文章编号:1000-5404(2005)16-1667-04

论著

# 兔原代肋软骨细胞的三步酶消化法高效分离及体外培养观察

周 强,李起鸿,许建中,石国华 (第三军医大学西南医院骨科,全军矫形外科中心,重庆 400038)

**提 要:目的** 观察三步酶消化法分离兔原代肋软骨细胞的效果和收获效率,并观察其体外传代培养的生物学特性。**方法** 三步酶消化法设计为以培养液配制的1 g/L胰蛋白酶/1 g/L EDTA、1 g/L透明质酸酶和2 g/L Ⅰ型胶原酶顺序消化肋软骨分离细胞,检测细胞收获效率和存活率;体外传代培养观察细胞形态、生长及胞外基质中Ⅰ型和Ⅱ型胶原、蛋白多糖聚集体等的变化。**结果** ①肋软骨经三步酶消化软骨基质逐步解离和降解,细胞被完全分离,每克软骨的细胞收获量平均为4 295.7×10⁴个细胞,细胞存活率平均为97.2%。②原代和第1代细胞附壁生长呈三角形或多角形,生长融合时呈卵圆形,Ⅱ型胶原免疫组化和甲苯胺蓝异染反应均呈阳性,原代细胞外基质有高的硫酸糖胺多糖含量为(80.61±11.40) μg/cm²;第3代后细胞逐渐变为梭形,Ⅱ型胶原免疫组化为阴性,甲苯胺蓝异染反应亦明显减弱,第4代细胞外基质的硫酸糖胺多糖含量为(44.74±10.18) μg/cm²。**结论** ①三步酶消化法能完全消化降解肋软骨基质,使细胞完全分离,并具有高细胞收获率和高细胞存活率。②原代和第1代肋软骨细胞具有良好的生物学活性。

**关键词:** 肋软骨;细胞分离;软骨细胞;组织工程
**中图法分类号:** R329.2 **文献标识码:** A

# Isolation of chondrocytes from rabbit rib cartilage with three-step enzymatic digestion and their biological characteristic *in vitro*

ZHOU Qiang, LI Qi-hong, XU Jian-zhong, SHI Guo-hua (Department of Orthopaedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract: Objective** To observe the effect of isolating and harvesting the chondrocytes from rabbits rib cartilage with the method of three-step enzymatic digestion, and the biological characteristic of the isolated chondrocytes during cultivation *in vitro* to evaluate their biological activity. **Methods** The method of three-step enzymatic digestion was designed that the rib cartilage was digested one by one with 1 g/L trypsin and 1 g/L EDTA, 1 g/L hyaluronidase and 2 g/L collagenase Ⅰ in the culture medium to isolate chondrocytes. The harvesting and viability rate of the primary chondrocytes were detected. During the passage cultivation *in vitro*, the changes of the chondrocyte shape and growth were observed, and the changes of the collagen type Ⅰ and Ⅱ and aggrecan in the extracellular matrix were detected. **Results** ① The extracellular matrix of rib cartilage was completely dissolved by the three-step enzymatic digestion, and the chondrocytes were completely isolated from the solid matrix. The number of the harvested chondrocytes from every gram of wet cartilage was 4 295.7×10⁴ on average, and their viability rate was 97.2% on average. ②The primary and first passage chondrocytes had triangle or multi-angle shape, and became elliptic shape at the growing confluence with the positive immunohistochemical staining of collagen type Ⅱ and the strong heterochromia to toluidine blue. The content of sulfate glycosaminoglycans(GAG) in the extracellular matrix of the primary passage cells was (80.61±11.40) μg/cm². The chondrocytes after the third passage gradually became spindle shape with the negative staining of collagen type Ⅱ and the weak heterochromia to toluidine blue. The content of sulfate GAG of the fourth passage cells was (44.74±10.18) μg/cm². **Conclusion** ① The method of three-step enzymatic digestion can make the extracellular matix of rib cartilage to be completely degraded, and has advantages of the high efficiency of harvesting primary chondrocytes with high cellular viability rate and simple manipulation. ②The primary and first passage chondrocytes have fine biological activity.

**Key words:** rib cartilage; cell separation; chondrocytes; tissue engineering

**基金项目:** 国家自然科学基金资助重点项目(39830100),西南医院科技创新基金资助项目(2002-4)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (39830100) and the Research Foundation for Sci & Tech Innovation of Southwest Hospital of Third Military Medical University (2002-4)

**作者简介:** 周 强(1965-),男,河北省乐亭县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事组织工程及骨病方面的研究,发表论文15篇。电话:(023)68765283

**收稿日期:** 2005-01-30;**修回日期:** 2005-06-24

在组织工程研究中，软骨是最早获得成功的组织工程组织，但其研究进程却较缓慢，尚不能很好的应用于临床，其中主要的限制为种子细胞的来源问题尚未很好地解决。肋软骨很可能成为软骨组织工程理想的自体种子细胞来源，但肋软骨基质非常丰富且致密，目前常用的软骨细胞分离方法分离效果差、细胞收获率低下[1]，而传代扩增细胞数量则会是软骨细胞丧失其生物学功能[2~4]，因此，不能满足组织工程软骨构建的要求。我们建立的原代软骨细胞三步酶消化分离法对肋软骨细胞的分离取得了良好的效果，获得了高的细胞收获率，为这一问题的解决提供了新的有效方法，同时，本实验观察了肋软骨细胞在体外传代培养过程中生物学特性的变化特点。

## 1 材料与方法

### 1.1 肋软骨原细胞的分离

1.1.1 肋软骨的取材 3周龄的日本大耳白兔6只（第三军医大学实验动物中心提供），体质量300~350 g，雌雄不限。分6次进行，空气栓塞法处死动物，无菌操作解剖并切取肋软骨，将其切成约1 $mm^3$大小的碎块，滤纸吸水并称重后，移入50 ml的塑料离心管（德国，NUNCLON公司），按本实验设计的三步酶消化法进行组织消化。

1.1.2 原代肋软骨细胞的三步酶消化法分离 第一步，加入以DMEM/Ham F12（美国，Hyclone公司）培养液配制的1 g/L胰蛋白酶（美国，Sigma公司）/1 g/L EDTA-2Na消化液20 ml，置于37 ℃恒温摇床中消化1 h，1 500 r/min离心5 min，弃上清。20 ml盖氏平衡盐液（Gey's balance salt solution，GBSS）漂洗，1 500 r/min离心5 min，弃上清。第二步，加入以含有体积分数为5% FBS（fetal bovine serum，FBS，美国，Hyclone公司）的DMEM/ Ham F12培养液配制的1 g/L透明质酸酶（美国，Sigma公司）消化液20 ml，置于37 ℃恒温摇床中消化1 h，1 500 r/min离心5 min，弃上清。20 ml GBSS漂洗，1 500 r/min离心5 min，弃上清。第三步，加入以含体积分数为5% FBS的DMEM/ Ham F12培养液配制的2 g/L Ⅰ型胶原酶（美国，Sigma公司）溶液20 ml，置于37 ℃恒温摇床中，消化3 h 30 min，每小时取出1次，在超净台内用滴管吹打10 min，最后1次吹打20 min。

1.1.3 原代肋软骨细胞的收获及计数 将组织消化液先后经200目及300目滤网过滤入100 ml烧杯中，以DMEM/ Ham's F12培养液稀释至80 ml，分装入更新的2个50 ml离心管，2 000 r/min离心10 min，弃上清。将所得细胞集中于1个离心管，加入20 ml培养液简单吹打漂洗后，1 500 r/min离心5 min，弃上清。重复1次后，加入含体积分数为10% FBS的基础培养液20 ml，吹打为单细胞悬液。取样3次，以细胞计数板计数，计算平均值及细胞收获的总数。台盼蓝排除法检测细胞存活率。

### 1.2 肋软骨细胞原代及传代的培养

取所需量的原代软骨细胞悬液，以$3\times10^4/cm^2$的密度、含体积分数为10% FBS的DMEM/Ham's-F12 + 584 mg/L谷氨酰胺（美国，Gibico公司）+ 0.1 mmol/L非必需氨基酸（美国，Gibico公司）+ 0.4 mmol/L脯氨酸 + 50 μg/L维生素C（美国，Gibico公司）+ 100 U/ml青霉素 + 100 μg/ml链霉素培养液，接种于25 $cm^2$的培养瓶（德国，NUNCLON公司）和放有1/4盖玻片的24孔板（美国，BD公司），置于37 ℃、体积分数为5% $CO_2$培养箱内。接种48 h后首次换液，以后隔天换液。当细胞生长至约90% 融合时，培养瓶中的细胞以0.25%胰蛋白酶/0.02% EDTA-2Na溶液消化收集，进行传代培养至第4代，方法与原代细胞培养相同。收集并计量各代培养瓶中细胞传代消化液，-20 ℃封存备检测；各代培养板中的细胞——玻片以4%多聚甲醛磷酸缓冲液固定供相应指标观测。

### 1.3 倒置显微镜观察

动态观察酶消化过程中软骨块的变化和细胞脱落分离的情况，以及在培养过程中软骨细胞的附壁、生长增殖和形态变化。

### 1.4 计算每克软骨组织收获细胞量

$$\text{每克组织收获软骨细胞数（个/g）}=\frac{\text{收获软骨细胞总数（个）}}{\text{软骨湿重（g）}}$$

### 1.5 甲苯胺蓝（toluidine blue，TB）染色

0.01 mol/L PBS（中国，武汉博士德公司）漂洗细胞盖玻片，TB染色，蒸馏水中沾洗，中性树胶封片，光镜下观察。

### 1.6 Ⅱ型和Ⅰ型胶原免疫组化染色

参照文献[5]的方法，0.01 mol/L PBS漂洗细胞盖玻片3 min，分别以鼠抗兔Ⅰ型和Ⅱ型胶原单克隆抗体（美国，Oncogene公司）为一抗，按免疫组化试剂盒（中国，北京中山公司）说明进行操作，以过氧化物酶（DAB）显色试剂盒（中国，武汉博士德公司）显色，光镜观察，如被染色为棕黄色，则为免疫组化阳性。

### 1.7 二甲基亚甲蓝显色法测定各代细胞外基质中硫酸糖胺多糖含量

1.7.1 细胞传代消化液中硫酸糖胺多糖（glycosaminoglycans，GAG）含量的测定 取100 μl传代消化液，加入含木瓜蛋白酶（美国，Sigma公司）30 μg的1 ml 20 mmol/L磷酸钠缓冲液（pH 6.8），60 ℃消化60 min。用改进的二甲基亚甲蓝显色法[6]测定传代消化液中硫酸GAG含量。

1.7.2 按下列公式计算细胞外基质中硫酸GAG含量

$$\text{硫酸GAG含量（μg/ cm²）}=\frac{\text{消化液中硫酸GAG含量（μg/ml）}\times\text{消化液总量（ml）}}{\text{培养瓶底面积（cm²）}}$$

### 1.8 统计学分析

实验数据以$\bar{x}\pm s$表示，用Microsoft Excel数据统计处理程序进行细胞收获量与软骨湿重间的相关分析和细胞外基质中硫酸GAG含量变化的$t$检验，相关分析。

## 2 结果

### 2.1 原代肋软骨细胞消化分离的观察

2.1.1 大体及倒置显微镜下观察 经0.1%胰蛋白酶/0.1% EDTA-2Na消化后，软骨块失去原有光泽，消化液清亮，镜下未见细胞。经0.1%透明质酸酶消化后，软骨块变得松软，变为絮片状，并相互绞绕成团，消化液仍较清亮，镜下可见个别脱落的细胞。在0.2% Ⅰ型胶原酶的消化过程中，消化液1 h后开始明显变混浊，镜下可见有较多脱落的细胞；消化液2 h后软骨块均明显变小，部分变为半透明，镜下可见消化液中的细胞数大量增加；3 h后软骨块均变为半透明，离心管上部管壁附有

大量胶冻状物,消化液变得非常混浊;消化至 3 h 30 min,除少量半透明软骨絮片残留外,绝大部分软骨絮片已消失,而胶冻状物增多,镜下见消化液中有高密度的细胞,胶冻状物为包裹有细胞的粗大纤维网团(图 1),半透明絮片内为密集排列的细胞(图 2),此时即为停止摇床内消化的较佳时机。经滴管吹打后胶冻状物很快溶解,半透明絮片则逐渐"熔化",镜下见半透明絮片和纤维网逐渐解离,其中的细胞被完全释放,消化液中细胞密度极高,尚残存少量未完全消化的纤维,细胞呈圆形且大小均匀,此时消化液透光度很差且相当粘稠,为停止消化、收集细胞的时机。

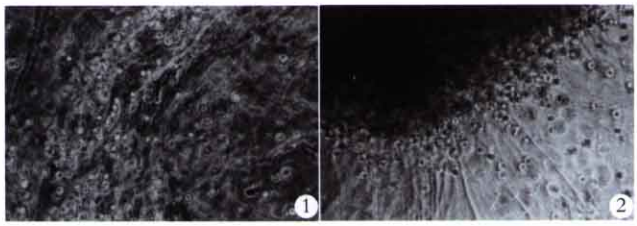


**图 1　胶冻状物为包裹有大量细胞的粗大纤维网团**　(倒置显微镜 ×100)

**Fig 1　A large quantity of cells and thick fibers in the glue-like matter**　(Invert microscope ×100)

**图 2　软骨絮片中为密集排列的细胞**　(倒置显微镜 ×100)

**Fig 2　Dense chondrocytes in pieces of cartilage**　(Invert microscope ×100)

2.1.2　原代软骨细胞的收获效率和细胞存活率　　每只动物所获软骨湿体质量为(0.61 ±0.08)g、细胞总数为(25.9 ±4.6) ×10⁶ 个、每克软骨所获细胞数为(43.0 ±2.2) ×10⁶ 个和所获细胞的存活率为(97.2 ±1.3)%,每只动物收获细胞量与软骨湿重间呈非常显著的正相关($r$ = 0.998,$P$ <0.01)。

## 2.2　细胞原代及传代培养的观察

2.2.1　倒置显微镜观察　　原代细胞接种 12 h 后个别细胞开始附壁铺伸,呈三角形,24 h 活细胞基本完成附壁铺伸,绝大多数为三角形或多角形,个别细胞为短梭形,第 3、4 天细胞增殖迅速,培养 5 d 达到 80% ~90% 的融合,细胞呈不规则的卵圆形,紧密排布似铺路石。第 1 ~4 代细胞间的附壁和生长速度无明显区别,但明显比原代细胞加快,接种 4 h 后即开始有少量细胞附壁铺伸,12 h 活细胞基本完成附壁,第 2、3 天迅速增殖,第 4 天即可达到 80% ~90% 的融合。第 1 代软骨细胞为更均匀的三角形和多角形细胞,生长达融合后与原代细胞形态上无明显区别。第 2 代软骨细胞生长达融合后细胞形态与第 1 代相比开始变长;第 4 代细胞生长未达融合前,梭形细胞数量明显增多,生长融合后细胞变得更长、类似梭形。

2.2.2　TB 染色光镜观察　　原代及第 1 代细胞的胞外基质对 TB 均呈较明显的红色异染反应(图 3),第 2 代异染反应开始减弱,至第 3、4 代细胞异染反应已明显减弱。

2.2.3　Ⅱ型和Ⅰ型胶原的免疫组化观察　　原代细胞有较强的Ⅱ型胶原免疫着色(图 4),第 1 代细胞明显减弱,而第 2 代细胞免疫着色则很微弱,第 3、4 代Ⅱ型胶原免疫组化为阴性;原代有较弱的Ⅰ型胶原免疫着色,而第 2 代以后软骨细胞Ⅰ型胶原着色则明显增强(图 5)。



**图 3　第 1 代细胞对 TB 呈较明显的异染反应**　(TB ×100)

**Fig 3　The first passage chondrocytes appeared the marked heterochromia to toluidine blue**　(TB ×100)

**图 4　原代细胞外基质的Ⅱ型胶原免疫着色呈阳性**　(S-P ×200)

**Fig 4　The primary chondrocytes appeared the positive immunohistochemical staining of collagen type Ⅱ**　(S-P ×200)

**图 5　第 3 代细胞外基质的Ⅰ型胶原免疫着色呈阳性**　(S-P ×200)

**Fig 5　The third passage chondrocytes appeared the positive immunohistochemical staining of collagen type Ⅰ**　(S-P ×200)

2.2.4　不同代次细胞外基质的硫酸 GAG 含量变化　　原代及第 1、2、3、4 代细胞外基质中的硫酸 GAG 含量分别为(80.61 ±11.40)、(75.23 ±7.29)、(66.31 ±13.66)、(58.94 ±8.21) μg/cm² 和(44.74 ±10.18) μg/cm²。第 1 代和第 2 代细胞分泌到细胞外基质中的硫酸 GAG 量与原代细胞相比无明显区别($P$ >0.05),而第 3 代有显著性差异($P$ <0.05)、第 4 代细胞非常显著差异($P$ <0.01)地低于原代细胞。

## 3　讨论

在软骨组织工程研究中种子细胞的来源仍是尚未很好解决的问题。尽管已有多种细胞应用于软骨组织工程研究,如关节软骨细胞、骺软骨细胞、间充质干细胞及胚胎干细胞等,但它们均有各自的缺陷,目前难以满足临床应用的要求。自体肋软骨有可能成为软骨组

织工程种子细胞的理想来源，但常用的软骨细胞分离方法分离细胞的效果差、细胞收获率低，致使收获的细胞数量远远不足，难以满足构建组织工程软骨的需求。因此，充分利用有限的供体肋软骨，高效率、高质量地获取软骨细胞对组织工程软骨的研究和临床应用均非常重要。

Manning[1]于1967年报道软骨细胞的酶消化分离法，他们用胰蛋白酶和细菌胶原酶联合消化，从人的关节软骨基质中分离收获了高纯度的软骨细胞。这一方法沿用至今，虽然进行了不同的改进，但软骨细胞收获率仍较低。魏西秦等[7]1987年报道这一软骨细胞分离方法的效果，结果为自每只3月龄兔四肢长骨的关节软骨可收获软骨细胞$(4\sim5)\times10^6$个。王建等[8]报道应用Green's法每只1月龄兔股骨和肱骨的关节软骨可收获$12\times10^6$个软骨细胞，使原代细胞收获量有所提高。其他还有Klagsbrun法[9]和Shimomura法[10]等用于软骨细胞的分离，但细胞分离效果亦不理想，而有关肋软骨细胞分离的效果目前尚很少有报道。

我们在现有方法的基础上，改进设计了原代软骨细胞三步酶消化分离法。透明软骨基质主要由Ⅱ型胶原和蛋白多糖聚集体组成，三步酶消化分离法的改进设计主要在于针对软骨基质成分合理应用消化酶。第一步利用胰蛋白酶非特异性消化作用，破坏蛋白质大分子间的键连接结构，以提高后续基质消化的效果；第二步利用透明质酸酶针对性消化蛋白多糖聚集体，使胶原网架"裸露"、结构变得松散，以便于胶原酶的消化；第三步利用胶原酶针对性消化基质的胶原网架，在消化过程中滴管间断吹打的机械力作用对促进胶原网架的解离降解及细胞完全脱落和缩短消化时间非常重要。酶的消化作用会导致细胞的损伤，而软骨细胞的完全分离需要长时间的酶消化，故在消化时间与收获细胞的效率和存活率之间存在着矛盾。我们选用培养液配制消化酶并在透明质酸酶和胶原酶溶液中加入血清以营养细胞，提高其抗损伤能力，达到在高效率收获细胞的同时保持细胞高存活率，解决了这一矛盾。在我们以往的实验中，三步酶消化分离法对原代关节和骺软骨细胞的分离均取得了优良而稳定的效果，原代细胞的收获效率得到了大幅度提高，每只兔四肢大关节和骺板的软骨分别平均收获原代细胞$73.0\times10^6$和$48.4\times10^6$个，每克湿重软骨分别平均收获原代细胞约$50.3\times10^6$和$32.3\times10^6$个，较常规方法提高6.3～15.8倍，细胞存活率分别平均为98.8%和97.6%[11,12]。在本实验中，我们将三步酶消化法用于肋软骨细胞的分离，实验结果表明取得了同样优良的分离效果和高的细胞收获效率，每只动物平均可收获细胞$25.9\times10^6$个，每克肋软骨平均可收获约$43.0\times10^6$个细胞，同时保持了细胞高存活率，平均为97.2%。因此，原代软骨细胞三步酶消化分离法是一种适用于多种透明软骨细胞分离且效果优良的方法，能够充分利用宝贵的供体软骨，最大限度地获取细胞量，具有效果稳定和操作简便的特点，为软骨组织工程研究中种子细胞的分离获取提供了一种有效的新方法。

体外培养观察表明原代细胞生长呈三角形和多角形，细胞外基质富含Ⅱ型胶原和蛋白多糖聚集体，为典型的软骨细胞生物学特点，且具有良好的附壁生长和增殖活性，说明本法分离收获的原代肋软骨细胞具有良好的生物学活性。细胞在传代培养过程中，虽然细胞的生长及增殖活性无下降并有所增强，但细胞合成分泌软骨特异性基质Ⅱ型胶原和蛋白多糖聚集体的活性却明显下降，至第3、4代细胞已非常低下，而Ⅰ型胶原的分泌在第2代后明显增强，说明细胞在传代培养过程中逐渐出现了去分化并失去软骨细胞的生物学特性。然而，实验数据表明原代和第1代细胞具有良好的生物学活性，可作为软骨组织工程种子细胞选择的依据。

**参考文献：**


[1] Manning W K, Bonner W M Jr. Isolation and culture of chondrocytes from human adult articular cartilage[J]. Arthritis Rheum, 1967, 10(3): 235-259.

[2] Gibson G, Lin D L, Roque M. Apoptosis of terminally differentiated chondrocytes in culture[J]. Exp Cell Res, 1997, 233(2): 372-382.

[3] Rodrigues A, Pap S, Vacanti C A. The effect of long-term culture on the ability of human articular chondrocytes to generate tissue engineered cartilage[A]. In: Stark G B, Horch R, Tanczos E, eds. Biological matrices and tissue reconstruction[M]. New York: Springer, 1998. 163-168.

[4] Bujia J, Sittinger M, Minuth W W, *et al*. Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer fleeces and perfusion culture[J]. Acta Otolaryngol, 1995, 115(2): 307-310.

[5] Kumagai J, Sarkar K, Uhthoff H K, *et al*. Immunohistochemical distribution of type Ⅰ, Ⅱ and Ⅲ collagens in the rabbit supraspinatus tendon insertion[J]. J Anat, 1994, 185(Pt 2): 279-284.

[6] Farndale R W, Buttle D J, Barrett A J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue[J]. Biochim Biophys Acta, 1986, 883(2): 173-177.

[7] 魏西泰，曹峻岭，熊咏民. 兔软骨细胞培养方法研究[J]. 中国地方病学杂志，1987，6(2)：89-92.

[8] 王 建，曾 益，陆 宁，等. 培养软骨移植修复关节软骨缺损的实验研究[J]. 中国矫形外科杂志，1999，6(7)：520-523.

[9] Klagsbrun M. Large-scale preparation of chondrocytes[J]. Methods Enzymol, 1979, 58: 560-564.

[10] ShimomuraY, Yoneda T, Suzuki F. Osteogenesis by chondrocytes from growth cartilage of rat rib[J]. Calcif Tissue Res, 1975, 19(3): 179-187.

[11] 周 强，李起鸿，戴 刚，等. 原代骺板软骨细胞的高效分离和体外培养观察[J]. 中华创伤杂志，2003，19(5)：293-296.

[12] 周 强，李起鸿，戴 刚，等. 三步酶消化法高效分离兔原代关节软骨细胞及体外培养观察[J]. 中华外科杂志，2005，43(8)：522-526.


（编辑 王 红）