DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.05.020
第24卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 5
544 2002年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)05-0544-03

组织工程化关节软骨细胞凋亡的研究

谢 肇,许建中,周 强,解世杰 (第三军医大学附属西南医院骨科,重庆 400038)

提 要:目的 观察离心管构建的组织工程软骨细胞凋亡及细胞增殖情况。方法 对离心管构建3周的组织工程软骨进行透射电镜、流式细胞仪检测和^{3}H-TdR掺入测定,与3周龄兔关节软骨对照。结果 透射电镜检查组织工程软骨有5%左右的细胞凋亡,正常关节软骨未见明显的细胞凋亡;流式细胞仪显示软骨细胞有8.5%左右的亚二倍体细胞,正常关节软骨有2.4%左右的亚二倍体细胞。^{3}H-TdR掺入测定显示细胞增殖能力较正常关节软骨明显增强。结论 培养3周的组织工程软骨细胞凋亡与细胞增殖均较正常软骨增强。

关键词:关节软骨细胞;离心管;细胞凋亡;细胞增殖
中图法分类号:R318.08;R322.71;R329.28 文献标识码:A

Apoptosis of tissue engineered articular chondrocytes constructed by centrifuge tube

XIE Zhao, XU Jian-zhong, ZHOU Qiang, XIE Si-jie (Department of Orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To observe the apoptosis and proliferation of chondrocytes in tissue engineered articular cartilage 3 weeks after construction with centrifuge tube. **Methods** Tissue engineered articular cartilage constructed by centrifuge tube were studied with electron microcopy, TUNEL, ^{3}H-TdR incorporation and flow cytometry. **Results** Nearly 5% apoptotic cells were found in the engineered articular cartilage under a microscope which were similar with that obtained by flow cytometry. The chondrocytes in tissue engineered articular cartilage had more ^{3}H-TdR incorporation than the articular chondrocytes from 3-week-old rabbits. **Conclusion** The chondrocytes in 3-week tissue engineered articular cartilage have stronger potency in both proliferation and apoptosis than the cells in normal articular cartilage.

Key words: articular chondrocyte, centrifuge tube, apoptosis, proliferation

细胞凋亡是机体正常发育所必需的,它是发育过程中细胞清除的正常途径。研究表明多种因素可引起关节软骨细胞的凋亡,关节软骨细胞凋亡的异常会引起骨关节炎(OA)等关节软骨疾病[1,2];离心管技术构建组织工程化关节软骨,其细胞生长的环境与体内有明显的区别,软骨细胞凋亡的情况如何,目前尚未见报道。本研究通过流式细胞仪、透射电镜、^{3}H-TdR掺入测定等技术对离心管构建3周的软骨组织细胞凋亡及增殖进行了观察,旨在研究离心管构建的软骨组织细胞凋亡的特点;从另一个角度探索构建组织工程软骨的适宜条件。

1 材料与方法

1.1 主要实验仪器、材料、试剂

实验仪器包括721-A分光光度计(上海市仪器厂)、RF-5000荧光光度计(岛津公司)、PTC-200循环扩增仪(MJ Reserch公司)、J2-HS高速冷冻离心机(BECKMAN公司)、2F-A型紫外透射分析仪(上海长明光学仪器厂)。实验材料有木瓜蛋白酶(E. Merck)。TUNEL原位凋亡试剂盒等试剂均购自于Sigma公司。JEM-100SX透射电镜,EPICS ELITE ESP型流式细胞仪。

1.2 组织工程软骨的构建

按文献[3]方法分离和纯化3周龄新西兰兔关节软骨细胞,按照Kato法,每管5×10^6个软骨细胞,将软骨细胞悬液移入15 ml Falcon塑料离心管内,再加入质量分数为10%的小牛血清DMEM培养液至5 ml,1 500 r/min离心5 min,使软骨细胞在离心管内形成小团块,然后放置于37 ℃体积分数为5%的二氧化碳、饱和湿度下培养。5 d后第1次换液,以后每隔2 d换液1次,培养3周。

对培养3周的组织工程软骨和3周龄的新西兰白兔关节软骨各6例进行^{3}H-TdR掺入测定等各项指标检测。

1.3 观察指标

1.3.1 透射电镜观察软骨组织的超微结构 培养3周的组织工程软骨和3周龄新西兰兔膝关节软骨分别经2.5%戊二醛前固定和1%锇酸后固定,蒸馏水洗5 min,常规乙醇逐级脱水。环氧树脂812包埋,超薄切片。醋酸铀和枸橼酸铅双重染色。透射电镜观察。

1.3.2 流式细胞仪检测 培养3周的组织工程化关节软骨组织与3周龄兔关节软骨经相同的方法同步消化,分别收集软骨细胞进行流式细胞仪检测。

1.3.3 ^{3}H-TdR掺入测定 于无菌条件下切取3周龄新西兰白兔,膝关节软骨,放置于无菌10 ml试管内,加入DMEM 6 ml,37 ℃体积分数为5%的二氧化碳孵箱内过夜。将培养3周的组织工程软骨与上述关节软骨同步处理如下:①每支试管置关节软骨或组织工程软骨一块,DMEM 0.8 ml,每管加入2 μCi/10 μl

基金项目:第三军医大学校管基金资助项目(1999)
作者简介:谢 肇(1967—),男,安徽省颍上县人,博士研究生,主治医师,主要从事骨科临床和组织工程方面的研究。电话:(023)68754000-73076
通信作者:许建中,电话:(023)68754164
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

^{3}H-TdR 10μl, 37 ℃ 5 h。②弃培养液, 生理盐水洗涤 3 次。③加入 60% 高氯酸 0.2 ml、30% H_2O_2 0.2 ml 和正辛醇 10μl, 80 ℃ 30 min。④取上述消化液 0.1 ml 闪烁瓶, 加入无水乙醇 3ml, 二甲苯闪烁液 1 ml, 进行放射性计数。

1.4　统计学处理

所得结果均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组织工程软骨和正常关节软骨 ^{3}H-TdR 的掺入量采用 SPSS 软件 t 检验方法进行统计学处理。

2　结果

2.1　透射电镜

组织工程软骨细胞为圆形或椭圆形, 细胞核清晰, 少许异染色质沿核均匀分布, 核内以常染色质为主。胞浆内有较多分泌囊泡和糖原颗粒, 内质网和高尔基体较为丰富, 见图 1。组织工程软骨细胞中有 5% 左右的软骨细胞体积明显变小, 胞浆浓缩, 细胞核变小, 染色质边集浓缩并凝集成块, 表现为典型的凋亡细胞特征, 见图 2。

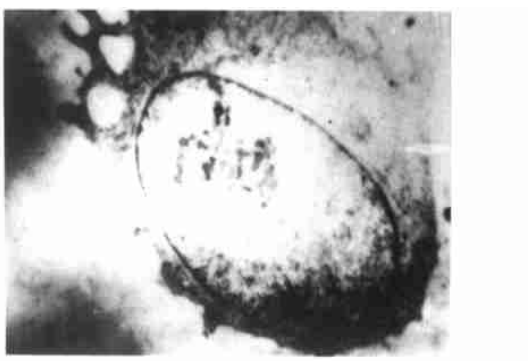


图 1　组织工程软骨细胞的电镜观察　(TEM× 5 000)

Fig 1　Chondrocytes in 3-week tissue engineered articular cartilage constructed by centrifuge tube　(TEM× 5 000)

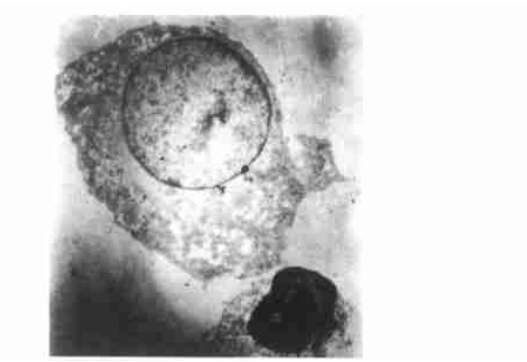


图 2　组织工程软骨凋亡软骨细胞的电镜观察　(TEM× 5 000)

Fig 2　Apototic chondrocytes in 3-week tissue engineered articular cartilage constructed by centrifuge tube　(TEM× 5 000)

2.2　流式细胞仪检测结果

正常兔关节软骨细胞和组织工程软骨细胞亚二倍体细胞比例: 正常关节软骨细胞 2.4%, 组织工程软骨细胞 8.5%, 见图 3。

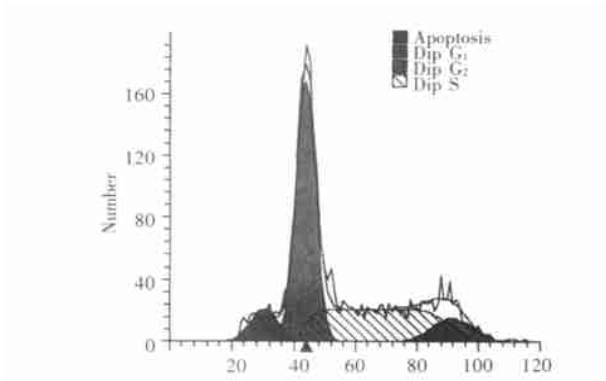


图 3　组织工程软骨细胞凋亡的流式细胞仪检查结果

Fig 3　Flow cytometry of apoptotic chondrocytes in 3-week tissue engineered articular cartilage constructed by centrifuge tube

2.3　组织工程软骨和 3 周龄兔关节软骨 ^{3}H-TdR 的掺入情况, 见表 1

表 1　培养 3 周的组织工程软骨与关节软骨 ^{3}H-TdR 的掺入情况(CPM, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　^{3}H-TdR incorporation of three-week tissue engineered articular cartilage constructed by centrifuge tube and the controlled articular cartilage(CPM, $\bar{x}\pm s$)

Group		t
Engineered articular cartilage	8 231.5±412.04	10.08
Normal articular cartilage	5 657±470.95	

组织工程软骨与关节软骨相比 $P<0.001$; 组织工程软骨 ^{3}H-TdR 掺入量为 8230±321; 正常关节软骨 ^{3}H-TdR 掺入量为 5672±463。经 t 检验, 实验组与对照组相比, ^{3}H-TdR 掺入量差异显著($P<0.001$)。

3　讨论

细胞凋亡是一定生理和病理情况下, 机体通过基因调控使细胞自动消亡的过程, 是细胞死亡的重要形式之一[4]。细胞凋亡的典型形态学表现: 细胞体积缩小, 细胞核浓缩, 核染色质聚集于核周边, 核仁裂解, 进而细胞膜内陷, 将细胞自行分裂为多个核膜包裹, 内涵物不外溢的细胞小体, 即凋亡小体[4,5], 最后被邻近细胞所识别、吞噬或自然脱落而消亡。

关节软骨细胞增殖和凋亡正常情况下处于动态平衡, 使关节软骨在总体上保障其细胞数量及形态和功能的稳定。关节软骨细胞凋亡率增加可引起关节软骨破坏导致骨关节炎等疾病[2]。离心管技术构建组织工程化软骨时, 软骨细胞生长的环境发生了改变, 这些因素对软骨细胞凋亡和细胞增殖将造成影响。培养 3 周内的组织工程软骨已经成熟, 具有与正常关节软骨相似的结构: 由软骨细胞及其细胞外基质组成, 每一软骨细胞被细胞外基质包绕[3]。故选择培养 3 周的组织工程软骨作为研究对象研究组织工程软骨的细胞凋亡与

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

细胞增殖情况。

本研究中电镜显示组织工程化软骨有5%左右软骨细胞具有凋亡细胞的特征,正常关节软骨细胞未见明显软骨细胞凋亡的形态表现。流式细胞仪对组织工程软骨细胞分析显示软骨细胞中有8.5%左右的亚二倍体细胞,3周龄兔关节软骨细胞流式细胞仪分析显示2.4%左右的亚二倍体细胞,从电镜观察结果推测2.4%左右的亚二倍体细胞可能是消化过程对软骨细胞损伤所致。两种软骨细胞的消化过程相同,可以认为消化过程对软骨细胞损伤相当。因此组织工程软骨细胞中6%左右的亚二倍体细胞应认为是凋亡细胞,结果与电镜相似。从以上结果看离心管内构建3周的组织工程软骨较正常关节软骨细胞凋亡率明显增加。

透射电镜下正常组织工程软骨细胞胞浆内有较多分泌囊泡和糖原颗粒,内质网和高尔基体较为丰富,提示细胞蛋白合成与基质分泌功能良好。^{3}H-TdR掺入检查发现培养3周组织工程软骨较正常关节软骨细胞的^{3}H-TdR掺入量显著增大;TdR为细胞合成DNA的必需成分,^{3}H-TdR掺入量反映软骨细胞DNA合成能力。可见离心管内构建3周的组织工程软骨细胞凋亡与细胞增殖均较正常关节软骨增强。

Boussidan等[6]的研究表明关节软骨的损伤引起软骨细胞的一系列反应,包括细胞的增殖和基质的合成增加。种子细胞的分离等过程可能导致软骨细胞的增殖能力增强;同时软骨组织作为一个整体通过启动自身调节机制,增加软骨细胞凋亡以维持构建软骨组织自身代谢的相对平衡。可能软骨细胞凋亡增加正是组织工程软骨生长较为稳定的因素。而离心管构建3周的组织工程软骨会逐渐增大[3],则是因为这一时期组织工程软骨的细胞增殖较凋亡处于优势。说明离心管内构建软骨,软骨组织同样具有维持自身代谢稳定的能力。可以认为离心管技术适合进行组织工程软骨的构建。

参考文献:

[1] Hashimoto S, Ochs R L, Komiya S, *et al*. Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degration in human osteoarthritis[J]. Arthritis Rheum, 1998, 41(9): 1 632—1 638.

[2] Blanco F J, Guitian R, Vazquez-Martual E, *et al*. Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis[J]. Arthritis Rheum, 1998, 41(2): 284—289.

[3] 杨志明,王 跃,解慧琪,等.应用无支架离心管培养技术构建组织工程化软骨组织[J].中华骨科杂志,2000,20(9):521—524.

[4] Kerr J E R, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics[J]. Br J Cancer, 1972, 26(4): 239—257.

[5] Arends M J, Morris R G, Wyllie A H. Apoptosis, the role of endonuclease[J]. Am J Pathol, 1990(3): 136—593.

[6] Boussidan F, Nahir A M. Altered chondrocytic oxidative metabolism during the resloration of depleted intercellular matrix[J]. J Exp Pathol, 1990, 71(3): 395—402.

(编辑 王 红)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2002)05-0546-01

腹膜外美克尔憩室伴异位胰腺1例

Report on a case of extraperitoneal Meckel's diverticulum with pancreas ectopia

涂永久,林大富,魏凌云 (解放军第174医院普通外科,厦门 361003)

患者,男性,24岁,因腹胀、腹痛伴肛门未排气2 d急诊入院。体格检查:体温:38.3 ℃,全腹微隆起,未见胃肠型及蠕动波,全腹部压痛,伴反跳痛及腹肌紧张,以右中下腹部尤明显,未扪及腹部包块,无移动性浊音,肠鸣音活跃,门诊腹部拍片显示:"低位小肠梗阻",血常规提示:血白细胞13.6×10^{9}/L,中性87%。入院后初诊为"急性阑尾炎伴穿孔",急诊在持续硬膜外麻醉下行剖腹探查术。探查见腹腔内有混浊脓性渗液约100 ml,距回盲部40 cm有一回肠憩室,长约10 cm,直径0.5~2.5 cm,距回肠红3 cm处狭窄,狭窄以上部位明显肿胀,部分化脓穿孔,呈青紫色,尖端约3 cm与脐部相连,并被周围腹膜包埋,形成腹膜外器官。整个憩室形成一束带压迫小肠,使其成为一闭袢性小肠梗阻,行"回肠憩室切除术",憩室游离后,于根部用7号丝线结扎后缝扎,离断后,荷包包埋于回肠壁。术后予胃肠减压,以先锋霉素、甲硝唑联合抗感染。病理检查为:美克耳憩室,长约10 cm,呈急性化脓性炎症,淤血、出血,部分坏死,管壁见异位胰腺组织。术后患者恢复顺利,术后72 h拔除胃管,胃肠功能恢复,术后1周拆线,切口甲级愈合,痊愈出院。

讨论

美克尔憩室的发生率为0.14%~4.5%,其重要性在于约25%的憩室可因颈部狭窄引流不畅,存在异位组织,残留憩室与脐部间束带等原因导致憩室炎、出血、穿孔及肠梗阻等合并症[1]。一般其尾端游离,本例比较有意义的表现为憩室的尖端部分似成为腹膜外器官,也是病变的主要部位。其异位的胰腺组织在憩室所占异位组织中亦比较少见。本例发病初期表现

(下转549页)

作者简介:涂永久(1966—),男,湖北省武汉市人,硕士,主治医师,主要从事普外及腹腔镜外科方面的研究,发表论文12篇。电话:(0592)2025971-3303

收稿日期:2001-09-18;修回日期:2002-04-14

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