技术方法

文章编号:1000-5404(2012)07-0676-02

人腱止点软骨细胞的分离培养及形态学特征观察

郭 林,陈加荣,陈 昊,杨 柳,戴 刚,王富友,何 锐 (400038 重庆,第三军医大学西南医院关节外科中心)

[摘要] **目的** 探讨人膝关节前交叉韧带(anterior cruciate ligament,ACL)腱止点软骨细胞的分离方法,观察软骨细胞的生物学特性。**方法** 取1例来源于交通事故的健康志愿者膝关节前交叉韧带腱止点标本,胰蛋白酶去除纤维组织后Ⅱ型胶原酶消化,观察细胞形态变化,使用甲苯胺蓝染色鉴定软骨细胞表型。**结果** 甲苯胺蓝染色见软骨细胞内蓝紫色异染颗粒,细胞核深染;细胞周围有少量异染颗粒出现。Ⅱ型胶原免疫组化染色:软骨细胞细胞质被染成棕黄色,细胞核不着色,具有软骨细胞共同生物学特性。**结论** 成功分离提取了腱止点软骨细胞,其形态和生物学特性与关节软骨细胞相似,但细胞密度低于相同方法分离的关节软骨细胞。

[关键词] 人;腱止点;纤维软骨细胞;分离

[中图法分类号] R322.71;R329 [文献标志码] B

腱止点是肌腱和韧带附着的重要结构,韧带纤维依次通过较厚的软骨层和较薄的钙化层附着于骨骼[1],在关节活动中韧带受到的应力被软骨层缓冲,因此软骨层是生理性腱止点“纤维-软骨-钙化层-骨”复合界面构成的关键[2-3],研究其发育可为临床上腱止点结构的生理性修复、重构或再生带来全新的治疗理念[4]。了解腱止点软骨细胞的增殖和生物学活性是治疗腱止点退变疾病的关键[5-6]。本研究为了解腱止点软骨细胞体外分离和生物学行为,利用人膝关节前交叉韧带(anterior cruciate ligament,ACL)获取腱止点软骨细胞,了解其分离方法和生物学特性将为其体外研究提供重要的研究依据。

1 材料与方法

1.1 仪器及试剂

细胞培养箱,倒置相差显微镜(Olympus IX71),10×10^4 U/L青霉素钠/庆大霉素双抗培养液,低糖DMEM(GIBCO公司),3.5 g/L葡萄糖培养液,0.05%的Ⅱ型胶原酶(GIBCO公司),2.5 g/L胰蛋白酶(GIBCO公司),PBS清洗液,手术刀、眼科剪和镊子。

1.2 实验方法

1.2.1 人腱止点软骨细胞分离 选取1例来源于交通事故的健康志愿者成人膝关节(年龄为35岁),完整切取ACL胫骨侧腱止点组织,去除肉眼可见的腱止点纤维组织,将软骨及软骨下骨和残余腱组织结构一同用骨刀及手术刀切成小片,将所有组织片放到盛有DMEM培养基的培养皿中。用含青霉素钠/庆大霉素双抗液的PBS冲洗数次后,剪切组织至1 mm×1 mm×1 mm大小的碎块,转入无菌离心管中。加入2.5 g/L的胰蛋白酶5 ml,在37 ℃恒温水浴中摇荡消化40 min直至软骨组织块基本消失,溶液变混浊为止,轻轻吹打弃去;再加入质量分数0.05%的Ⅱ型胶原酶5 ml,将消化瓶放置恒温摇箱中,消化4~6 h。用5 ml离心管收集细胞,1 000 r/min离心5 min,弃上清液,DMEM液清洗2次,重悬后使细胞均匀分布。

1.2.2 软骨细胞的计数、活性鉴定 移取9滴悬液入离心管中,加入10 g/L的台盼蓝液,混匀,置2~3 min,取适量均匀分散于计数板,计算每毫升DMEM培养液中活细胞的数量。

1.2.3 细胞的培养、传代培养 按1×10^6/孔细胞浓度接种于6孔培养板,加入2 ml DMEM培养液,置于37 ℃、饱和湿度5% CO_2的孵箱中培养,每3天换液1次,倒置显微镜下观察并照相。细胞长满单层后,用酶消化法消化并收集、计数并传代。

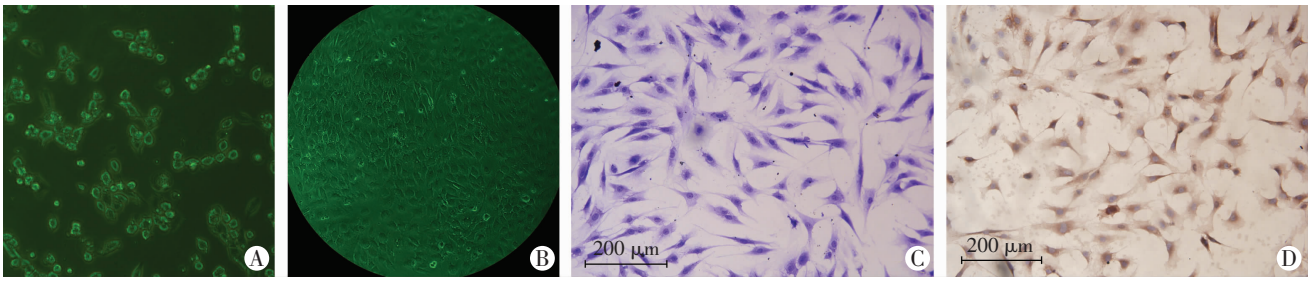
1.2.4 软骨细胞鉴定 分离原代细胞在倒置显微镜下观察。随机抽取3代培养细胞爬片,采取10 g/L甲苯胺蓝法进行基质异染。常规行Ⅱ型胶原免疫组化染色。

2 结果

倒置显微镜下观察,分离培养的原代细胞为圆球形,胞外见折光性较强的基质,细胞呈悬浮状,接种后12 h开始贴壁,24~48 h大部分细胞贴壁伸展(图1A),呈多角形、三角形、圆形和短梭形,细胞间突触相互融合,细胞间隙逐渐减小,并逐渐呈单层“铺路石”状生长(图1B),胞核为圆形或椭圆形,位于胞体中心。培养至7~10 d即可传代。传至第4代,梭形细胞逐渐增多。以后传代速度逐渐减慢。甲苯胺蓝染色:软骨细胞内见蓝紫色异染颗粒,细胞核深染;细胞周围有少量异染颗粒出现(图1C)。Ⅱ型胶原免疫组化染色:软骨细胞细胞质被染成棕黄色,胞核不着色(图1D)。

[基金项目] 国家自然科学基金(81000806)

[通信作者] 杨 柳,E-mail:jointsurgery@163.com



A:原代培养第 3 天光镜观察(×100);B:原代培养第 7 天光镜观察(×100);C:甲苯胺蓝染色观察;D:Ⅱ型胶原免疫组化染色观察

图 1 人腱止点软骨细胞培养及鉴定结果

3 讨论

腱止点是人体韧带或肌腱的附着结构[1],通常在承受较大或多向应力的部位容易发育为层次较厚的腱止点复合结构,也被称为间接腱止点,有别于多数肌肉组织附着于骨的直接腱止点。韧带纤维依次通过较厚的软骨层和较薄的钙化层附着于骨骼,软骨层可缓冲韧带传来的应力,钙化层决定了附着于骨的强度,曾被认为不含软骨、钙化层的直接腱止点,亦被证实有极薄的软骨层和钙化层与 Sharpey 纤维共同附着[2]。其中,软骨-钙化层的形成是构成生理性腱止点的关键,单纯修复仅能够带来瘢痕化的腱止点[3]。研究其发育的调控因素将为临床上腱止点结构的再生或生理性修复带来全新的治疗理念。

腱止点软骨细胞含量少,取材时应尽量保存软骨下骨和纤维组织以避免去除过多软骨成分。这样虽然尽可能从组织中保留了腱止点软骨细胞,但不能以净重来计算软骨细胞含量。因既往文献中罕见腱止点软骨细胞的分离方法,我们借鉴关节软骨细胞分离方法以尽可能获取软骨细胞。Manning 等[7]曾于 1967 年报道了酶消化分离法,但软骨细胞收获量不佳。目前常见的还有 Green[8]法和 Klagsbrun[9]法等,但这些方法对软骨细胞的分离数量和纯度均有不尽如人意之处。归其原因,与消化过程过长和使用酶步骤过多有关,消化和死亡的软骨细胞数量均较多,使得收获率下降。我们设计了原代软骨细胞Ⅱ型胶原酶顺序消化联合胰蛋白酶法[10],使细胞的分离具有优良而稳定的效果。与传统酶消化法相比,没有过多的酶消化过程破坏细胞,收获率明显提升。同时,两步酶消化较以往复杂的程序简化了操作,也减少了细菌污染机会。

从本研究中发现,腱止点软骨细胞的生长与传代特性与关节软骨细胞非常相近,无论在形态学还是生长贴壁及传代上均有较多共同之处,均呈现为典型的多角形、三角形、圆形或短梭形,在贴壁生长的过程中细胞间突触相互融合,细胞间隙逐渐减小,逐渐呈关节软骨细胞常见单层"铺路石"状生长[7,11-12]。既往文献报道提示,腱止点软骨在胚胎发育阶段与关节软骨处于同一胚层,在成长发育阶段也与关节软骨有相同的内环境,这也解释了腱止点软骨细胞与关节软骨细胞为何有如此之多的生物学相似处。本研究通过分离、传代、鉴定腱止点软骨细胞,为其体外实验打下了一定基础,并为将来深入研究其体外生物学活性以及生长调控提供了有力的实验依据。

参考文献:

[1] Benjamin M, Ralphs J R. Fibrocartilage in tendons and ligaments--an adaptation to compressive load[J]. J Anat, 1998, 193(Pt 4): 481-494.

[2] Benjamin M, Kumai T, Milz S, *et al*. The skeletal attachment of tendons-tendon "entheses"[J]. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2002, 133(4): 931-945.

[3] Koike Y, Trudel G, Uhthoff H K. Formation of a new enthesis after attachment of the supraspinatus tendon: A quantitative histologic study in rabbits[J]. J Orthop Res, 2005, 23(6): 1433-1440.

[4] Mackie E J, Ahmed Y A, Tatarczuch L, *et al*. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40(1): 46-62.

[5] Crubézy E, Goulet J, Bruzek J, *et al*. Epidemiology of osteoarthritis and enthesopathies in a European population dating back 7700 years[J]. Joint Bone Spine, 2002, 69(6): 580-588.

[6] Gaissmaier C, Koh J L, Weise K. Growth and differentiation factors for cartilage healing and repair[J]. Injury, 2008, 39 Suppl 1: S88-S96.

[7] Manning W K, Bonner W M Jr. Isolation and culture of chondrocytes from human adult articular cartilage[J]. Arthritis Rheum, 1967, 10(3): 235-239.

[8] Green W T Jr. Behavior of articular chondrocytes in cell culture[J]. Clin Orthop Relat Res, 1971, 75: 248-260.

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

[10] 周强, 李起鸿, 许建中, 等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(16): 1667-1670.

[11] Kronenberg H M. Developmental regulation of the growth plate[J]. Nature, 2003, 423(6937): 332-336.

[12] Taschner M J, Rafigh M, Lampert F, *et al*. Ca^{2+}/Calmodulin-dependent kinase Ⅱ signaling causes skeletal overgrowth and premature chondrocyte maturation[J]. Dev Biol, 2008, 317(1): 132-146.

(**收稿**:2011-10-15;**修回**:2011-12-28)

(编辑 栾 嘉)