DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.02.005
第24卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 2
2002年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2002

文章编号:1000-5404(2002)02-0129-03

论著

关节软骨组织工程种子细胞的优化获取

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

提 要:目的 优化关节软骨组织工程种子细胞的体外获取方法。方法 分析不同代次体外单层培养幼兔关节软骨细胞接种密度与相对接种存活率的关系,并观察其细胞生长状况、形态特征及分化功能。结果 相同培养条件下,体外单层培养关节软骨细胞的相对接种存活率和生长活性与其接种密度呈正相关;同一代次适宜密度[(2~3)×10^4/cm^2]接种者的相对接种存活率和生长活性同高密度[(4~5)×10^4/cm^2]接种者相近;传代培养(第2~4代)细胞的相对接种存活率和生长活性相对高于原代培养者。结论 在相同培养条件下及一定传代次数内,适宜密度接种进行关节软骨细胞单层传代培养,可获取数量多、活性高的关节软骨组织工程种子细胞。

关键词:组织工程;关节软骨;种子细胞;接种密度;生长活性
中图法分类号:R322.72;R329.2 文献标识码:A

Optimal accumulation of seeding cells for articular cartilage tissue engineering

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

Abstract: Objective To optimize the accumulation method of seeding cells for articular cartilage tissue engineering. Methods Relation between the plating density and the plating efficiency of young rabbit articular cartilage cells at different passages in monolayer culture were analyzed, and the growth status, morphologic features, and differentiation properties of those cells were observed. Results Under the same circumstances, the plating efficiency, the growth activity of primary and passage articular cartilage cells in monolayer culture significantly related to the plating density (The larger the density was, the higher plating efficiency and activity of the cells were). The plating efficiency and growth activity of the cells at the appropriate plating density (2~3×10^4 cells/cm^2) was close to those in the high plating density, and the plating efficiency and grouth activity of cell in passage culture (passages Ⅱ~Ⅳ) were higher than those of primary cells. Conclusions After the division and proliferation of articular cartilage cells in monolayer culture at the appropiate plating density, a large number of seeding cells with high growth activity can be obtained for articular cartilage tissue engineering.

Key words: tissue engineering; articular cartilage; seeding cell; plating density; growth activity

种子细胞(Seeding cell)是组织工程的基本要素之一。如何在适宜的体外消化分离和单层培养条件下,充分利用培养软骨细胞的生物学特性,在其有限的分裂增殖时限内,获取数量多、活性高、分化功能良好的种子细胞,是目前关节软骨组织工程制备技术中的重要问题之一[1,2]。通过分析不同代次体外单层培养幼兔关节软骨细胞接种密度与相对接种存活率的关系,并观察其细胞生长状况、形态学特征及分化功能,为关节软骨组织工程种子细胞的优化获取提供了一种行之有效的方法。

1 材料与方法

1.1 兔关节软骨细胞分离消化与单层培养

按魏西秦[3]方法,无菌条件下切取4~6周龄健康日本大耳白兔关节软骨,并将其切成1 mm^3大小的碎块。依次加入0.05%透明质酸酶溶液、0.20%胰蛋白酶溶液及0.20% Ⅱ型胶原酶溶液消化,用300目滤网过滤收获软骨细胞,经细胞计数(台盼蓝染色细胞活度>90%)后,按(2~3)×10^4/cm^2接种于含常规原代细胞培养液(Hams-F_{12}+DMEM+10%胎牛血清+0.1%青、链霉素)培养瓶内,置37 ℃、5% CO_2培养箱内孵育。

细胞形成单层后,加入0.25%胰蛋白酶消化,镜下观察细胞变圆、部分游离后,终止消化;收获细胞经计数(台盼蓝染色细胞活度>90%)后,以(2~3)×10^4/cm^2接种于含常规传代细胞培养液(DMEM+10%胎牛血清+0.1%青、链霉素)培养瓶内,置37 ℃、5% CO_2培养箱内孵育。每日在倒置显微镜下观察细胞生长状况和形态变化。

1.2 不同代次及不同接种密度单层培养关节软骨细胞生长活性检测

1.2.1 实验步骤 将原代及第2、4代单层培养软骨细胞以0.5、1、2、3、4、5×10^4/cm^2密度梯度稀释,分别于24孔板及含盖玻片6孔板中接种培养。

1.2.2 检测指标 ①相对接种存活率(贴壁伸展细胞数/接种细胞数×100%)检测[4];②细胞生长状况及形态变化:倒置显微镜观察[4];③细胞病理学观察:采用HE、VG和甲苯胺蓝染色[5],光镜下观察。

1.3 统计学方法

结果以$\bar{x}\pm s$表示,应用SPSS医用统计软件包进行数据统

基金项目:国家自然科学基金重点资助项目(39830100);全军"十五"医药卫生科研基金重点资助项目(01Z72)
作者简介:戴 刚(1960-),男,甘肃省秦安县人,博士,副主任医师,主要从事骨与软骨组织工程,可吸收医用修复材料方面的研究。发表论文38篇,现在北京军区总院骨科,北京 100700。电话:(010)66721629-8002
收稿日期:2001-05-18;修回日期:2001-10-10

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

计学处理。采用 ANOVA 方差分析并行方差齐性检验；采用直线回归与相关分析，结果以直线回归方程表示，并计算 r 值和 P 值。

2 结果

2.1 不同代次及不同接种密度单层培养关节软骨细胞的相对接种活性

同一代次单层培养关节软骨细胞的相对接种存活率，在一定范围内，与其接种密度的大小呈正相关，中等密度接种者[(2～3)×10^4/cm^2]高于低密度接种者[(0.5～1)×10^4/cm^2，$P<0.01$]，而与高密度接种者[(4～5)×10^4/cm^2]无统计学差异($P>0.05$)，见图 1；相同接种密度不同代次单层培养关节软骨细胞的相对接种存活率，第 2、4 代者均高于原代者($P<0.01$)，而第 2 代者与第 4 代者之间无统计学差异($P>0.05$)，见表 1。

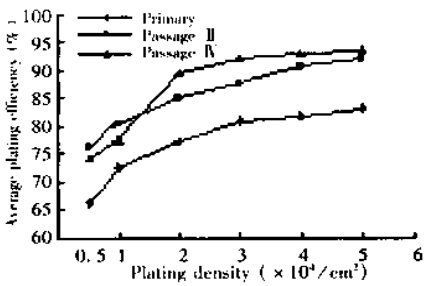


图 1 不同代次培养软骨细胞接种密度与其相对接种存活率的关系曲线

Fig 1 The correlation of plating density with plating efficiency of different passage articular cartilage cells in monolayer culture

表 1 不同代次培养软骨细胞接种密度与其相对接种存活率回归与相关分析

Tab 1 The analysis of the regression and correlation of plating density with plating efficiency of different passage articular cartilage cells in monolayer culture

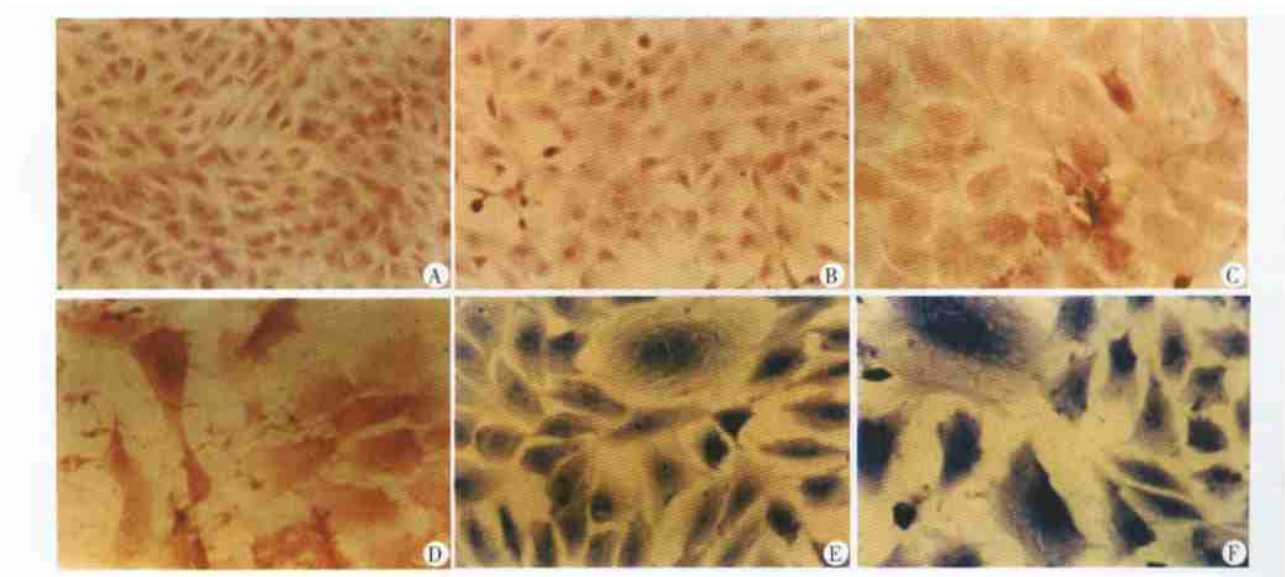
Passages	Linear regression	r	P
Primary	Y=3.6724X+69.00	0.905	<0.01
Passage Ⅱ	Y=3.6260X+77.33	0.954	<0.01
Passage Ⅳ	Y=4.6085X+76.17	0.891	<0.01

X: Plating density(×10^4/cm^2); Y: Plating efficiency [($\bar{x}\pm s$)%]

2.2 同代次适宜接种密度单层培养关节软骨细胞生长活性观察

2.2.1 倒置显微镜动态观察 适宜接种密度[(2～3)×10^4/cm^2]原代培养兔关节软骨细胞于 24～36 h 内弥散贴壁、大部分伸展，可见部分漂浮细胞；48 h 大部分细胞向外伸突呈多角形，部分细胞呈椭圆形，相互连接形如网状；经过大约 20 h 潜伏期后，培养细胞在 2～3 d 内分裂增殖并相互融合形成单层，增殖细胞呈多角形或椭圆形见图 2A。第 2 代和第 4 代培养细胞悬浮、贴壁、伸展、伸突所占时间较短，约 6～24 h，漂浮细胞较原代培养明显减少；经 12～18 h 潜伏期后，细胞形态随传代次数增加而由多角形或椭圆形逐渐变成短梭形或梭形，细胞体积逐渐增大见图 2B。

2.2.2 细胞病理学观察 适宜接种密度原代和第 2、4 代单层培养关节软骨细胞和基质胶原 VG 染色呈深红色见图 2C、D，S-GAG 甲苯胺蓝染色呈蓝紫色见图 2E、F；传代培养细胞两种特殊染色强于原代培养细胞。



A、C、E: Primary cells[A(HE×200); C(VG×400); E(Toluene blue×400)]; B、D、E: Passage Ⅳ cells [B(HE×200); D(VG×400); F(Toluene blue×400)]

图 2 适宜密度接种单层培养关节软骨细胞

Fig 2 Articular cartilage cells in monolayer culture of appropriate plating density

3 讨论

如何利用少量软骨组织，在适宜的体外消化分离和单层培养条件下，在其有限的分裂增殖时限内，获取数量多、活性高、分化功能良好的种子细胞，是目前关节软骨组织工程制备技术中的重要问题之一[1,2]。研究表明，关节软骨的细胞成份单一，不含神经和血管基质，经体外酶消化分离，即可得到高纯度的软骨细

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

胞[3,6]。然而培养软骨细胞依赖邻近同源细胞释放的自分泌信号分子而在体外存活。高密度单层培养软骨细胞能够在无其他类型细胞、血清、异种蛋白或信号分子的条件下存活数周时间; 而低密度单层培养软骨细胞则在同样条件下短期内出现凋亡[7,8]。此外培养软骨细胞的分裂增殖能力有限, 经体外培养一定时间、增殖达到一定数量后, 培养细胞出现明显老化而进入不分裂状态[7,8]。因此, 同一来源软骨细胞, 在相同培养条件下, 可由于细胞接种密度及传代次数不同, 而使培养软骨细胞的分裂增殖、形态变化及分化功能状态完全不同[7~9]。

不同代次及不同接种密度体外单层培养关节软骨细胞相对接种活性的分析结果表明: ①同一代次培养细胞的相对接种存活率, 在一定范围内与其接种密度密切相关。其接种密度越大, 相对接种存活率越高; ②同一代次适宜密度[$(2\sim3)\times10^4$ /cm^2] 接种者, 其相对接种存活率高于低密度[$(0.5\sim1)\times10^4$ /cm^2] 接种者($P<0.01$), 而与高密度[$(4\sim5)\times10^4$ /cm^2] 接种者相近($P>0.05$); ③相同接种密度不同代次培养细胞的相对接种存活率, 第 2、4 代者均高于原代者($P<0.01$), 而第 2 代者与第 4 代者之间无统计学差异($P>0.05$), 即一定范围内传代培养关节软骨细胞的接种活性相对高于原代培养者。上述结果为关节软骨组织工程种植细胞体外扩增培养时接种密度与传代次数的选择提供了实验依据。

体外单层培养关节软骨细胞生长过程、形态变化及分化功能的观察结果表明, 不同代次适宜密度[$(2\sim3)\times10^4$ /cm^2] 接种单层培养的关节软骨细胞, 早期均呈弥散性均匀贴壁伸展, 形如网状, 拥有较大的增殖空间(与高密度接种者比较), 通过其不断繁殖, 逐渐充填"网眼", 并相互融合形成单层。细胞病理学观察证实, 其融合形成单层的培养细胞, 形态相近, 分布均匀, 并可分泌基质胶原和蛋白多糖。以此可获得数量多、活性高、分化功能良好的关节软骨组织工程所需的种子细胞。比较适宜接种密度对传代培养关节软骨细胞有促增殖作用的效能。

研究表明, 许多多肽生长因子及某些化学药物对体外培养关节软骨细胞的分裂增殖具有明显地促进作用[1]。选择既能显著促进培养软骨细胞分裂增殖, 又可防止其退变和凋亡的相关生物因子, 对关节软骨组织工程种子细胞的体外快速与高效获取具有重要意义。其相关研究有待进一步完成。

参考文献:

[1] Temenoff J S, Mikos A G. Tissue engineering for regeneration of articular cartilage[J]. Biomaterials, 2000, 21(3): 431—440.

[2] Nerem R M, Sambanis A. Tissue engineering: from biology to biological substitutes[J]. Tissue Eng, 1995, 1(1): 3—13.

[3] 魏西秦, 曹峻岭, 熊咏民. 兔软骨细胞培养方法研究[J]. 中国地方病学杂志, 1987, 6(2): 89—92.

[4] 鄂　征, 主编. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 第 2 版. 北京: 北京出版社, 1997. 147—157.

[5] 龚志锦, 主编. 病理组织制片和染色技术[M]. 上海: 上海科技出版社, 1994. 52—53, 66—67, 169—170.

[6] Buckwalter J A, Mankin H J. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions[J]. AAOS Inst Course Lect, 1998, 47(3): 477—486.

[7] Ishizaki Y, Burne T E, Raff M C. Autocrine signals enable chondrocytes to survive in culture[J]. J Cell Biology, 1994, 126(5): 1 069—1 077.

[8] Gibson G, Lin D L, Roque M. Apoptosis of terminally differentiated chondrocytes in culture[J]. Exp Cell Res, 1997, 233(2): 372—382.

[9] Simth J R, Pereira-smith O M. Replicative senescence implication for *in vivo* aging and tumor suppression[J]. Science, 1996, 273(1): 63—67.

(编辑　谢义霞)

(上接 128 页)

动脉有吻合。脊髓的动脉血供有 3 个主要来源, 脊髓前动脉、脊髓后动脉以及根动脉, 其中胸段的根动脉来自于肋间动脉[1,2]。脊髓的静脉回流经根前及根后静引流至椎静脉丛。椎静脉丛向上与延髓静脉相通, 在胸段与胸腔内奇静脉及上腔静脉相通, 从而又与肺静脉有联系。这些特点表示肺部的血管网与脊髓血管网有联系, 成为肺癌脊髓转移的解剖基础。

肺为活动性器官, 呼吸、咳嗽等因素可使胸腔内压力发生剧烈变化。椎静脉丛内的压力很低, 没有瓣膜, 其血流方向不定, 常受胸腔压力的变动而改变, 支气管动脉在肺门处形成广泛的交通网, 因而肺癌细胞在胸腔内压力剧烈变化情况下脱落入血经通过肋间-支气管动脉干, 或椎静脉丛, 到达脊髓或椎体, 锚着于脊髓、椎体微血管床而发生转移。

Bobek[3] 报告有的肺癌患者在肺癌确诊前仅诉颈部疼痛而无肺部表现。还有的患者则表现为四肢肌肉萎缩, 或无力, 似运动神经元疾病[4]。我们临床观察统计的病人, 其首发临床症状为腰痛, 双下肢麻木、无力, 或大小便障碍等脊髓压迫症状, 在院外多被诊断为腰肌劳损, 或腰椎间盘突出症, 或脊髓病变。

本组病例误诊的主要原因是: ① 呼吸道症状缺乏, 无咳嗽, 咳血及胸痛症状, 无胸闷、气急; ② 体格检查无喘鸣, 局部淋巴结肿大不明显; ③以下肢损伤症状为主, 因而常首先考虑脊髓或腰椎病变。

因此, 对有长期吸烟史的中老年人, 出现双下肢无力、感觉障碍及大小便功能障碍时, 皆要进一步详细检查, 常规行胸部 X 光片检查, 有条件的可行胸部 CT 检查, 或支气管镜检查, 以明确肺部情况, 排除肺癌脊髓转移。临床上, 肺癌的转移病变是多种多样的。因而在临床工作中, 我们除注意肺癌脑部转移外, 还要注意脊髓的转移, 防止出现误诊、漏诊。

关键词: 肺癌; 脊髓; 转移
中图法分类号: R73-37; R734.2　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 姚家琪 主编. 人体动脉解剖模式图谱——正常及变异[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998. 24—28.

[2] 朱贵卿 主编. 呼吸内科[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998. 90.

[3] Bobek J, Wilk L. Cervical pain as the only complaint in a patient with metastatic advanced lung carcinoma[J]. Neurol Neurochir Pol, 1999, 33(5): 1 187—1 193.

[4] Verma A, Berger J R, Snodgrass S, *et al*. Motor neuron disease: a paraneoplastic process associated with anti—hu antibody and small-cell lung carcinoma[J]. Ann Neurol, 1996, 4(1): 12—116.

(编辑　薛国文)

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