

## 改良组织块混合酶消化法成骨样细胞培养

李靖<sup>1</sup> 黄鲁豫<sup>1</sup> 王全平<sup>1</sup> 吕荣<sup>1</sup> 白建萍<sup>1</sup> 倪国华<sup>2</sup>

(1. 第四军医大学西京医院全军骨科研究所, 陕西 西安 710033; 2. 解放军 160 医院骨科)

**【摘要】** 目的 应用组织块与混合酶消化联合使用进行大鼠颅骨成骨细胞体外培养。方法 取新生 2~3 d 的 SD 大鼠颅骨剪碎依次用不同浓度的胰蛋白酶和 II 型胶原酶混合分 2 次对颅骨进行消化。纯化、接种后进行原代和传代培养并对细胞进行鉴定。结果 原代培养的细胞 ALP 染色阳性区域可以达到 90% 以上, 传代培养后细胞阳性率为 100%。18 d 左右有钙结节形成。电镜观察示细胞表面有微绒毛, 粗面内质网丰富。原代培养细胞 BMP 免疫组化呈弱阳性表达, 传代培养后细胞 BMP 表达逐渐增强, 以第 5 代左右细胞表达强度最高。结论 改良组织块混合酶消化法成骨细胞培养具有细胞成分单一、表型稳定的特点。可为成骨细胞的代谢和生理的体外研究提供高纯度的细胞。

**【关键词】** 细胞, 培养的; 成骨细胞; 表型

**Osteoblastic-like cell culture with modified method of mixed enzymatic digestion** LI Jing, HUANG Luyu, WANG Quanping, et al. Institute of Orthopaedics of Chinese PLA, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University (Shanxi Xi'an, 710033, China)

**【Abstract】** **Objective** To investigate possibility of culture of osteoblast from rat cranial bone in vitro with modified method which based on the combination of tissue block and mixed enzyme digestion **Methods** The newly born SD rats were sacrificed and the cranial bones of the rats were obtained and cut to blocks of 1 mm×1 mm. Then the blocks were digested by collagenase combined with trypsinogen two times with 10 minutes for the first time and 30 minutes for the second time. The ratio of collagenase to trypsinogen is 3 to 2 for the first time, 3 to 1 for the second time, respectively. ALP stains for the cultured cells and TEM investigation were performed to determine the activity of osteoblast. **Results** The area positive for ALP staining is no less than 90% in the primary culture and almost 100% in the subculture. Calcium nodule appeared on the 18th days. Ultrastructural investigations showed that there are microvillus on the surface and plenty of rough endoplasmic reticulum in cells. BMP-immunoreactivity was detected in the primary culture cells and increased gradually and peaked in fifth subculture using immunocytochemical technique. **Conclusion** The modified culture of osteoblastic-like cells has the advantages of single component and stable phenotype, therefore can be used for the study of metabolism and physiology of osteoblast in vitro.

**【Key words】** Cell, culture; Osteoblast; Phenotype

体外培养成骨细胞的方法对于研究生物因子、理化因素等对骨代谢的影响有着重要的意义。随着基因克隆技术的发展, 为了探讨各种基因在成骨细胞中的表达以及外源性基因对成骨细胞的影响, 建立纯化的成骨细胞成为研究的必要条件。组织工程在医学各个领域的迅速开展, 骨组织工程中大量纯化的成骨细胞的需求也对成骨细胞体外培养提出新的要求。目前采用的胰蛋白酶-胶原酶分段消化法有一定的局限性, 主要表现为细胞纯度不高和对细胞本身活性的影响<sup>[1,2]</sup>。因此, 我们在以往培养方法的基础上建立一种新的组织块与混合酶消化法以进行

成骨细胞的体外培养。

### 1 材料与方 法

**1.1 实验材料** 新生牛血清(CS, 特级, 杭州四季青公司), DMEM(Gibco 公司), 胰蛋白酶(Sigma 公司), II 型胶原酶(Sigma 公司), BMP 单克隆抗体由第四军医大学口腔医学院惠赠, SABC 试剂盒购自博士德公司, 新生 SD 大鼠(二级)由第四军医大学实验动物中心提供。

### 1.2 方 法

**1.2.1 细胞培养** 新生 2~3 d 的 SD 大鼠 2 只, 75% 酒精浸泡 10 min 处死。仔细切取颅盖骨移入无

菌平皿,加入 D-Hanks 液 10 ml 反复冲洗并且仔细剪除颅盖骨附着的软组织以及顶结节。将颅盖骨移入安瓿瓶内剪碎到 1 mm×1 mm×1 mm 大小块状物后,加入 D-Hanks 液混匀移入离心管中;倾倒入 D-Hanks 液后,将胰蛋白酶与 II 型胶原酶(两者浓度均为 0.1%)1:1.5 体积比例加入离心管中,37℃ 静置 5 min。去除消化液,加入 D-Hanks 液 6 ml,800 转/min 离心洗涤 8~10 min。去除 D-Hanks 液后,再将胰蛋白酶与胶原酶以 1:3 体积比例加入离心管中,继续 37℃ 静置消化 30 min。去除消化液后,加入 D-Hanks 液离心洗涤 8~10 min。再加入胶原酶终浓度为 0.05%,37℃ 静置 30 min。去除胶原酶消化液加入 D-Hanks 液洗涤。加入 15% CS/DMEM(DMEM 细胞培养液的配制:取 DMEM 1 袋 1 000 ml 装、碳酸氢钠 2.3 g、L-谷氨酰胺 0.3 g 维生素 C 0.05 mg 混合后加去离子水至容积为 1 000 ml。磁力搅拌机搅拌 1 h 后用双层 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤消毒。过滤后加入新生牛血清使培养液终浓度为 15%)共 4 ml 吹打混匀后分装入 50 ml 培养瓶。

**1.2.2 细胞纯化** 将装入培养瓶的培养物于 37℃ 静置 5 min 后轻轻倾立培养瓶,将培养瓶底部培养液(包括骨粒)用移液管移入另一培养瓶,如此重复 3 次。37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下培养。0.25%胰蛋白酶消化传代。原代培养后传代过程中继续以上法纯化 1 次。原代于第 6 d 换液 1 次,以后每 3 d 换液 1 次。

**1.2.3 细胞生长特性的观察** 从原代培养开始,在倒置显微镜下观察细胞生长状况和生物形态学的变化。

**1.2.4 细胞 HE 染色和碱性磷酸酶(ALP)染色** 将盖玻片铺于培养皿底部,第 1、2、3、4 代细胞传代后 36 h 后取出盖玻片用 4℃ 冷丙酮固定 30 min。对盖玻片上的细胞分别进行钙钴法 ALP 染色和 HE 染色。

**1.2.5 细胞的钙结节染色** 原代持续培养的细胞出现结节后用 PBS 漂洗 3 次,10% 甲醛固定后进行茜素红染色。

**1.2.6 细胞的免疫组化染色(SABC 法)** 生长于盖玻片上的细胞用 4℃ 冷丙酮固定 30 min;0.3% 的甲醇双氧水处理 10 min;37℃ 条件下正常羊血清封闭 30 min;加入 BMP 单克隆抗体,37℃ 作用 1 h;加入生物素化二抗,37℃ 作用 30 min;加入 ABC 复合物于 37℃ 作用 30 min;上述各步之间均以 PBS 振洗 5 min。DAB 显色 5~10 min;苏木精衬染,脱水,透明,

封片。

**1.2.7 细胞的透射电镜观察** 消化收集第 3 代细胞 5×10<sup>6</sup> 个,4℃ 的 PBS 洗涤 2 次,2 000 转/min 离心 15 min,弃上清液后细胞团块用 2.5% 戊二醛固定 2 h,再用 1% 四氧化钨固定 1 h,经梯度丙酮脱水,环氧树脂浸透包埋,超薄切片后醋酸双氧铀和枸橼酸铅双重染色,透射电子显微镜观察。

## 2 结果

培养细胞贴壁生长 2 h 后细胞开始增大、变形,外观逐渐变为圆形、梭形和鳞片状。细胞数目逐渐增多,细胞生长活跃,6 d 时细胞开始汇合成单层,生长逐渐缓慢。10 d 左右大部分组织块内的细胞游出(图 1)。细胞汇合后呈多层重叠现象,重叠细胞多变为矮柱状或方形,约 18 d 左右出现细胞结节。细胞结节的茜素红染色形成红色散在颗粒状物质,表明有钙结节形成。

细胞 ALP 染色结果显示细胞胞质内有黑色颗粒状物质,有少量分散在细胞周围。原代细胞染色阳性区域约达 90% 以上,随着传代次数的增加,ALP 染色的阳性率逐渐增加,到第 3 代细胞时阳性率已经达到 100%。此时细胞 HE 染色形态大多为散状,立方体(图 2)。超微结构观察细胞多为不规则圆形或椭圆形,细胞表面有微绒毛,细胞周围有少量胶原纤维。细胞粗面内质网发达,核多不规则位于细胞周边,有 1~2 个核仁,核内以常染色质居多(图 3,4)。原代 BMP 染色弱阳性,随传代次数的增加表达强度逐渐增强,以第 5 代左右为阳性表达程度最高。

## 3 讨论

颅盖骨体外成骨样细胞培养有组织块法以及胰蛋白酶与胶原酶分段消化法<sup>[3]</sup>。组织块法特点是培养细胞纯度较高,但细胞游出比较缓慢而且数量少;酶消化法优点是能够得到较多的细胞,但纯度低是其缺点。如何在提高细胞培养纯度同时增加培养细胞数量是目前成骨细胞培养需要解决的问题。

本实验采用组织块与混合酶消化方法联合使用获取大量高纯度成骨细胞。我们在培养过程有以下体会:(1)取材时剔除骨缝结缔组织及顶部透明软骨结节,减少可能带来的成纤维细胞和软骨细胞的污染<sup>[4]</sup>。(2)胰蛋白酶消化能力强但容易对细胞产生损害作用;II 型胶原酶对颅骨细胞外基质有很好的消化作用但消化力弱。因此我们在第 1、2 次消化的过程中采用低胰蛋白酶浓度逐渐降低的方法辅助以胶原酶的消化,这样在提高消化效率的同时降低了

对细胞的伤害性。在分次消化过程中第 2 次消化后的细胞成分比较单一,因此只需要用胶原酶进行消化。(3)根据成纤维细胞较成骨样细胞容易贴壁的特点<sup>[5]</sup>,我们对细胞进行反复贴壁,去除了一部分混杂于消化液中的成纤维细胞,提高了成骨样细胞纯度。(4)由于早期组织块贴壁不够稳定因此将初次换液的时间推迟到培养后 6 d,为使细胞能够在这段时间内获取足够的营养将培养液血清浓度提高为 15%。(5)组织块大小合适。组织块过大导致细胞无法全部游出,中央细胞坏死和贴附不够稳定,较为合适的组织块约为 1 mm × 1 mm × 1 mm。

对培养细胞进行表型鉴定发现:细胞钙结节染色阳性;细胞微绒毛丰富,粗面内质网发达,细胞核不规则,细胞核内常染色质为主,核仁明显,并且可以合成分泌胶原;培养细胞 BMP 呈阳性表达,第 5 代左右阳性表达强度最高;随传代次数增加,细胞 ALP 染色阳性区域增加,第 3 代细胞 ALP 染色阳性

区域已经达到 100%。以上结果提示随着传代数的增加细胞成骨样表型逐渐稳定<sup>[6]</sup>。此外,我们培养的成骨样细胞传 9 代左右可保持较好的生长状况。因此该方法所培养的成骨样细胞具有细胞成分单一,表型稳定的特点。(图 1-4 见插页 1)

#### 参考文献

- 1 Nakahara H, Bruder SP, Goldberg VM, et al. In vivo osteochondrogenic potential of cultured cells derived from the periosteum. Clin Orthop, 1990, 259:223-232.
- 2 Hefly TJ, Stern PH, Brand JS. Enzymatic isolation of cells from neonatal calvaria using two purified enzymes from Clostridium histolyticum. Exp Cell Res, 1983, 149(1):227-236.
- 3 司徒镇强,吴军正. 细胞培养. 西安:世界图书出版社,1996. 111-116.
- 4 王前,钟世镇,龚文汇,等. 鼠颅盖骨成骨细胞体外培养及 ALP 免疫组化法鉴别纯化. 中华骨科杂志, 1995, 15(6):364-366.
- 5 鄂征. 组织培养技术. 第 2 版. 北京:人民卫生出版社,1988. 170-171.
- 6 Wlodarski KH. Properties and origin of osteoblasts. Clin Orthop, 1990, 252:276-293.

(收稿:2002-01-30 修回:2002-06-05 编辑:房世源)

#### · 短篇报道 ·

## 186 例腰椎间盘突出症的 SEP 及 EMG 观察

李明 胡怡 孙彬

(中国中医研究院望京医院,北京 100102)

对我院 186 例腰椎间盘突出症患者进行了体感诱发电位(SEP)针极肌电图(EMG)的检测。以探讨该二项检查在临床诊断中的意义。

### 1 资料和方法

186 例患者中男 115 例,女 71 例;年龄在 18~70 岁;病程 3 个月~7 年。受试者均经 MRI、CT 检查确诊为腰椎间盘突出。采用美国 CADWELI 肌电图/诱发电位仪,进行胫后神经 SEP、EMG 的测试。SEP 测定采用常规的检测方法,刺激电极置于患侧内踝部,记录电极放置于臀纹中点、T<sub>12</sub>棘突及皮层 C<sub>2</sub>(颅中央),参考电极置 F<sub>PZ</sub>(前额),刺激强度 20~35 MA,叠加 250 次,重复 2 次以上,以脚趾轻微抽动为准。主要观察 T<sub>12</sub>电位潜伏期、波型。EMG 检测用同心圆针电极垂直插入肌肉,收集运动单位信号,对每块肌肉均进行插入电位、松弛、小力收缩、大力收缩状态的观察与记录。主要观察小力收缩时 10~20 个运动单位的平均时限及波幅百分比。

### 2 结果

SEP 检测异常者 97 例占 54%,表现为 T<sub>12</sub>潜伏期延长,

波型异常或消失。(T<sub>12</sub>收集腰髓的 N24)EMG 共检测 558 块肌肉包括患侧股四头肌、胫前肌、腓肠肌,结果显示相应节段的肌肉呈神经原性损害(L<sub>4,5</sub>, L<sub>5</sub>S<sub>1</sub>, L<sub>4,5</sub>S<sub>1</sub>, 根性损害),与临床提供的 MRI、CT、X 线片的诊断符合率 98%,定位准确率 93%。

### 3 讨论

我们认为 EMG 检测是一种相对精确的检测方法,用于腰椎间盘突出症的诊断是必要的,其①与 CT、MRI 结合,进一步提高诊断水平;②即可弥补影像学检查的不足,又可了解受累神经根的机能状态、损害程度,为临床选择性治疗(手法、手术)提供参考;③定位准确率高,可为临床手术提供帮助;④对神经根受损以外的疾病的鉴别诊断也有一定参考价值。

另外,186 例腰椎间盘突出症下肢 SEP 检测结果则与临床诊断不完全一致,它的阳性率明显低于 EMG,节段定位也有一定限度,虽然也可以用于腰椎间盘突出症的检测,但结果仅能作为参考。

(收稿:2003-01-24 编辑:王宏)



## 牵拉肘机制的有关解剖学观测

(正文见 652 页)



图1 婴幼儿肘关节(关节囊已切开)示桡骨头明显比桡骨颈大。图2 婴幼儿肘关节上面观(关节囊已切开)示围绕桡骨头周围丰富的滑膜皱襞,桡骨头后内侧滑膜皱襞呈叶片状,前外侧呈膜片状及绒毛状。图3 婴幼儿肘关节上面观(关节囊已切开,显示桡侧部分)示围绕桡骨头周围丰富的滑膜皱襞,桡骨头后内侧呈大片叶状的滑膜皱襞,前外侧滑膜皱襞呈月牙状并向前内侧延伸。

## 改良组织块混合酶消化法成骨样细胞培养

(正文见 661 页)

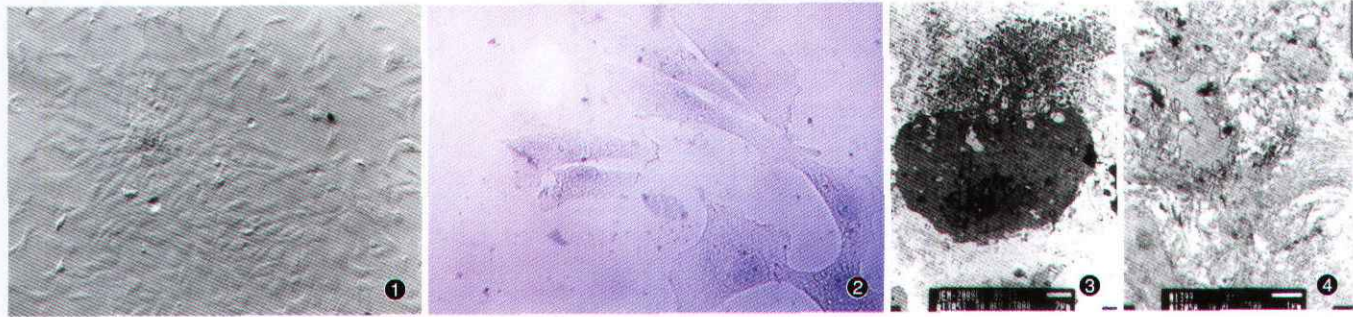


图1 细胞培养 10 d, 组织块周围大量细胞游出, 中央可见残留的组织碎片(倒置显微镜  $\times 100$ ) 图2 第三代成骨样细胞, 细胞呈梭状、立方形和多角形(HE 染色  $\times 400$ ) 图3 培养细胞呈椭圆形, 表面微绒毛丰富, 细胞核不规则(透射电镜  $\times 3000$ ) 图4 培养细胞粗面内质网发达, 池扩张, 细胞周围可见胶原纤维, 骨样基质形成(透射电镜  $\times 7500$ )

## 永生软骨细胞为基础的工程化软骨修复软骨缺损的实验研究

(正文见 664 页)

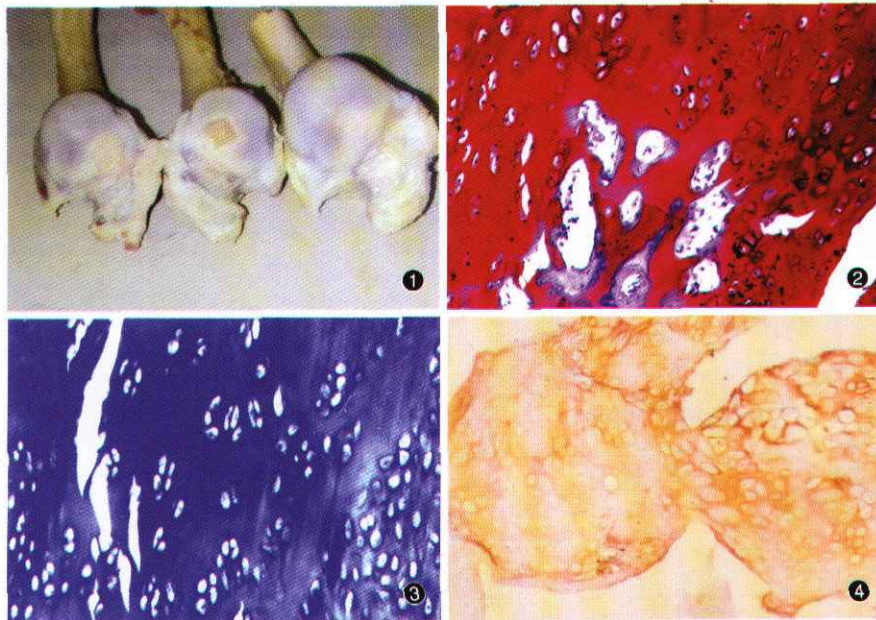


图1 术后6个月三组关节修复外观从右到左依次为: 实验组、对照组、材料组 图2 术后6个月实验组番红“0”染色 ( $\times 200$ ) 图3 术后6个月实验组甲苯胺蓝染色 ( $\times 200$ ) 图4 术后6个月实验组II型胶原染色 ( $\times 200$ )