DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.05.011
第24卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 5
524 2002年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)05-0524-03

转化人关节软骨细胞的Ⅱ型胶原表型诱导

何清义,李起鸿,许建中,杨 柳 (第三军医大学附属西南医院骨科,重庆 400038)

提 要:目的 用离心管聚集体培养(Aggregate culture)诱导转化人关节细胞的Ⅱ型胶原。方法 将体外长期培养的第30、40、50代转化软骨细胞消化后进行离心管培养,比较细胞在单层培养、离心管聚集体培养,以及在普通培养基,BAI诱导培养基下[2型骨形态发生蛋白(BMP-2)+抗坏血酸盐(Ascorbate)+胰岛素(insulin)],Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型胶原的表达和胞外基质产生情况。结果 在单层培养条件下,转化软骨细胞只表达Ⅰ型胶原,而在BAI诱导培养基及离心管聚集体培养下转化软骨细胞表达丰富的Ⅱ型胶原和大量胞外基质。结论 离心管聚集体培养是诱导转化软骨细胞Ⅱ型胶原的有效方式。

关键词:转化软骨细胞;表型;诱导
中图法分类号:R322.72;R341.26;R394 文献标识码:A

Phenotype induction of type Ⅱ collagen in transformed human articular chondrocytes

HE Qing-yi, LI Qi-hong, XU Jian-zhong, YANG Liu (Department of Orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To induce type Ⅱ collagen phenotype of transformed human articular chondrocytes with aggregate culture of centrifuge tube. Methods The 30th, 40th, 50th passaged transformed chondrocytes maintained for long term in vitro were digested and cultured respectively in two-dimensional culture and centrifuge tubes. Under the circumstances of two-dimensional culture, aggregate culture, ordinary medium and BAI induced medium (bone morphogenetic protein 2 + ascorbate + insulin), the expressions of type Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ collagens and the production of extracellular matrix were compared in above-mentioned cells. Results In two-dimensional culture and ordinary medium, only type Ⅰ collagen was secreted in transformed chondrocytes. Aggregate culture and BAI inducted medium induced rich type Ⅱ collagen and extra-cellular matrix in transformed chondrocytes. Conclusion Centrifuge tube aggregate culture method can induce the secretion of type Ⅱ collagen of transformed chondrocytes.

Key words: transformed chondrocytes; phenotype; induction

关节软骨的营养仅来自于关节滑液,无血液、淋巴循环,亦无神经支配,损伤后其自身修复能力较差,关节软骨的缺损的修复一直是临床上尚未解决的难题,因为成熟的关节软骨修复能力相当有限,直径大于4 mm者一般不能自行修复。异体软骨移植存在两个致命的弱点,一是无法克服组织相容的问题,最终会被受者排斥而使移植失败;二是异体软骨的来源严重不足;自体软骨移植虽无免疫排斥反应,但自体软骨来源却极为有限,并且还会形成供区的软骨缺损,是一种创伤修复创伤的治疗模式;人工合成替代品植入后易导致异物反应和感染。近年来,组织工程学的发展为软骨缺损的完全修复带来了契机[1]。但是,种子细胞—关节软骨细胞在体外培养至第5代时,其特异性标志蛋白Ⅱ型胶原已经丧失表达。因此,不能通过体外大量扩增种子细胞来满足构建软骨的需要[2]。作者在通过人乳头瘤病毒16型E7基因片段(HPV16E7)转化人关节软骨细胞使其增殖能力大大提高的基础上,通过离心管聚集体培养研究其诱导Ⅱ型胶原的表达情况。

1 材料与方法

1.1 材料来源

经HPV16E7基因转化成功的人关节软骨细胞、DMEM/F-12(1∶1)培养基、Ham F-12培养基及胎牛血清(FBS)均为美国Hyclone公司产品。2型骨形态发生蛋白(BMP-2)、抗坏血酸盐(Ascorbate)、胰岛素(Insulin)来自于美国Gibico公司,Tripure™ Isolation Reagent购自Roche公司,一抗鼠抗人Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型胶原抗体购自Newmarker公司。二抗(生物素化兔抗鼠IgG/羊抗鼠IgG)及SABC的试剂盒来自于美国Dako公司。

1.2 细胞培养及诱导

1.2.1 单层二维培养 转化软骨细胞第30、40、50代,经质量浓度为2.0 g/L的胰酶消化后,按2×10^4 cells/cm^2接种于铺有10 cm×10 cm盖玻片的培养板上。分别用DMEM/F-12(10%FBS)培养液及BAI诱导培养液(其中含BMP-2 30ng/ml,ascorbate 25 μg/ml,insulin 100 ng/ml)进行培养,每2~3 d换液1次。

1.2.2 离心管聚集体培养 各取第30、40、50代转化软骨细胞,制成细胞悬液后,细胞计数,分别按1×10^7 cells/tube接种入15 ml聚苯乙烯离心管,1 000 r/min离心5 min,弃上清,加入磷酸缓冲液(PBS)吹打洗涤2次,1 000 r/min离心5 min,用吸管小心吸除上清,分别加入DMEM/F-12(10%FBS)培养液及BAI诱导培养液,每个离心管10 ml,进行诱导培养,每3 d换液1次。

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(39830100)
作者简介:何清义(1973—),男,重庆市巴县人,博士研究生,主治医师,主要从事组织工程方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68754000-73076
通信作者:李起鸿,电话:(023)68754483
收稿日期:2002-02-04;修回日期:2002-04-19

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

1.3　Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型胶原及胞外基质检测

1.3.1　免疫组化染色　　取上述各代 80% 汇合的细胞盖片, PBS 洗涤, 90%的乙醇固定 10～12 min, PBS 洗涤 2 次, 分别加入一抗鼠抗人Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型胶原抗体, 4 ℃冰箱过夜, 二抗(生物素化兔抗鼠 IgG/ 羊抗鼠 IgG) 37 ℃孵育 2 h, 用 SABC 试剂盒及 DAB 显色, 按说明书上染色步骤操作。

1.3.2　离心管聚集体培养的 HE 及阿尔新蓝染色　　取上述各代离心管聚集体培养 14 d 的细胞团块, 4%多聚甲醛固定, 常规组织切片, HE、阿尔新蓝染色。

1.3.3　单层培养以及离心管聚集体培养后Ⅱ型胶原 RT-PCR　Tripure™ Isolation Reagent 提取单层培养的各代转化软骨细胞以及经离心管聚集体及 BAI 诱导培养 14 d 的各代细胞团块的 RNA。

Ⅱ型胶原的引物为: 上游引物 5′ AACTGGCAAGCAAGGAGACA 3′

下游引物 5′ AGTTTCAGGTCTCTGCAGGT3′

RT-PCR 在美国 PE 公司的 PERKIN ELMER 2 000 上进行, 用 Roche 公司的高保真 Titan one Tube RT-PCR 试剂盒来操作, 以出现 621bp 的目的条带为阳性结果。

1.3.4　离心管聚集体 BAI 诱导培养后免疫组化检测　　取上述各代离心管聚集体培养 14 d 的细胞团块, 4%多聚甲醛固定, 常规组织切片, Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型胶原免疫组化检测方法同 1.3.1。

2　结果

2.1　单层二维培养的Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型胶原的表达

第 30、40、50 代转化软骨细胞不论在普通培养基或 BAI 诱导培养基条件下均只表达Ⅰ型胶原, 见图 1, Ⅱ、Ⅲ型胶原表达阴性。



图 1　二维单层培养的转化软骨细胞在普通培养基或 **BAI** 诱导培养基条件下均只表达Ⅰ型胶原(→)　(SABC× 100)

Fig 1　Positive stained type Ⅰ collagen (arrow) in transformed chondrocytes in normal medium or BAI inducted medium under two-dimensional monolayer culture　(SABC× 100)

2.2　离心管聚集体培养的细胞团块的形态观察

用普通培养基 DMEM/ F-12 培养 2 周后, 细胞团块逐渐崩解, 无法进行 HE 及阿尔新蓝染色, 而用 BAI 诱导培养基培养 2 周后的各代 转化细胞其细胞团块除有轻度收缩外, 细胞团块呈白色半透明状, HE 染色发现细胞圆或卵圆形, 分布均匀, 细胞位于陷窝内, 见图 2。阿尔新蓝染色强阳性, 显示有大量的胞外基质合成和分泌, 见图 3。

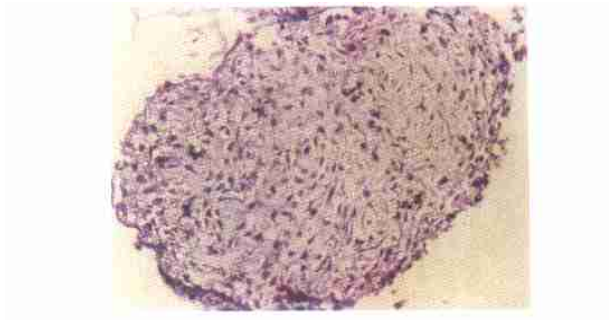


图 2　离心管及 **BAI** 诱导培养后, 转化软骨细胞团块 **HE** 染色发现细胞圆或卵圆形, 分布均匀, 细胞位于陷窝内　(HE× 100)

Fig 2　Round or olivary transformed chondrocytes bonded in lacunae in uniform order after the centrifuge tube and BAI culture　(HE× 100)

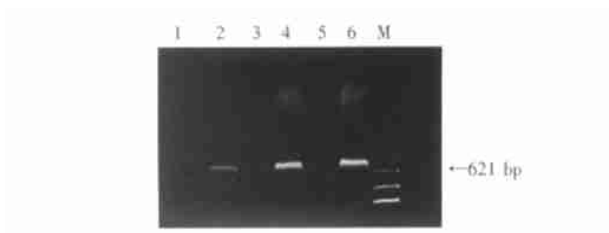


图 3　离心管及 **BAI** 诱导培养后, 转化软骨细胞团块阿尔新蓝染色呈强阳性, 显示有大量的胞外基质合成和分泌　(Alcian blue stain× 100)

Fig 3　Massive extracellular matrices with Alcian blue staining produced by transformed chondrocytes after centrifuge tube and BAI culture　(Alcian blue staining× 100)

2.3　单层培养以及离心管聚集体 BAI 诱导培养后Ⅱ型胶原的表达

离心管聚集体 BAI 诱导培养后, RT-PCR 显示各转化细胞代次均有 621bpⅡ型胶原的 m RNA 表达, 证明经过上述诱导后, Ⅱ型胶原的 m RNA 已经被成功翻译; 不论是用 DMEM/ F-12 (10%FBS)培养液 或 BAI 诱导培养液, 单层培养的各代转化软骨细胞的Ⅱ型胶原 m RNA 表达阴性, 见图 4。



1, 3, 5: No collage type Ⅱ in transformed chondrocytes at passage 30, 40 and 50 with monolayer culture; 2, 4, 6: Bands of 621 bp in transformed chondrocytes at passage 30, 40 and 50 with aggregate culture of centrifuge tube; M: PCR marker(from down to up 237, 377, 515, 695, and 994 bp)

图 4　单层培养及离心管聚集体诱导培养后后转化软骨细胞Ⅱ型胶原的 **RT-PCR**

Fig 4　RT-PCR of collagen type Ⅱ secreted by transformed chondrocytes by monolayer culture and aggregate culture of centrifuge tube induction

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

2.4 离心管聚集体 BAI 诱导培养后免疫组化情况

免疫组化显示，细胞团块的Ⅰ、Ⅲ型胶原染色阴性，而Ⅱ型胶原表达强阳性，表明诱导已使Ⅱ型胶原蛋白成功表达，从蛋白质水平证明上述诱导方法完全成功，见图 5。



图 5 离心管及 **BAI** 诱导培养后细胞团块Ⅱ型胶原表达强阳性 (SABC× 100)

Fig 5 Strongly positive stained collage type Ⅱ in transformed chondrocytes after centrifuge tube and BAI culture (SABC× 100)

3 讨论

软骨细胞在体生理环境就处于三维立体环境中，软骨细胞位于软骨陷窝内，四周均为胶原以及蛋白多糖等胞外基质，体外培养必须模拟这一状态[3]。细胞与细胞的相互作用以及胞外基质等均可影响软骨细胞表型的表达。在成熟的关节软骨中，软骨细胞一般处于静止状态，软骨细胞与软骨基质之间保持着动态的平衡，当用酶消化基质打破这种稳态后将启动软骨细胞的增殖，但是体外单层培养很快将使软骨细胞表型不稳并去分化(Dedifferentiation)[4]，本实验转化软骨细胞单层培养时只表达Ⅰ型胶原，Ⅱ、Ⅲ型胶原表达阴性。这种去分化是可逆的，一旦被它们自己新产生的基质所包绕(Encapsulated)就会重新分化并恢复表型[4]。Benya 等[5]用琼脂悬浮培养的方法可使去分化的兔软骨细胞重新表达软骨细胞的特有表型－Ⅱ型胶原，表明三维培养能够使表型恢复，但对于人软骨细胞的表型恢复并不适用。

高浓度的种子细胞能够促进细胞与细胞之间的接触与相互作用，并且细胞通过自分泌、旁分泌的方式分泌多种细胞生长因子从而影响软骨的增殖、分化[6]。本研究的细胞密度较高，达 1×10^7 个/管，并通过离心的方法使细胞聚集成团，创造了细胞与细胞之间的紧密接触以及相互作用的环境，当细胞分泌基质后，转化软骨细胞随后就被埋于三维基质中，从而使细胞与在体环境较为相似，细胞团块的 HE 染色发现细胞圆或卵圆形，分布均匀，细胞位于陷窝内。阿尔新蓝染色呈强阳性，显示有大量的胞外基质合成和分泌。

BMP-2 为 30 kDa 的蛋白质，由两个 16-kDa 的亚单位通过二硫键联结在一起，提取的 BMP-2 蛋白质异位注射 7 d 后能诱导软骨的形成[7]。Iwata[8] 的研究表明 BMP 能够诱导肌肉来源和滑膜来源的细胞向软骨细胞分化。BMP-2 刺激蛋白多糖显著上升，但只有在不含血清或血清浓度很低的情况下才得以实现[9]，如用 10％胎牛血清可抑制人肋软骨细胞Ⅱ型胶原基因的表达，当去掉血清加入含有胰岛素的替代血清培养基就能使Ⅱ型胶原基因表达[10]。小剂量的抗坏血酸盐加入无血清培养基中能够刺激软骨细胞 4～5 倍的增殖[11]。上述结果与本研究的实验比较一致，BAI 诱导培养液(其中含 BMP-2, ascorbate, insulin)诱导转化软骨细胞后，RT-PCR 显示各转化细胞代次均有 621bp Ⅱ型胶原的 m RNA 表达，证明经过上述诱导后，Ⅱ型胶原的 mRNA 已经被成功翻译，免疫组化显示细胞团块Ⅱ型胶原表达强阳性。总之，软骨细胞体外培养增殖能力较差，虽然可通过基因转染的方式使其增殖能力大大提高，但Ⅱ型胶原的表型却不易维持，本实验表明可通过模拟在体三维环境以及各种生长因子的组合使去分化的转化软骨细胞重新表达Ⅱ型胶原表型。

参考文献：

[1] Vacanti C A, Upton J. Tissue-engineered morphogenesis of cartilage and bone by means of cell transplantation using synthetic biodegradable polymer matrices[J]. Clin Plastic Surg, 1994, 21(3): 445－462.

[2] 曹谊林, 商庆新. 软骨、骨组织工程的研究与趋势[J]. 中华创伤杂志, 2001, 17(1): 7－9.

[3] 何清义, 李起鸿. 间歇性液态压力和连续灌注系统下的软骨细胞培养[J]. 中华骨科杂志, 2000, 20(9): 545－547.

[4] Brittberg M. Autologous chondrocyte transplantation[J]. Clin Orthop, 1999, 367(Suppl): S147－S155.

[5] Benya P D, Schaffer J D. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gel[J]. Cell, 1982, 30(1): 215－224.

[6] Freed L E, Martin I, Vunjak-Novakovic G. Frontiers in tissue engineering[J]. Clin Ortho, 1999, 367(Suppl): S46－S58.

[7] Wang E A, Rosen V, D. Alessandro J S, *et al*. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(6): 2 220－2 224.

[8] Iwata H, Ono S, Sato T, kawamura M. Bone morphogenetic protein-induced muscle-and synovium-derived cartilage differentiation *in vitro*[J]. Clin Orthop, 1993, 296(1): 295－300.

[9] Van Susan J L, Buma, P, Van Beuningen H M, *et al*. Responsiveness of bovine chondrocytes to growth factors in medium with different serum concentration[J]. J Orthop Res, 2000, 18(1): 68－77.

[10] Goldring M B, Fukuo K, Birkhead J R, *et al*. Transcriptional suppression by interlukin-Ⅰ and interferon-r of type Ⅱ collagen gene expression in human chondrocytes[J]. J Cell Biochem, 1994, 54(1): 85－99.

[11] Venezian R, Shenker B J, Data S, *et al*. Modulation of chondrocyte proliferation by ascorbic acid and BMP-2[J]. J Cell Physiol, 1998, 174(3): 331－341.

(编辑 王 红)

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