

· 基础研究 ·

膝骨关节炎滑膜细胞体外培养及生物学特性观察

张鹏¹, 石关桐², 郑昱新²

(1. 上海市第六人民医院针推伤科, 上海 200233; 2. 上海中医药大学附属曙光医院骨伤科)

【摘要】目的:观察原发性膝骨关节炎患者滑膜细胞的体外生长特性,探讨骨性关节炎的发病机制。方法:组织块培养法分离早期与晚期(依据 Kellgren和 Lawrence的放射学诊断标准划分)OA患者滑膜细胞进行培养,用光镜、电镜、组织化学方法等观察鉴定该细胞类型。结果:患者滑膜细胞符合巨噬样滑膜细胞(A型细胞)及成纤维细胞样滑膜细胞(B型细胞)的特征,早期与晚期滑膜细胞在生长周期及细胞超微结构等方面存在差异。晚期较早期滑膜细胞生长周期长、生长极向性差、细胞内溶酶体丰富。结论:组织块培养法可以有效分离人类关节滑膜细胞,建立原发性膝骨关节炎患者滑膜细胞系。

【关键词】滑膜; 细胞,培养的; 骨关节炎,膝

Biologic characteristics of human synoviocytes of gonarthrosis in vitro ZHANG Peng, SHI Guan-tong*, ZHENG Yu-xin* Department of Traumatology and Orthopaedics of the 6th Hospital of Shanghai, Shanghai 200233, China

ABSTRACT Objective: To investigate the biological characteristics of human synoviocytes of primary gonarthrosis in vitro **Methods:** Human synoviocytes were isolated from synovial membrane (earlier stage and later stage of OA) by tissue culture isolation, which were identified by light microscope, electron microscope, histochemical method **Results:** The isolated cells were in accordance with the characteristics of macrophage-like synoviocytes (type-A synoviocytes) and fibroblast-like synoviocytes (type-B synoviocytes). Differences showed in the growth cycles, differentiations and ultra microstructures between the two stages **Conclusion:** Tissue culture isolation is an effective isolation of human synoviocytes to establish the human synoviocyte line of primary gonarthrosis

Key words Synovial membrane; Cells, cultured; Osteoarthritis, knee

骨关节炎 (osteoarthritis, OA), 又称骨关节病、退行性关节病,是最常见的一种慢性、进展性关节疾病。滑膜细胞是构成滑膜层的最大细胞群体,因此体外滑膜细胞的培养是探求骨关节炎发病机制、体外筛选治疗药物的重要手段。人类关节滑膜细胞的分离培养方法较多^[1-3],我们采用组织块培养法,建立早期与晚期原发性膝骨关节炎患者滑膜细胞系,并对其特性及两期细胞的差异进行了观察。

1 材料与方 法

1.1 试剂及器材 含 10%小牛血清 (杭州四季青)的 DMEM 培养液 (Gibco)、胰蛋白酶 (Sigma)、25 cm² 细胞培养瓶、24孔、96孔细胞培养板 (Coming公司 Corstar)、倒置相差显微镜 (Olympus)、CO₂ 细胞培养箱、超净工作台 (上海净化设备厂)、酶标分析仪 (Multiskan ms)、非放射性细胞增生检测试剂盒 (Promega)、CM-120透射电镜 (Philips)。

1.2 人类滑膜细胞的分离与培养

1.2.1 滑膜组织 膝骨关节炎患者滑膜组织由上海交通大学附属瑞金医院骨科提供。年龄为 48~61岁患者,病症符合美国风湿病学院于 1986年提出的膝 OA 诊断标准^[4],并依据 Kellgren和 Lawrence的放射学诊断标准分为早期 (0~2级)与晚期 (3~4级)患者。经膝关节镜清创手术获取病变滑膜组织。

1.2.2 滑膜细胞的组织块培养法^[5] D-Hanks液漂洗滑膜组织 3次,剪碎至 1 mm³的小块,少量培养液湿润培养瓶底,将滑膜组织块以间距 5 mm左右放入培养瓶内,将培养瓶放置入培养箱内,待 2 h后组织小块贴附,缓缓加入 1 ml培养液覆盖组织小块。

1.2.3 滑膜细胞的原代培养 培养 24 h后补加 4 ml培养液。2 d后首次更换培养液,除去未贴壁的组织块,补充新鲜培养液,以后隔天换液,倒置相差显微镜下逐日观察细胞形态及增殖水平,适时拍照记录,直至组织块周围细胞铺满 50%培养瓶底面,此为滑膜细胞的原代培养。

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (30472222)

通讯作者:石关桐 Tel: 021-53831114 E-mail: gtshi@sina.com

1.2.4 滑膜细胞的传代培养:原代培养的滑膜细胞铺满培养瓶底面 50%面积时,即可进行传代培养。以 0.25%胰蛋白酶溶液将贴壁细胞消化分离(37℃, 3~5 min),小牛血清终止,按 1:2比例进行传代培养接种,此为 1代滑膜细胞。待布满培养瓶底面 90%面积时,即可按 1:2比例再次进行传代培养。

1.3 四唑氮化合物(MTS)/黄嘌呤氧化酶(PMS)比色法^[7]测定滑膜细胞生长曲线 取培养 3~5代滑膜细胞,经胰蛋白酶消化后制备成滑膜细胞悬液,光镜下计数后接种于 4块 96孔细胞培养板中,每块板接种 8个复孔,接种密度 5×10^4 个细胞/cm², 10%小牛血清培养,连续观察 9 d,共 4个点(分别是第 2、4、6、9天),以 MTS/PMS比色法测定细胞增殖,共测量 4次,绘制细胞生长曲线。

1.4 人滑膜细胞的鉴定

1.4.1 HE染色光镜观察 将 3~5代滑膜细胞悬液加入 12孔培养板内(孔内预置有 1.5 cm × 1.5 cm大小方玻片),培养 7 d后取出玻片。D-Hanks液漂洗,乙醇梯度脱水、固定,常规 HE染色,二甲苯透明后封固。倒置相差显微镜下观察细胞的形态及生长状况。

1.4.2 组织化学观察 按以往方法^[7]分别进行 ARS及甲苯胺蓝染色,光镜观察。

1.4.3 透射电镜观察 取布满瓶底 90%面积的 3~5代滑膜细胞,2%戊二醛 PBS固定液固定 2 h,1%锇酸 PBS固定液固定 2 h,乙醇梯度脱水,环氧丙烷置换 2次后 618包埋液浸透。超薄切片,枸橼酸铅电子染色。Philips CM-120透射电镜观察。

2 结果

2.1 细胞活体相差显微镜观察 原代培养的滑膜细胞组织块贴附后第 2天即可见组织块边缘有细胞爬出,细胞呈树突样、成纤维细胞样、巨噬细胞样及卵圆形等不同,以卵圆形细胞为主,待生长 2周后成纤维细胞样细胞比例逐渐增加,并呈长梭

状极向排列(图 1)。早期患者原代滑膜细胞约经 21 d布满瓶底 50%面积,晚期患者原代滑膜细胞生长慢于早期患者,约需 30 d左右。

经传代以后滑膜细胞增殖迅速,7 d(早期)或 10 d(晚期)即可布满瓶底 90%面积,此时已可见分泌颗粒及囊泡出现。1代以后 B型滑膜细胞比例逐渐增加,至第 3代可占视野内细胞 95%以上。此时如不进行传代培养而继续定期更换培养液,则可见不透光的结节出现,且密度及数量渐增(图 2)。

2.2 滑膜细胞生长曲线 2~6 d细胞快速增殖,6 d左右细胞增殖接近高峰后逐渐平缓,增殖速度明显下降(见表 1)。

表 1 滑膜细胞生长曲线值(OD值)

Tab 1 The growth curve of synoviocytes(OD)

| 培养时间(d) | OD值(n=8) |
|---------|---------------|
| 2 | 0.560 ± 0.042 |
| 4 | 0.747 ± 0.056 |
| 6 | 1.059 ± 0.091 |
| 9 | 1.067 ± 0.073 |

2.3 HE染色光镜观察 光镜下见早期组滑膜 A型细胞呈卵圆形或呈不规则形状,胞周有短突起,核仁清晰; B型细胞呈梭形或柱形,细胞核呈卵圆形位于细胞中央,核仁明显,细胞周围可见分泌物集聚。晚期组与早期组相比较可见细胞排列极向性稍差。

2.4 组织化学观察 ARS染色:结节呈由红至深红染的强阳性,散在于视野中;甲苯胺蓝染色:结节及周围细胞皆呈阳性反应,结节处异染质呈深蓝色。此生物学特性同于采用胰蛋白酶消化法分离之滑膜细胞^[1]。

2.5 透射电镜观察 早期组 A型滑膜细胞内有较多的线粒体、次级溶酶体,仅有少量的粗面内质网和游离核糖体分散于胞质内; B型滑膜细胞内核仁明显,粗面内质网和高尔基体高

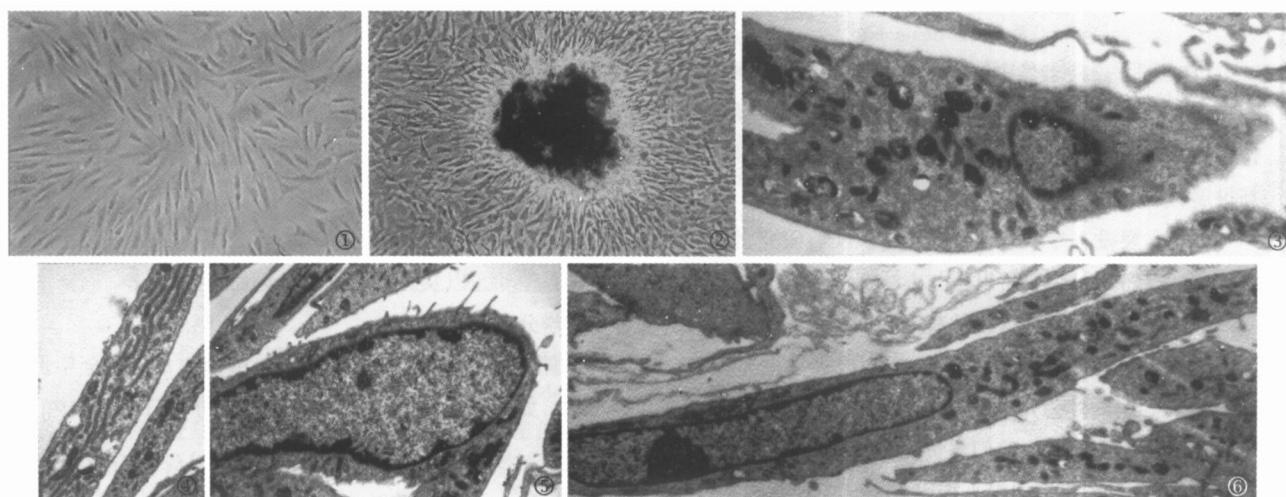


图 1 第 1代滑膜细胞生长 3 d后 图 2 3代滑膜细胞生长 75 d后 图 3 早期 A型滑膜细胞(×9 700) 图 4 早期 B型滑膜细胞(×9 700) 图 5 晚期 A型滑膜细胞(×9 700) 图 6 晚期 B型滑膜细胞(×7 400)

Fig 1 The synoviocytes in the 1st passage cultures were cultured for 3 days Fig 2 The node of the synoviocytes in the 3rd passage cultures was cultured for 75 days Fig 3 The type A synoviocytes of earlier stage of OA (×9 700) Fig 4 The type B synoviocytes of earlier stage of OA (×9 700) Fig 5 The type A synoviocytes of later stage of OA (×9 700) Fig 6 The type B synoviocytes of later stage of OA (×7 400)

度发达,胞浆突起长而粗。符合以往文献^[3,8]记载两型细胞的特征。而晚期组的差异则主要表现为:B型滑膜细胞内除了较发达的粗面内质网以外,还有较多的溶酶体分布(图3-6)。可能与其生长时间较长,在生长过程中吞噬了细胞碎片与分泌颗粒等物质有关。

3 讨论

正常人类关节滑膜约 1~3 μm厚,可分为内膜和内膜下层 2层。内膜是由相互重叠成 2~3层的滑膜衬里(Synovial lining cells)组成。这些细胞又可分为 A型、B型和尚存有争议的 C型 3种滑膜细胞,这些细胞包埋在颗粒状无定形的基质中,基质内有分散的纤维分布。A型滑膜细胞是关节内的主要炎性细胞,具有吞噬并降解和清除关节腔内颗粒物质及细胞碎片、合成并释放溶解酶类等功能。在正常情况下,其活性较低。但是,一旦被激活,它们可以产生炎症反应,合成并分泌白细胞介素 1(IL-1)和肿瘤坏死因子(TNF)等。这些炎症反应一方面促进了组织的修复,另一方面又导致了关节的损伤。B型滑膜细胞内丰富的、高度发达的粗面内质网和高尔基体反应了其具有分泌功能,是关节内的主要功能细胞。作为成纤维细胞的一种特殊亚型,其具有合成和分泌透明质酸、Ⅱ型胶原蛋白等的能力^[8]。

人类关节滑膜细胞的分离培养方法较多,可单用胰蛋白酶^[1]或胶原酶^[2]消化滑膜组织而获得滑膜细胞,也可以采用联合使用胶原酶和胰蛋白酶消化的方法^[3]。本实验采用较为传统的滑膜组织块贴附培养法,同样可以获得实验所需的滑膜细胞,且具有以下优点:所需滑膜组织量少,仅 5 mm³左右滑膜组织即可以进行培养;避免了购买价格昂贵的胶

原酶;经 3次传代后的细胞数量足可用于实验研究。但如传代超过 5次后会出现细胞老化现象,增殖速度减慢,细胞形态变化较大,至第 8代完全失去增殖活性。

采用本法分离培养滑膜细胞,需注意以下几点:取材要保证新鲜无菌,可用培养液及冰块暂时保存,并尽快进行分离培养;滑膜组织冲洗尽量仔细,以冲去组织块上血细胞及脂肪组织等;剪切滑膜组织时应尽量剪碎,以剪碎至 1 mm³的小块为宜;补加培养液时应缓缓加入,避免将已贴附的组织块冲起,导致分离培养失败。

参考文献

- 1 邓廉夫,柴本甫,齐进.损伤性和骨关节炎性滑膜细胞成骨作用的体外研究.中华骨科杂志,1997,17(11):693-695.
- 2 曾润铭,张忠民,金大地.类风湿关节炎滑膜细胞向破骨细胞分化实验研究.中华风湿病学杂志,2005,9(3):149-153.
- 3 蒋建平,杨铁城,侯凡凡,等.人类关节滑膜 A型和 B型细胞的分离和体外培养.第一军医大学学报,2001,21(1):52-55.
- 4 Altman R, Asch E, Bloch D, et al Development of criteria for classification and reporting of osteoarthritis Classification of osteoarthritis of the knee. Arthritis Rheum, 1986, 29: 1039-1049.
- 5 司徒镇强,吴军正.细胞培养.西安:世界图书出版西安公司,2004.72-73.
- 6 刘巧红,沈凌汛,滕云,等.甲氨喋呤对类风湿关节炎滑膜细胞增生及细胞周期的影响.中华风湿病学杂志,2004,8(4):223-226.
- 7 柴本甫,汤雪明,徐荣辉.家兔皮肤成纤维细胞的成骨潜能(组织化学及放射自显影研究).中华骨科杂志,1994,14(11):682.
- 8 陈百成,张静.骨关节炎.北京:人民卫生出版社,2004.52-96.

(收稿日期:2006-07-10 本文编辑:李为农)

《中国骨伤》2007年征订启事

《中国骨伤》杂志是中国中西医结合学会和中国中医科学院主办的国家级专业性学术期刊,是中国期刊方阵双奖期刊。本刊办刊宗旨是坚持中西医并重原则,突出中西医结合特色,执行理论与实践、普及与提高相结合的方针。主要报道中医、西医和中西医结合在骨伤科领域的科研成果、理论探讨和临床诊疗经验,反映我国骨伤科在医疗、科研工作中的新进展,以促进国内外骨伤科的学术交流。

本刊主要设有专家述评、临床研究、实验研究、骨伤论坛、学术探讨、影像分析、诊治失误、经验交流、文献综述、手法介绍、继续教育园地、科研思路与方法、临床病例报告、国内外骨伤科医学动态以及医学书刊评价等栏目。

凡订阅本刊并参加继续教育园地试题答题者可获继续教育 类学分。

本刊为月刊,每月 25日出版,期刊内页采用 80 g亚光铜版纸,国际通用 16开大版本,72页,单价 9.80元,全年价 117.60元。国内外公开发售,全国各地邮局订阅,邮发代号:82-393。如错过征订机会,杂志社亦可代办补订(请直接汇款至杂志社),国内订户我们将负责免费邮寄。

地址:北京东直门内南小街甲 16号《中国骨伤》杂志社 邮编:100700

电话:010-84020925,010-64014411-2693 传真:010-84036581

http://www.zggszz.com E-mail:zggszz@sina.com