DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.09.018

论著

文章编号:1000-5404(2003)09-0786-03

永生化软骨细胞体内软骨形成的实验研究

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

提 要:目的 探讨以永生化软骨细胞作为种子细胞构建和形成软骨的可能性。方法 把人端粒酶逆转录酶基因(hTERT)导入兔髁状突软骨细胞,G418筛选,挑选阳性克隆扩增培养;实验组将扩增培养的转染细胞与细胞支架材料β-磷酸三钙(β-TCP)复合,对照组将正常软骨细胞与β-TCP复合或单纯β-TCP在体外培育后种植于裸鼠皮下,3和6个月取材进行组织学和免疫化学检测,并与对照1组和对照2组进行比较。结果 实验组和对照1组可见复合体包裹软骨样组织,对照2组有少量纤维样组织形成。免疫组化染色显示,实验组番红"O"、甲苯胺蓝和Ⅱ型胶原染色呈强阳性,有明显软骨组织形成,与对照组有显著性差异($P<0.01$),对照1组染色呈弱阳性,对照2组则为阴性。结论 永生化软骨细胞可以作为软骨组织工程的种子细胞,具有较好的软骨形成能力。

关键词:永生化;软骨细胞;支架;组织工程

中图法分类号:R-332;R318.08;R322.71 文献标识码:A

Experimental study of the cartilage formation of immortalized chondrocytes *in vivo*

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

Abstract: Objective To explore the feasibility of the construction and formation of cartilage with immortalized chondrocytes by tissue-engineering technology *in vitro*. Methods Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene was introduced into rabbit mandibular condylar chondrocytes by eukaryotic vector. After screening with G418, the positive clones were amplified for culture. Normal or immortalized chondrocyte-loaded cytoskeleton β-tricalcium phosphate (β-TCP) complexes were incubated *in vitro* for 1~2 d and then implanted into subcutaneous tissue of nude mouse. The complexes of immortalized chondrocyte-β-TCP and chondrocyte-β-TCP or β-TCP alone were established as the experimental group and control groups respectively. The specimens were harvested within 3 and 6 months after surgical procedure for histological and immunohistochemical observation. Results In experimental groups and control group 1, the complexes packed with cartilage-like tissue were found, but there was only a little fiber-like tissue formed in control group 2. Immunohistochemistry revealed strong positive staining with safranine-O, toluidine blue and collagen type II and obvious formation of cartilage. There was significant difference between the experimental group and the control groups ($P<0.01$). Weak positive staining was found in control group 1 but negative in control group 2. Conclusion Immortalized chondrocytes can be used as the seed cells for cartilage tissue engineering due to the better capacity of cartilage formation.

Key words: immortalization; chondrocytes; cytoskeleton; tissue-engineering

由于外伤和关节炎等因素导致大量关节软骨不同程度的损伤,但是软骨本身的修复能力非常有限[1],依靠软骨的自发修复通常不能使病变的软骨得到有效和完全的恢复,而目前也缺乏有效的外科手段来修复损伤的关节软骨;因此,关节功能障碍甚至功能丧失的修复和重建是临床关节外科急需要解决的问题,同时也是当前关节外科研究的热点和重点之一[2]。软骨组织工程的创立和发展给软骨缺损的修复带来了希望,但是制约软骨组织工程的瓶颈问题—如何获得大量软骨组织工程种子细胞,到目前为止还没有得到有效的解决,因为正常软骨细胞在体外培养8~10代就出现老化和停止分裂,很难扩增出大量的软骨细胞来满足软骨组织工程的需要[3]。

基金项目:国家"863"生物高技术基金资助项目(2001A216031)

作者简介:方泽强(1966-),男,湖北省武穴市人,博士,主治医师,主要从事颌面外科创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:2002-08-10;修回日期:2002-11-20

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

端粒酶的主要功能是通过稳定染色体末端端粒长度来阻止细胞老化和延长细胞寿命, 而 hTERT 可以激活端粒酶阴性细胞的端粒酶活性来延缓细胞老化和延长细胞寿命, 甚至使转染的细胞获得永生化[4]。端粒酶和 hTERT 的这种作用近年来备受关注, 研究人员对它们与细胞衰老的关系以及这种作用的可能应用进行了大量的研究。

本实验采用 hTERT 转染兔关节软骨细胞, 通过缩短细胞倍增时间、延长软骨细胞的寿命和体外培养时间, 获得充足的永生化软骨细胞与β-TCP 支架一起构建软骨细胞-β-TCP 陶瓷复合体, 体外培育 1~2 d 后移植到裸鼠皮下; 通过细胞和免疫化学来检测软骨形成情况, 并探讨永生化软骨细胞在软骨组织工程方面应用的可行性。

1　材料和方法

1.1　材料和实验分组

pCI-hTERT 载体由军事医学科学院郭希民博士惠赠; DMEM、FBS、Ⅱ型胶原酶、胰酶、Ⅱ型胶原单克隆抗体(鼠抗人)、G418 均为 Gibco 公司提供;β-TCP 多孔生物陶瓷材料(法国地中海大学研制和提供)。

实验分为 3 组: 实验组(n= 10, 永生化软骨细胞—材料复合体), 对照 1 组(n= 10, 软骨细胞—材料复合体); 对照 2 组(n=4, 单纯材料)。

1.2　兔软骨细胞分离培养、hTERT 转染和鉴定

3 周龄新西兰兔(由军事医学科学院实验动物中心提供), 脱臼处死, 无菌下取兔膝关节软骨块, 0.15%Ⅱ型胶原酶消化分离制备软骨细胞悬液, 进行原代培养, 细胞长至 80% 汇合时用 0.25% 胰酶消化传代。

真核表达载体 $P^{CI\text{-}hTERT}$采用脂质体转染法, 用含 G418 筛选, 挑选阳性单克隆培养, 获得稳定表达 hTERT 克隆并扩增培养。筛选后培养扩增 10 d, 收集大量扩增的转染软骨细胞与β-TCP 复合, 少部分用于软骨细胞的鉴定(ABC, Ⅱ胶原染色)和继续培养(100 代)。

1.3　转染细胞端粒酶活性的检测

使用端粒酶检测试剂盒(Sigma)采用 TRAP(PCR-based telomerase repeat amplification protocol)按试剂盒的提供的方法进行检测。TS 引物(5′-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3′), CX 引物(5′-CCCTTACCCTTACCCTTACCCTAA-3′)(上海生工生物公司合成), 反应条件为: 94 ℃、30 s; 60 ℃、30 s; 72 ℃、45 s, 30 个循环, 最后 72 ℃ 延伸 10 min。阴性对照以裂解液代替端粒酶提取液, 以 GAPDH 上游引物(5′-CTCAGACACCATGGGGAAGGTGA-3′)代替 TS 引物。PCR 产物用 9% 聚丙酰胺电泳(175 V, 45 min; 240 V, 1 h)进行分离。用试剂盒提供的 TSR8 作为阳性对照。

1.4　转染细胞致瘤性检测

将转染的软骨细胞(1.5×10^8 个)接种于裸鼠皮下, 分别于 3、6 个月取材进行 HE 染色。

1.5　体外构建细胞—β-TCP 复合体和植入

将体外培养扩增的永生化软骨细胞(1×10^7 个)和正常软骨细胞分别接种到β-TCP 支架上, 37 ℃孵育 8 h 后, 在 DMEM(含 10% FBS)中培养 24~48 h, 移植至裸鼠皮下。

1.6　软骨形成的检测

复合体植入后 3 和 6 个月分别取材, 标本经 4% 多聚甲醛固定、包埋、切片后, 进行番红"O"-亮绿和甲苯胺蓝染色; ABC 法进行Ⅱ型胶原免疫组织化学检测(一抗为鼠抗人Ⅱ型胶原单克隆抗体, 1∶100)。

1.7　统计学处理

图像用 Fragment Manager 图像分析仪(Amersham Pharmacia)进行自动分析。配对资料用 t 检验。

2　结果

2.1　转染软骨细胞的鉴定

转染后细胞爬片Ⅱ型胶原免疫组织化学染色阳性, 说明转染后的细胞仍然具有软骨细胞的特征。

端粒酶活性检测显示, 转染后的细胞可见相隔 6 bp 的多条电泳带, 端粒酶呈阳性表达, 而未转染的软骨细胞则为阴性。

2.2　致瘤性检测结果

3 个月可见大部分转染的软骨细胞死亡, 6 个月软骨细胞全部坏死, 吸收, 转染软骨细胞致瘤性为阴性。

2.3　标本的大体观察、组织化学和免疫组织化学检测

实验组和对照 1 组, 复合体已被软骨样组织包裹, 弹性较好, 体积有所缩小; 对照 2 组明显缩小, 周围被覆纤维样组织。

植入后 3 个月, 实验组组织切片显示番红"O"和甲苯胺蓝染色阳性的新生软骨形成, 修复区与周围软骨连接较好; 对照 1 组, 切片周边有部分软骨样组织形成, 但中间为阴性; 对照 2 组染色为阴性。植入后 6 个月, 材料基本降解, 实验组新生软骨组织逐渐相互连接融合, 番红"O"和甲苯胺蓝染色阳性, 软骨细胞和软骨基质丰富, 关节缺损基本修复; 对照 1 组, 新生软骨样组织范围较 3 个月有所扩大, 但中间无明显染色, 关节缺损部分修复; 对照 2 组, 无明显软骨样组织形成。

实验组, 术后 3 个月切片可见大量的Ⅱ型胶原染色阳性的软骨细胞, 6 个月阳性范围明显扩大; 对照 1 组, 切片周边可见Ⅱ型胶原染色阳性的软骨细胞, 6 个月阳性范围有所扩大, 但中间为阴性; 对照 2 组, Ⅱ型胶原染色阴性。实验组与对照 1 组比较(P<0.05), 实验组与对照 2 组比较(P<0.01), 两者相差有显著性意义。

3　讨论

据报道, 仅在美国, 每年有上百万人因疾病或事故造成组织或器官损伤, 其中包括大量的关节软骨的损伤, 治疗这些病人耗资 400 亿美元。针对人体损伤的组织或器官进行治疗的主要方法是进行异体组织或器官移植, 但这种治疗方法受到供体缺乏的严重限制。由于软骨组织自身的修复能力非常有限, 因此如何对损伤的软骨组织进行有效的修复治疗, 一直是临床迫切需要解决的问题, 也是临床医学研究的重点之一。科研人员在这方面进行了多种研究和探索, 其中包括胚胎干细胞的定向诱导分化和软骨组织工程体外构建软骨组织等, 特别是软骨组织工程的发展给软骨缺损

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

的修复带来了希望。但是正常软骨细胞在体外培养容易出现去分化现象，很难扩增出足够的软骨细胞用于工程化软骨体外构建的需要。

端粒酶因其能稳定细胞末端端粒长度、延长细胞寿命而备受关注。端粒酶的功能主要是通过向端粒末端添加 TTAGGG、阻止端粒随细胞分裂而逐渐缩短，从而避免细胞出现“复制、衰老”现象。人端粒酶逆转录酶基因(hTERT)是端粒酶的催化亚基，体外实验证实转染 hTERT 可以激活端粒酶阴性细胞的端粒酶活性，从而延缓细胞老化和显著延长细胞寿命，同时使转染的细胞倍增时间明显缩短。

本实验结果显示，转染后的软骨细胞Ⅱ型胶原染色阳性，具有软骨细胞的特性，可传至 100 代而仍然显示旺盛的分裂增殖趋势，大大超过正常软骨细胞的寿命，显著延长了软骨细胞体外培养时间，在 10 d 内扩增至 400 倍，从而能够获得大量软骨细胞来满足软骨组织工程构建软骨的需要。组织化学和免疫化学结果表明，实验组有大量的透明软骨组织形成，Ⅱ型胶原染色强阳性($P<0.01$)；对照 1 组只见周边有部分软骨组织形成，复合体中间Ⅱ型胶原染色阴性，没有新生软骨组织形成；对照 2 组Ⅱ型胶原染色阴性，无新生软骨组织形成。造成这种差别的原因可能是，正常软骨细胞分裂 8～10 代即进入老化，停止分裂增殖，形成软骨组织的能力差[5]，很难通过自身的分裂增殖形成足够的软骨组织来修复缺损区；而转染 hTERT 的软骨细胞获得了旺盛的分裂增殖能力，并且保持了软骨细胞的表型，能够在一定的时间内依靠自身的分裂增殖、形成大量的软骨组织来修复软骨缺损区，这进一步说明转染的软骨细胞具有良好的软骨形成能力[6]。

虽然转染 hTERT 能够显著延长细胞寿命和缩短细胞倍增时间，但是 Gurwitz 等[7] 的实验证明，转染 hTERT 的细胞不具有恶性细胞的特征，在软琼脂培养基中不能形成克隆，即使经过 200 次的分裂还能保持它们的二倍体核型；加入纺锤体抑制剂秋水仙素时，这些转染的细胞即停止分裂；在细胞周期中还表现出接触抑制。本实验也证明，永生化软骨细胞裸鼠致瘤实验为阴性，这说明转染 hTERT 的细胞具有应用的安全性[8]。

本实验通过 hTERT 转染兔关节软骨细胞并在体外大量扩增，与 β-TCP 一起成功地在体外构建和裸鼠体内形成了软骨组织。实验结果证明 hTERT 转染的永生化软骨细胞具有较好的软骨形成能力，在软骨组织工程和软骨修复领域具有重要的应用前景。

参考文献：

[1] Daniel A, Grande A S, Breitbart J M, *et al*. Cartilage tissue engineering [J]. Clin Orthop, 1999, 367(S): 176－185.

[2] Breinan H A, Minas T, Hsu H P, *et al*. Effect of cultured autologous chondrocytes on repair of chondral defects in a canine model[J]. J Bone Joint Surg Am, 1997, 79(10): 1439－1451.

[3] Freed L E, Martin I, Vunjak-Novakovic G. Frontiers in tissue. *In vitro* modulation of chondrogenesis[J]. Clin Orthop, 1999, 367(Suppl): S46－S58.

[4] Allsopp R C, Vaziri H, Patterson C, *et al*. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblast[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(21): 10114－10118

[5] Jackson D W, Lalor P A, Aberman H M, *et al*. Spontaneous repair of full-thickness defects of articular cartilage in a goat model. A primary study[J]. J Bone Joint Surg, 2001, 83(1): 53－64.

[6] Mallein-Gerin F, Ruggiero F, Quinn T M, *et al*. Analysis of collagen synthesis and assembly in culture by immortalized mouse chondrocytes in the presence or absence of α1 (IX) collagen chains[J]. Exp Cell Res, 1995, 219(1): 257－265.

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

[8] Morales C P, Holt S E, Ouellette M, *et al*. Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase[J]. Nat Genet, 1999, 21(1): 115－118

（编辑 冷怀明）

（上接 785 页）

迅速长大。本例肿瘤呈两个直径约 5 cm 大小球形包块。隆突性皮纤维肉瘤的组织学特征为大小形态较一致的梭形瘤细胞，核分裂像较少，异型性较低，密集的梭形瘤细胞与胶原纤维，围绕一个中心作放射状排列，称为车辐状结构(Storiform 结构)。CD34 是一种针对 DFSP 的特异性抗原，表达为强阳性，具有诊断意义[1,2]。本例患者在院外误诊为恶性纤维组织细胞瘤(MFH)达 15 年，应注意与其鉴别。MFH 多发生于中老年患者，好发于四肢，原发于胸壁者较少见，肿瘤位于较深部组织，可在皮下组织广泛浸润，瘤细胞成分复杂多样，有单核或多核巨细胞，核分裂象多见，也可形成车辐状结构，但 CD34(－)，而 CD68(＋)。DFSP 的主要治疗手段是外科切除，早期彻底手术，切除效果较好。据报道，本病 10 年生存率为 97.8%，复发率为 65.9%[3]。手术应至少距肿瘤 5 cm 连同肿瘤基底肌筋膜切除肿瘤，减少复发率[4]。

关键词：隆突性皮肤纤维肉瘤；胸壁肿瘤；CD34
中图法分类号：R739.5 文献标识码：B

参考文献：

[1] Hoang M P, Selim M A, Bentley R C, *et al*. CD34 expression in desmoplastic melanoma[J]. J Cutan Pathol, 2001, 28(10): 508－512.

[2] Oliveira-Soares R, Viana I, Vale E, *et al*. Dermatofibrosarcoma protuberans: a clinicopathological study of 20 cases[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2002, 16(5): 441－446.

[3] 陈忠年. 实用外科病理学[M]. 上海：上海医科大学出版社，1997. 81.

[4] D'Andrea F, Vozza A, Brongo S, *et al*. Dermatofibrosarcoma protuberans: experience with 14 cases[J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2001, 15(5): 427－429.

（编辑 王 红）

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