃)。如小烧杯内残留软骨块较多,可重复上述步骤进行二次消化。原代细胞培养 2 d 后给予换液,以后隔日换液。取细胞悬液滴于细胞计数器中,按照如下公式对软骨细胞进行计数。每毫升 DMEM/F12 培养液中的细胞总数 = 4 大格细胞总数 / 4 × 10⁴ × 稀释倍数。滴少许台盼蓝染液于细胞计数器中,活细胞细胞壁完整不被染色,而死细胞则被染成蓝色。细胞存活率 = 4 大格活细胞数 / 4 大格细胞总数 × 100%。当软骨细胞融合至 >80% 时,细胞呈现铺路石样改变,此时可将细胞传代培养。用 3 ml 吸管吸出原培养液, PBS 缓冲液漂洗 3 次以后,加入 2 ml 0.25%胰蛋白酶摇晃培养瓶消化细胞约 2 min,直至显微镜下观察细胞呈皱缩状或呈瀑布状落下为止。终止消化后,吹打瓶底。将培养瓶内液体移入 15 ml 离心管中 1 800 r/min 离心 8 min,留取沉淀物,弃上清。再次加入 6 ml 培养液同法离心,以保证彻底去除胰蛋白酶,防止细胞消化过度。弃上清,吸取 6 ml 培养液于离心管中,吹打混合均匀后移入 25 ml 细胞培养瓶内入培养箱继续培养。

1.2.2 软骨细胞爬片甲苯胺蓝染色 将第 3 代软骨细胞悬液放入有盖玻片的培养皿中,移入培养箱中培养, 2 d 后细胞贴于盖玻片上,此时细胞爬片制作成功。取出细胞爬片, PBS 缓冲液冲洗爬片 3 次, 4%多聚甲醛溶液固定 10 min。将爬片放入干净培养皿中,滴入适量 0.1%甲苯胺蓝染液浸泡 4 h。无水乙醇冲洗 3 min,干燥后显微镜观察并拍照。

1.2.3 I/II 型复合胶原膜与软骨细胞共培养之前的消毒、浸泡 用眼科剪将 I/II 型复合胶原膜修剪成大小合适的圆形材料, 75%乙醇浸泡 5 h, PBS 缓冲液冲洗 3 次,每次约 15 min。放于 24 孔板中,加入适量 DMEM/F12 培养液浸泡 1 d,将粗糙面向上。

1.2.4 MTT 法检测软骨细胞在 I/II 型复合胶原膜上的细胞活性 取 2 ml 0.25%胰蛋白酶消化第 3 代软骨细胞后,将细胞浓度调至 1 × 10⁵ 个/ml 接种于 4 块 96 孔培养板中,每个培养板分为两组,分别为细胞组、细胞和胶原膜共培养组。每组放置 10 个样本,每 2 天换 1 次液。先后取第 2、4、6 和 8 天的培养板,加入 5 mg/ml 的 MTT 液 10 μl/孔,培养箱孵育 4 h 后加 DMSO, 100 μl/孔,恒温摇床振荡 10 min

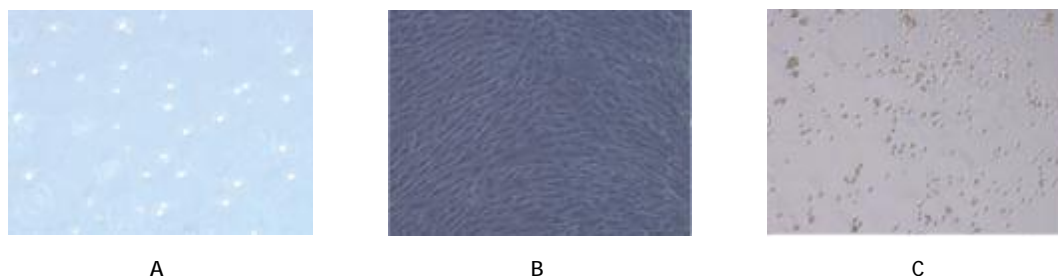
后在酶标仪 490 nm 波长处测吸光度值(optical density, OD)。

1.2.5 糖胺聚糖水平检测 将第 3 代软骨细胞悬液按照同一细胞浓度接种于 4 块空白的 96 孔板和 4 块含有 I / II 型复合胶原膜复合物的 96 孔培养板中, 每组放置 10 个样本, 每 2 天换 1 次液。先后取第 2、4、6 和 8 天的软骨细胞上清液, 以免糖胺聚糖酶联免疫分析试剂盒检测糖胺聚糖水平。

1.2.6 扫描电镜观察软骨细胞与 I / II 型复合胶原膜复合物 取第 3 代软骨细胞, 将细胞浓度调至 1×10^5 个 / ml, 与复合胶原膜在 24 孔板中共培养 3 d。其中, 第 2 和 3 天给予细胞换液。第 3 天换液后, 将细胞胶原膜复合物从培养板中取出, PBS 缓冲液漂洗 3 次, 取 2.5% 戊二醛、1% 锇酸进行固定, 用不同浓度的乙醇进行梯度脱水。样品行临界点干燥后, 将其贴于样品台上喷金行扫描电镜观察。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。



A: 原代软骨细胞; B: 原代软骨细胞 5 d 后铺满瓶底; C: 传代消化的第 3 代软骨细胞

图 1 软骨细胞形态观察 ($\times 400$)

2.3 MTT 法检测软骨细胞在 I / II 型复合胶原膜上的细胞活性

MTT 法测得细胞组与共培养组第 2、4、6 和 8 天的 OD 值。可以看出, 软骨细胞无论是单独培养还是与胶原膜共培养都能很好地增殖, 4 d 以内细胞增殖速度较快, 此后速度减慢。且同一天共培养组的 OD 值要高于细胞组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1 和图 3。

2.4 糖胺聚糖水平检测

从细胞组与共培养组第 2、4、6 和 8 天的糖胺聚糖水平可见, 复合胶原膜共培养 4 d 以内的软骨细胞分泌较多的糖胺聚糖, 细胞活性较高, 且胶原膜能促进软骨细胞增殖, 两组的糖胺聚糖水平比较, 差异

2 结果

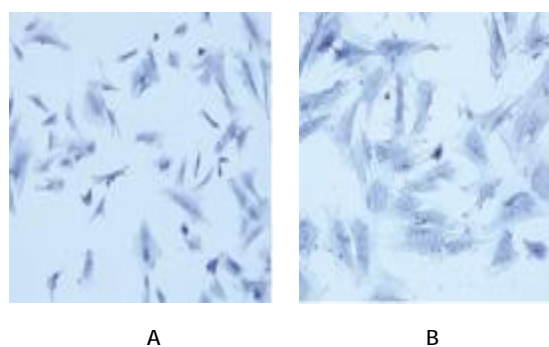
2.1 软骨细胞形态及存活率

原代软骨细胞初为卵圆形, 悬浮于培养液中, 培养 2 d 后细胞贴壁生长, 其余不能贴壁的细胞可通过换液去除。细胞贴壁以后, 逐渐铺展成多角形或梭形, 伸出短小的突出。高倍镜下观察到软骨细胞胞核清楚, 为圆形、椭圆形。5 d 后细胞融合至 $>80\%$, 呈集落性生长, 呈现典型的铺路石样改变。分离的原代软骨细胞浓度约为 2.5×10^5 个 / ml, 台盼蓝染色测定细胞存活率约为 90%。传代后的软骨细胞开始时同样为卵圆形, 贴壁后变为梭形或多角形。而贴壁时间较原代细胞短, 第 3 代软骨细胞约 36 h 即可完成贴壁。随着传代次数的增加, 细胞去分化现象明显, 细胞伸出伪足, 3 代以后的各代细胞增殖能力下降, 传代周期较前几代长。见图 1。

2.2 软骨细胞爬片甲苯胺蓝染色

软骨细胞均被染色, 细胞轮廓清晰。细胞核深染, 细胞质浅染, 两者分界清晰。细胞质内散在蓝紫色异染颗粒。见图 2。

有统计学意义 ($P < 0.05$)。这与 MTT 法得出的结论一致。见表 2 和图 4。



A: 软骨细胞爬片 ($\times 400$); B: 软骨细胞爬片 ($\times 800$)

图 2 软骨细胞爬片甲苯胺蓝染色

2.5 扫描电镜观察软骨细胞与 I/II 型复合胶原膜复合物

扫描电镜观察到复合胶原膜的孔径均一,平均为 100 μm 左右。软骨细胞铺展在复合胶原膜上,生长良好,部分细胞伸出伪足,呈现出聚集生长的趋势。高倍镜下观察到细胞膜表面的微绒毛和突起等结构,符合软骨细胞的基本特征。见图 5。

表 1 两组的 OD 值比较 (n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	第 2 天	第 4 天	第 6 天	第 8 天
细胞组	0.673 ± 0.388	0.802 ± 0.322	0.832 ± 0.237	0.845 ± 0.576
共培养组	1.071 ± 0.564	1.239 ± 0.442	1.259 ± 0.658	1.265 ± 0.447
t 值	1.838	2.527	1.931	1.822
P 值	0.041	0.021	0.069	0.085

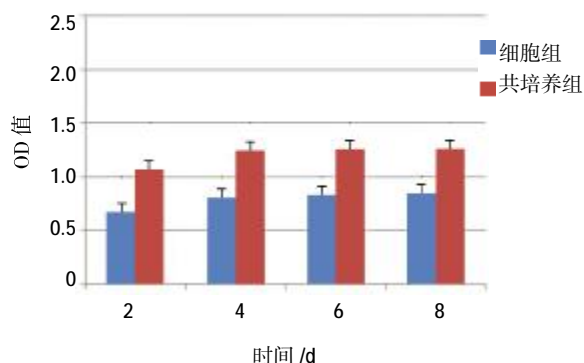


图 3 两组的 OD 值比较

表 2 两组的糖胺聚糖含量比较 (n=10, μg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	第 2 天	第 4 天	第 6 天	第 8 天
细胞组	14.13 ± 3.12	23.28 ± 3.26	23.96 ± 2.97	24.11 ± 3.59
共培养组	18.43 ± 2.17	27.32 ± 2.78	28.13 ± 3.14	29.47 ± 2.75
t 值	3.270	3.165	3.051	3.748
P 值	0.004	0.005	0.007	0.002

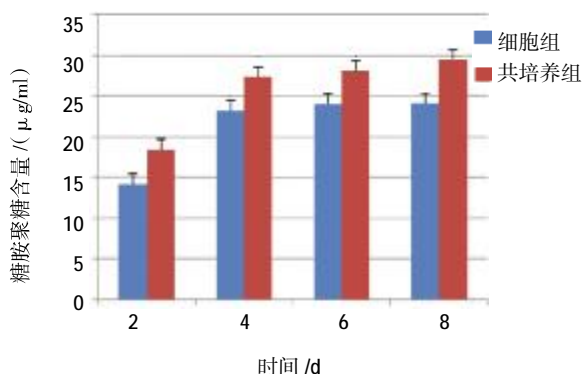
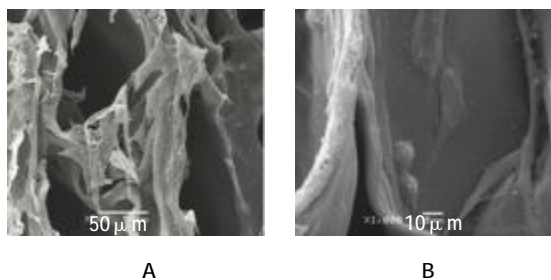


图 4 两组糖胺聚糖含量比较



A:复合物的扫描电镜图(×500);B:复合物的扫描电镜图(×1000)

图 5 软骨细胞胶原膜复合物的扫描电镜图

3 讨论

酶在软骨细胞的分离过程中起着至关重要的作用。胰蛋白酶可去除混于软骨块中的滑膜和结缔组织等,保证 II 型胶原酶能更好地与组织块接触。胰蛋白酶消化获取的软骨细胞纯度较高,混入其中的杂质较少。软骨细胞具有贴壁的特性,而杂质并不贴壁,可通过换液的方式去除杂质。II 型胶原酶的主要作用是把细胞基质中的胶原纤维降解成低分子短链多肽,从而将软骨细胞分离出来。值得强调的是,无论是胰蛋白酶还是 II 型胶原酶,在使用时一定要控制好时间和浓度,否则对软骨细胞会有所损伤。一般而言,胰蛋白酶的作用时间约为 0.5 h, II 型胶原酶的作用时间约为 2 h。在 II 型胶原酶进行第 2 次消化时可加入适量胎牛血清,这样可降低胶原酶对细胞的毒性,对细胞起到一定的保护作用。软骨细胞适合在温度为 37℃、二氧化碳浓度为 5% 的环境中培养。培养液的 pH 需调至 7.3 左右,培养液中需含有胎牛血清和维生素 C,以保证细胞正常增殖并维持细胞活性^[5-6]。软骨细胞贴壁后一般隔天换液。当细胞培养液由红色变为黄色时说明培养液中的营养已被耗尽,对细胞生长不利,需立即换液。

自软骨细胞移植技术问世以来,如何获取数量充足、表型稳定的种子细胞一直是困扰众多学者的一个难题。研究表明,软骨细胞传至 3 代以后,细胞会失去原有的形状,细胞表型发生改变,发生去分化^[7]。如何解决软骨细胞的去分化问题是组织工程领域的难点,但细胞聚集培养就能很好地解决这一问题。由于软骨细胞不断地分泌生长因子,在聚集培养的过程中,局部生长因子浓度升高,有利于细胞维持表型^[8]。同时,细胞与细胞基质之间进行信号传导,有利于细胞恢复表型。故在软骨细胞体外培养时,一定要注意接种的密度,防止因密度过低发生

去分化^[9-11]。对组织工程而言,选择表型稳定的软骨细胞是至关重要的。软骨细胞传至 5 代后呈长梭形,此时可断定细胞的表型发生改变^[12]。因此,软骨细胞移植一般用 3 代以内的软骨细胞。

本实验中笔者通过细胞形态观察和甲苯胺蓝染色对软骨细胞进行鉴定^[13-14]。软骨细胞贴壁前为卵圆形,贴壁后变成三角形、梭形,呈集落性生长,符合软骨细胞的形态^[15]。甲苯胺蓝是一种碱性染料,软骨细胞的细胞核及细胞质均为酸性,能与甲苯胺蓝的阳离子结合,细胞核被染成深蓝色,细胞质被染成浅蓝色。除此之外,因软骨细胞可特异性分泌 II 型胶原,故 II 型胶原免疫组织化学染色和免疫荧光染色也是很好的鉴定方法^[16]。细胞线粒体内含有琥珀酸脱氢酶,能把 MTT 还原为甲瓚,DMSO 能将甲瓚溶解。在一定细胞数范围内,用酶标仪测得 490 nm 波长处的 OD 值与细胞数成正比。MTT 法正是基于上述原理检测细胞活性。笔者研究发现,共培养 4 d 以内细胞增殖较快,活性较高,与国外的文献报道相符^[17]。糖胺聚糖水平检测与 MTT 法所得结论一致。

综上所述,两步酶法可成功分离出软骨细胞,细胞杂质较少,数量充足,表型稳定,生物活性好,是组织工程很好的种子细胞来源^[18]。笔者采用 I / II 型复合胶原膜作为支架材料,上层为 II 型胶原膜,比较粗糙,利于细胞附着、生长;下层为 I 型胶原膜,比较致密,可防止细胞流失。胶原膜在制备过程中需要使用多种试剂,也无法做到无菌操作。化学试剂和细菌污染均可影响细胞生长,故胶原膜与软骨细胞共培养之前需使用 75%乙醇浸泡,然后用培养液浸泡,保证细胞的培养环境中没有混入细菌和化学试剂。笔者发现,胶原膜和软骨细胞共培养时,同一天共培养组细胞的 OD 值要高于细胞组。在本实验中,无论是 MTT 法还是糖胺聚糖含量测定都证实该结论。

参 考 文 献:

- [1] ITO S, SATO M, YAMATO M, et al. Repair of articular cartilage defect with layered chondrocyte sheets and cultured synovial cells[J]. *Biomaterials*, 2012, 33: 5278-5286.
- [2] JACK F, BRIAN C, AMAN D. Clinical cartilage restoration: evolution and overview[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2011, 469: 2696-2705.
- [3] VANLAUWE J, SARIS DB, VICTOR J, et al. Five-year outcome of characterized chondrocyte implantation versus microfracture for symptomatic cartilage defects of the knee: early treatment matters[J]. *Am J Sports Med*, 2011, 39(12): 2566-2574.
- [4] WOODS A, JAMES CG, WANG GY, et al. Control of chondrocyte gene expression by actin dynamics:a novel role of cholesterol/Ror- α signaling in endochondral bone growth[J]. *Journal of Cellular and Molecular (Online)*, 2009, 13(9B): 3497-3516.
- [5] VAN OSCH GJ, VAN DER VEEN SW, VERWOERD-VERHOEF HL. In vitro redifferentiation of culture-expanded rabbit and human auricular chondrocytes for cartilage reconstruction[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2001, 107: 433-440.
- [6] 傅欣,段小宁,张继英,等. 自体血清与胎牛血清培养兔关节软骨细胞的生物学特性[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(46): 8599-8606.
- [7] 马涛,杨晓宇,温鹏,等. 胶原酶消化分离兔关节软骨细胞及体外聚集培养的观察[J]. *宁夏医科大学学报*, 2014, 36(1): 98-100.
- [8] DROR R, HANA A, ZVI N, et al. Characteristics of cartilage biopsies used for autologous chondrocytes transplantation[J]. *Cell Transplantation*, 2001, 10: 203-208.
- [9] 胡志俊,胡波,唐德志,等. 兔膝关节软骨细胞的分离培养及形态学特征[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(46): 8555-8558.
- [10] 赵明,陈竹,张旭乾,等. 关节软骨细胞体外培养及生物学特性的实验研究[J]. *川北医学院学报*, 2013, 28(2): 95-98.
- [11] CLAUS S, AUBERT-FOUCHER E, DEMOOR M, et al. Chronic exposure of bone morphogenetic protein-2 favors chondrogenic expression in human articular chondrocytes amplified in monolayer cultures[J]. *J Cell Biochem*, 2010, 111: 1642-1651.
- [12] TAKASHI H, TOMOE Y, LU HX, et al. Nuclear deformation and expression change of cartilaginous genes during in vitro expansion of chondrocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 374: 688-692.
- [13] TERRY DE, CHOPRA RK, OVENDEN J, et al. Differential use of alcian blue and toluidine blue dyes for quantification and isolation of anionic glycoconjugates from cell culture:application to proteoglycans and a high-molecular-weight glycoprotein synthesized by articular chondrocytes[J]. *Anal Biochem*, 2000, 285: 211-219.
- [14] 刘雷,韦庆军,陈管雄,等. 乳兔关节软骨细胞的分离、培养及生物学特性的观察[J]. *广西医科大学学报*, 2014, 31(3): 364-368.
- [15] 刘明东,盛天金,王万宗. 胰蛋白酶及 II 型胶原酶消化获取关节软骨细胞 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(46): 8551-8554.
- [16] 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.
- [17] WILLERS C, CHEN J, WOOD D, et al. Autologous chondrocyte implantation with collagen bioscaffold for the treatment of osteochondral defects in rabbits[J]. *Tissue Engineering*, 2005, 11(7/8): 1065-1076.
- [18] KUHNE M, JOHN T, EL-SAYED K, et al. Characterization of articular chondrocytes and articular/articular chondrocytes co-cultures in terms of an application in articular cartilage repair [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2010, 25: 701-708.

(申海菊 编辑)