DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.15.014
第25卷第15期 第三军医大学学报 Vol.25, No.15
1342 2003年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 200

论著

文章编号:1000-5404(2003)15-1342-03

永生化软骨细胞体外快速扩增的实验研究

方泽强[1],王常勇[2],李慧增[3],孙 远[3],杨 军[3] ([1]第四军医大学口腔医学院,西安 710032;[2]军事医学科学院基础医学研究所,北京 100850;[3]第三军医大学附属西南医院口腔科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨获取大量软骨组织工程种子细胞的方法和技术。方法 通过真核表达载体,把人端粒酶逆转录酶基因(hTERT)转入兔髁状突软骨细胞,筛选、挑选阳性克隆在微载体-RCCS内快速扩增永生化软骨细胞。观测RCCS中微载体培养永生化软骨细胞的生长情况和检测细胞代谢率,进行Ⅱ型胶原免疫组化染色,并与常规培养方法进行比较。结果 永生化软骨细胞在微载体-RCCS中生长迅速、细胞代谢率高、倍增时间缩短($P<0.01$)。在培养第8天,细胞数量可达最初接种的95倍($P<0.01$)。结论 联合应用微载体和RCCS培养技术,能够在体外快速、大量扩增永生化软骨细胞。

关键词:永生化;软骨组织工程;旋转生物反应器;微载体
中图法分类号:R318.08;R322.7+1;R329.2+4 文献标识码:A

In vitro amplification of immortalized chondrocytes with micro-carriers in RCCS

FANG Ze-qiang, WANG Chang-yong, LI Hui-zeng, SUN Yuan, YANG Jun (College of Stomatology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: Objective To explore the method and technique to gain adequate seed cells for cartilage tissue engineering. Methods hTERT gene was introduced into rabbit mandibular condylar chondrocytes by eukaryotic vector. Rapidly proliferated immortalized chondrocytes in positive clones in micro-carrier rotary cell culture system (RCCS) were screened and selected. The growth of immortalized chondrocytes and the metabolic rate were observed. Collagen type Ⅱ expression of immortalized chondrocytes of the experimental groups was observed. The immunohistochemical results were compared with those of the control groups. Results The immortalized chondrocytes in experimental groups could grow rapidly with a high metabolic rate and shorter population doubling time (PD) ($P<0.01$). The amount of immortalized chondrocytes reached 95 times of the initial amount after culture for 8 d ($P<0.01$). Immunohistochemistry showed that collagen type Ⅱ was positively expressed in both experimental and control groups. Conclusion The immortalized chondrocytes can proliferate rapidly in large amount with the combined application of microcarrier and RCCS culture system.

Key words: immortalization; cartilage tissue engineering; rotary cell culture system; microcarrier

关节痛是中老年关节运动障碍的主要原因。疼痛通常源于原发性骨-关节炎导致的关节变性或因创伤导致的软骨缺失。由于严重的关节损伤常导致关节无力。几十年来科学家和外科医生们一直在致力于修复缺失的软骨或使之再生,但是,进展非常有限。软骨组织工程的诞生与发展为软骨修复带来了巨大的希望。然而,如何获得大量的软骨细胞却一直是制约其发展的瓶颈之一。

正常软骨细胞不但增殖缓慢,而且在培养6~8代后容易发生去分化,停止分裂。端粒酶可以稳定端粒长度,延长细胞寿命。旋转生物反应器(Rotary cell culture system, RCCS)是一个采用膜扩散式气体交换形式、水平旋转的细胞组织培养系统,该系统具有模拟微重力、高密度培养人体细胞、组织的特性。而微载体可以提供较大接触面积,有利于细胞的生长。RCCS和微载体的这些特性,使其在组织工程研究领域具有重要的应用前景,国内相关研究报道很少。

本研究旨在探讨以微载体为载体,在RCCS中快速、大量扩增永生化软骨细胞(Immortalized chondrocytes, IMCCs)的可能性,进而为这种技术在软骨组织工程中的应用奠定一定基础。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170256)
作者简介:方泽强(1966—),男,湖北省武穴市人,博士研究生,主治医师,主要从事颌面外伤修复与组织工程方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68753636
收稿日期:2002-11-07;修回日期:2003-02-16

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1　材料与方法

1.1　分组

实验分为实验组(IMCCs-微载体 RCCS 培养组, $n=10$)和对照组(IMCCs-培养瓶组, $n=10$)

1.2　兔软骨细胞的分离、培养

3 周龄新西兰大白兔(由军事医学科学院实验动物中心提供)10 只, 体质量(0.4±0.02)kg。脱臼处死, 无菌条件下取髁突关节表面软骨, 0.15% II 型胶原酶消化 6 h, 200 目无菌滤网过滤, 制成细胞悬液, 用含 10% FBS 的 DMEM(Gibco)培养基稀释(含青霉素、链霉素各 100 U/ml), 37 ℃、5% CO_2 孵箱培养。细胞分裂增殖至 80%左右汇合时, 用 0.25%的胰酶消化传代。

1.3　hTERT 基因转染

真核表达载体 $P^{CI\text{-}hTERT}$(军事医学科学院郭希民博士惠赠)采用脂质体转染法(效率为 23%), 用 G418(Gibco)筛选, 挑选阳性单克隆扩增培养, 获得稳定表达 hTERT 克隆。

1.4　在 RCCS 内培养永生化软骨细胞

将适量预处理的 Cytodex-3 微载体 (Pharmacia, USA)与永生化软骨细胞悬液充分混匀, 加入到 110 ml RCCS(Synthecon, USA)中, 并补加 DMEM 培养基至 110 ml, 调整细胞数度为 4.0×10^5/L。RCCS 容器初始旋转速度为 10 r/min, 10 h 后以 30 r/min 持续搅拌; 同时进行永生化软骨细胞的常规培养, 两者均在 37 ℃、5% CO_2 孵箱内培养, 视培养基颜色及 pH 值变化决定是否换液及换液量。

1.5　细胞生长曲线测定和形态学观察

在倒置显微镜和扫描电镜(日立 S450)下观察常规培养的永生化软骨细胞的形态和生长状况。用四唑盐(MTT)比色法测定两组细胞的生长曲线。细胞倍增时间(PD), $PD=[\log2/(\log N_t-\log N_0)]\times t$, 其中 N_t 和 N_0 分别代表接种后和培养 t 小时后的细胞数。

1.6　免疫细胞化学分析

胰酶消化收集微载体培养第 8 天的永生化软骨细胞并爬片, ABC 法进行 II 型胶原免疫组织化学检测(一抗为鼠抗人 II 胶原单克隆抗体, 1∶100, Gibco)。用同样方法对培养瓶内培养的细胞进行鉴定。阳性染色为棕黄色。

1.7　细胞代谢率测定

参照试剂盒(Sigma)说明书, 分别在永生化软骨细胞培养的第 1、3、5、7、9、11 天测定 RCCS 和培养瓶内培养基中的葡萄糖和乳酸浓度。

1.8　统计学分析

采用 SPSS 统计软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　永生化软骨细胞在微载体表面贴附生长情况

培养 24 h, 可见大部分永生化软骨细胞贴附于微载体表面, 呈半球形。随后细胞向周围伸展, 伸出伪足于微载体表面。微载体培养至第 5 天, 永生化软骨细胞迅速生长, 约第 8 天, 细胞汇合达 90%。

2.2　细胞形态学观察

扫描电镜观察显示, 永生化软骨细胞在微载体表面大量增殖, 细胞状态良好, 永生化软骨细胞形态大部分为圆形或椭圆形, 见图 1。

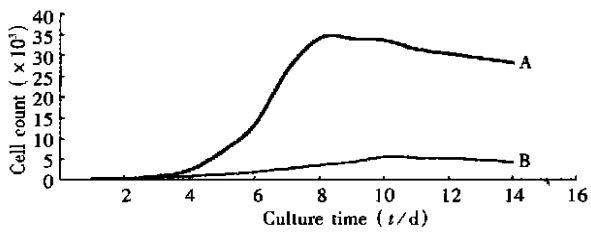


图 1　微载体培养永生化软骨细胞第 8 天扫描电镜观察　(SEM× 6 600)

Fig 1　Appearance of chondrocytes on day 8 of microcarrier culture　(SEM× 6 600)

2.3　永生化软骨细胞微载体培养与静态培养生长曲线的测定

常规培养和微载体—RCCS 培养的永生化软骨细胞生长曲线均呈倒置的"S"形, 两者的细胞倍增时间分别是应用小时分表示 26 h 48 min 和 16 h 25 min, 前者是后者的 1.65 倍, 说明 RCCS 培养的永生化软骨细胞持续、快速分裂增殖能力显著增强($P<0.01$), 见图 2。



A and B display culture curves of immortalized chondrocytes in RCCS and routine culture, respectively

图 2　不同条件下永生化软骨细胞生长曲线

Fig 2　Culture curves of chondrocytes under different conditions

2.4　免疫细胞化学分析

收集微载体上培养第 8 天的永生化软骨细胞进行免疫组化分析显示, 这些细胞 II 型胶原免疫组化染色均呈阳性, 与普通培养的第 2 代永生化软骨细胞 II 型胶原免疫组化染色无差异。

2.5　细胞代谢率的测定

微载体培养期间, RCCS 内培养液的葡萄糖浓度降低速率为 $11.2\ mmol\cdot10^{-9}\cdot d^{-1}$, 培养瓶内培养基葡萄糖浓度降低速率

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

为3.7 mmol·10^{-9}·d^{-1}。同时 RCCS 内乳酸的生成速率为 8.1 mmol·10^{-9}·d^{-1}，培养瓶内乳酸的生成速率为 6.9 mmol·10^{-9}·d^{-1}。由此得出 RCCS 内消耗单位葡萄糖的乳酸产率为 0.72，培养瓶内消耗单位葡萄糖的乳酸产比为 1.86（$P<0.01$）。

3 讨论

软骨组织工程的种子细胞来源一直是制约其发展的关键问题之一，研究人员从干细胞的诱导分化、异体细胞的基因修饰等方面进行了大量的探索来解决这一难题，但均没有取得满意的结果[1]。近年来，端粒酶因其在抗细胞老化方面的重要性而备受关注，端粒酶是一种核糖核蛋白复合体，具有逆转录活性，不依赖 DNA 聚合酶，可以与自身携带的 RNA 模板合成染色体末端端粒的重复序列（TTAGGG），以维持端粒长度的稳定性[2]。端粒酶通过稳定端粒的长度而使细胞能够继续分裂，增强细胞的分裂增殖能力，进而延长细胞的寿命甚至使细胞获得永生化[3]。Gurwitz 等[4] 对采用转染端粒酶基因而永生化的肾上腺皮质细胞的研究发现，该细胞体外培养时间大大超出正常同种细胞，而且能够维持正常细胞的表型，这种研究的成功为大规模的体外扩增种子细胞提供了可能性。本研究也显示，永生化的软骨细胞传至 100 代仍然保持旺盛的分裂增殖趋势。虽然转染 hTERT 能够显著延长细胞寿命，但是 Gurwitz 等的实验证明，转染 hTERT 的细胞不具有恶性细胞的特征，在细胞周期中表现出接触抑制，这些细胞与 matrigel 胶一同注入裸鼠皮下，也不能形成肿瘤，这说明转染 hTERT 的细胞具有应用的安全性。

虽然永生化可以延缓细胞老化，但是仍然不能很好的解决在短时间内扩增出大量种子细胞的问题。微载体培养技术的发明，为体外大规模培养贴壁细胞成为可能[5,6]，该培养体系的特点是能够为贴壁细胞培养提供充分的表面积，大大提高细胞的生长密度，从而有效的快速大规模扩增细胞。1992 年，美国 NASA 首次发明 RCCS 并将其应用于软骨、心肌、皮肤及肝脏等组织和器官的组织工程研究，已经取得明显进展[7]。RCCS 具有模拟微重力环境、高密度和高分化度培育人体组织或器官、破坏性应力小的优点，使细胞在破坏力最小的条件下得到迅速、大量扩增[8,9]。而传统的培养瓶培养细胞技术，因为细胞附着在平面载体上，以单层细胞的方式进行分化、增殖，并且补加的细胞生长因子及营养物质分布不均，从而限制了细胞的增殖速度，难以进行大规模细胞培养。

本实验首次结合微载体与 RCCS 培养技术进行永生化软骨细胞体外培养，结果表明永生化软骨细胞可在微载体上快速大量增殖，8 d 内，永生化软骨细胞扩增量增加到接种时的 95 倍，而常规的静态培养，永生化软骨细胞只能增加到 15 倍，前者的扩增量是后者扩增量的 6.3 倍；对培养液检测显示，RCCS 培养的永生化软骨细胞其葡萄糖消耗率和能量利用率显著高于静态培养的永生化软骨细胞。上述结果表明在 RCCS 和微载体培养体系中永生化软骨细胞具有旺盛的分裂增殖能力。对 RCCS 和微载体培养体系中扩增的永生化软骨细胞进行Ⅱ胶原检测表明，结果为阳性，与原代软骨细胞无明显差异。这进一步说明，在 RCCS 和微载体培养体系中永生化软骨细胞不但可以快速、大量扩增，而且可以维持软骨细胞的表型[10]。

本实验成功的应用 RCCS 与微载体培养技术实现体外大规模扩增永生化软骨细胞。该技术为解决软骨组织工程种子细胞来源提供了一种可能，在软骨组织工程产品的临床应用方面具有重要的潜在应用价值。

参考文献：

[1] Koch R J, Gorti G K. Tissue engineering with chondrocytes[J]. Facial Plast Surg, 2002, 18(1): 59-68.

[2] Morin G B. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats[J]. Cell, 1989, 59(3): 521-529.

[3] Counter C M, Botelho F M, Wang P, *et al*. Stabilization of short telomeres and telomerase activity accompany immortalizatin of Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocyte[J]. J Virol, 1994, 68(5): 3410-3414.

[4] Gurwitz D, Bodnar G B, Ouellette M, *et al*. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human fibroblasts[J]. Clin Genet, 1999, 55(5): 305-308.

[5] Mitteregger R, Vogt G, Rossmanith E, *et al*. Rotary cell culture system (RCCS): a new method for cultivating hepatocytes on microcarriers[J]. Int J Artif Organs, 1999, 22(12): 816-822.

[6] Wu S C, Huang G Y. Stationary and microcarrier cell culture processes for propagating Japanese encephalitis virus[J]. Biotechnol Prog, 2002, 18(1): 124-128.

[7] Freed L E, Langer R, Martin I, *et al*. Tissue engineering of cartilage in space[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94(25): 13885-13890.

[8] Falsafi S, Koch R J. Growth of tissue-engineered human nasoseptal cartilage in simulated microgravity[J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2000, 126(6): 759-765.

[9] Hammond T G, Hammond J M. Optimized suspension culture: the rotating-wall vessel[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2001, 281(1): F12-25.

[10] Rhee H W, Zhau H E, Pathak S, *et al*. Permanent phenotypic and genotypic changes of prostate cancer cells cultured in a three-dimensional rotating-wall vessel[J]. *In Vitro* Cell Dev Biol Anim, 2001, 37(3): 127-140.

（编辑 陈聪连）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net