

永生化下颌髁突软骨细胞形态学特征的研究

段小红 吴军正 董绍忠 刘 斌

摘要 目的:比较永生化下颌髁突软骨细胞(IMCC)和原代培养的下颌髁突软骨细胞(MCC)在形态学特征等方面的差别。方法:通过相差显微镜、光镜、电镜等观察细胞的形态特征,采用HPIAS-1000图像分析系统比较IMCC和MCC的大小。结果:MCC表现出以多角形为主的多形性形态特征,并随培养代数的增加细胞形态发生改变;IMCC为多角形,传代对其形态无明显影响。MCC的超微结构表现出软骨细胞的一般特征,IMCC近似于前成软骨细胞,部分细胞核浆比例、细胞核形态发生改变。图像分析发现IMCC在细胞长短径、面积等方面小于MCC($P < 0.01$)。结论:IMCC基本保留了MCC的形态特征,其表型稳定,属于一种分化程度较低、幼稚的软骨细胞,可能近似于下颌髁突的增殖层细胞。

关键词 下颌髁突 软骨细胞 永生化 超微结构 形态学

A Study on the Morphological Characters of Immortalized Mandibular Condylar Chondrocyte

Duan Xiaohong, Wu Junzheng, Dong Shaozhong, et al

The Department of Oral Biology, Stomatological College, the Fourth Military Medical University

Abstract

Objective: The purpose of this study was to compare the morphological character between immortalized mandibular condylar chondrocyte (IMCC) and primarily cultured mandibular condylar chondrocyte (MCC). **Methods:** The phase contrast microscope, photomicroscope and transmission electron microscope were used to observe the morphological character of IMCC and MCC. The high-resolution pathological image and word report system-1000 (HPIAS-1000) was used to compare the size of IMCC and MCC.

Results: The phase contrast micrography showed that MCCs in primary culture underwent distinct morphological changes with respect to shape, size, and density of the cells. The majority of MCCs were in polygonal shape earlier in culture, while more fusiform and spindle-shaped cells were found after 4-5 passages. While IMCCs were polygonal-shaped, similar to MCCs. Subculture, freezing and recovering had no effect on cellular shape of IMCC. Transmission electron microscopy indicated that MCC had chondrocyte-like phenotype, while IMCC looked like prechondroblast or immature chondrocyte. Some of IMCCs had irregular nucleus, and the proportion of nucleus/cytoplasm changed. By analysis of HPIAS-1000, the diameter and area of IMCC were obvious smaller than those of MCC ($P < 0.01$). **Conclusion:** IMCC retain the main morphological character of MCC, and also keep a stable phenotype, which belong to immature chondrocytes, similar to cells in the proliferative zone.

Key words: condyle chondrocytes immortalization ultrastructure morphology

下颌髁突是颞颌关节的重要组成部分之一,其表层为纤维层、增殖层和软骨层等组成的纤维软骨。体外培养的下颌髁突软骨细胞(mandibular condylar chondrocyte, MCC)常表现出不同分化状态的软骨细胞并存,软骨细胞的表型特征也随培养时间而变化,这些不稳定的因素为研究MCC的生物学特性带来了一定的困难^{1~3}。作者通过转基因

技术,建立了永生化的下颌髁突软骨细胞(imortalized mandibular condylar chondrocyte, IMCC)⁴,该细胞系能在体外1年半的时间内稳定传代100次以上。一些研究表明^{5,6},转化细胞可在细胞形态、排列、生长模式等方面发生改变,本实验对IMCC的形态特征与原代培养的MCC进行比较。

1 材料和方法

1.1 IMCC的建系过程⁴

构建含有猿猴病毒(simian virus,SV)40大T抗原基因片段的重组逆转录病毒载体,采用脂质体介导的方法,将目的基因转入包装细胞PA317,利用G418筛选阳性克隆,收集并过滤阳性克隆的病毒上清。采用胶原酶和胰蛋白酶消化法原代培养1~2周的新西兰白兔的MCC。用高滴度的病毒上清感染MCC,G418筛选3周后有克隆出现,用滤纸法和有限稀释法挑选克隆,并扩大培养,进行常规的冻存、复苏、传代,以及有关的生物学鉴定。

1.2 形态特征观察

细胞按常规方法培养,4d左右传代1次,接种密度约25 m²面积5 ×10⁴至7 ×10⁴个细胞。从细胞接种后每隔24h,相差显微镜下观察细胞的形态和生长特征的改变。采用细胞爬片的方法,进行常规苏木素—伊红(hematoxylin and eosin,HE)染色。

1.3 IMCC和MCC形态大小的比较

用胰酶常规消化细胞,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)洗1次,制成单细胞悬液,然后细胞涂片,空气干燥后,用甲醇固定细胞,并用Giemsa液染色30min,常规酒精系列脱水,二甲苯透明封片。10倍光镜下,随机选取不同的视野,观察细胞大小,采用HPIAS-1000图像分析系统(同济医科大学)采集图像并分析数据。

1.4 超微结构特征

常规胰酶消化细胞,收集约1 ×10⁸细胞,PBS洗2遍,1000g室温离心5min后,弃上清,缓慢给细胞沉淀加入3%戊二醛,4℃放置。包埋时用PBS洗3次,每次10min,1%锇酸后固定4~1h,50%~100%系列丙酮脱水,Epon812树脂包埋,修块,制备超薄切片,轴铅双重染色。JEM-2000EX型透射电镜观察。

2 结 果

2.1 相差显微镜和光镜的观察结果

MCC早期以多角形细胞居多,少数细胞呈纺锤形,从第4~5代起,纺锤形和梭形的细胞增多,第10代左右,细胞的生长开始变得缓慢,并逐渐生长停止,细胞不再分裂。IMCC与MCC形态近似,主要为多角形,细胞体积小于MCC,传代过程中细胞的形态无明显变化,见图1。两种细胞HE染色结果见图2。

2.2 两种细胞形态大小的比较

两种细胞形态大小的比较见表1。

2.3 超微结构特征

MCC表面有微绒毛突起,胞浆内有发育良好的粗面内质网和结构正常的线粒体,同时胞浆内存在许多糖原颗粒。细胞核较圆,核膜清晰,常染色质

占胞核的绝大部分,少量异染色质集中在核内膜,可见1~2个盘绕的核仁丝。IMCC表面亦有微绒毛突起,胞浆成分与MCC相比,粗面内质网和高尔基体不发达,糖原颗粒较多。有部分细胞核浆比例增大,细胞核中异染色质明显增多,呈团块状,分散在核周边。个别细胞核呈现出规则形态,见图3。

表1 IMCC和MCC细胞大小的比较(μm)

Tab 1 Comparison of the size of IMCC and MCC (μm)

细胞	面积	长径	短径	长短比	圆形成度	细胞数
MCC	341.70 ±141.00	22.55 ±5.51	18.65 ±4.19	1.21 ±0.16	0.93 ±0.06	123
IMCC	97.45 ±26.03	11.98 ±1.70	10.45 ±1.38	1.15 ±0.10	0.99 ±0.04	136
t 检验 (P 值)	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	

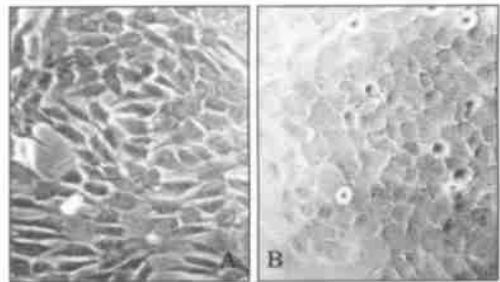


图1 相差显微镜下MCC和IMCC的形态 ×100
A. MCC B. IMCC

Fig 1 Phase contrast micrographs of MCC and IMCC in culture ×100
A. MCC B. IMCC

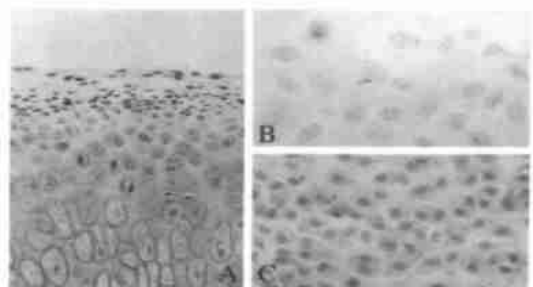


图2 下颌髁突组织、MCC和IMCC的细胞形态 HE ×200
A. 下颌髁突组织 B. MCC C. IMCC

Fig 2 micrographs of the supraosseous tissue of mandibular condyle, MCC and IMCC HE ×200
A. mandibular condyle B. MCC C. IMCC

3 讨 论

下颌髁突表层是纤维软骨,由表及里分为纤维层、增殖层和软骨层。体外培养时分离出的下颌髁突软骨细胞常常是处于不同分化阶段的软骨细胞

的混合体,因此原代 MCC 的细胞形态呈现出以多角形为主的多形性特征,这与其他学者的报道近似^{1~3},并且在体外培养一段时间后软骨细胞出现去分化的现象,细胞生长速度变慢,细胞形态主要为梭形。IMCC 有明显增强的增殖能力,从细胞的形态来看,基本保留了软骨细胞的体外培养形态,呈多角形,与原代培养的 MCC 近似,而且传代、冻存和复苏没有影响其形态。

从以往组织学的研究发现,位于增殖层的细胞体积小于不成熟的软骨细胞,并且软骨细胞在成熟、肥大化的过程中体积逐渐变大,见图2⁷。通过比较 IMCC 和 MCC 的细胞面积发现,前者明显小于后者,从细胞大小来讲,IMCC 可能处于分化程度较低的状态,而 MCC 则分化程度较高。同时还观察到,MCC 细胞面积的变异系数较大,这可能与后者是处于不同分化阶段的细胞组成的群体有关。

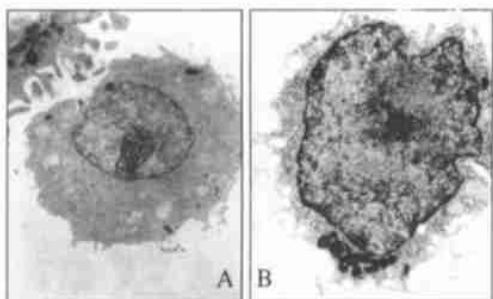


图3 透射电镜下 MCC 和 IMCC 超微结构特征
A. MCC ×4000 B. IMCC ×7500

Fig 3 The ultrastructure character of MCC and IMCC under transmission electron microscopy

A. MCC ×4000 B. IMCC ×7500

Bhalerao 等⁵的研究发现,T 抗原转化的软骨细胞分化程度低,类似于分化较差的骨肉瘤中的骨原细胞。本实验中 MCC 的超微结构类似于软骨细胞^{8,9},IMCC 则多处于 DNA 合成旺盛的时期或分裂前期,细胞呈现出一种幼稚的状态,如粗面内质网和高尔基体不发达等。个别细胞具有转化细胞

的特征,如具有不规则的细胞核等^{9,10}。

本实验表明,IMCC 具有无限增殖性,其形态均一,以多角形为主,细胞面积等小于原代的 MCC,属于一种分化程度较低的软骨细胞,可能近似于下颌髁突的增殖层细胞。

参考文献

- 1 Engel FE, Khave AG, Boyan BD. Phenotypic changes of rabbit mandibular condylar cartilage cells in culture. *J Dent Res*, 1990, 69(11):1753~1758
- 2 Gridler NM. The behaviour of mandibular condylar cartilage in cell culture. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 1993, 22(2):178~184
- 3 Takigawa M, Okada M, Takano T, et al. Studies on chondrocytes from mandibular condylar cartilage, nasal septal cartilage, and sphenoid-occipital synchondrosis in culture. *J Dent Res*, 1984, 63(1):19~22
- 4 段小红,吴军正,毛勇,等. SV40 诱导下颌髁突软骨细胞永生化的实验研究. *中华口腔医学杂志*, 2001, 35(1):16~19
- 5 Bhalerao J, Bogers J, van Mark E, et al. Establishment and characterization of two clonal cell lines derived from murine mandibular condyles. *Tissue Cell*, 1995, 27(4):369~382
- 6 Thenet S, Benya PD, Demignot S, et al. SV40-immortalization of rabbit articular chondrocytes: alteration of differentiated functions. *J Cell Physiol*, 1992, 150(1):158~167
- 7 段小红,王惠芸. 负荷改变对下颌髁突骨上组织细胞及细胞外基质的影响——超微结构的研究. *实用口腔医学杂志*, 1999, 15(1):3~5
- 8 Shibata S, Suzuki S, Yamashita Y, et al. A comparative ultrastructural study of the mitotic chondrogenic cells in the mandibular condyle and tibial growth plate of the rat. *Arch Oral Biol*, 1993, 38(10):845~851
- 9 汪德耀主编. *细胞生物学超微结构图谱*. 北京:高等教育出版社,1989:138~193
- 10 黄文清主编. *肿瘤电子显微镜诊断学*. 上海:上海科学技术出版社,1992:53~61

(2000-11-27 收稿,2001-12-07 修回)

(本文编辑 王 晴)

《涎腺疾病》出版发行

北京大学口腔医学院马大权教授主编的《涎腺疾病》一书已由人民卫生出版社发行。本书主要阐述涎腺病理生理基本理论及临床诊治方法,内容包括唾液构成及分泌机制、涎腺肿瘤的组织发生及临床病理、分子生物学、外科手术、涎腺炎症及舍格伦综合征以及面神经、发育异常等。适合于口腔科、颌面外科、耳鼻喉科、头颈外科、成形外科以及从事涎腺生理研究工作者参考。书号 ISBN 7-117-04691-0,全书 60 余万字,图文并茂,售价 56 元。可向新华书店或医药卫生专营书店购买。