

# 胶原海绵与兔软骨细胞体外三维培养的实验研究

朱如里<sup>1</sup> 高学纯<sup>1</sup> 王明丽<sup>2</sup> 董英海<sup>1</sup> 卢晓林<sup>1</sup> 韩俊<sup>2</sup> 胡勇<sup>2</sup>

(1. 安徽医科大学第一附属医院, 安徽 合肥 230032; 2. 安徽医科大学微生物教研室, 安徽 合肥)

**【摘要】** 目的 观察用人胎盘 I 型胶原海绵作为兔软骨细胞体外三维培养支架时, 软骨细胞形态学特征和功能及该支架的吸附性和组织相容性。方法 将新生兔原代和传代软骨细胞接种于人胎盘 I 型胶原海绵进行体外培养, 用光镜和扫描电镜观察细胞形态和结构及支架的吸附性和组织相容性, 用免疫组化观察细胞 II 型胶原合成。结果 以胶原海绵作为支架的传代软骨细胞能维持其形态学特征及细胞功能, 该支架有较好的吸附性和组织相容性。结论 人胎盘 I 型胶原海绵可作为软骨细胞体外三维培养较好的支架材料。

**【关键词】** 细胞培养; 体外研究; 软骨细胞; 细胞支架

**The experimental study on three dimensions culture of rabbit chondrocytes seeded into type I collagen sponge of human placenta** ZHU Ru-li, GAO Xue-chun, WANG Ming-li, et al. The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University (Anhui Hefei, 230032)

**【Abstract】 Objective** To observe the morphology and function of chondrocytes seeded into type I collagen sponge of human placenta and to find the sponge's adsorption to chondrocytes and its biocompatibility. **Methods** Primary and passage chondrocytes of newly born rabbits were cultured after they were seeded into type I collagen sponge of human placenta. The morphology and structure of chondrocytes cells, as well as sponge's adsorption and its biocompatibility were observed by using light microscope and scanning electron microscope. The synthesis of collagen of type II was studied by using immunohistochemical method. **Results** Passage chondrocytes seeded into the sponge maintained the morphology characteristic and cells functions. The sponge had excellent adsorption and biocompatibility. **Conclusion** The type I collagen sponge of human placenta can be used as the scaffolds in the three dimensions culture of chondrocytes.

**【Key Words】** Cells culture; In vitro; Chondrocyte; Cytoskeleton

软骨细胞三维培养在软骨组织工程中很重要, 而三维培养的支架选择是关键<sup>[1]</sup>。由人胎盘 I 型胶原加工而成的胶原海绵, 既往主要用于创面止血, 鲜有报道作为细胞培养的支架。本实验将其作为兔软骨细胞体外培养的三维支架, 进行了系统的实验研究。现将结果报道如下。

## 1 材料和方法

**1.1 主要试剂和仪器** 人胎盘 I 型胶原海绵(上海其胜生物制剂实业公司), DMEM(Gibico 公司), II 型胶原酶(Sigma 公司), II 型胶原单抗(Neomarkers 公司), ABC 试剂盒(华美公司), 倒置显微镜(Olympus 公司), 电镜(Philips 公司)。

**1.2 软骨细胞悬液的制备** 取 2 日龄新生新西兰大白兔 4 只, 无菌操作下切取双下肢膝关节软骨, 切成 0.1cm × 0.1cm × 0.1cm 碎片, 用 PBS 冲洗, 将软骨碎片置于有 Hanks 液培养瓶中, 加入 0.25% II 型胶原酶, 于 37℃ 恒温水浴 7~12 小时,

收集细胞制成原代软骨细胞悬液, 将软骨细胞悬液制成  $1 \times 10^6$  个细胞/ $\text{mm}^3$  浓度备用。

## 1.3 实验分组

**1.3.1 无支架单层细胞培养组(A组)** 将原代软骨细胞悬液加入含 20% 小牛血清的 DMEM 培养瓶中, 在 5%  $\text{CO}_2$  孵育箱中 37℃ 恒温培养, 隔日换液, 细胞 80% 融合时进行传代, 培养至第 3 周。

**1.3.2 有支架的原代细胞培养组(B组)** 将原代软骨细胞悬液加入有胶原海绵的 96 孔板中, 在 5%  $\text{CO}_2$  孵育箱中 37℃ 恒温培养, 隔日换液至第 3 周。

**1.3.3 有支架的传代细胞培养组(C组)** 将 A 组传代软骨细胞悬液制成  $1 \times 10^6$  个/ $\text{mm}^3$  浓度, 加入有胶原海绵的 96 孔板中, 5%  $\text{CO}_2$  孵育箱中 37℃ 恒温培养, 隔日换液至第 3 周。

## 1.4 形态学观察

**1.4.1 倒置显微镜和 HE 染色观察** 将各组标本在不同时间点用倒置显微镜观察培养细胞的形态、生长及分化等现象,

并对部分标本进行苏木素伊红(HE)染色观察。

**1.4.2 免疫组化染色观察** 将 A 组软骨细胞和 C 组的软骨细胞—海绵复合体用 4% 多聚甲醛(4℃)固定后,经 PBS 水合,用 ABC 法进行免疫组化染色观察。先加入 1:50 鼠抗人 II 型胶原单抗,37℃ 孵育 2 小时,再用 1:50 抗鼠 IgG 作为二抗,37℃ 孵育 30 分钟,然后加入 1:50A 和 B 液混合液 30 分钟,DAB 显色,然后脱水,透明,封片观察。

**1.4.3 扫描电镜观察** 将 C 组 3 周的软骨细胞—海绵复合体标本,用 Hanks 液小心洗涤后,行 2% 戊二醛固定和 1% 锇酸(4℃)后固定,乙醇梯度脱水,临界点干燥,离子溅射仪喷金,扫描电镜观察。

## 2 结果

**2.1 倒置显微镜和 HE 染色观察结果** A 组:软骨细胞培养 24 小时大部分贴壁生长,呈圆形,折光性好,3~4 天后细胞逐渐变成梭形,1 周大部分细胞融合,予传代。第二、三代细胞传代后均逐渐增殖,细胞大多数为梭形。HE 染色示:细胞胞浆和细胞外基质浓染,并见核分裂相(图 1)。B 组:原代软骨细胞接种到支架上,24 小时细胞很少吸附于支架上,48 小时细胞折光性下降,胞体固缩(图 2),1 周时细胞无增殖,细胞稀少,10 天时仅见支架存在。C 组:传代软骨细胞接种到支架上,24 小时细胞较均匀分布于支架内,1 周时细胞大量增殖,并分泌基质,3 周时外形仍维持在圆形,软骨细胞分布于支架网孔中和网壁上,细胞分泌基质,将细胞与海绵融合成一片,软骨细胞周围有透亮陷窝(图 3);海绵支架 1 周后开始松散,3 周逐渐成小碎片。HE 染色示细胞呈圆形,胞浆和细胞外基质浓染。

**2.2 免疫组化染色观察** A 组软骨细胞经抗 II 型胶原单抗免疫组化染色显示胞浆和细胞外基质有阳性反应。C 组软骨细胞—海绵复合体经抗 II 型胶原单抗免疫组化染色也显示胞浆和细胞外基质阳性反应(图 4)。

**2.3 扫描电镜观察** C 组在胶原海绵支架上生长的传代软骨细胞在 1200 倍镜下示软骨细胞似葡萄样吸附于支架网孔和网壁(图 5),在 5000 倍时见圆形的细胞表面均匀分布丰富的绒毛突起(图 6)。

## 3 讨论

**3.1 胶原海绵作为软骨细胞培养支架的可行性** 胶原海绵由三维螺旋结构的胶原蛋白组成。胶原蛋白是细胞外基质的组成部分,是细胞代谢的场所和细胞附着的基本框架。胶原海绵孔径在 25~100 $\mu$ m。Sittinger 等<sup>[2]</sup>认为孔径在 50~100 $\mu$ m 的三维支架最佳,所以此胶原海绵可吸附较多的软骨细胞。胶原海绵具有较好的亲水性,无细胞毒性,无免疫原性,无热原反应,不溶血<sup>[3,4]</sup>。本研究结果显示传代软骨细胞能够在该支架上生长,故以其作为软骨细胞培养支架是可行的。

**3.2 胶原海绵支架对种子细胞的要求** 在三维支架上,细胞的吸附与单层培养时细胞的贴壁一样重要,只有很好地吸附,细胞才能继续生长增殖。原代软骨细胞由于其吸附能力差,因此接种后不能吸附生长,在 1 周内逐渐减少,消失。而传代软骨细胞吸附能力好,在 3 周仍能生长增殖,因此传代软骨细胞可作为种子细胞。但种子细胞可能发生去分化。Sailor 等<sup>[5]</sup>发现在软骨细胞培养中加入 BMP 2 能促进 II 型胶原基

因表达进而促进 II 型胶原合成;Buschmann 等<sup>[6]</sup>实验证实:静压力明显抑制基质合成,而一定的动压力刺激基质合成,因此细胞因子和力学环境在抑制细胞去分化中有重要的作用,这为解决种子细胞去分化问题提供了一个途径。

**3.3 胶原海绵支架上软骨细胞形态学特征和功能** 在 A 组软骨细胞培养后细胞形态由圆形变成梭形似成纤维细胞,这是由于软骨细胞贴壁生长后,出现“返祖”现象,反映软骨细胞的中胚层来源,因而外形似成纤维细胞。细胞在 1 周内如不进行传代培养,增殖的细胞将因无空间支架,营养物质不能进入,代谢产物不能排泄,细胞死亡。C 组在胶原海绵支架上生长的传代软骨细胞在 3 周内不但一直维持原代软骨细胞的圆形,而且细胞大量增殖,基质合成增加。这是由于细胞在胶原海绵里悬浮培养,流体剪力作用有助于软骨细胞重新获得它们的圆形状态<sup>[7]</sup>,而且胶原海绵有促进软骨细胞增殖和胶原合成作用<sup>[8]</sup>。

软骨细胞分泌 II、IX、XI 胶原,其中 II 型胶原是软骨细胞特异分泌的基质,3 周时胶原海绵—软骨细胞复合体免疫组化染色显示阳性反应,说明胶原海绵支架上的软骨细胞能维持软骨细胞的功能。

**3.4 胶原海绵作为软骨细胞培养支架的特点** 在海绵支架中培养 3 周的软骨细胞周围出现软骨陷窝,细胞与海绵融为一体,这是由于 3 周时支架逐渐降解,而软骨细胞分泌的基质逐渐伸入到支架空间中,由此可见胶原海绵有较好的组织相容性。从扫描电镜观察到软骨细胞吸附于支架网孔和网壁,这是支架较好吸附性的体现,其结构基础是软骨细胞表面的绒毛结构和海绵本身的絮状结构。

**3.5 胶原海绵支架存在的不足** 本研究中,胶原海绵在细胞培养 3 周后逐渐变成片状,因此力学性能下降。现有学者将胶原海绵通过化学修饰处理使其强度增强,以弥补其不足。

(本文图 1~6 见插页 1)

## 参考文献

- 1 Vacanti CA, Upton J. Tissue engineered morphogenesis of cartilage and bone by means of cell transplantation using synthetic biodegradable polymer matrices. *Clin Plas Surg*, 1994, 21(3): 445-462.
- 2 Sittinger M, Bujia J, Rotter N, et al. Tissue engineering and autologous transplant formation: Practical approaches with resorbable biomaterials and new cell culture techniques. *Biomaterials*, 1996, 17(5): 237-245.
- 3 Quteish D, Singh G, Dolby AE. Development and testing of a human collagen graft material. *J Biomed Mater Res*, 1990, 24(6): 749-760.
- 4 武继民, 叶萍, 关静. 胶原海绵的结构分析和生物学评价. *军事医学科学院院刊*, 1998, 22(4): 281-285.
- 5 Sailor LZ, Hewick RM, Morris EA. Recombinant human bone morphogenetic protein 2 maintains the articular chondrocytes phenotype in long term culture. *J Orthop Res*, 1996, 14(6): 937-945.
- 6 Buschmann M D, Gluzband YA, Grodzinsky AJ. Mechanical compression modulates matrix biosynthesis in chondrocyte/agarose culture. *J Cell Sci*, 1995, 108(4): 1497-1508.
- 7 Frondoza C, Sohrohi A, Hungerford D. Human chondrocytes proliferate and produce matrix components in microcarrier suspension culture. *Biomaterials*, 1996, 17(9): 879-888.
- 8 Berthod F, Hayek D, Damour O. Collagen synthesis by fibroblasts cultured within a collagen sponge. *Biomaterials*, 1993, 14(10): 749-754.

(收稿: 2001-04-12 编辑: 房世源)

# 胶原海绵与兔软骨细胞体外三维培养的实验研究

(正文见 75 页)

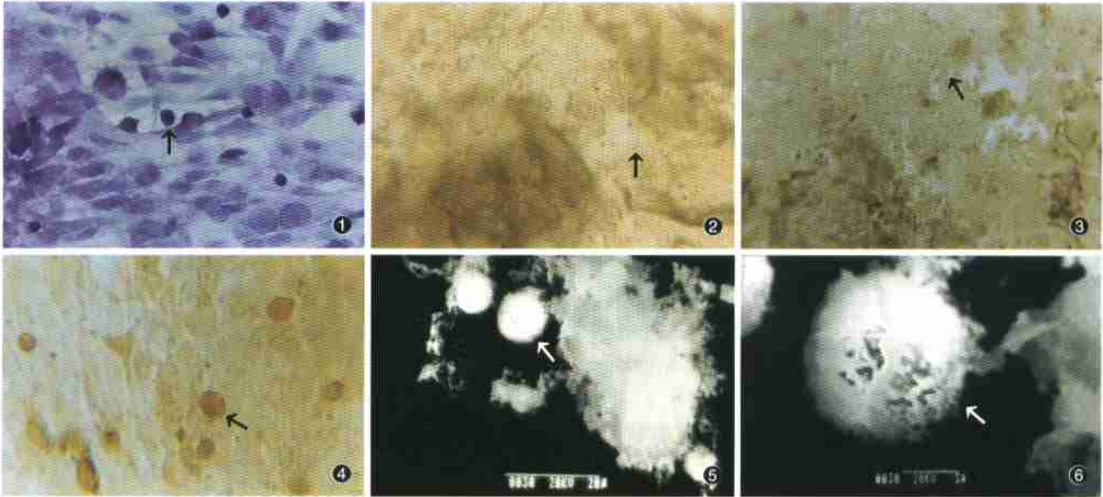


图1 无支架单层细胞培养3周, 软骨细胞增殖, 为棱形, ↑所示为核分裂相软骨细胞, 倒置显微镜 HE × 400。图2 有支架的原代细胞培养48小时, 软骨细胞较少分布于支架上, 胞体固缩, ↑所示为固缩软骨细胞, 倒置显微镜 × 100。图3 有支架的传代细胞培养3周, 细胞大量增殖, 为圆形, 分布于支架网孔中和网壁上, 软骨细胞周围有透亮陷窝, ↑所示为软骨细胞及其周围透亮陷窝, 倒置显微镜 × 100。图4 3周时, 软骨细胞—海绵复合体免疫组化染色显示软骨细胞及胞外基质Ⅱ型胶原免疫组化染色阳性反应, ↑所示为软骨细胞及胞外基质阳性反应, 免疫组化 ABC 法 × 200。图5 3周时, 软骨细胞(↑示)吸附于支架网孔和网壁上, 扫描电镜观察 × 1200。图6 在支架上生长3周的软骨细胞, 其表面均匀分布丰富的绒毛突起(↑示), 扫描电镜观察 × 5000。

# 川芎嗪在骨骼肌缺血再灌注损伤中的作用

(正文见 79 页)

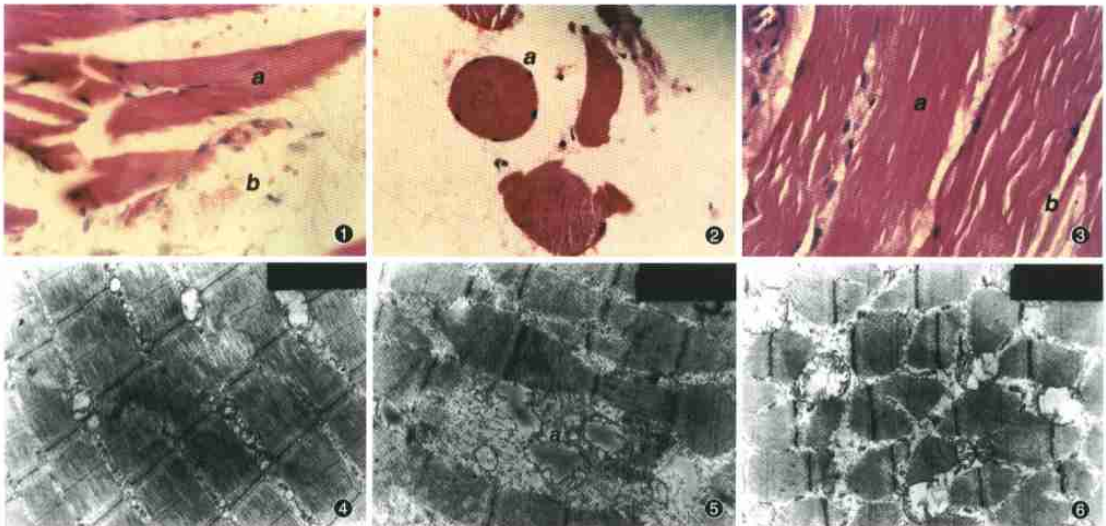


图1 缺血2小时后骨骼肌。a: 横纹较模糊; b: 间质轻度水肿 HE × 40。图2 对照组再灌注1小时后骨骼肌 a: 胞浆凝固, 核固缩 HE × 40。图3 实验组再灌注1小时后骨骼肌 a: 横纹肌成束排列, 横纹尚清晰, 欠整齐; b: 间质未见水肿 HE × 40。图4 缺血2小时后骨骼肌。a: 线粒体稍肿胀, 嵴部分消失, 线粒体内外膜结构完整。透射电镜 × 10000。图5 对照组再灌注1小时骨骼肌。a: 线粒体重度肿胀, 扩张, 嵴大部消失, 线粒体膜模糊、破坏, 组织水肿明显。透射电镜 × 10000。图6 实验组再灌注1小时后骨骼肌。a: 线粒体部分恢复正常。透射电镜 × 10000。