

组织工程化软骨-软骨细胞的获取

Procurement of cartilage and chondrocytes by tissue engineering

谈志龙 李德达 邢国胜 于顺禄 李世民

TAN Zhi long, LI De da, XING Guo sheng, YU Shun lu, LI Shi min

【关键词】 软骨; 组织细胞学制备技术 【Key words】 Cartilage; Histocytological preparation techniques

软骨缺损的修复一直是骨科界的难题之一,自 1968 年 Chesterman 等^[1]首次采用体外培养的软骨细胞修复软骨缺损以来,该方面的研究越来越受到人们的重视,近几年发展起来的应用组织工程学方法修复软骨缺损虽未应用于临床,但逐渐被认为是一种有希望治疗全层软骨缺损的手段。组织工程化软骨包括:①种子细胞-软骨细胞。②组织相容性好、可降解、可吸收、可塑性的生物材料。③加入能调节细胞增殖、保持细胞表型等特征的细胞因子,适合工程化软骨生长环境的各种生物反应器。而能大量获得良好的软骨细胞是对骨性关节炎和类风湿性关节炎等发病机理研究所需要的^[2,3],也是软骨组织工程研究的前提。

1 软骨细胞的提取、培养和鉴定

目前的实验研究,软骨细胞多采用 1 个月龄的家兔关节软骨、耳廓软骨或出生 24 小时家兔取双侧下颌骨髁状突软骨细胞、大鼠的胸肋软骨、由水囊流产下来的胎儿关节软骨等^[4-7],越年幼软骨细胞的数量越多,细胞分化能力越强,将取下来的软骨切成 1~2mm³ 大小,因软骨细胞埋藏于致密的氨基糖蛋白基质中,必须经酶消化法去除基质才能获得,一般采用透明质酸酶、胰蛋白酶和 II 型胶原酶在 37℃ 温度下消化,各种消化方法在用酶的浓度和消化时间上有所不同^[8],目的是为了充分消化软骨基质,获得较多的软骨细胞,又不损伤软骨细胞。目前常采用质量分数为 0.25% 的胰蛋白酶消化 30 分钟,0.1% 或 0.2% II 型胶原酶消化 4~8 小时,恒温 37℃ 的摇床上进行,消化液用 100μm 滤网过滤,将滤液离心洗涤软骨细胞,然后用 DMEM 培养液稀释,计数细胞总量和检测细胞成活率,培养用体积分数为 10% 的新生小牛血清 1 × 10⁵U/L 青霉素、100mg/L 链霉素、50mg/L 抗坏血酸的 DMEM 培养液中培养。培养条件 37℃ 恒温,体积分数为 5% 的 CO₂ 饱和温度下孵育箱培养,隔日或 3 天换液 1 次。传代用 0.25% 胰蛋白酶室温消化,收集原代和传代 2~4 代的软骨细胞为组织工程化的种子细胞,接种到生物载体上。

在细胞学鉴定上:①相差显微镜下,软骨细胞培养 24~36 小时开始贴壁变形,可见三角形,主要为多边形,胞浆丰富,胞核圆形居中,有 2~3 个核仁,细胞长成一片时呈明显铺

路石状,外观与长梭形的成纤维细胞较易区别,培养 2 周细胞聚集,可出现结节状分布,细胞传至 5~6 代时,细胞体积开始变大,边缘出现一些指状突起,核也变大,增殖速度减慢。② HE 和甲苯胺蓝染色:HE 染色,在载玻片上染色后可见细胞中等大小,圆形或椭圆形,少数可见突起,胞浆丰富,呈透明蓝色均质状,有的内含大小不等的空泡及嗜酸性尘粒,核圆或椭圆,有 1~2 个核仁,细胞周围有猩红色基质;甲苯胺蓝染色有异染物质出现,说明有糖胺聚糖合成。③透射电镜下,软骨细胞呈圆球形,胞浆丰富,内含粗面内质网、高尔基复合体较发达,胞浆中有较多的分泌泡,胞内为合成基质成份,还可见大量呈团的糖元颗粒,细胞核周围有大量的线粒体,在细胞周围可见细小胶原纤维。④S~100 蛋白免疫组织化学链霉素合素-辣根过氧化物酶法染色鉴定软骨细胞,显示原代细胞核内见 S~100 蛋白阳性标记颗粒,对照人胎成纤维细胞 S~100 蛋白呈阴性。⑤II 型胶原染色,细胞在盖玻片长满后取出,ABC 法进行 II 型胶原免疫组化染色,可见软骨细胞胞浆、胞外分泌的 II 型胶原被染成棕黄色,胞核不着色,未成片的细胞为弱阳性^[9]。⑥核酸原位杂交技术检查软骨细胞特异性的 II 型胶原 mRNA,大多数体外培养的原代细胞胞浆内可见密集的紫色颗粒,呈阳性结果,对照组细胞浆内未见紫色颗粒,呈阴性,说明软骨细胞内有合成 II 型胶原的 mRNA,具有合成 II 型胶原的能力,从而确定为软骨细胞。

2 有关软骨细胞培养的其它问题

2.1 细胞贴壁率及纯度 在相差显微镜下,细胞的贴壁率传代快于原代是因为传代细胞对环境有很强的适应性,塑料培养瓶贴壁率大于玻璃瓶。关于软骨细胞纯度的问题因软骨组织中只含有单一的软骨细胞,所以分离出来的软骨细胞纯度很高,在操作过程中,如误带滑膜后可混入成纤维细胞,当培养细胞贴壁后,在相差显微镜下可用细胞刮子刮除或经过传代可获得 99% 以上高纯度的软骨细胞。

2.2 软骨细胞生长曲线 原代细胞接种后第 2 天生长缓慢,为潜伏期,自第 3 天起呈快速生长,构成生长曲线,为对数生长期,到第 5 天以后,细胞生长再次平缓,为平台期。传代方面组织工程化软骨在细胞选择上,就细胞增殖而言,第 4 代以前传代细胞优于原代,而且传代细胞均有比原代更强的材料适应性,到第 8 代细胞的生长能力明显减弱,第 12 代已无明显

显细胞增殖。细胞倍增时间可用公式求得: $DT = (t - t_0) \log 2 / (\log N - \log N_0)$, 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 和 t 时的细胞数。

2.3 永生化软骨细胞 从软骨中获得的软骨细胞来源有限, 而且软骨细胞增殖能力低, 体外培养对细胞密度有高度依赖, 且为有限增殖, 传代代数过多, 细胞出现老化现象, 使传代细胞难以计数, 特别是软骨细胞在体外长期培养有去分化趋势, 表型(特别是 II 型胶原)难以保持, 因此众多学者试图建立一种能长期培养, 表型稳定的永生化软骨细胞, 为软骨组织工程提供大量的经过预先处理和优化的软骨细胞。Steinberg 把类人猿病毒和 40 大 T 抗原基因(simian virus 40 large T antigen, SV40LT Ag)以 II 型胶原基因的启动子和增强子所构成的重组质粒用磷酸钙共沉淀法转入兔关节软骨细胞中, 获得了永生化兔关节软骨细胞, 可传代 80 代以上, 而且保存着软骨细胞特有的表型(II 型胶原和多聚糖), 但永生化软骨细胞在致癌性和表型稳定性方面存在着争议, 还有待于进一步深入研究^[10]。

2.4 软骨细胞的保存 软骨在 10% 的小牛血清 DMEM 培养液中 4℃ 冷藏 3 天, 细胞仍保持高度活性, 细胞成活率可达 93.5±7.2% 以上, 1 周存活率在 87%~97%。也有报道将分离好的软骨细胞 DMEM 溶液中加低温冷冻保护剂 10% 二甲亚砜(DMSO)预冷 4℃, 然后以 1℃/min 速度缓慢降至 -80℃, 最后迅速投入 -196℃ 液氮中储存 7 天后, 采用快速复温法细胞存活率可达 95% 以上, 进行培养 14 天仍可保持软骨细胞形态和生物学特征, 为今后进一步开展软骨细胞移植研究提供实验依据^[11, 12]。

2.5 软骨细胞浓度 软骨细胞移植浓度对组织工程化有一定的影响。Vacanti 等^[13] 研究表明 $5 \times 10^8 \sim 10 \times 10^8$ /ml 的细胞是适宜的, 这种浓度的细胞生成软骨组织绝大部分为透明软骨, 只有少量的纤维组织。另有报道^[14], 移植软骨细胞浓度小于 2×10^7 /ml 产生纤维组织, 当 $2 \times 10^7 \sim 10 \times 10^7$ /ml 形成透明软骨, 无纤维组织形成。在无蛋白的琼脂糖培养中, 细胞浓度大于 10^6 /ml 时, 大部分细胞能存活数周, 小于 10^5 /ml 细胞很快死亡。移植软骨细胞密度明显影响软骨细胞的功能和生存, 所以放入载体的软骨细胞必须有足够的浓度才能取得满意的效果。

2.6 有关细胞因子对软骨细胞的作用 在软骨细胞移植过程中, 生长因子具有刺激软骨细胞分化和产生软骨基质的作用^[15], 软骨组织骨含有多种生长因子及其受体, 主要通过自分泌和旁分泌的方式对软骨的形成和修复起局部调节作用, 如成纤维生长因子(fibroblast growth factor, FGF)在体外培养中可促使分化中的软骨细胞发生迁移和集落的形成, 促进离体的软骨细胞前质的分化和软骨细胞的增殖与成熟, 导致有丝分裂原的形态的形成^[16], 当软骨细胞缺乏碱性成纤维细胞因子时(bFGF)便不能合成与释放硫酸软骨素和 II 型胶原蛋白, 加入 bFGF 时可又恢复这种能力^[17]。国内有分离兔髌状突软骨细胞在培养基内加入 $10 \mu\text{g/L}$ bFGF 细胞增殖后与胶原酶培养, 培养 1 周后植入同种成年兔背部, 几周后可见软骨样组织形成^[18]。转化生长因子(transforming growth factor beta, TGF- β)对软骨细胞发育不同阶段起着不同的作用, 对软骨

细胞的分化和功能具有双向调节作用^[19], 它能促进未分化和分化早期的软骨细胞 DNA 复制, 从而促进软骨细胞增殖, 并促进蛋白多糖和 II 型胶原的合成, 对于分化末期的软骨细胞可抑制其分化, 并抑制软骨基质的合成与钙化, 抑制碱性磷酸酶的活性。另外胰岛素生长因子(insulin like growth factor, IGF), 血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF), 骨形成蛋白(BMP)等都具有促进细胞增殖, 调节细胞的分化, 促进细胞外基质合成的作用。

总之, 生物活性因子对软骨细胞的生物学作用其间的量效和时效关系以及生物因子间相互作用等仍需全面系统的研究^[20]。

参考文献

- Chesterman PJ, Smith AU. Homotransplantation of articular cartilage and isolated chondrocytes: an experimental study in rabbits. *J Bone Joint Surg (Br)*, 1968, 50: 184-197.
- 李松, 黄石登, 曹峻岭, 等. 自由基对体外培养人胚关节软骨细胞的影响. *中华骨科杂志*, 1998, 18(7): 426-428.
- 管剑龙, 施桂英. 基质金属蛋白酶与骨关节炎. *中华风湿病学杂志*, 2000, 4: 54-55.
- 刘彦春, 王炜, 曹谊林, 等. 包埋后的几丁质与软骨细胞体外培养的实验研究. *中华骨科杂志*, 1998, 8(8): 495-496.
- Weiss A, Livne E, DorMark K, et al. Growth and repair of cartilage: organ culture system utilizing chondroprogenitor cells of condylar cartilage in new mice. *J Bone Mineral Res*, 1983, 3: 993.
- 阎明, 党耕町. 羟基磷灰石软骨细胞复合物的构建. *中华外科杂志*, 1999, 37(7): 403-405.
- 王跃, 杨志明, 解慧琪, 等. 人胎关节软骨细胞体外培养的生物学特性. *中华实验外科杂志*, 2000, 17: 319-321.
- 陈福林, 毛天球, 冯雪, 等. 兔关节软骨细胞的体外分离、纯化及鉴定. *现代口腔医学杂志*, 1998, 12: 263-265.
- 王德春, 陈崢嵘, 宋后燕, 等. 聚乙醇酸负载同种异体软骨细胞移植修复兔关节软骨缺损. *中华创伤杂志*, 1997, 13: 228-231.
- 何清义, 李起鸿, 许建中. 软骨细胞的永生化及其生物学特性. *中华创伤杂志*, 2001, 17(5): 23-25.
- 李元, 邓廉夫, 杨铭铭, 等. 冷冻复苏培养的关节软骨细胞生物学特性. *上海第二医科大学学报*, 1997, 17: 281-283.
- 姚向前, 马绪臣, 张震康. 人髌状突软骨细胞的分离、培养和生物学性状. *现代口腔医学杂志*, 1997, 11: 241-244.
- Vacanti CA, Vacanti JP. Bone and cartilage reconstruction with tissue engineering approaches. *Otolaryngol Clin North Am*, 1994, 27: 263-276.
- 司全明, 侯筱魁. 促进关节软骨缺损修复的方法. *中华创伤杂志*, 1999, 15: 477-478.
- 陈百成, 张洪斌, 张汉杰, 等. 生长因子对软骨细胞的作用. *中华骨科杂志*, 1999, 19(12): 746-748.
- Goldring BM, Goldring SR. Skeletal tissue response to cytokines. *Clin Orthop*, 1990, (258): 245-278.
- Gospodarowicz D. Fibroblast growth factor: chemical structure and biologic function. *Clin Orthop*, 1990, (257): 231-238.
- 焦岩涛, 马绪臣, 张震康, 等. 组织工程重建兔髌下颞关节盘软骨. *中华创伤杂志*, 2001, 17: 20-22.
- 徐卫东, 吴岳嵩, 赵定麟, 等. 成纤维细胞生长因子对兔关节软骨损伤的修复作用. *中国矫形外科杂志*, 1999, 6: 118-119.
- 余家阔, 曲绵域, 田得祥. 人骨形态发生蛋白对体外培养胎儿关节软骨块的影响. *中华外科杂志*, 1997, 35(11): 687-689.

(收稿: 2001-12-30 编辑: 李为农)