DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.05.027
第24卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 5
2002年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2002

文章编号:1000-5404(2002)05-0559-04

论著

髂板软骨细胞复合生物凝胶体外培养生成软骨组织的实验研究

周 强,李起鸿,杨 柳,戴 刚 (第三军医大学附属西南医院骨科,重庆 400038)

提 要:目的 观察将髂板软骨细胞接种于自制的生物凝胶经体外培养生成软骨组织的生物学特点,初步评价这一凝胶基质作为软骨组织构建材料的生物学性能。方法 将第一代髂板软骨细胞接种于生物凝胶进行体外培养,行大体、倒置显微镜以及组织学、Ⅰ型和Ⅱ型胶原免疫组化光镜观察。结果 髂板软骨细胞-生物凝胶复合物,在体外培养过程中不能维持其初始外形,培养1周直径可收缩为初始的45%,但能保持种子细胞的稳定均相分布。经体外培养2周后由外周向中心逐渐形成软骨组织,表面为由1~3层梭形细胞组成的膜样结构,内部细胞主要为圆形细胞,有细胞外基质相隔,形成软骨细胞陷窝。基质中富含软骨特异性基质成分Ⅱ型胶原和蛋白聚糖,而Ⅰ型胶原免疫组化逐渐转为弱阳性,位于表面膜结构。结论 这一生物凝胶具有良好的细胞相容性,适合软骨细胞在其中生成成熟的工程化软骨,但难以维持其初始外形。

关键词:髂板;组织工程;组织再生;软骨;软骨细胞
中图法分类号:R318.08;R322.71 文献标识码:A

Cartilage regeneration from epiphyseal chondrocytes cultured in biological gel *in vitro*

ZHOU Qiang, LI Qi-hong, YANG Liu, DAI Gang (Department of Orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the biological characteristics of the cartilage regenerated from epiphyseal chondrocytes implanted into a self-made biological gel during *in vitro* cultivation, and evaluate the biological property of the gel as the matrix material of cartilage tissue engineering. Methods The first passage chondrocytes were harvested and implanted into the gel for culture in vitro. The changes of chondrocyte-gel complex in morphology, the syntheses of collagen type Ⅱ and Ⅰ, and aggrecan were investigated grossly and with inverted microscope and immunochemical methods. Results The chondrocyte-gel comlplex contracted to 45% of its original volume and lost its primary shape in the first week of cultivation, but maintained the even and uniform distribution of cells. The complex gradually changed from periphery to center and finally became mature cartilage after 2 weeks of cultivation. At this time, the complex was covered on surface with a membrane-like structure consisting of 1-3 layers of spindle cells, and inside, round cells were separated by extracellular matrix with the formation of chondrocytic lacunas. The complex showed strong positive staining of collagen type Ⅱ and aggrecan in the matrices and light positive staining of collagen type Ⅰ mainly in peripheral membrane. Conclusion The biological gel possesses satisfying cellular compatibility, and is fit for chondrocytes growing in it to regenerate engineered cartilage, but its primary shape is not well-maintained.

Key words: epiphseal plate; tissue engineering; tissue regenetation; cartilage; chondrocyte

髂板缺损的修复首先必须阻止血管长入髂板缺损区,这就要求工程化的髂板组织应具有较成熟的软骨组织结构。通过种子细胞粘附于三维多孔支架的常用工程化组织构建方法,得到的工程化组织短期体外培养仍具有多孔性,不适合修复髂板缺损。我们自制的一种天然生物凝胶液能与种子细胞均匀混合,在特定的条件下可固化,经短期体外培养即可生成较成熟的工程化软骨,能达到髂板组织工程的这一要求。本实验则着重观察了将髂板软骨细胞接种于这一生物凝胶经体外培养生成软骨组织的生物学特点,并对这一凝胶基质作为组织构建材料的生物学性能进行了初步评价。

1 材料和方法

1.1 原代髂板软骨细胞的分离和培养

无菌条件下解剖分离3周幼兔四肢长骨,剔除软组织,切取髂板,剪成约1~2 mm^3 碎块。系列酶消化后,经200目筛网过滤,离心收集原代髂板软骨细胞,台盼蓝排除法细胞活性计数。原代细胞以3×10^4/cm^2 的密度、30 ml[含10%胎牛血清(Hyclone)+584 mg/L谷氨酰胺+0.1 mmol/L非必需氨基酸(Gibico)+0.4 mmol/L脯氨酸+50 μg/L维生素C(Sigma)]的DMEM/Hams-F12培养液接种于175 cm^2 的培养瓶(NUNCLON公司,德国),置于37 ℃、5% CO_2 培养箱内。接种24 h后首次换液,以后隔天换液。当细胞生长至约90%融合时,0.25%胰蛋白酶/0.02% EDTA-Na_2 消化,离心收集第1代软骨细胞。

1.2 髂板软骨细胞接种于生物凝胶及培养

将第1代髂软骨细胞按2.5×10^7/ml的密度加入配制好的自制生物凝胶液(一种提取纯化的蛋白凝胶溶液),吹打混均。固化塑形为直径12 mm、厚3 mm的细胞凝胶块。每孔一块置于6孔培养板中(BD公司,美国),加入5 ml培养液(与细胞培养液相同),置于37 ℃、5% CO_2 孵箱内培养,5 h后全量换液,以后隔天换液4 ml。分别于培养1、2、3、4周各采集3个标本,测量大小,4%多聚甲醛固定,常规石蜡包埋。

1.3 观测指标

1.3.1 大体及倒置显微镜观察

1.3.2 组织学光镜观察 常规石蜡切片,部分切片行常规HE染色、逐级酒精脱水、二甲苯透明、中性树胶封片,另一部分切片行甲苯胺蓝液染色、滤纸吸水待干、二甲苯透明、中性树胶

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(39830100);全军"十五"医药卫生科研基金资助重点项目(01Z072)
作者简介:周 强(1965-),男,河北省乐亭县人,博士,主治医师,讲师,主要从事组织工程及骨病方面的研究。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

封片，光镜观察。

1.3.3 Ⅰ型和Ⅱ型胶原免疫组化 常规石蜡切片，一抗分别选用鼠抗兔Ⅰ型和Ⅱ型胶原单克隆抗体(Oncogene)，按免疫组化试剂盒(中山公司)说明进行操作，DAB 显色液(博士德公司)显色，光镜观察，阳性为棕黄色。

2 结果

2.1 大体及倒置显微镜观察

固化的细胞-生物凝胶块，在加入培养液时会与培养板底部脱离，常有少许菲薄的细胞-凝胶残留于板底，其中的细胞在 1～2 h 即可完成铺伸，迅速生长增殖。细胞—凝胶块内，细胞呈规则的圆形且透亮，分布均匀，见图 1。24 h 后细胞-凝胶块开始收缩，表面细胞变为梭形，中心部透光性明显降低，尚可见细胞轮廓。72 h 细胞-凝胶块严重收缩，直径由原来的 12 mm 收缩为 6～7 mm，高由 3 mm 变为约 2 mm。随后，收缩明显减缓，1 周时直径为 5.4～6 mm，为初始直径的 45%～50%，见图 2，高度变化不明显，以后大小无明显变化，透光性更差，已难以辨认细胞。随着培养时间的延长细胞凝胶块的硬度明显增加，但仍比天然软骨差得多，具有弹性、表面非常润滑。

2.2 组织学观察

培养 1 周，细胞—生物凝胶块已具有了初步的组织结构。表面为 1～3 层的梭形细胞，类似一层膜组织。内部细胞主要为圆形细胞，有细胞外基质相隔，部分已初步形成了的软骨细胞陷窝，见图 3，甲苯胺蓝染色呈明显的红色异染反应，中心的细胞生长较差，细胞外基质松散，异染反应弱或无。培养 2 周，工程化组织的外周部已形成了软骨组织结构，异染反应强，中心部软骨组织结构发育不佳，但异染反应已很明显。培养 3～4 周，整个工程化组织逐渐发育成初步的软骨组织结构，对甲苯胺蓝染色呈较明显的软骨异染反应，见图 4。

2.3 Ⅰ型和Ⅱ型胶原的免疫组化

Ⅱ型胶原的免疫组化显示，各时相点工程化组织均为明显阳性，1 周时稍弱，2～4 周阳性均较强，见图 5。Ⅰ型胶原的免疫组化显示，1 周有较为明显的免疫阳性着色，外周较强，2 周时明显减弱，3 周后主要位于表面的膜样细胞层，见图 6。

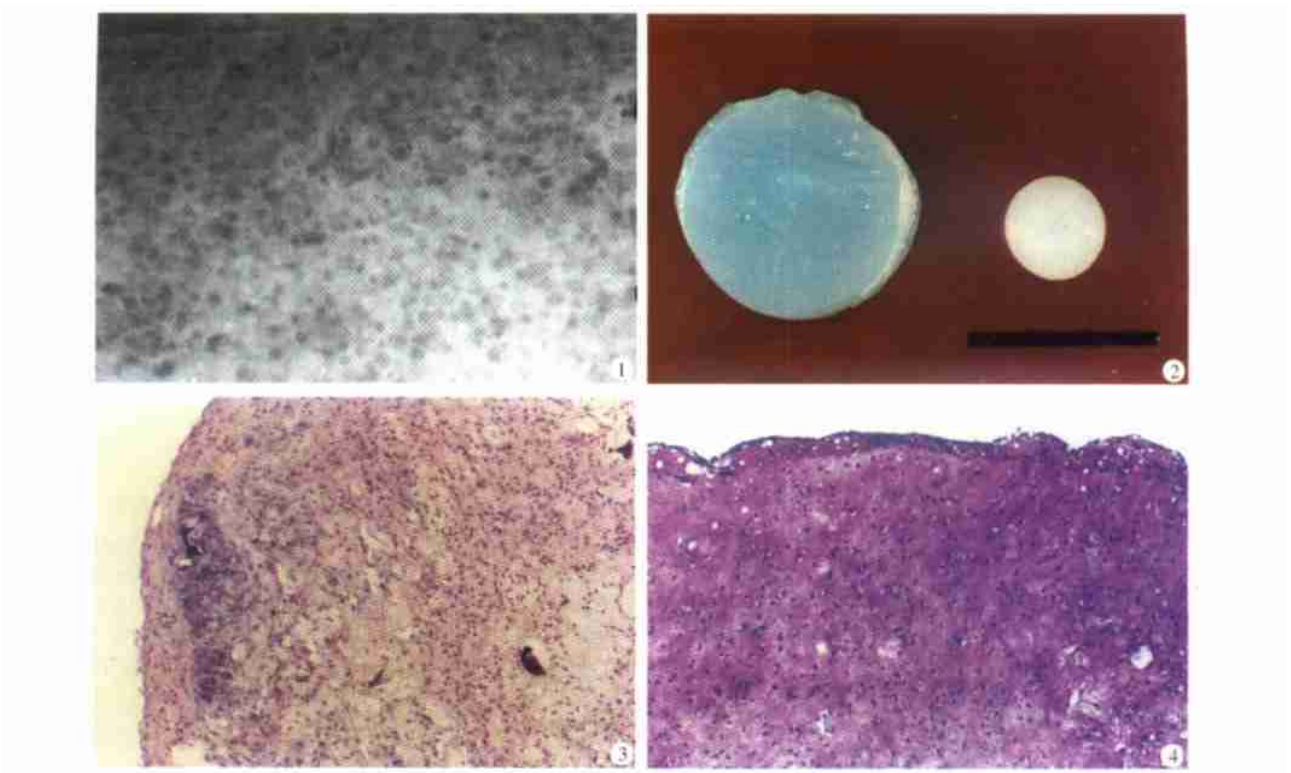


图 1 凝胶中细胞分布均匀 (×100)

Fig 1 Homogeneous distribution of implanted chondrocytes in the gel (×100)

图 2 右为 1 周的细胞-凝胶块，左为无细胞凝胶块 图条为 1 cm

Fig 2 Chondrocyte-gel comlplex cultured for 1 week (Right) and gel complex without cell (Left) (the bar indicates 1 cm)

图 3 细胞凝胶块培养 1 周表面为 1～3 层的梭形细胞(⇦)，形成的软骨陷窝(←) (HE×200)

Fig 3 Complex cultured for 1 week with 1—3 layers of spindle cells on surface and formation of chondrocytic lacuna (HE×200)

图 4 4 周工程化组织形成软骨组织结构，甲苯胺蓝异染反应强 (×100)

Fig 4 Regenerated cartilage tissue by the complex showing strong metaochromatic to toluidine blue at the 4th weeks (×100)

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

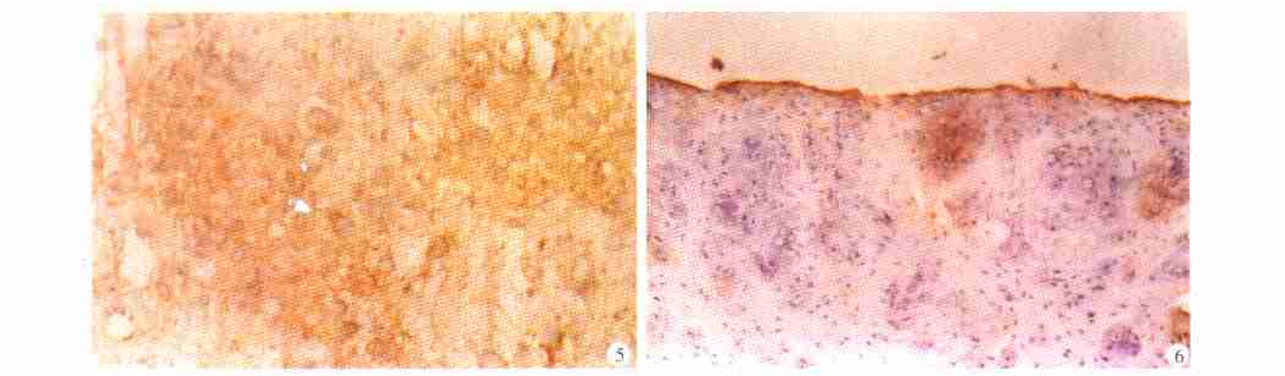


图 5　细胞凝胶块培养 2 周时Ⅱ型胶原的免疫组化染色呈强阳性　(S-P× 400)

Fig 5　Positive staining of collagen type Ⅱ in the peripheral membrane of complex at the 2nd week　(S-P× 400)

图 6　细胞凝胶块培养 3 周时表面膜结构Ⅰ型胶原的免疫组化染色呈阳性　(S-P× 200)

Fig 6　Positive staining of collagen type Ⅰ in the peripheral membrane of complex at the 3rd week　(S-P× 200)

3　讨论

一些凝胶类材料具有以液态方式存在且在特定条件下固化的特点, 能维持细胞在其中呈稳定的三维均相分布, 并允许种子细胞在其中增殖分化、形成相应的组织结构。这些特点为组织工程的研究和应用带来的便利是三维高孔隙生物材料难以取代的。天然的凝胶材料种类很多, 常用于组织工程研究的主要有琼脂糖、海藻酸盐、纤维蛋白、胶原等, 人工合成的有聚氧乙烯/聚氧丙烯共聚物、聚氧乙烯水凝胶、聚(N－异丙烯酰胺)凝胶、高分子透明质酸、聚丙烯延胡羧酸盐等。

Benya 等[1] 首先将软骨细胞置于琼脂糖凝胶中培养发现软骨细胞的高分化表型不仅能够得以维持, 并可使已去分化的软骨细胞再分化为特异的软骨表型。Yasui 等[2] 应用胶原凝胶作为三维培养系统进行软骨细胞的培养, 发现细胞在其中增殖分化、合成软骨特异性基质大分子。Bonaventure 等[3] 将去分化的人关节软骨细胞包埋于海藻酸盐凝胶珠中进行培养, 可以再表达软骨特异性的Ⅱ型胶原和蛋白多糖, 细胞周围形成含有胶原的细胞外基质, 但与琼脂糖凝胶相比, 形成细胞克隆的能力较弱。Perka 等[4] 将软骨细胞包埋于纤维蛋白与海藻酸盐混合珠中, 当形成稳定的细胞外基质结构后再祛除海藻酸盐, 制成稳定的移植物。另外, 种子细胞可与凝胶类材料混合直接注射于机体局部修复缺损的组织[5]。

本实验的结果表明, 骺板软骨细胞与自制生物凝胶能够充分均匀混合, 并固化成一定的外形, 能维持细胞在凝胶中形成稳定的三维均相分布。在这一细胞—凝胶复合体的制备过程, 能够很好地保持细胞的生物活性, 对细胞无损伤, 凝胶块浸泡于培养液中不发生熔融或崩解。培养 1 周, 即可形成初步的组织结构, 最外层是由 1 ~3 层细胞构成的膜样结构, 邻近膜结构的细胞开始形成软骨细胞陷窝, 免疫组化和甲苯胺蓝染色显示细胞已经开始合成和分泌软骨特异性的大分子即Ⅱ型胶原和蛋白聚糖。随着培养时间的延长, 软骨组织的形成由外周到中心逐渐成熟, 细胞外基质中Ⅱ型胶原和蛋白聚糖的阳性反应逐渐增强。相反, Ⅰ型胶原在培养 1 周时呈明显的阳性, 随培养时间延长反应很快减弱, 最后仅在表面膜样细胞层尚有弱的阳性反应。这些结果说明以细胞和生物凝胶构建的工程化软骨组织在体外培养过程中, 经历了一个细胞外基质合成、分泌和改建逐渐形成成熟软骨组织的过程。

采用缓慢搅拌或(和)旋转式微重力培养系统, 将种子细胞接种于三维支架高孔隙材料, 需培养 12 周组织生长才能基本充填支架的孔隙, 生成较成熟的软骨组织, 组织学结果与本实验 2 ~4 周的相似[6~8]。通过离心管内细胞聚集培养, 虽然可以在 2 ~4 周获得较成熟的骺板软骨, 但其外形固定为圆盘状, 生成组织的大小极有限, 一般直径不超过 4 ~5 mm[9,10,11], 而本实验构建的工程化软骨在形状和大小上具有一定的可控性。

在实验中, 我们还观察到细胞凝胶块在培养的前 3 日, 因其中活细胞的作用会产生明显的收缩, 部分地丧失了其初始外形, 同时大大增加了工程化组织的密度, 降低了其物质交换的能力, 这可能是中心部细胞的组织形成能力低的原因之一。正是由于这一缺陷, 用这一方法构建的工程化软骨难以获得完全符合临床特异性外形要求的组织工程软骨。因此, 虽然这一凝胶材料具有良好的细胞相容性并适合软骨细胞在其中生成软骨组织, 但是这一组织构建技术在维持工程化软骨组织的外形和大小等方面还有待于进一步改进。

参考文献:

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

[2] Yasui N, Osawa S, Ohchi t, *et al*. Primary culture of chondrocytes embedded in collagen gels[J]. Exp Cell Biol, 1982, 50(2): 92－100.

[3] Bonaventure J, Kadhom N, Cohen-Solal L, *et al*. Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocyte cultured in alginate beads[J]. Exp Cell Res, 1994, 212(1): 97－104.

[4] Perka C, Arnold U, Spitzer R S, *et al*. The use of fibrin beads for tissue

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

engineering and subsequential transplantation[J]. Tissue Eng, 2001, 7(3): 359—361.
[5] Moskalewski S, Hyc A, Grzela T, *et al*. Difference in cartilage formed intramuscularly or in jiont surface defects by syngeneic rat chondrocytes isolated from the articular-epiphyseal cartilage complex[J]. Cell Transplant, 1993, 2(6): 467—473.
[6] Ma P X, Langer R. Morphology and mechanical function of long-term *in vitro* engineered cartilage[J]. J Biomed Mater Re, 1999, 44(2): 217—221.
[7] Martin I, Vunjak-Novakovic G, Yang J, *et al*. Mammalian chondrocyte expanded in the presence of fibroblast growth factor 2 maintain the ability to differentiate and regenerate three-dimensional cartilaginous tissue[J]. Exp Cell Res, 1999, 253(2): 681—688.
[8] Freed L E, Hollander A P, Matin I, *et al*. Chondrogenesis in a cell-polymer-bioreactor system[J]. Exp Cell Res, 1998, 240(1): 58—65.
[9] Yan W Q, Tong M H, Yang T S, *et al*. Reorganization of isolated chondrocyles into growth plate-like tissue in pelleted cultures[J]. J Bone Miner Metab, 1995, 13: 77—80.
[10] 周 强, 李起鸿, 戴 刚, 等. 经离心管培养骺软骨异体修复兔骺板部分损伤的初步观察[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(10): 1139—1142.
[11] 周 强, 李起鸿, 戴 刚, 等. 高数量骺板软骨细胞聚集培养生成软骨组织的观察[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(5): 556—558.

(编辑 王 红)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2002)05-0562-01

大量不保留灌肠术肛管插入深度的探讨

Study of insert depth of enema tube in high-capacity nonretention enema

屈 轶[1], 乔瑞霞[2] (第三军医大学: [1] 附属西南医院骨科; [2] 护理系护理学教研室, 重庆 400038)

肛管插入结肠的深度、灌肠液量及灌肠液保留时间对灌肠效果有直接影响。按文献[1]的要求, 大量不保留灌肠时, 肛管插入的深度为7~10 cm, 灌肠液量为500~1 000 ml。但在临床实际操作时, 按此标准, 常难以达到清洁肠道的目的。为了更好地实现清洁肠道, 强化灌肠术的科学性, 本研究结合骨科常见病人, 如脊椎骨折、截瘫, 骨病术后及术前的肠道准备, 对大量不保留灌肠术肛管插入的深度、灌肠液量和保留时间进行了探讨。

1 对象与方法

对象: 选择骨科常见病患者60例, 随机分为2组, 实验组30例, 男19例, 女11例, 平均年龄39岁。对照组30例, 男16例, 女14例, 平均年龄43。

器具: 灌肠器具一套, 肛管为上海精化医用橡胶厂生产的橡胶肛管(长30 cm)。

方法: 按文献[1]大量不保留灌肠法要求进行操作, 灌肠液为生理盐水1 000 ml, 温度40 ℃, 筒内液面高于肛门50 cm。

2 结果

本试验观察结果见表1. 对照组患者肛管插入深度较实验组浅, 所以, 肠道灌入液体量少, 灌入液体在肠道中保留时间亦短, 显然, 灌肠效果差。

表1 两组患者肛管插入深度、灌入液量、保留时间

组别	人数	插入深度(cm)			灌入液量(ml)		保留时间(min)	
		全距	平均数	标准差	全距	平均数	全距	平均数
试验组	30	18—22	20.1	1.3983	500—1000	790	5—10	8.0000
对照组	30	7—10	8.8	0.9613	80—100	91	2—3	2.4667

3 讨论

60例灌肠病例中, 实验组与对照组患者均按文献[1]灌肠术操作要求进行。从表1中可以看出, 两组患者肛管插入深度、灌入液量、灌入液体保留时间明显不同, 见表1。用SPSS10.0软件包进行数据处理, 结果: 肛管插入深度两组 $t=36.475$, $P=0.000$; 灌入液量两组 $t'=27.834$, $P=0.0000$, 保留时间两组 $t'=15.8920$, $P=0.000$。

对照组肛管插入浅, 由于灌肠液对肛管和直肠的刺激, 使肠蠕动活跃, 其结果, 一是使灌入液体量少(只有80~100 ml), 二是灌肠液在肠道中保留时间短(2~3 min内灌肠液即沿肛门溢出)。根据大肠的解剖, 肛管长约4 cm, 直肠全长10~14 cm; 所以, 肛管插入7~12 cm根本无法达到清洁肠道和解除便秘的作用, 即使是反复多次的灌肠也不能达到目的。

试验组肛管插入深(18~22 cm), 灌入液量多(500~1 000 ml), 灌入液保留时间长(5~10 min), 灌肠效果好。这是因为正常人的直肠腔内通常并无粪便, 只是当肠蠕动将粪便推入直肠时, 刺激直肠感受器发出冲动, 经盆腔神经和腹下神经传至脊髓腰骶段的初级排便中枢, 并上传到大脑皮层, 才引起便意和排便反射。对于骨科患者, 由于长期卧床, 肠蠕动减慢, 加之患者有意识地制止排便, 使直肠渐渐失去对粪便压力刺激敏感性, 粪便在大肠内停留过久, 水分吸收过多而干燥, 此时灌肠时, 肛管插入深度必须长于直肠的最长长度, 才能使灌入的大量液体从上向下"冲击", 将粪便排出体外, 如果插入7~10 cm, 肛管头端正好处于干结的粪便处, 不但灌入的液体少, 而且保留的时间也短; 当进行肠道手术或检查时, 插入7~10 cm, 肛管头端正好处于无粪便的直肠中, 通过空虚的直肠向存有粪便的结肠中灌入液体, 既灌入的液量少, 保留的时间又短, 所以, 则难达到清洁肠道和排除便秘的目的。

本研究结合临床上骨科常见病患者实施大量不保留灌肠术实践, 对灌肠术肛管插入深度进行了研究, 根据肛管、直肠解剖特点, 结合骨科病人大量不保留灌肠术的目的, 认为肛管插入深度以18~22 cm为宜, 此深度一方面可使灌肠液保留时间适当延长, 可促使干结粪便软化, 另一方面可使大量灌肠液产生"冲击压力", 使粪便排出, 从而较好的达到大量不保留灌肠的目的。

关键词: 灌肠液保留时间; 插入肛管深度; 灌肠液量; 不保留灌肠
中图法分类号: R452 文献标识码: B

参考文献:

[1] 陈维英, 主编. 基础护理学[M]. 第3版. 南京: 江苏科学技术出版社, 1998. 3.

(编辑 冷怀明)

作者简介: 屈 轶(1981—)湖北省襄樊市人, 护士。电话(023)65310955
收稿日期: 2001-12-10; 修回日期: 2002-04-04

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