DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.05.026
第24卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 5
556 2002年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)05-0556-03

高数量骺板软骨细胞聚集培养生成软骨组织的观察

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

提 要:目的 观察高数量骺板软骨细胞的离心管内长期聚集培养生成软骨组织的大小和生物学特点,并对这一培养技术进行初步评价。方法 酶消化法分离幼兔骺板软骨细胞,以90×10⁴原代细胞经离心沉降于15 ml塑料离心管底聚集培养,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 培养生成的软骨,随培养时间的延长体积逐渐增大,4周时直径最大为4.5 mm;外周组织结构类似于骺软骨的生发层或软骨膜,由多层细胞构成,随时间的延长而减少;中心部位为肥大的软骨细胞,随培养时间的延长而增多。2周后,甲苯胺蓝染色呈强的异染反应,Ⅱ型胶原免疫组化呈强阳性;Ⅰ型胶原的免疫组化着色明显减弱,主要位于外周。结论 离心管内工程化软骨构建技术所需操作简便、设备简单,生成的工程化骺板软骨具有良好的软骨结构和富含软骨特异性基质成分,增加细胞数量可使形成的软骨体积有所增大,但其大小和形状仍很有限。

关键词:骺板;组织工程;离心管培养;组织再生;软骨细胞
中图法分类号:R322.71;R329.2 文献标识码:A

Cartilage regeneration from large number of epiphyseal chondrocytes pellet cultured in centrifuge tube

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

Abstract: **Objective** To observe the size and biological characteristics of the cartilage regenerated from the pellets of large number of epiphyseal chondrocytes cultured in centrifuge tube, and evaluate this technique of cartilage regenetation. **Methods** Chondrocytes were isolated with enzyme digestion from the epiphyseal cartilage of young rabbits. The pelleted mass of 90× 10⁴ chondrocytes by centrifugation were cultured in a plastic centrifuge tube. The pellet morphology and syntheses of collagen type Ⅱ and Ⅰ and aggrecan were investigated grossly and with light and inverted microscopy. **Results** The pellets converted into cartilage when cultivated in a centrifuge tube, which gradually became mature in structure along with the time elapsing, and with the maximal diameter of 4.5 mm after 4 weeks' culture. The periphery of the cartilage resembled the germinal layer of epiphyseal cartilage or the cartilage membrane, consisting of several cellular layers, 6—8 layers in the 3rd week, for example, which decreased with time. Its central part was composed of hypertrophic chondrocytes, whose number increased with time. The pellets cultivated after 2 weeks appeared strong positive staining of collagen type Ⅱ and strong metachromatic to toluidine blue, but the positive staining of collagen type Ⅰ mainly in periphery was weaken. **Conclusion** The regeneration of cartilage cultivated in a centrifuge tube is a simple manipulation, and the regenerated cartilage has a typical cartilage structure and rich collagen type Ⅱ and aggrecans in the matrix with limited size and shape.

Key words: epiphyseal plate; tissue engineering; centrifuge culture; tissue regenetation; chondrocyte

细胞在无基质材料或支架材料的条件下体外培养一般很难形成组织,离心管内软骨细胞聚集体培养是一种不需支架材料的特殊工程化软骨构建技术,能生成较成熟的软骨组织。但目前采用这一技术生成的骺板软骨体积较小,难以用于较大面积骺板缺损的修复。因此,本实验的目的为探索通过大量增加所用骺板软骨细胞的数量以增大生成工程化骺板软骨的体积,并观察所生成软骨组织的生物学特点,以及对这一培养技术进行初步的评价。

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

1 材料和方法

1.1 离心管内骺板软骨细胞聚集培养

无菌条件下解剖分离3周幼兔四肢长骨,剔除软组织,切取骺板,剪成约1~2mm³碎块。系列酶消化后,经200目筛网过滤,离心收集原代骺板软骨细胞,苔盼蓝排除法细胞活性计数。每90×10⁴活细胞以1 500 r/min、5 min离心沉降于15 ml塑料离心管底(BD公司),加含10%胎牛血清(Hyclone)的IMDM(Hyclone)培养液,置于37 ℃、5%CO_2孵箱内培养,隔天2/3量换液。分别于培养1、2、3、4、5、6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。

1.2 观测指标

1.2.1 大体及倒置显微镜观察

1.2.2 组织学光镜观察 常规石蜡切片,脱蜡至水,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、

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

中性树胶封片, 光镜观察。

1.2.3　Ⅰ型和Ⅱ型胶原免疫组化　　参照文献[1] 的方法, 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

细胞团培养 3～4 d 开始收缩, 1 周后体积开始增大, 细胞团逐渐变为白色半透明的结节样软骨组织, 3 周时直径为 3～3.5 mm、高为 2.0～2.5 mm, 第 4 周直径为 4～4.5 mm、高为 2.2～3.0 mm, 见图 1, 以后生长减缓, 至 6 周无明显增大。形成的软骨结节质地较硬, 倒置显微镜下见其细胞呈圆形, 有细胞外基质相隔。

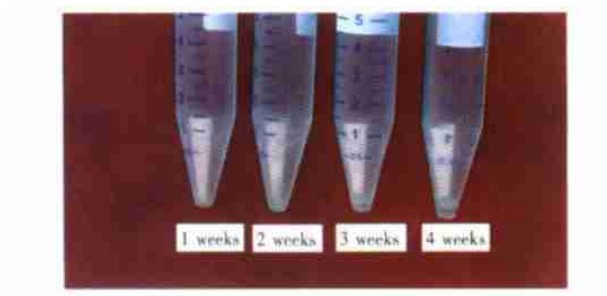


图 **1**　离心管培养 **1～4** 周的软骨组织

Fig 1　Cartilage cultured in the centrifuge tubes for 1～4 weeks

2.2　组织学观察

软骨组织块的外周部分组织结构类似于髂板软骨的生发层或软骨膜, 由多层梭形、卵圆形或圆形细胞组成, 细胞间有丰富的胞外基质, 培养 2～3 周时有 6～8 层细胞, 见图 2, 以后随培养时间的延长其宽度变窄、细胞数量减少, 6 周时仅有 1～3 层细胞。中心部位与外周界限明显, 软骨细胞体积较大, 随时间的延长而向外周扩展, 4 周有少量不规则的同源细胞柱状排列形成, 且中心的细胞明显肥大, 以后组织块中心开始出现肥大细胞的坏死溶解。甲苯胺蓝染色 1 周时即出现红色异染反应, 主要位于类软骨膜下, 2 周后异染反应更强, 见图 3。

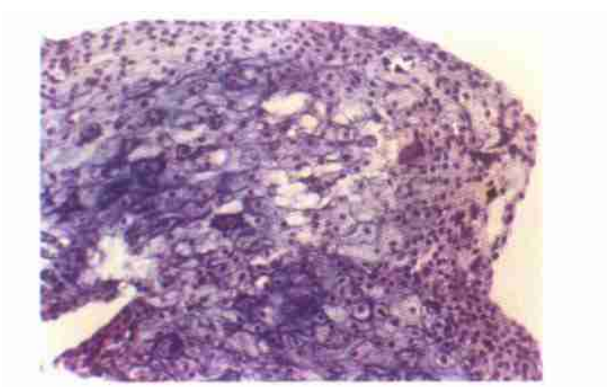


图 **2**　培养 **3** 周的软骨块"类生发层"有 **6～8** 层细胞　(HE× 200)

Fig 2　Cartilage cultured for 3 weeks having a germinal lay like structure consisting of 6～8 cellular layers of cells　(HE× 200)

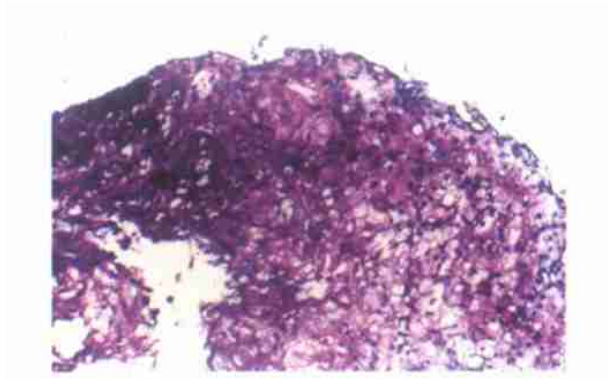


图 **3**　培养 **2** 周的软骨块有很强的甲苯胺蓝红色异染反应　(× 200)

Fig 3　Cartilage with 2 weeks' culture showing strong metaochromatic to toluidine blue　(× 200)

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, 各时相点均有明显的免疫阳性着色, 培养 1 周稍弱, 2 周后阳性着色均较强, 见图 4。Ⅰ型胶原的免疫组化显示, 培养 1 周时免疫着色阳性, 外周部明显强于中心部, 着色随培养时间的延长而呈减弱的趋势。2 周时中心部免疫着色明显减弱, 3 周后阳性着色进一步减弱, 主要位于外周, 见图 5。

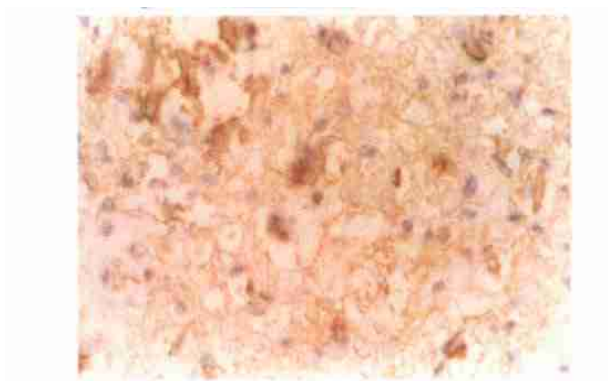


图 **4**　培养 **2** 周的软骨块Ⅱ型胶原免疫组化染色呈强阳性　(S-P× 400)

Fig 4　Cartilage appearing strong positive staining of collagen type Ⅱ at the 2nd week of cultivation　(S-P× 400)



图 **5**　培养 **3** 周的软骨块Ⅰ型胶原免疫组化染色呈弱阳性, 主要位于外周部　(S-P× 400)

Fig 5　Three-week cultured cartilage with weak positive staining of collagen typeⅠ　(S-P× 400)

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

3 讨论

离心管内软骨细胞聚集生成软骨这一技术首先是由日本学者Kato[2]于1988年建立的，他将8×10^4个原代肋骨骺板软骨细胞通过低速离心沉降于15 ml的塑料离心管底部形成细胞团，培养8～10 d细胞开始生成软骨样组织，在12 d细胞增殖达平台期，以后软骨细胞开始终末分化并产生基质矿化。随后，中国学者颜炜群等[3]对Kato的方法加以改进，以15×10^4个原代肋骨骺板软骨细胞离心沉降，培养生成圆盘形具有骺板样组织结构的软骨组织，培养4周其直径小于2.5 mm。Ballock等[4]以16×10^4个骺板静止区的原代软骨细胞在离心管中培养生成了骺发育性软骨样组织，培养21 d形成了直径约2 mm、高约1 mm软骨组织块，软骨细胞呈辐射状排列，中心区为肥大软骨细胞。另外，新近哺乳动物骨髓间充质干细胞体外诱导分化为软骨组织，也是利用这一技术首先获得成功的[5]。由于小面积的骺板缺损可以自身修复，只有骺板损伤达到一定的面积才会导致骺板早闭和肢体生长障碍，这也是以工程化骺板组织修复骺板缺损的意义所在。但是应用这一技术生成的软骨组织体积太小，显然不适合用于组织工程骺板软骨修复较大面积骺板缺损的研究。因此，有必要探索如何能够增大应用这一技术生成骺板软骨的体积。我们在增加细胞数量方面做了初步尝试。

本实验以90×10^4原代骺板软骨细胞离心沉降，培养生成了工程化软骨组织。培养4周组织块体积达最大，直径为4～4.5 mm、高为2.2～3.0 mm，在生成软骨的体积上较以往研究有明显增大。从组织学结果看，虽然未形成典型的骺板结构，但组织结构与以往文献报道基本一致，外周部为由多层细胞组成的骺软骨类生发层或类软骨膜，中心部为肥大软骨细胞区。培养2～3周时类生发层有6～8层细胞，且具有一定大小的体积，随培养时间的延长类生发层细胞数量逐渐减少，而中心部肥大软骨细胞区不断扩大，并出现细胞的坏死溶解，可能是由于组织块比较致密，达到一定体积时出现中心部细胞营养供应障碍所致。这些很可能是培养到一定时间组织停止长大、所能获得工程化软骨体积有限的原因所在。Ⅰ型和Ⅱ型胶原免疫组化结果表明，随着培养时间的延长形成的软骨组织逐渐成熟，2～3周时整个组织块Ⅱ型胶原的免疫着色均很强，而Ⅰ型胶原主要限于类生发层；同时，甲苯胺蓝染色也显示了较强的异染反应，说明细胞外基质中已含有相当量的软骨特异性蛋白多糖。上述结果表明，培养2～3周时生成的软骨组织块具有一定的大小，组织结构及生化成分也相对较成熟，可能具有较好的生物学功能活性，是用于修复动物骺板缺损模型或进行其他进一步体外实验观察的较佳时机。

离心管内工程化软骨构建技术的优点在于所需技术简便、设备简单，避开了目前短时间内尚难以解决的诸多支架材料问题，生成的工程化软骨具有良好的组织结构和较高含量的软骨基质特异性生化成分。本实验培养生成的软骨组织块大小可以满足小型动物骺板软骨缺损模型的修复性研究[6]。另外，这一培养技术也是研究骨、软骨发生、生长代谢和软骨相关疾病难得的良好体外模型[7,8]。然而，应用这一技术一般均以原代软骨细胞为种子细胞，是否可用于传代细胞还有待进一步的实验验证，且生成工程化软骨组织的形状固定、大小较有限。因此，有必要对其进行更深入的基础研究，使其在技术及工艺上得到根本性的改进，以适应大型动物模型的治疗性研究和进一步临床应用的需要。

参考文献：

[1] Kumagai J, Sarkar K, Uhthoff H, *et al*. Immunohistochemical distribution of type Ⅰ, Ⅱ and Ⅲ collagens in the rabbit supraspinatus tandon insertion[J]. J Anat, 1994, 185(Pt2): 279－284.

[2] Kato Y, Iwamoto M, Koike T, *et al*. Terminal differentiation and calcification in rabbit chondrocyte cultures grown in centrifuge tubes: Regulation by transforming growth factor β and serum factors[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85(24): 9 552－9 556.

[3] 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.

[4] Ballock R T, Reddi A H. Thyroxine is the serum factor that regulates morphogenesis of columar cartilage from isolated chondrocyte in chemically defined medium[J]. J Cell Biol, 1994, 126(5): 1 311－1 318.

[5] Johnstone B, Hering T M, Caplan A I, *et al*. *In vitro* chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells[J]. Exp Cell Res, 1998, 238(1): 265－272.

[6] 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)：1 139－1 142.

[7] Ballock R T, Zhou X, Mink L M, *et al*. Both retinoic acid and 1, 25(OH)2 vitamin D3 inhibit thyroid hormone-induced terminal differentiaton of growth plate chondrocytes[J]. J Orthop Res, 2001, 19(1): 43－49.

[8] Ballock RT, Zhou X, Mink L M, *et al*. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in epiphyseal chondrocytes induced to terminally differentiate with thyroid hormone[J]. Endocrinology, 2000, 141(12): 4 552－4 557.

（编辑 王 红）

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