

· 基础研究 ·

循环静水压力对维持兔软骨细胞表型的影响

黄正¹, 傅文¹, 冯伟¹, 张凤华², 朱雅萍¹, 魏立¹, 周琦¹, 袁石福¹, 黄好³, 杜宁²

(1. 上海市交通大学医学院附属瑞金医院伤骨科研究所, 上海 200025; 2. 上海市交通大学医学院附属瑞金医院伤骨科; 3. 上海市仁和医院口腔科)

【摘要】 目的:本研究将兔软骨细胞放在静水压力负载装置中培养,并传代,施加不同频率和大小的静水压,观察其对兔软骨细胞表型的影响。方法:用酶消化法获取兔关节软骨细胞,分别在不同的压力和频率下作普通培养瓶贴壁的单层培养,并传代。40 kPa循环静水加压为实验组,40 kPa持续静水加压培养和常压培养作为对照。型胶原和型胶原免疫组化,苏木素套核染色,倒置显微镜观察摄像。以 RT-PCR方法检测软骨细胞中蛋白聚糖、聚集蛋白聚糖、型胶原和型胶原 mRNA的表达。结果:在循环静水压力下培养,软骨细胞有较高的细胞增殖率,培养至第 7代未见明显表型改变,仍然表达型胶原、蛋白聚糖和聚集蛋白聚糖等。常压培养,软骨细胞传代至第 5代以后,逐渐失去软骨细胞的特有表型。而持续静水压力培养的软骨细胞传代至第 3代以后就开始逐渐失去软骨细胞的特有表型。结论:一定的循环静水压力能维持软骨细胞的合成分泌功能,有助于软骨细胞特有表型的稳定。

【关键词】 软骨细胞; 压力; 细胞培养技术

Effects of cyclic hydrostatic pressure on the stability of chondrocyte phenotype in vitro HUANG Zheng^{*}, FU Wen-yu, FENG Wei, ZHANG Feng-hua, ZHU Ya-ping, WEI Li, ZHOU Qi, YUAN Shi-fu, HUANG Hao, DU Ning^{*} The Institute of Orthopaedics and Trauma, the Affiliated Ruijin Hospital of Jiaotong University of Shanghai, Shanghai 200025, China

ABSTRACT Objective: To investigate how to maintain the chondrocytes phenotype under cyclic hydrostatic pressure **Methods:** Isolated rabbit chondrocytes which were obtained by using protease digestion method were cultured in monolayer and propagated under cyclic hydrostatic pressure (in experimental group), sustained hydrostatic pressure, or normal pressure (in control group). The proliferation and the intracellular matrix of chondrocytes were observed under light microscopy. The expression of proteoglycan, aggrecan, collagen type and were detected with reverse transcription-polymerase chain reaction **Results:** Under the cyclic hydrostatic pressure culture, the growth rate was higher than that of other groups without chondrocyte phenotype changing until cultured to the 7th passage. Under the sustained hydrostatic pressure culture, the chondrocytes changed phenotype gradually after cultured to the 3rd passage. Under the normal pressure culture, the chondrocytes changed phenotype after cultured to the 5th passage. **Conclusion:** Cyclic hydrostatic pressure system is a promising method for the maintenance of the chondrocytes phenotype

Key words Chondrocytes; Pressure; Cell culture techniques

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2007, 20(3): 180-183 www.zggszz.com

以往研究发现,单层培养的关节软骨细胞在培养过程中逐渐失去了典型软骨细胞的形态学特征,变得像成纤维细胞,而且型胶原的分泌减少,失去了软骨细胞特异性,即出现了分化^[1]。Lee等^[2]发现,机械应力可诱导软骨细胞凋亡,改变软骨细胞的新陈代谢,从而导致关节软骨的退变。有学者发现,骨性关节炎早期簇聚软骨细胞合成型胶原,随着病变进展,最终只合成型和型胶原,去分化变为纤维样细胞^[3]。软骨细胞的培养,是研究软骨细胞活化分化过程中细胞分子

学特征的一种强大的工具,但是软骨细胞在传代时也有向纤维原细胞去分化的倾向,这在软骨细胞培养中是一个主要问题^[4]。认识并研究去分化软骨细胞,并使其再分化,对研究骨性关节炎和制造足够量的软骨细胞用于修复软骨缺损的组织工程都有重要意义。本文研究了循环静水压力下软骨细胞的培育方法,对照常压下培养和持续静水压力下培养并传代,观察软骨细胞生长特点、增殖率、细胞外基质和细胞特有表型的维持情况。

1 材料和方法

1.1 主要仪器和试剂 压力装置:主要由一个密封容器和压缩气体钢瓶以及 2个阀门组成。容器可以容纳培养板和培养瓶,并可以放入普通培养箱当中。压缩气体为 5%二氧化碳和 95%空气组成的混合气体,通过阀门调节可以提供 10~

基金项目:国家自然科学基金资助(编号:30271628),上海市自然科学基金(编号:03ZR14084),上海市教委基金(编号:02XJ21021,04BB22),上海市卫生局课题(编号:034077)
通讯作者:黄正 Tel: 021-64370045-663339, 021-29669082 E-mail: hardeesss@126.com

400 kPa的循环压力。酶标分析仪 (WellscanMK), 培养箱 (Heraeus B25060 EK2C0 2), PCR 扩增仪 (GeneAmp9600型, 美国), 电泳槽 (Bio-RAD), Fluor-SSM Mult Imager凝胶图像分析系统。Olympus IX70倒置式相差显微镜, Olympus Vanox-T系统显微镜。DMEM 购自 Hyclone公司, PCR 引物由上海生物工程技术有限公司合成, Trizol (Invitrogen, 美国)。

1.2 软骨细胞的分离和培养

1.2.1 软骨细胞的分离

用酶消化法分离兔软骨细胞。由上海市松江区松联实验动物场提供的兔龄小于 24 h 的新西兰白兔 4 只, 雌性, 20 g 左右, 浸泡在 75% 的乙醇处死并消毒。取肩、肘、髌、膝的透明关节软骨, 剪碎组织, 用 Hanks 液冲洗。组织中加入 0.25% 的胰酶 15 ml (按照组织体积的 10 倍), 37 ℃, 搅拌 10 min, 弃上清, 加入含 10% 小牛血清的培养液 1 ml 终止消化。加入 0.2% 胶原酶 15 ml, 37 ℃, 搅拌 30 min, 取上清, 每 10 min 1 500 转离心, 将离心管底部获取的软骨细胞用 10% DMEM 吹打散, 移入培养瓶或者培养板。重复步骤在软骨碎片中加入 0.2% 胶原酶再消化分离软骨细胞 2 次。

1.2.2 软骨细胞的培养

将分离得到的软骨细胞以每瓶 1×10^6 细胞密度接种于 25 cm^2 的培养瓶中, 分 3 组放入压力装置中培养并传代。A 组, 循环静水加压实验组。将密封容器放入普通培养箱, 通过调节阀把压力设置为 40 kPa, 每天加压 4 h。B 组, 持续静水加压对照组。压力设置为 40 kPa, 每天持续加压 24 h。C 组, 常压对照组。关闭阀门, 密封容器内的细胞在常压下培养。

1.3 观测指标

1.3.1 软骨细胞形态观察

用倒置相差显微镜观察软骨细胞的形态特征。

1.3.2 生长曲线

MTT 法分析不同压力对软骨细胞增殖的影响^[5]。各组选取第 1、4、7 代细胞都分别接种在 96 孔板上, 每代接种 10 孔, 接种密度同培养瓶 (约 6×10^3 孔), 分为 A、B、C 3 个组 (分组同上)。分别在接种贴壁后第 1~7 天终止培养, 每孔加入 20 μ l MTT, 静置 4 h, 倒去液体, 每孔加入二甲亚砜 (DMSO) 150 μ l 过夜, 酶标仪读出每孔的吸光度 (OD 值)。以时间 (d) 为横坐标, OD 值为纵坐标, 绘制细胞生长曲线。

1.3.3 免疫组化

将划好大小合适的灭菌玻片放入 24 孔培养板, 滴入每代细胞悬液, 每孔接种密度同培养瓶 (约 5×10^4 孔)。在贴壁细胞占瓶底 80% 时取出玻片, PBS 冲洗 2 遍, 95% 乙醇固定 10 min, 再用 PBS 冲洗 2 遍, 最后加入 PBS 覆盖, 放入 -4 ℃ 保存。使用北京中杉金桥生物技术有限公司 SP-9002 型胶原和 型胶原免疫组化染色试剂盒, 一抗为鼠多克隆抗体, 二抗为生物素标记山羊抗小鼠 IgG。按照说明书操作, 终止反应后 5 min, 加入苏木素套核染色 5 min, 最后用蒸馏水冲洗干净。Olympus Vanox-T 系统显微镜数码相机, Viewfinder Lite 1.0 成像系统以及 Leica Qwin Cobur 软件分析。型胶原和 型胶原的阳性结果为黄褐色颗粒状染色。

1.3.4 RT-PCR 检测

培养瓶底长满细胞后用 TRIZOL 裂解细胞, 抽提 RNA, 逆转录为 cDNA, 加入引物 56~35 循环作聚合酶链式反应。GAPDH: 5' GGA GCCAAAAGGGTCA TC3'; 5' CCA GTGA GTTCCCGTTC3 (346bp)。型胶原: 5' TTCT-

TGGTGCTCCTGGCA TTC3'; 5' GCAA TCCGTTGTGTCCCTTTA TG-3 (489bp)。型胶原: 5' GACCCCA TGCA GT ACATG3'; 5' GACGGTCTTGCCCCACTT3 (648bp)。蛋白聚糖 (PG): 3' GAGGTGGTGGTGA AAA GGTGT5'; 3' GTGTGGA TGGGGTACCT-GAC5。聚集蛋白聚糖: 5' GAGGTCGTGGTGAAA GGTGT3'; 5' GTGTGGA TGGGGTACCTGAC3 (206bp)。产物凝胶电泳, 紫外灯下拍照 Fluor-SSM Mult Imager 凝胶图像系统分析。

1.4 统计处理

MTT 法检测的 OD 值用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 每组 $n = 10$, 采用 SPSS 10.0 统计软件运用单因素 3 水平方差分析方法对数据进行统计处理。RT-PCR 检测的各样本表达量 = 各样本目的基因净光密度 / 各样本 GAPDH 净光密度。

2 结果

2.1 形态学观察

分离的软骨细胞通常在 24~48 h 陆续贴壁, 倒置相差显微镜下可见原代细胞均匀分布的圆形、椭圆形或三角形, 边缘光滑锐利, 一般 4~7 d 可长满瓶底。当细胞占瓶底 80% 时用 0.25% 胰酶消化传代, 传代接种密度 1×10^6 瓶。A 组循环加压的细胞第 1~7 代与原代细胞的外形及生长方式基本一致, 第 7 代依然可以在 7 d 长满瓶底。B 组持续加压的细胞, 从第 3 代开始细胞形态开始变化, 变成长梭形, 细胞体积增大, 边缘不光滑, 有多个指状突起, 细胞边界不清常重叠, 胞浆多, 胞核小。与原代细胞同样的接种密度, 第 7 代细胞 4 周仍然不能长满瓶底。C 组常压下培养, 从第 5 代开始细胞形态出现变化, 第 7 代细胞 2 周才能长满瓶底。

2.2 生长曲线

第 1 代软骨细胞 3 组比较 (图 1): 3~5 d 各组细胞快速增殖, 为细胞增殖期, 5~7 d 细胞增殖到高峰后逐渐平缓, 为平台期。3 组间增殖规律没有明显差异。第 4 代软骨细胞 3 组比较 (图 2): 1~3 d 各组细胞相对数量差异不大, 细胞快速增殖期可见 A 组的细胞增殖率最高, 增殖期延续到 6 d, 细胞相对数量最多; B 组 3~4 d 以后细胞增殖明显趋缓, 细胞相对数量最少。第 7 代软骨细胞 3 组比较 (图 3): A 组仍然保持较高的细胞增殖率, B 组第 3 d 增殖趋缓, 第 7 d 细胞相对数量只有 A 组的 1/2。选取 A、B、C 3 组第 1、4、7 代 7 d 的 OD 值 ($\bar{x} \pm s$) 采用方差分析进行统计处理, $df = 27$, 第 1 代 3 组比较 $P > 0.05$, 第 4、7 代 3 组比较 $P < 0.05$, 可见第 1 代在第 7 天时 3 组间差异无显著性意义, 第 4 代和第 7 代在第 7 天的 OD 值 3 组间比较有统计学差异, 说明循环静水加压促进了细胞增殖, 持续静水加压则抑制了细胞增殖。

2.3 免疫组化和 型胶原表达:

A 组 1~7 代均有 型胶原稳定表达, 第 7 代也未见 型胶原着色; B 组第 3 代 型胶原表达明显减弱, 并且开始出现 型胶原着色, 第 4 代起胞浆未见棕褐色 型胶原的特异性染色。C 组第 5 代 型胶原表达明显减弱, 出现 型胶原着色, 第 6 代起未见 型胶原染色 (图 4-7)。

2.4 RT-PCR 结果

各样本表达量 = 各样本目的基因净光密度 / 各样本 GAPDH 净光密度。A 组: 1~7 代均有 型胶原 (图 8), 蛋白聚糖和聚集蛋白聚糖稳定表达, 未见 型胶原表达。B 组: 第 3 代 型胶原表达水平降低, 第 4 代起未见 型胶原表达 (图 9), 同时蛋白聚糖和聚集蛋白聚糖表达减少。

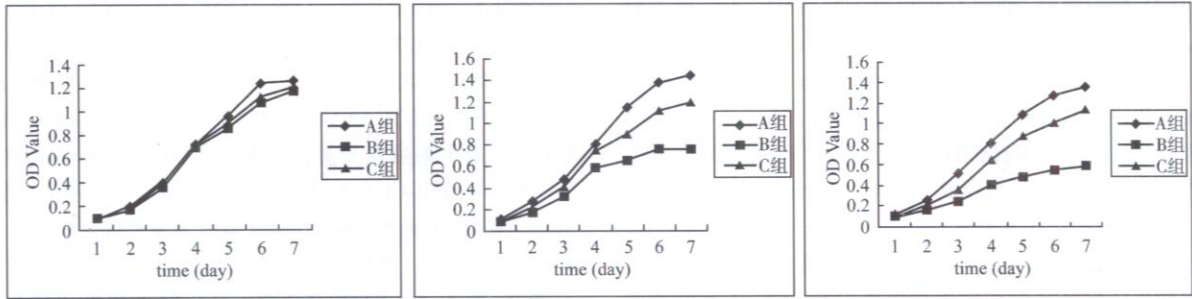


图1 第1代生长曲线 A组:循环静水加压组 B组:持续静水加压对照组 C组:常压对照组 图2 第4代生长曲线 A组:循环静水加压组 B组:持续静水加压对照组 C组:常压对照组 图3 第7代生长曲线 A组:循环静水加压组 B组:持续静水加压对照组 C组:常压对照组

Fig. 1 Growth curve of the 1st passage Group A: cyclic hydrostatic pressure group Group B: sustained hydrostatic pressure group Group C: normal pressure group Fig. 2 Growth curve of the 4th passage Group A: cyclic hydrostatic pressure group Group B: sustained hydrostatic pressure group Group C: normal pressure group Fig. 3 Growth curve of the 7th passage Group A: cyclic hydrostatic pressure group Group B: sustained hydrostatic pressure group Group C: normal pressure group

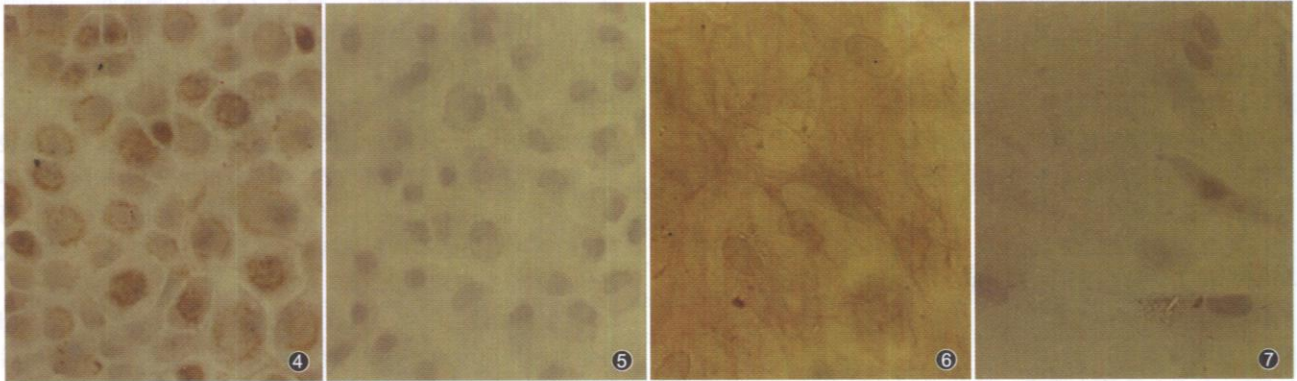


图4 循环静水压力培养的软骨细胞Ⅱ型胶原染色:循环静水压力刺激下培养的第7代软骨细胞呈圆形、椭圆形或三角形,边缘光滑锐利,细胞边界清晰,细胞核为苏木素染色呈深蓝色,胞浆有褐色颗粒状着色,为Ⅱ型胶原特异性染色。× 200

图5 循环静水压力培养的软骨细胞Ⅰ型胶原染色:循环静水压力刺激下培养的第7代软骨细胞未见Ⅰ型胶原的阳性染色。× 200 图6 持续静水压培养的软骨细胞Ⅰ型胶原染色:持续静水压力刺激下培养的第3代细胞去分化体积增大,边缘不光滑,有多个指状突起,细胞边界不清,胞浆多,褐色细颗粒状为Ⅰ型胶原特异性染色。× 200

图7 持续静水压力培养的软骨细胞Ⅱ型胶原染色:持续静水压力刺激下培养的第3代软骨细胞去分化,呈梭形,体积增大,边缘不光滑,细胞边界不清,未见软骨细胞特异性Ⅱ型胶原染色。× 200

Fig.4 The 7th passage chondrocytes under the cyclic hydrostatic pressure culture. The cells proliferated as clumps of circular, oval or triangular cells, and were stained brown and yellow. The nucleolus were stained blue by collagen type II antibody × 200 Fig.5 The 7th passage chondrocytes under the cyclic hydrostatic pressure culture. The cells were not positively stained by collagen type I antibody × 200 Fig.6 The 3rd passage chondrocytes under the sustained hydrostatic pressure culture. The shape of the cell was big and irregular. The cells were stained brown and yellow, and nucleolus were stained blue by collagen type I antibody × 200 Fig.7 The 3rd passage chondrocytes under the sustained hydrostatic pressure culture. The cells proliferated as clumps of long shuttle cells, and not stained positively by collagen type II antibody × 200

C组:第5代 Ⅱ型胶原表达水平降低,出现 Ⅰ型胶原表达,第6代起未见 Ⅱ型胶原表达,蛋白聚糖和聚集蛋白聚糖表达水平降低。

3 讨论

许多学者对退行性变软骨的软骨细胞进行体外培养和观察发现,软骨中有类似成纤维细胞样的软骨细胞,趋于成纤维化的软骨细胞越多,病变软骨组织骨化现象越严重^[6]。压应力作用于软骨细胞产生的细胞因子,可能在骨关节炎发病过程中起重要作用^[7]。骨性关节炎的软骨细胞通过 5 l integrin途径传导机械应力刺激,提示了机械应力与骨性关节炎软骨细胞向纤维细胞去分化有一定内在联系^[8]。循环流体

力学的研究,表明机械应力在体内软骨细胞修复和重建中有重要意义^[9]。循环静水压力对维持软骨细胞表型的研究,不仅能够改善体外培养软骨细胞的技术,获得大量表型稳定的软骨细胞,同时对研究骨关节炎发病过程也有一定的提示作用。关节软骨主要由软骨细胞和胞外基质组成,胞外基质主要包括胶原和蛋白多糖,其中 Ⅱ型胶原占胶原的 95%^[10]。体外培养软骨细胞经过多次传代以后发生转型,最主要的变化就是从合成 Ⅱ型胶原转为合成 Ⅰ型胶原^[11],因此可以把 Ⅱ型胶原和蛋白多糖作为软骨细胞正常表型的标志,而 Ⅰ型胶原合成可作为去分化细胞的典型表型标志。关节运动时软骨经历循环应力载荷而发生周期性变形和恢复。现在越来越

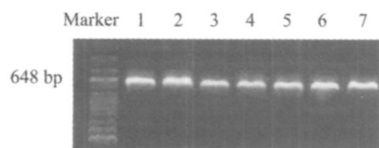


图 8 A组 型胶原 RT-PCR 检测, A组 (循环静水加压组) 1~7代均有 型胶原表达 (从左到右分别为 1~7代)

Fig. 8 In the Group A, the 1st to 7th passage chondrocytes under the cyclic hydrostatic pressure culture were all expressed collagen type (from left to right is 1st to 7th passage)

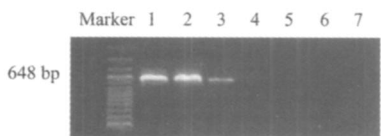


图 9 B组 型胶原 RT-PCR 检测, B组 (持续静水加压组) 第 3代 型胶原表达水平降低, 第 4代起未见 型胶原表达 (从左到右分别为 1~7代)

Fig. 9 In the Group B, the chondrocytes were under the sustained hydrostatic pressure culture. The 3rd passage decreased collagen type expression. After the 4th passage the chondrocytes did not express collagen type (from left to right is 1st to 7th passage)

多的实验证据表明这种循环载荷对维持软骨细胞正常表型和维持胞外基质功能是必须因素^[12]。本实验在设置一定的循环静水压力后研究发现, 通过循环静水压力的周期性刺激软骨细胞, 可以维持软骨细胞的正常分泌功能, 甚至促进了细胞增殖, 这对解决组织工程软骨中种子细胞的来源有重要的提示作用^[13]。对照组持续加压和常压下培养则较早出现细胞表型的改变, 型胶原表达水平升高。维持软骨细胞表型, 阻止细胞去分化的培养方式还有很多, 如 Perka等^[14]用藻酸盐和纤维蛋白结合, 对软骨细胞作立体培养; Hsu等^[15]用旋转式聚合物支架, 做软骨细胞旋转培养。但循环静水压力培养, 操作简单、成本低廉, 而且循环压力更能模拟生理条件, 便于研究各种干预在贴近生理状况下对关节软骨的生物学形状影响。

参考文献

1 雷雨, 田卫东. 软骨组织工程研究进展. 国外医学: 口腔医学分册,

2003, 30(6): 432-434.
 2 Lee MS, Trinidad MC, Kenoue T, et al Regulation of nitric oxide and bcl-2 expression by shear stress in human osteoarthritic chondrocytes in vitro. J Cell Biochem, 2003, 90(1): 80-86
 3 曲绵域, 康勇. 病患关节软骨中肥大软骨细胞的生物学特性的研究. 中国运动医学杂志, 2000, 19(1): 6-8.
 4 Thirion S, Berenbaum F. Culture and phenotyping of chondrocytes in primary culture. Methods Mol Med, 2004, 100: 1-14.
 5 冯伟, 石印玉, 沈培芝, 等. 补肾方和柔肝方含药血清对软骨细胞增殖动力学研究. 浙江中医学院学报, 2001, 25(4): 15-17.
 6 王庆蓉, 官颖鹏, 邵卫. 软骨细胞在膝骨性关节炎中的超微结构改变. 电子显微学报, 2000, 19(6): 820-824.
 7 邢东明, 张平, 王琦, 等. 压应力对体外培养的软骨细胞产生细胞因子的影响. 解剖学报, 2001, 32(4): 385-387.
 8 Milward-Sadler SJ, Wright MO, Lee H, et al Altered electrophysiological responses to mechanical stimulation and abnormal signaling through alpha5beta1 integrin in chondrocytes from osteoarthritic cartilage. Osteoarthritis Cartilage, 2000, 8(4): 272-278.
 9 Angele P, Yoo JU, Smith C, et al Cyclic hydrostatic pressure enhances the chondrogenic phenotype of human mesenchymal progenitor cells. Differentiated in vitro. J Orthop Res, 2003, 21(3): 451-457.
 10 杨物鹏, 许建中. 软骨细胞培养及其调控. 中国矫形外科杂志, 2000, 8(7): 800-804.
 11 Schnable M, Marbovits S, Eckhoff G, et al Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. Osteoarthritis Cartilage, 2002, 10(1): 62-70.
 12 Lucchinetti E, Bhargava MM, Torzilli PA. The effect of mechanical load on integrin subunits alpha5 and beta1 in chondrocytes from mature and immature cartilage explants. Cell Tissue Res, 2004, 315(3): 385-391.
 13 何川, 邓廉夫. 关节软骨细胞的生物力学特征研究进展. 国外医学: 骨科学分册, 2001, 22(3): 139-142.
 14 Perka C, Spitzer RS, Lindenhayn K, et al Matrix-mixed culture: new methodology for chondrocyte culture and preparation of cartilage transplants. J Biomed Mater Res, 2000, 49(3): 305-311.
 15 Hsu SH, Kuo CC, Yen HJ, et al The effect of two different bioreactors on the neocartilage formation in type collagen modified polyester scaffolds seeded with chondrocytes. Artif Organs, 2005, 29(6): 467-474.

(收稿日期: 2006-07-20 本文编辑: 连智华)

中国康复医学会颈椎病专业委员会 第一届全国中青年颈椎病专题论坛暨优秀论文评选征文通知

以“颈椎病 21 世纪”为主题,旨在全面回顾、展现 21 世纪颈椎疾患的预防、治疗及康复技术,深入对颈椎病研究,提高预防颈椎病的意识,总结诊治康复成果。中国康复医学会颈椎病专业委员会主办、北京大学第三医院承办的“第一届全国中青年颈椎病专题论坛暨优秀论文评选”拟定于 2007 年 6 月 15 至 17 日在北京京民大厦召开。届时将邀请国内著名颈椎病的康复科专家、骨科专家及中医科专家做专题演讲,与会代表评选优秀论文,投稿内容如下:颈椎病的基础研究、预防及护理、外科治疗、非手术治疗及康复。

来稿要求: 第一作者,年龄 45 岁以下,论文在 2000 年以后发表或未发表过的文章。800 字以内结构式中文摘要 1 份。奖励使用网上投稿系统(赠书,详见论坛网站),也可以通过 E-mail 及邮寄形式。来稿提供工作单位、详细地址、邮政编码、电话及 E-mail。被录用论文将另行通知您参评的具体要求。截稿日期: 2007 年 4 月 30 日。来稿地址,北京市海淀区花园北路 49 号 北京大学第三医院骨科,100083,王凤英、张振会、吴云霞收。电话及传真,010-62017691-7368, 8820, 8821。专题论坛, www.csc-cam.com.cn

E-mail: cervical_section@126.com。会议时间: 2007 年 6 月 15 日报到, 6 月 16、17 日会议。注册费 600 元, 观会者注册费 300 元; 2007 年 4 月 30 日报名注册费 400 元, 观会者注册费 200 元。提交论文的参会代表将授予中华医学会继续教育 类学分。