

• 基础实验研究论著 •

新西兰兔关节软骨细胞分离培养与鉴定的实验研究

刘小荣, 张 笠, 高 武, 卢青云, 孟 研

(甘肃省第二人民医院检验科, 甘肃兰州 730020)

摘要:目的 探讨新西兰兔关节软骨细胞体外分离、培养及鉴定的实验方法。方法 单纯采用Ⅱ型胶原酶消化新西兰兔关节软骨组织以分离软骨细胞,经体外培养后,以形态学观察、甲苯胺蓝染色和Ⅱ型胶原蛋白细胞化学染色对软骨细胞进行鉴定。结果 倒置相差显微镜显示3代以内软骨细胞呈多角形或三角形,核为圆形或椭圆形;甲苯胺蓝染色可见细胞呈紫蓝色,细胞基质呈蓝色;Ⅱ型胶原蛋白细胞化学染色可见胞浆及胞膜出现棕黄色颗粒,细胞基质内也有少量棕黄色颗粒。结论 成功建立了新西兰兔关节软骨细胞分离及培养体系,3代以内软骨细胞生长良好,保持稳定的生物学特征,传代4次后出现“去分化”现象。

关键词:软骨; 细胞培养术; 兔

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.19.002

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2012)19-2307-02

Isolation, culture and identification of New Zealand rabbit articular cartilage cells

Liu Xiaorong, Zhang Li, Gao Wu, Lu Qingyun, Meng Yan

(Department of Clinical Laboratory, the Second Hospital of Gansu Province, Lanzhou, Gansu 730020, China)

Abstract: Objective To isolate, culture and identify rabbit articular cartilage cells in vitro. Methods Articular cartilage cells were obtained by type II collagen enzyme digestion from the cartilage of New Zealand white rabbits. The cells were identified by phase-contrast microscope, toluidine blue staining and type II collagen immunohistochemical staining. Results Morphology and fluorescence staining showed that cartilage cells presented with polygonal or triangle within three generations. Toluidine blue staining showed that cell plasma and membrane presented with dark blue. Type II collagen immunohistochemical staining showed clear cytoplasm and cell membrane presented with brown. Conclusion A system for isolation, culturing and identification New Zealand rabbit cartilage cells was successfully established. Cartilage cells could grow well within three generations and maintain stable biological characters. After fourth generation, cartilage cells might turn to dedifferentiation.

Key words: cartilage; cell culture techniques; rabbits

关节损伤、炎症及退行性病变均可通过影响软骨细胞而导致关节软骨破坏,因此软骨细胞是研究关节软骨生理和病理的常用体外模型。软骨细胞位于软骨基质内的软骨陷窝中,周围包裹着胶原纤维蛋白和蛋白聚糖等大分子构成的固态结构,因此体外分离培养软骨细胞存在一定难度^[1];同时软骨细胞增殖能力较低,随体外培养传代次数增加,Ⅱ型胶原和聚集蛋白聚糖表达量逐渐减少,进而出现“去分化”现象^[2-3]。因此,软骨细胞体外培养依然存在挑战。本研究采用Ⅱ型胶原酶消化法分离软骨细胞,并进行体外培养及鉴定,以期建立软骨细胞体外分离、培养体系,并研究其生物学特性。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 健康成年新西兰大白兔4只,体质量2.5~3.0 kg,清洁级,由甘肃中医学院动物实验中心提供[许可证:SCXK(甘)2011-0001],动物处理方法符合《关于善待实验动物的指导性意见》^[4]。

1.2 仪器与试剂 Ⅱ型胶原酶、MTT、DMSO、吡啶橙(美国Sigma),甲苯胺蓝(美国 Amresco),兔抗人Ⅱ型胶原单克隆抗体、免疫组织化学试剂盒(武汉博士德),倒置相差显微镜(日本 Olympus),CO₂细胞培养箱(美国 Thermo),Wellscan MK3 酶标仪(芬兰 Labsystems),DMEM 培养基、10%胎牛血清(FBS)、0.25%胰蛋白酶(美国 Gibco)。

1.3 方 法

1.3.1 关节软骨细胞的分离 剥离新西兰兔关节软骨组织,无菌条件下迅速转至超净工作台,用含100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素PBS冲洗3次,去除软骨组织沾染的血液和脂肪组织;在DMEM培养基中将软骨组织切成约1×1×1

mm³大小碎片,将碎片移至20 mL无菌离心管中,按体积比1:3加入0.2 mg/mLⅡ型胶原蛋白酶,37℃过夜;次日向离心管中加入3~5 mL DMEM培养基(含10%FBS),经200目细胞筛过滤后收集过滤液,1 000 r/min离心5 min,弃上清液,用PBS漂洗细胞沉淀2次后离心弃去上清液并收集细胞^[5-6]。

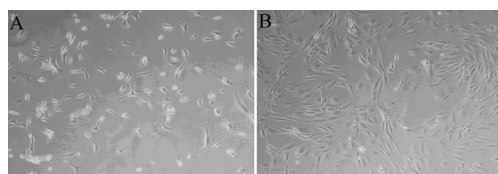
1.3.2 关节软骨细胞的培养 将收集的细胞接种至25 mL培养瓶中,用DMEM培养基(含10%FBS)进行培养,每3天换液1次,原代软骨细胞生长覆盖瓶底80%以上时,用0.25%胰蛋白酶(含0.02% EDTA)消化,进行传代培养^[7]。

1.3.3 关节软骨细胞的鉴定 (1)形态学观察:用倒置相差显微镜观察培养软骨细胞的形态,判断细胞生长状况及生命活动规律。取生长状态良好原代及第1代软骨细胞,95%乙醇固定10 min,干燥后加入足量0.01%吡啶橙染液染色5 min,PBS漂洗1 min,0.1 mol/L氯化钙分色1 min,PBS漂洗3次,每次数秒,荧光显微镜下观察并拍照。(2)甲苯胺蓝染色:软骨细胞甲苯胺蓝染色方法参照文献^[8]。(3)Ⅱ型胶原免疫细胞化学染色:软骨细胞Ⅱ型胶原免疫细胞化学染色方法参照文献^[9]。(4)增殖功能测定:软骨细胞增殖功能测定方法参照文献^[10]。

2 结 果

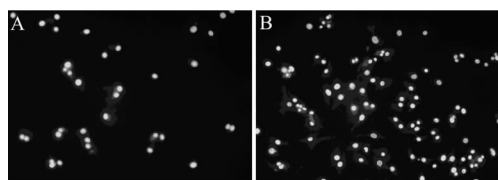
2.1 软骨细胞形态学特征 在倒置相差显微镜下观察,原代软骨细胞培养8~12 h后贴壁,2~3 d后开始伸展,细胞体积较小,呈多角形(图1A);12~15 d后形成单层细胞,呈梭形并有少量突起,细胞核较大,细胞排列紧密,有较强折光性,呈“铺路石”样。第1代软骨细胞刚接种时呈球形,12 h开始贴壁,24 h完成铺伸,多呈三角形、长梭形或多角形,72 h后开始增殖,单层生长,彼此不相接触(图1B)。软骨细胞增长至爬满瓶底

时变为圆形,胞体丰满,细胞质均匀,核大而圆并且互连接成“铺路石”样结构。长期培养可形成肉眼可见的白色“类软骨样”物质。吖啶橙荧光染色显示软骨细胞核呈清晰绿色荧光,第 1 代细胞贴壁时间较原代软骨细胞短,且增殖速度加快(图 2)。



A: 新西兰兔原代关节软骨细胞接种 3 d 后(×100); B: 新西兰兔第 1 代关节软骨细胞接种 3 d 后(×100)。

图 1 倒置显微镜观察

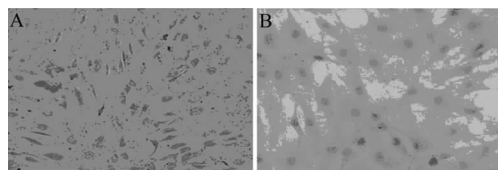


A: 新西兰兔原代关节软骨细胞接种 3 d 后(×200); B: 新西兰兔第 1 代关节软骨细胞接种 3 d 后(×200)。

图 2 吖啶橙荧光染色观察

2.2 甲苯胺蓝染色结果 甲苯胺蓝染色可见软骨细胞呈紫蓝色,细胞基质呈蓝色,软骨细胞内及细胞周围有蓝紫色异染颗粒,证明软骨细胞合成和分泌蛋白聚糖(图 3A)。

2.3 II 型胶原免疫细胞化学染色结果 II 型胶原免疫组化染色可见软骨细胞胞浆及胞膜染成棕黄色,细胞基质内可见少量棕黄色颗粒,胞核不着色,证明细胞表达软骨细胞特征性 II 型胶原,且主要分布在细胞质和细胞膜上(图 3B)。



A: 甲苯胺蓝染色(×200); B: II 型胶原免疫细胞化学染色(×200)。

图 3 第 1 代新西兰兔软骨细胞染色观察

2.4 软骨细胞生长曲线 第 1 代软骨细胞培养 0~3 d 增殖缓慢,4~6 d 快速增殖并达到高峰,7~9 d 趋于平缓,10~13 d 呈下降趋势(图 4)。

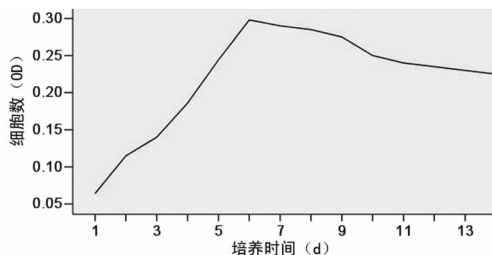


图 4 第 1 代新西兰兔软骨细胞生长曲线

3 讨 论

3.1 新西兰兔关节软骨细胞分离 目前,国外多采用链霉菌蛋白酶和胶原酶序贯消化法分离软骨细胞^[11-12],国内则多采用胰蛋白酶和 II 型胶原蛋白酶序贯消化法^[1]。由于酶序贯消化法操作步骤复杂,且两种酶同时作用可能会加重对软骨细胞的

损伤。因此,有学者单纯用 II 型胶原蛋白酶消化软骨组织以分离软骨细胞,且分离获得的软骨细胞活性保持良好^[3,13-14]。本课题组曾采用胰蛋白酶和 II 型胶原蛋白酶序贯消化法分离新西兰兔软骨细胞,发现分离获得的原代软骨细胞贴壁困难。为此,本研究改用单纯 II 型胶原蛋白酶消化软骨组织,以建立新西兰兔软骨细胞体外分离及培养体系。单纯 II 型胶原蛋白酶消化法分离软骨细胞,可避免胰蛋白酶和 II 型胶原蛋白酶的反复杂化,也减少了对分离细胞进行反复洗涤、离心的步骤。本研究证实此法不仅简化了软骨细胞分离步骤,更减少了反复消化、洗涤、离心对软骨细胞造成的损伤,使分离获得的原代软骨细胞具有良好活性。

3.2 新西兰兔关节软骨细胞体外培养 软骨细胞随着体外培养传代次数增加和培养时间延长,会因表型不稳定而出现“去分化”现象^[3],在形态上表现为逐渐从多角形和圆形变为类似成纤维细胞样的扁平、长梭形^[15],在功能上主要表现为软骨细胞特异性标志物 II 型胶原蛋白和聚集蛋白聚糖表达减少或丧失^[16]。Kang 等^[17]研究发现,随着传代次数增加,软骨细胞增殖能力下降而细胞凋亡增加,第 2 代软骨细胞高表达 II 型胶原蛋白而低表达 I 型胶原蛋白,传代至第 5 代时 II 型胶原蛋白表达降低而 I 型胶原蛋白表达升高,表明软骨细胞发生“去分化”;也有研究显示原代软骨细胞传至第 2 代时已发生“去分化”^[18]。目前普遍认为体外单层培养软骨细胞在传至 3~4 代后,软骨合成基质相关基因表达下降,难以保留软骨细胞原有表型而发生“去分化”^[3]。本实验结果显示,第 3 代及以前新西兰兔软骨细胞呈多角形,没有向成纤维样细胞转变,甲苯胺蓝染色和 II 型胶原蛋白细胞化学染色结果表明软骨细胞可良好地表达聚集蛋白聚糖和 II 型胶原蛋白,证明细胞具有良好活性。

3.3 新西兰兔关节软骨细胞鉴定 软骨细胞鉴定主要通过测定聚集蛋白聚糖(甲苯胺蓝染色法)和 II 型胶原蛋白(细胞化学染色法)^[19]。本实验中,甲苯胺蓝染色显示新西兰兔软骨细胞呈紫蓝色,细胞基质呈蓝色;II 型胶原蛋白细胞化学染色可见胞浆及胞膜染成棕黄色,细胞基质内也有少量棕黄色颗粒。以上结果显示,第 3 代及以前的软骨细胞聚集蛋白聚糖和 II 型胶原蛋白表达阳性,具有良好生物学活性和功能。

综上所述,II 型胶原蛋白酶消化法可在短时间内获得高纯度和高存活率的软骨细胞,形态学、甲苯胺蓝染色及 II 型胶原蛋白细胞化学染色证实第 3 代及以前的细胞保留了稳定的软骨细胞表型特征,具有良好生物学活性和功能。

参考文献

- [1] 刘军,戴刚,杨柳. 骨关节炎软骨细胞的体外分离培养[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2008,12(46):9045-9048.
- [2] 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(6):1642-1651.
- [3] 张艳,柴岗,刘伟,等. 体外培养过程中去分化的人软骨细胞基因表达谱的变化[J]. 中华整形外科杂志,2007,23(4):331-334.
- [4] 中华人民共和国科技部. 关于善待实验动物的指导性意见[Z]. 北京:科技部,2006.
- [5] 宋鸿,陈炜. 兔软骨细胞的分离培养及其生物学特征的检测[J]. 遵义医学院学报,2008,31(6):573-578.
- [6] 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.

2.2 RM 吸收峰检测 RM 饱和溶液吸收峰主要在 203、215、317 nm 波长处,在 400~600 nm 波长处无明显吸收峰,见图 1。

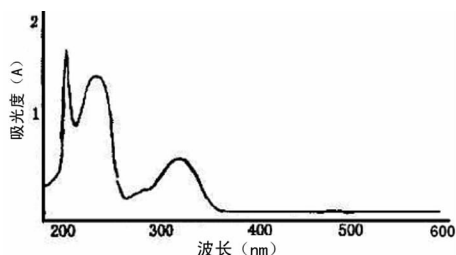


图 1 RM 饱和溶液吸收曲线

2.3 反应产物吸收曲线 Cr、RM 与苦味酸反应的产物在 475、480 nm 波长处出现吸收峰,见图 2。

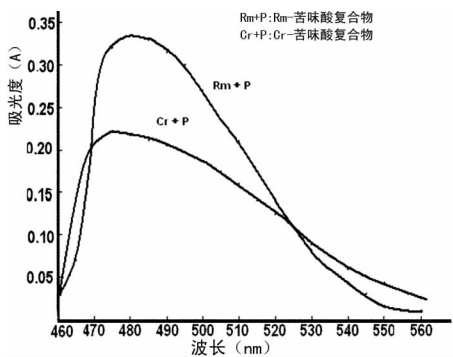


图 2 反应产物吸收曲线

3 讨论

本研究证实 RM 可导致 Cr 检测结果假性增高,原因在于 RM 与苦味酸的反应产物在 480 nm 处有吸收峰,与 Cr 检测波长 510 nm 十分接近。因此,如果血清标本中存在 RM,可导致 Cr 检测过程中 510 nm 检测波长下的吸光度增加,导致血清 Cr 检测结果假性增高。RM 是新一代噻唑烷二酮类药物,能增强肝脏、脂肪及肌肉组织胰岛素受体的敏感性,促进葡萄糖的摄取和利用,广泛用于 2 型糖尿病的治疗^[6-9]。而糖尿病肾病是糖尿病患者是最常见,也是后果最为严重的并发症之一。监测糖尿病患者血清 Cr 水平有助于科学、客观地评估患者肾功能,

并据此制定相应的治疗措施。本研究发现 RM 可导致 Cr 检测结果假性增高,说明有必要在临床工作中加强分析前质量控制,尤其是对于接受 RM 治疗的糖尿病患者,更应重视标本采集的时间,避免在服药后立即采集血液标本进行检测,从而将 RM 对 Cr 检测的干扰效应降至最小,进而为临床提供更为真实、可信的检测结果^[10-11]。

参考文献

- [1] 陈文彬,王有赤. 诊断学[M]. 5 版. 北京:人民卫生出版社,2001:380-381.
- [2] Vasiliades J. Reaction of alkaline sodium picrate with creatinine: I. kinetics and mechanism of formation of the mono-creatinine picric acid complex[J]. Clin Chem,1976,22(10):1664-1671.
- [3] Kroll MH, Roach NA. Mechanism of interference with the Jaffe reaction for creatinine[J]. Clin Chem,1987,33(7):1129-1132.
- [4] 顾新民. 碱性苦味酸测定肌酐影响因素[J]. 中华现代中西医杂志,2005,3(4):356-357.
- [5] 张传洽. Jaffe 速率法、电极法和酶法测定肌酐结果的比较[J]. 国际检验医学杂志,2006,27(3):383-384.
- [6] 李斌. 罗格列酮对糖尿病肾病患者 CRP、IL-2、IL-6、TNF- α 水平的影响[J]. 山东医药,2008,48(20):88.
- [7] 张群力,陈东东. 罗格列酮联合氯沙坦治疗糖尿病早期肾病疗效观察[J]. 西北药学杂志,2009,24(4):303-304.
- [8] Toruner F, Altionova AE, Bukan N, et al. Plasma visfatin concentrations in subjects with type 1 diabetes mellitus[J]. Horm Res, 2009,72(1):33-37.
- [9] Beysen C, Murphy EJ, Nagaraja H, et al. A pilot study of the effects of pioglitazone and rosiglitazone on de novo lipogenesis in type 2 diabetes[J]. J Lipid Res,2008,49(12):2657-2663.
- [10] Plebani M, Carraro P. Mistake in a stat laboratory: types and frequency[J]. Clin Chem,1997,43(9):1348-1351.
- [11] Carraro P, Plebani M. Errors in a stat laboratory: types and frequencies 10 years later[J]. Clin Chem,2007,53(9):1338-1342.

(收稿日期:2012-05-23)

(上接第 2308 页)

- [7] 叶蕪芝,李西海,梁文娜,等. 软骨细胞体外分离培养与鉴定的实验研究[J]. 福建中医学院学报,2008,18(6):32-37.
- [8] 李兵,吴志宏,刘广源,等. 三种软骨细胞分离培养方法对细胞骨架影响的比较[J]. 中华实验外科杂志,2007,24(9):1108-1110.
- [9] 匡世军,刘志光,何一青,等. 兔颞下颌关节盘纤维软骨细胞分离培养的实验研究[J]. 中山大学学报:医学科学版,2006,27(3):318-321.
- [10] 张志光,郑卫平,苏凯. 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.
- [11] Chockalingam PS, Varadarajan U, Sheldon R, et al. Involvement of protein kinase Czeta in interleukin-1beta induction of ADAMTS-4 and type 2 nitric oxide synthase via NF-kappa B signaling in primary human osteoarthritic chondrocytes[J]. Arthritis Rheum,2007,56(12):4074-4083.
- [12] Ho LJ, Lin LC, Hung LF, et al. Retinoic acid blocks pro-inflammatory cytokine-induced matrix metalloproteinase production by down-regulating JNK-AP-1 signaling in human chondrocytes[J]. Biochem Pharmacol,2005,70(2):200-208.
- [13] Ryu JH, Chun JS. Opposing roles of WNT-5A and WNT-11 in interleukin-1beta regulation of type II collagen expression in articu-

- lar chondrocytes[J]. J Biol Chem,2006,281(31):22039-22047.
- [14] 张莉,郭全义,睦翔,等. 羊软骨细胞在生物反应器中的培养和扩增[J]. 中国矫形外科杂志,2006,14(6):446-448.
- [15] Schulze-Tanzil G, Muller RD, Kohl B, et al. Differing in vitro biology of equine, ovine, porcine and human articular chondrocytes derived from the knee joint: an immunomorphological study[J]. Histochem Cell Biol,2009,131(2):219-229.
- [16] Fukui N, Ikeda Y, Tanaka N, et al. $\alpha v \beta 5$ integrin promotes dedifferentiation of monolayer-cultured articular chondrocytes[J]. Arthritis Rheum,2011,63(7):1938-1949.
- [17] Kang SW, Yoo SP, Kim BS. Effect of chondrocyte passage number on histological aspects of tissue-engineered cartilage[J]. Biomed Mater Eng,2007,17(5):269-276.
- [18] Ahmed N, Gan L, Nagy A, et al. Cartilage tissue formation using redifferentiated passaged chondrocytes in vitro[J]. Tissue Eng Part A,2009,15(3):665-673.
- [19] Enomoto H, Inoki I, Komiya K, et al. Vascular endothelial growth factor isoforms and their receptors are expressed in human osteoarthritic cartilage[J]. Am J Pathol,2003,162(1):171-181.

(收稿日期:2012-05-12)