

本文引用:王林林,董玉珍.兔软骨细胞的体外分离、培养及鉴定[J].新乡医学院学报,2015,32(4):310-313.

【基础研究】

兔软骨细胞的体外分离、培养及鉴定

王林林, 董玉珍

(新乡医学院第一附属医院骨外二科,河南 卫辉 453100)

摘要: **目的** 探讨体外软骨细胞的分离培养方法。**方法** 采用机械-双酶消化法对兔软骨组织进行消化,以获得软骨细胞,经过体外培养传代后,通过观察显微形态学、细胞增殖生长曲线及Ⅱ型胶原蛋白免疫组织化学染色对软骨细胞进行鉴定。**结果** 成功建立体外培养兔软骨细胞的培养体系。显微镜显示原代培养的软骨细胞呈多角形或三角形贴壁生长,传代5次后出现“纤维样分化”。物理形态及免疫组织化学染色显示5代以内的细胞可以保持稳定的生物学特征。**结论** 本研究建立的软骨细胞分离方法简单、方便。

关键词: 兔;软骨细胞;细胞培养;体外培养;鉴定

中图分类号: Q813.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2015)04-0310-04

Separation, cultivation and identification of rabbit chondrocyte *in vitro*

WANG Lin-lin, DONG Yu-zhen

(The Second Department of Osteology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To explore the method of separating and culturing the rabbit chondrocyte *in vitro*. **Methods** The chondrocyte of rabbits was obtained by using mechanical-double enzymatic digestion method. The chondrocyte was cultured *in vitro* after passage; and the chondrocyte was identified by observing its micromorphology, drawing cell proliferative growth curve and immunohistochemical staining with type II collagen protein. **Results** Culture system of rabbit chondrocyte *in vitro* was established successfully. Microscopy showed that primary cultured chondrocyte was polygonal or triangular and adherent grew; "fiber-like differentiation" appeared after passage five times. The results of physical form and immunochemical staining showed that the cells within five generations could maintain stable biological characteristics. **Conclusion** The method of separating rabbit chondrocyte *in vitro* in this study is simple and convenient.

Key words: rabbit; chondrocytes; cell culture; culture *in vitro*; identification

骨性关节炎是一种以关节软骨退行性变和继发性骨质增生为特性的慢性关节疾病,因关节软骨退化损伤导致关节边缘和软骨下骨反应性增生所致,是临床上多发的老年退行性疾病。随着我国老龄化人数的增加,骨性关节炎的发病率越来越高,该病导致的疼痛及活动不便严重影响老年患者的生活^[1]。目前对该病的治疗仍缺乏特效药,软骨的破坏可能会影响到软骨细胞,导致软骨细胞分泌炎性细胞因子。再生软骨细胞移植能有效治疗软骨损伤,根治骨性关节炎。但传统培养软骨细胞的方法较复杂、繁琐,且容易污染,导致软骨细胞死亡、成活率和质量较低;因此寻找简单的体外培养软骨细胞的方法对骨性关节炎的治疗非常重要。故本研究拟建立一

种有效的体外软骨细胞分离培养的方法,以获取大量分裂活跃且具有高活力的软骨细胞,为软骨细胞成功移植、治愈骨关节炎提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂 CO₂ 恒温培养箱、双人单面超净工作台、恒温振荡培养箱(河南中良科学仪器有限公司),低温高速离心机(长沙英泰仪器有限公司),普通光学显微镜、倒置荧光显微镜、倒置显微镜(上海蔡康光学仪器厂),酶标仪(上海闪谱生物科技有限公司)。达尔伯克改良伊格乐培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM/F12)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、胰蛋白酶购自美国Gibco公司,Ⅱ型胶原酶、四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)、二甲基亚砜购自美国Sigma公司,青-链霉素双抗购自美国HyClone公司,兔抗兔Ⅱ型胶原一抗、羊抗兔生物素标记二抗购自上海生工生物工程有限公司,二氨基联苯胺(3,3'-

DOI: 10.7683/xyxyxb.2015.04.006

收稿日期: 2014-12-08

作者简介: 王林林(1984-),男,河南驻马店人,硕士研究生在读,研究方向: 关节与脊柱疾病。

通信作者: 董玉珍(1970-),女,河南新乡人,博士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向: 关节与脊柱疾病; E-mail: dongyuzhen1998@163.com。

diaminobenzidine, DAB) 显色剂购自中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 实验动物 4 周龄雄性新西兰白兔 2 只, 体重约 0.8 kg, 购于新乡医学院实验动物中心。

1.3 方法

1.3.1 兔软骨细胞的分离 借鉴高春华等^[2]的体外分离关节软骨细胞的方法, 取 4 周龄雄性新西兰白兔, 常规处死后无菌操作取出兔膝关节软骨, 采用机械-双酶消化法在超净工作台上分离关节组织, 提取软骨组织, 将其剪成 1 mm × 1 mm 碎片, 放入容积 20 mL 小烧杯中, 磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffered saline, PBS) 冲洗 3 次, 加入质量分数 0.1% 乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 5 mL, 常温下静置 20 min 后离心弃上清液, 加入 3 倍体积的质量分数 0.25% 胰蛋白酶, 置于 37 °C 恒温振荡器内消化 40 min, 轻轻吹打弃去上清液, PBS 冲洗 2 次, 按 1 : 1 加入质量分数 0.2% II 型胶原酶和质量分数 0.25% 胰蛋白酶各 5 mL, 置于 37 °C 恒温振荡器内消化 20 min, 4 °C 低温 $1\ 000\ r \cdot \min^{-1}$ 离心 5 min, 弃上清液, 加入 6 mL 含质量分数 0.2% II 型胶原酶消化液置于 37 °C 恒温振荡器内消化, 每 90 min 取上清液 1 次, 剩余烧杯内更换消化液继续消化, 取含体积分数 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基至上清液中和胰蛋白酶, 高速离心收集沉淀细胞, 所收集细胞重悬于 DMEM/F12 培养液 (含体积分数 10% FBS, 青、链霉素各 $100\ mg \cdot L^{-1}$) 中。

1.3.2 兔软骨细胞的培养 采用锥虫蓝染色法对细胞悬液进行计数, 将计数后的细胞悬液以 $(4 \sim 6) \times 10^5$ 接种于 $25\ cm^2$ 的培养瓶, 每瓶加入 4 mL 细胞悬液, 37 °C 体积分数 5% CO_2 恒温恒压培养箱内培养。常规换培养液, 当软骨细胞生长至约占瓶底 80% 时进行传代培养。消化酶分离后在倒置显微镜下若观察到细胞已逐渐变为圆形, 并且有漂浮的趋势, 迅速终止消化后低温高速离心, 弃上清液, 重新加入含体积分数 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液, 轻轻吹打细胞使其均匀分布, 调整细胞浓度, 使之成为 $1 \times 10^8\ L^{-1}$, 接种于培养瓶内进行传代培养, 或培养板内用于实验^[3]。

1.3.3 软骨细胞计数及活性鉴定 应用苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色对软骨细胞进行计数, 软骨细胞爬片后, 经 HE 染色倒置荧光显微镜下观察; 备细胞混悬液, 用吸管向洁净 Eppendorf 离心管内滴加 1 滴细胞悬液、1 滴锥虫蓝、8 滴 DMEM/F12 培养液, 1 ~ 2 min 后, 用血球计数板进行细胞计数。计数 4 个大方格细胞总数为 N, 每毫升活细胞

数根据下列公式计算: $N = 4$ 大格细胞总数 / 4 × 稀释倍数 × 10^4 。细胞活性率 = 4 大格活细胞数 / 4 大格细胞总数 × 100%。

II 型胶原蛋白细胞免疫组织化学染色进行软骨细胞活性鉴定, 将细胞接种在盖玻片上, 爬片生长成单层后取出, PBS (pH 7.4) 冲洗 3 次, 每次 5 min, 以体积分数 4% 多聚甲醛固定 30 min, 体积分数 3% 过氧化氢室温下孵育 5 min。使用含体积分数 10% FBS 培养基封闭孵育 10 min, 弃去血清, 滴加 1 : 100 兔抗兔 II 型胶原一抗, 4 °C 孵育过夜, 取出后常温下静置 30 min, PBS (pH 7.4) 冲洗 3 次, 每次 5 min; 滴加羊抗兔生物素标记的二抗, 室温孵育 10 min, PBS (pH 7.4) 冲洗 3 次, 每次 5 min。DAB 显色, 苏木精复染, 中性快干胶封片显微镜下观察。

1.3.4 绘制细胞增殖生长曲线 采用 MTT 比色法绘制软骨细胞生长曲线^[4], 取生长状态良好的软骨细胞 (第 2、3 代) 接种于 96 孔酶标板中, 接种细胞浓度为 $1 \times 10^8\ L^{-1}$, 设置空白调零孔 2 孔, 各代软骨细胞接种 48 孔, 每孔 100 μL , 共接种 2 块板, 隔日换液。每日随机抽取 6 孔, 连续观察 8 d 后, 每孔加入过滤后 $5\ g \cdot L^{-1}$ MTT 溶液 40 μL , 37 °C 恒温箱作用 4 h 后, 吸弃上清液, 每孔加入 200 μL 二甲基亚砷溶液, 37 °C 恒温振荡 5 min 后在波长为 490 nm 的酶标仪中测吸光度值 (A); 应用 Prism 软件绘制细胞增殖生长曲线。

2 结果

2.1 倒置显微镜下观察细胞 倒置显微镜下观察分离获取的原代软骨细胞呈圆球形, 悬浮状, 锥虫蓝活性检测实验显示细胞活性率约 90%。细胞悬浮 4 h 逐渐开始贴壁, 24 ~ 72 h 内贴壁完成, 细胞开始伸展, 48 h 后形成单层细胞, 细胞逐渐变形为三角形或多角形, 细胞排列紧密, 细胞核较大, 呈椭圆形或圆形, 有较强折光性, 细胞质丰富, 呈梭形, 有少量突起。5 d 后, 软骨细胞呈不规则的卵圆形, 可见成簇、集落样, 细胞外观为多角形, 多层生长的细胞被其分泌的基质所包埋, 肉眼观形成似结节状组织, 单层生长的细胞呈典型的铺路石样。7 d 后细胞明显增殖, 软骨细胞可以分泌大量细胞基质, 沉积在细胞周围的基质将软骨细胞互相连接起来融合成片, 传 1 代后的软骨细胞生长增殖速度加快, 约 12 h 细胞贴壁并增殖生长, 细胞外形仍以圆形、椭圆形为主, 约 5 d 后融合瓶底, 随着细胞传代数的增加, 细胞开始呈现梭形状态, 且生长开始变得缓慢, 传代周期延长; 见图 1。



A: 原代培养 48 h; B: 原代培养 96 h; C: 传 1 代培养 48 h; D: 传 2 代培养 48 h; E: 传 3 代培养 48 h。

图 1 倒置显微镜下兔软骨细胞形态(×100)

Fig. 1 Micromorphology of rabbit chondrocyte under inverted microscope(×100)

2.2 兔软骨细胞生长曲线 以第 2、3 代软骨细胞生长时的计数情况,利用 MTT 绘制其生长曲线,第 2、3 代软骨细胞经培养后生长曲线呈“S”型,1~3 d 细胞贴壁缓慢生长,4~5 d 细胞进入对数增殖期,6~8 d 增殖平稳,呈平台期。第 2 代软骨细胞的生长曲线与第 3 代基本相同,但第 3 代软骨细胞增殖期比第 2 代长,第 2 代平台期比第 3 代短。

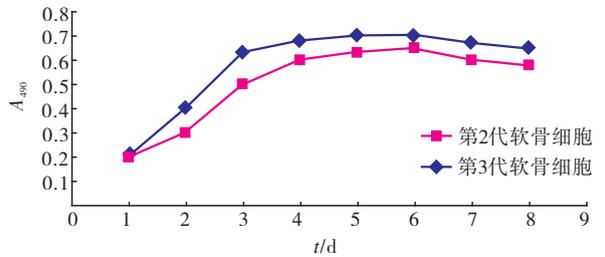
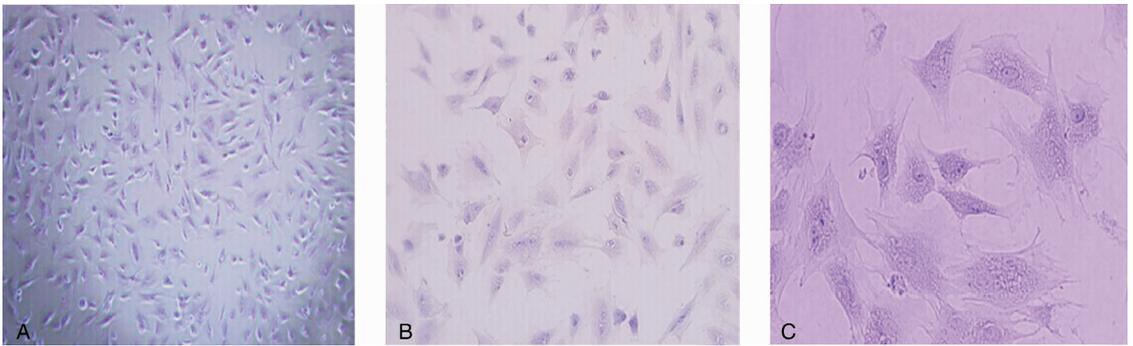


图 2 第 2 代和第 3 代兔软骨细胞增殖生长曲线

Fig. 2 Growth curve of the second and the third generations of rabbit chondrocyte

2.3 HE 染色 软骨细胞爬片后,经 HE 染色倒置荧光显微镜下观察,细胞核淡染呈紫色圆泡,细胞呈三角形、多角形、椭圆形状,细胞质基质红染,细胞质及细胞周围有紫红色或红色异染出现(图 3)。



A: ×100; B: ×200; C: ×400。

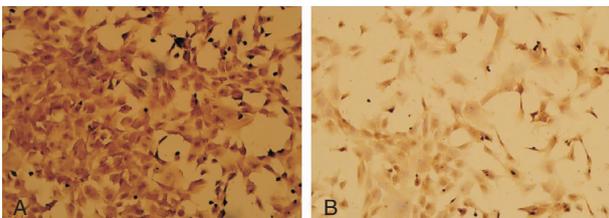
图 3 兔软骨细胞形态(HE 染色)

Fig. 3 Morphology of rabbit chondrocyte(HE staining)

2.4 II 型胶原蛋白免疫组织化学染色 II 型胶原蛋白免疫组织化学染色结果可见软骨细胞的细胞质及细胞膜呈棕黄色,细胞质基质内可见少量棕黄色颗粒,细胞核不着色(图 4A)。软骨细胞随着传代次数的增加,细胞质基质及细胞质的棕黄色着色逐渐减弱(图 4B)。

3 讨论

本实验采用机械-双酶消化法对兔软骨组织进行消化,可简化消化步骤并缩短消化时间,提高细胞的活性率和获得率,所获软骨细胞损伤小,活性好,增殖力强,表型稳定;较传统方法更简单,操作步骤明显减少,这就减少了引起污染的机会。细胞因消化酶造成的化学损伤及离心造成的物理损伤明显减少,软骨细胞与消化酶的接触时间从 6~8 h 缩短为 1.5 h,离心次数也明显减少,提高了细胞培养的成活率。软骨细胞缺乏特异性标志物,蛋白聚糖及 II 型胶原蛋白是评价软骨细胞功能的主要指标,属于软骨细胞特征性的分泌物^[6]。本研究通过 II 型胶原蛋白细胞染色可见软骨细胞细胞质及细胞膜染成棕黄色,细胞质基质内可见少量的棕黄色颗粒,细胞核不着色,软骨细胞经传代后细胞质及基质的棕黄



A: 第 2 代软骨细胞; B: 第 4 代软骨细胞。

图 4 兔软骨细胞 II 型胶原蛋白(免疫组织化学染色,×200)

Fig. 4 Type II collagen protein of rabbit chondrocyte (immunohistochemical staining, ×200)

色着色逐渐减弱,通过观察培养至第5代后软骨细胞的形态及生物学特征均有变化。这些形态学变化与胡志俊等^[7]报道基本一致。本研究明显提高了软骨细胞的传代次数并能保持细胞的特性。

骨性关节炎是关节表面软骨损伤的一种临床表现,关节软骨主要由软骨细胞和基质组成,因其无血管及淋巴管,损伤后自我修复能力较弱,至今仍缺乏改善骨性关节炎病情进展的有效治疗方法,软骨移植是当前较为有效的治疗方法^[8]。软骨移植主要有骨软骨移植和软骨细胞移植;软骨细胞移植又分为异体软骨细胞移植和自体软骨细胞移植,自体软骨细胞移植来源有限并可造成供区的破坏,异体软骨细胞移植则容易造成免疫排斥反应,均给软骨移植带来困难。软骨细胞培养即自体软骨细胞在体外培养扩增后接种到一种生物相容性良好、具有生物可降解性及一定三维空间结构的生物材料支架上,形成细胞材料复合物,然后移植入体内形成某种结构和功能的组织和器官^[9],是治疗骨性关节炎的有效方法。

本研究建立了简便快捷获取高纯度软骨细胞的方法,对软骨细胞的生长、传代、鉴定等提供了实验研究基础,也为下一步的软骨细胞移植创造了条件。

参考文献:

- [1] Altman R, Asch E, Bloch D, *et al.* Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis; classification of osteoarthritis of the knee [J]. *Arthritis Rheum*, 1986, 29 (8) : 1039-1049.
 - [2] 高春华,张仲文. 人关节软骨细胞体外培养的传代特点及鉴定 [J]. *武警医学*, 2007, 18 (12) : 922-925.
 - [3] 秦俊,陈廖斌,王辉. 人骨关节炎软骨细胞的体外培养 [J]. *武汉大学学报*, 2007, 28 (2) : 129-133.
 - [4] Lin Z, Willers C, Xu J, *et al.* The chondrocyte: biology and clinical application [J]. *Tissue Eng*, 2006, 12 (7) : 1971-1984.
 - [5] Duke P J, Daane E L, Montufar-Solis D. Studies of chondro-genesis in rotating system [J]. *J Cell Biochem*, 1993, 51 (3) : 274-282.
 - [6] 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的影响比较 [J]. *中华实验外科杂志*, 2007, 24 (9) : 1108-1110.
 - [7] 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.
 - [8] Giovannini S, Diaz-Romero J, Aigner T, *et al.* Micromass co-culture of human articular chondrocytes and human bone marrow mesenchymal stem cell to investigate stable neo-cartilage tissue formation *in vitro* [J]. *Eur Cell Mater*, 2010, 20: 245-259.
 - [9] Chiang H, Jiang C C. Repair of articular cartilage defects: review and perspectives [J]. *J Formos Med Assoc*, 2009, 108 (2) : 87-101.
- (本文编辑: 杨 博 英文编辑: 杨 博)
-
- (上接第 309 页)
- [4] Asami K. Treatment strategy for activating EGFR-mutated non-small cell lung cancer after failure of first-generation EGFR-TKIs [J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 2014, 41 (5) : 533-538.
 - [5] Zhang L, Zhao G, Hou Y, *et al.* The experimental study on the treatment of cytokine-induced killer cells combined with EGFR monoclonal antibody against gastric cancer [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2014, 29 (3) : 99-107.
 - [6] 刘桂举,梅家转,张晓娟,等. 厄洛替尼增强肺腺癌 A549 细胞对 CIK 细胞杀伤的敏感性 [J]. *中国肿瘤临床*, 2013, 40 (11) : 617-620.
 - [7] 李瑞君,梅家转,禹萌,等. 顺铂、氟尿嘧啶增强食管癌细胞 NKG2D 配体的表达及 CIK 细胞的杀伤活性 [J]. *肿瘤防治研究*, 2012, 39 (7) : 765-768.
 - [8] 张晓娟,梅家转,赵继智,等. 顺铂对 CIK 细胞杀伤肺腺癌 A549 细胞敏感性影响的研究 [J]. *中华肿瘤防治*, 2013, 20 (16) : 1229-1231.
 - [9] Ullrich E, Koch J, Cerwenka A, *et al.* New prospects on the NKG2D/NKG2DL system for oncology [J]. *Oncoimmunology*, 2013, 2 (10) : e26097.
 - [10] Paschen A, Baingo J, Schadendorf D. Expression of stress ligands of the immunoreceptor NKG2D in melanoma: regulation and clinical significance [J]. *Eur J Cell Biol*, 2014, 93 (1/2) : 49-54.
 - [11] Huergo-Zapico L, Acebes-Huerta A, López-Soto A, *et al.* Molecular bases for the regulation of NKG2D ligands in cancer [J]. *Front Immunol*, 2014, 5 : 106.
 - [12] Marcus A, Gowen B G, Thompson T W, *et al.* Recognition of tumors by the innate immune system and natural killer cells [J]. *Adv Immunol*, 2014, 122 : 91-128.
 - [13] Vanneman M, Dranoff G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12 (4) : 237-251.
 - [14] Boissel N, Rea D, Tieng V, *et al.* BCR/ABL oncogene directly controls MHC class I chain-related molecule A expression in chronic myelogenous leukemia [J]. *J Immunol*, 2006, 176 (8) : 5108-5116.
 - [15] Okita R, Mougiakakos D, Ando T, *et al.* HER2/HER3 signaling regulates NK cell-mediated cytotoxicity via MHC class I chain-related molecule A and B expression in human breast cancer cell lines [J]. *J Immunol*, 2012, 188 (5) : 2136-2145.
 - [16] Beano A, Signorino E, Evangelista A, *et al.* Correlation between NK function and response to trastuzumab in metastatic breast cancer patients [J]. *J Transl Med*, 2008, 6 : 25.
 - [17] Bedel R, Thiery-Vuillemin A, Grandclement C, *et al.* Novel role for STAT3 in transcriptional regulation of NK immune cell targeting receptor MICA on cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2011, 71 (5) : 1615-1626.
 - [18] Molinero L L, Fuertes M B, Fainboim L, *et al.* Up-regulated expression of MICA on activated T lymphocytes involves Lck and Fyn kinases and signaling through MEK1/ERK, p38 MAP kinase, and calcineurin [J]. *J Leukoc Biol*, 2003, 73 (6) : 815-822.
- (本文编辑: 李胜利 英文编辑: 王 燕)