

# 兔关节软骨细胞体外培养的生物学特性及中药黄芪对其的影响

张宇明<sup>1</sup>, 卫小春<sup>2</sup>

(1. 山西省人民医院, 山西 太原 030012; 2. 山西医科大学第二医院)

**摘要** 目的: 研究兔关节软骨细胞与海藻酸钠复合体外培养的生物学特性及中药黄芪对其的影响。方法: 取 5 个月龄兔膝关节软骨分离成软骨细胞悬液分组培养, A 组只用培养液培养, B 组用含 2% 黄芪注射液的培养液培养。分别于第 2、4、6、8 周进行细胞组织形态学、糖胺多糖(GAG)含量的测定及 II 型胶原蛋白表达的观察。结果: ①两组于第 4~6 周体外培养的软骨细胞合成糖胺多糖的能力及 II 型胶原蛋白的表达均达高峰, 6 周后逐渐下降; ②B 组软骨细胞合成糖胺多糖及 II 型胶原蛋白的能力均比同期 A 组增强, 具有显著统计学意义( $P < 0.05$ )。结论: 软骨细胞与海藻酸钠复合培养, 可保持软骨细胞的表型, 用其构建组织工程化软骨是可行的。黄芪有促进软骨细胞合成 II 型胶原和 GAG 的作用。

**关键词** 软骨细胞; 海藻酸钠; 黄芪; 糖胺多糖; II 型胶原蛋白

**Biological characteristics of rabbit articular chondrocytes cultured in vitro and effects of Chinese herbal Astragalus membranaceus on them** ZHANG Yu-ming<sup>\*</sup>, WEI Xiaochun.<sup>\*</sup> The People's Hospital of Shanxi Province, Shanxi Taiyuan, 030012, China

**Abstract Objective:** To study the biological characteristics of rabbit articular chondrocyte and Alginate's complex cultured in vitro and evaluate the effects of Chinese herbal Astragalus membranaceus on them. **Methods** Rabbits knee articular chondrocytes were isolated and divided into two groups. Group A was cultured with culture medium and Group B with culture medium which contain 2% Astragalus membranaceus injection. Morphological features, the expression of glycosaminoglycan and collagen II were observed respectively. **Results:** ①In both groups the expression of collagen II and glycosaminoglycan reached the highest level from the fourth week to sixth week and decreased after the sixth week. ②In Group B the expression of collagen II and glycosaminoglycan were significantly stronger than that of Group A. **Conclusion:** The compound culture of chondrocytes and Alginate can maintain the stable phenotype of chondrocytes. The Chinese herbal Astragalus membranaceus can promote the expression of collagen II and glycosaminoglycan significantly.

**Key words** Chondrocyte; Alginate; Astragalus; Glycosaminoglycan; Collagen II

在体外培养的软骨组织工程细胞实验中, 已证明多种细胞因子、激素、调节剂、药物等对软骨细胞的生物合成有影响。黄芪是一种补气药, 具有多种药理作用, 可促进细胞代谢, 使细胞生长旺盛。有学者从不同角度研究过黄芪对软骨细胞的作用, 但至今尚未取得一致意见<sup>[1, 2]</sup>。本实验通过对兔离体软骨细胞的培养进行研究, 观察其生物学特性及中药黄芪对其的影响, 为临床应用奠定一定的理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验仪器与试剂 CO<sub>2</sub> 培养箱(BB-5060 型),

洁净工作台(BCM-1000 型), 电子天秤(AE240 型), 紫外可见分光光度计(6010 型)。黄芪注射液(成都地奥九泓制药厂, 批号: 0011179)、DMEM 培养基、F12 培养基(Gibco 公司)、链菌蛋白酶、II 型胶原酶、海藻酸钠(Sigma 公司)、阿新兰(Schmid GmbH 公司)、II 型胶原蛋白免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司), Hanks 液(自配)。

**1.2 软骨细胞的分离、制备** 选取 5 个月龄的新西兰兔 5 只处死。在无菌条件下切取双侧膝关节。取股骨、胫骨关节面的关节软骨后用 Hanks 液冲洗。软骨重量称重后按 12 ml/g 软骨加入链菌蛋白酶, 消化 1.5 h(37 °C 温箱), 600 r/min, 离心 5 次, 弃去上

清液,加入 II 型胶原酶(12 ml/g 软骨,放入 37 °C 孵箱过夜)。离心后,弃去上清液,过筛网,加基础培养液定容,用细胞计数板计算溶液中细胞浓度。离心(1 200 r/min)弃去上清液,按每毫升  $4 \times 10^6$  个细胞加入 1.2% 海藻酸钠溶液,混匀后制成 20 ml 海藻酸钠软骨细胞盘(8 × 10<sup>4</sup> 个细胞/盘)。

**1.3 分组培养、传代** 在 24 孔培养板每孔放入 1 ml 培养液,每孔放入 1 个盘,共培养 80 个盘,分为 A、B 两组,每组 40 个盘,A 组用 10% 的小牛血清 DMEM 培养;B 组每孔中加入 0.01 ml 黄芪注射液配制成含 2% 黄芪的培养液进行培养。两组均放入 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。分别于第 2、4、6、8 周各取出 10 个海藻酸钠软骨细胞盘进行细胞形态学观察,糖胺多糖(GAG)测定、SABC 双标免疫组化染色方法检测 II 型胶原蛋白的表达。

**1.4 检测项目及方法**

**1.4.1 细胞形态学观察** 将两组海藻酸钠软骨细胞盘培养到第 2、4、6、8 周,取出后,以常规方法制备石蜡切片 HE 染色,观察细胞形态学。

**1.4.2 GAG 含量的测定** 采用阿尔新兰分光光度法测定培养软骨细胞盘的硫酸化 GAG 的含量。

**1.4.3 II 型胶原蛋白的检测及免疫组化结果判定** 采用 SABC 双标免疫组化染色方法检测 II 型胶原蛋白的表达。II 型胶原蛋白的阳性表达均为棕红色分布于软骨细胞周围。(-)表示切片中无阳性细胞;(+)表示切片中为浅红色;(++)表示切片中为桔红色;(+++ )表示切片中为红褐色。同时阴性对照组:不加 I 抗,其他过程同正常程序,结果全为阴性。

**1.5 统计学方法** GAG 的测定结果采用成组设计定量资料的 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有显著性意义。

**2 结果**

**2.1 组织形态学 HE 染色结果** A 组:0 周时,软骨细胞为小圆形,胞浆透亮,核居中、核仁不清晰。从第 2、4、6 周可以看到在体外培养状态下,软骨细胞的体积逐渐增大,核增大,核仁明显,同源细胞群增多,胞浆中空泡逐渐增多,软骨周围淡蓝色基质范围在逐渐增大。8 周之后,软骨细胞明显出现退化现象,胞浆异常增大,且空泡明显增大,核浓缩变小,核仁不清晰。B 组:第 2 周时,细胞形态较 A 组同期规整,数目略多,周围基质范围有所增加,第 4~ 6 周时,可明显地看出细胞体积大,趋于成熟,核较大、核

仁明显,周围的基质阴影更明显。而 8 周之后,可看到胞浆增大,核浓缩略变小,核仁清晰可见。

**2.2 GAG 的测定结果** 原代细胞即有较多量 GAG 合成,在第 4 周达到高峰,第 4 周与第 2、8 周比较差异有显著性意义(*P* < 0.05)。随着培养时间的延长合成 GAG 的能力下降。从第 2 周开始 B 组合成 GAG 能力比同期 A 组明显增强(*P* < 0.05)(见表 1)。

表 1 不同检测时期 A 与 B 两组软骨细胞 GAG 的含量( $\bar{x} \pm s, \mu\text{g}/\text{盘}$ )

Tab. 1 Expression of glycosaminoglycon of group A and B in different time( $\bar{x} \pm s, \mu\text{g}/\text{plate}$ )

Groups	2 weeks	4 weeks	6 weeks	8 weeks
Group A	5.13 ± 1.20	10.81 ± 2.10 <sup>#</sup>	9.78 ± 2.10	5.67 ± 1.60
Group B	7.64 ± 1.60*	14.15 ± 2.20* <sup>#</sup>	12.64 ± 1.80*	8.79 ± 2.00*
<i>t</i> value	2.034	2.381	3.313	2.246
<i>P</i> value	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05

注:与同期 A 组相比\* *P* < 0.05;与组内 2 和 8 周相比<sup>#</sup> *P* < 0.05

Note:Compared with the expression of glycosaminoglycon on group A at the same time \* *P* < 0.05; Compared with the expression of glycosaminoglycon on same group in 2 and 8 weeks <sup>#</sup> *P* < 0.05

**2.3 II 型胶原蛋白免疫组化测定** A 组:0 周时可以看到部分培养细胞的胞核呈淡粉色,细胞周围基本未见显色。随着培养时间的延长,第 2、4、6 周可以看到细胞的着色在逐渐增强,显色范围逐渐增加,而且多集中在细胞周围的基质当中。进入 8 周后,可以看到黑褐色区域的范围在逐渐增大,而红褐色区域在相对缩小。B 组:从第 2 周开始,均较 A 组同期软骨细胞基质显色程度略深,范围有所增加,而从第 4~ 6 周可以看到较 A 组明显不同,显色程度加深,周围基质的显色范围也明显加大,而进入第 8 周之后,其黑褐色颗粒出现的范围较 A 组同期明显小。同时阴性对照组:不加 I 抗,其他过程同正常程序,结果全为阴性。

**3 讨论**

**3.1 组织工程软骨生物学的的评价** 关节软骨是特殊的结缔组织,有独特的力学和生物学特性。担负着关节的滑动,吸收震荡,维护着关节的正常功能。软骨细胞是关节软骨的惟一细胞,它所分泌的细胞外基质主要是胶原和蛋白多糖,胶原约占关节组织干重的 60%,蛋白多糖约占 25%~ 35%。研究表明:关节软骨至少含有 5 种不同类型的胶原<sup>[3]</sup>。II 型胶原提供基质的基本框架,是软骨基质中含量最多的有机成分,为关节软骨组织的特征性蛋白。因此,II

型胶原的合成与分泌是软骨细胞维持其分化表型的特定指标,其在工程化软骨的含量与组成结构已成为评价工程化软骨必不可少的重要指标。但在体内具有高分化特征、可分泌关节软骨组织特有的 II 型胶原的软骨细胞在体外普通培养时,软骨细胞表型不稳定,容易丧失其高分化状态,被称为软骨细胞的去分化(dedifferentiation)现象<sup>[4]</sup>。本实验采用免疫组化染色方法检测 II 型胶原蛋白,发现用 1.2% 的海藻酸钠为载体复合兔关节软骨细胞制成的海藻酸钠软骨细胞盘,在体外培养至第 4~6 周,II 型胶原的表达及 GAG 的合成达到高峰,细胞增殖功能旺盛,8 周后,二者开始下降。实验表明,用该载体复合软骨细胞制成的海藻酸钠软骨细胞盘能使培养的软骨细胞保持表型稳定。因此,海藻酸钠软骨细胞培养法构建组织工程化关节软骨是可行的。

**3.2 中药黄芪对组织工程软骨细胞生物学特性的影响** 软骨细胞合成代谢有两个基本途径,即标准的基因系统和特殊的糖系统。胶原是通过标准的基因系统途径合成的,在粗面内质网内,通过氨基酸集聚、脯氨酸和赖氨酸羟化等一系列程序,最终形成胶原纤维。蛋白多糖的合成是通过特殊的糖系统,与核糖核蛋白体合成,并加软骨素-4 和软骨

素-6,以及硫酸角蛋白连接在特殊位置而合成。本实验显示 2% 的黄芪对体外培养的软骨细胞分泌 GAG、II 型胶原蛋白有促进作用。其机制可能为黄芪的有效成分选择性地作用于软骨细胞合成代谢的途径。

第 8 周以后,与同期 A 组相比, B 组细胞基质仍能保持较旺盛状态,细胞表型基本稳定,其中与黄芪促进 GAG 的合成功能旺盛密不可分。而糖胺多糖是软骨的重要结构成分之一,在生理条件下可以电离,因而带有大量的负电荷具有强烈的亲水性,对维持软骨形态和功能起着重要作用<sup>[5]</sup>。为软骨细胞体外培养体系很好维持和促进软骨细胞的表型提供了一种新方法、新思路。

#### 参考文献

- 1 吕红斌,王嘉芙,岳珍.体外培养的兔软骨细胞对某些中药反应的超微结构观察.中国运动医学杂志,1997,16(1):56-58.
- 2 吕红斌,岳珍,王嘉芙.4种中药对体外培养兔关节软骨细胞代谢的影响.中国运动医学杂志,1995,14(3):135-137.
- 3 Freed LE, Vunjak NG. Microgravity tissue engineering in vitro cell. Der Biol Animal, 1997, 33: 381-385.
- 4 张长杰,范振华,黄北明.可聚蛋白多糖与骨关节炎.国外医学:物理医学与康复分册,1998,18(2):4-6.
- 5 岳珍,王嘉芙,吕红斌.行气消肿类中药对体外培养的软骨细胞代谢的影响.中国运动医学杂志,1998,17(1):34-37.

(收稿日期:2004-09-20 本文编辑:连智华)

## 骨伤科教学 VCD 出版信息

最新出版的 VCD: 外固定架在创伤骨科的应用 48. 髋关节置换术 48. 先天性髌脱位 48. 夹板固定 48. 腰椎间盘突出症的手法治疗 48. 牵引疗法 48. 骨伤科功能锻炼 48. 骨伤科常用临床检查方法 48. 内科常见病症的推拿治疗 48. 常见肩部伤筋的推拿治疗 38. 常见腰腿痛的推拿治疗 48. 推拿手法治疗颈椎病 48. 膝部伤筋的推拿治疗 48. 腕部伤筋的推拿治疗 48. 推拿练功之少林功 48. 推拿练功之易筋经 48. 骨关节疾病的影像诊断 48. 中风的康复治疗 48. 拔罐法 48. 腧穴疗法 48. 小儿常见病的推拿治疗 38. 家庭小儿保健按摩 38. 足部按摩 48. 经外奇穴的部位与临床应用 38. 颈椎病的诊断与治疗 48. 理筋手法 48. 坐骨神经痛的中医治疗 48. 中老年人自我保健按摩 48. 胫骨骨折内固定术 38. 股骨骨折绞锁髓内钉固定术 48. 脊柱相关疾病的手法治疗 48. 多发性骨髓瘤 48. 骨骼系统放射性核素检查 48. 脊柱与四肢体格检查 38. 骨科常用护理技术操作 48. 运动系统解剖(骨、关节)48. 中华医学音像版 VCD: 中国骨伤学(±15 辑)(1)中国骨伤学发展史 50.(2)骨伤总论 50.(3)上肢骨折(一)50.(4)上肢骨折(二)50.(5)下肢骨折(一)50.(6)下肢骨折(二)50.(7)躯干骨折 50.(8)脱位 50.(9)伤筋总论 50.(10)伤筋手法疗法 50.(11)练功疗法 50.(12)上肢伤筋 50.(13)下肢伤筋 50.(14)颈部伤筋 50.(15)腰部伤筋 50. 中医名家整复手法荟萃(1)河南正骨 50.(2)杨天鹏理筋手法 50.(3)石氏伤科 50. 骨折的现场急救 40. 学按摩(2 片)80. 儿科推拿疗法 50. 小儿推拿常用手法和穴位 50. 内科常见慢性病的推拿治疗 50. 实用推拿手法 50. 双针刺法及胡兴立推拿经验 50. 头颈部疾病按摩基本手法 40. 李墨林先生按摩手法 50. 腰小关节紊乱、腰椎间盘突出症 40. 急性腰扭伤 40. 骨关节损伤治疗手法 40. 脊柱损伤性疾病整治手法 50. 漏肩风的防治 40. 理筋手法疗法 50. 牵引技术 50. 多方位整脊疗法 50. 软组织损伤特殊试验 50. 腰椎间盘突出症的治疗 50. 骨伤科外用药的配置与应用 50. 外洗药在骨伤科临床应用 40. 骨关节炎治疗新进展(附导读一册)80.

邮购办法: 以上片名后数字为定价(元), 免收邮费, 一次购 100 元以上 9 折优惠, 200 元以上 8 折优惠。片名如写不下请来函、短信(13521666588)或电话告知。汇款地址: 北京 100050 信箱三分箱 医林书店收。电话(传真): 010 89590266。联系人: 赵洁。备有新书及千余种光盘目录, 来函、电话、短信或电子邮件索取即寄, 本店电子信箱: yilinsd@sohu.com