

· 专栏论著 ·

下颌骨髁突软骨细胞传代过程中生物学特性变化

焦岩涛 王大章 韩文利 胡 静

摘要 目的: 观察体外培养及传代对人髁突软骨细胞生物学特性的影响。方法: 采用体外细胞培养、免疫生化及分子生物学方法观察传代过程中人髁突软骨细胞形态、II型胶原及蛋白多糖合成及I、II、III型前胶原的mRNA水平变化。结果: 传代过程中人髁突软骨细胞II型胶原合成及其mRNA水平逐渐降低, 至第7代已基本丧失, 而I、III型胶原的mRNA水平随传代逐渐升高, 同时伴有细胞蛋白多糖合成的减少, 细胞壁形态由圆形或多角形转变为长梭形占优势。结论: 体外培养及反复传代可影响软骨细胞的表型特征。髁突软骨细胞的反分化标准应从胶原、蛋白多糖合成及细胞形态等方面综合评价。

关键词 髁状突 软骨细胞 培养 表型

软骨细胞的分化状态直接影响着软骨的生物学性能, 软骨细胞分化异常是常见关节疾患——骨关节炎的一个重要表现。研究体外环境中细胞分化状态的变化, 可为寻找骨关节炎有效防治手段及建立性状稳定的软骨细胞库奠定基础。以往研究¹多为大关节软骨细胞。本研究采用形态学、生物化学及分子生物学方法对体外培养人髁突软骨细胞在传代过程中的生物学行为变化进行了观察。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

II型胶原酶(Sigma, USA), DMEM培养基(Gibco, USA), 小牛血清(华西医科大学分子生物学实验室), II型胶原单克隆抗体(Oncogene Research Products, USA), 含I、II型胶原cDNA片段质粒(北京医科大学运动医学研究所曲绵域教授惠赠), 含III型胶原及 β Actin cDNA片段的质粒(华西医科大学章锦才教授惠赠), 细胞总RNA分离纯化试剂盒及低熔点琼脂糖(Gene Co Ltd, USA), 限制性内切酶EcoR I, Hind III(Gibco, USA), 地高辛标记检测试剂盒及尼龙膜(Boehringer Mannheim, Germany), 其它试剂均为国产分析纯。

1.2 髁突软骨细胞的分离、培养、传代

参照文献²方法, 下颌骨髁突软骨取自因健康原因需终止妊娠的4~6月水囊引产人胚胎, 经机械分离及胰蛋白酶、胶原酶消化, 获得高成活率、均一的软骨细胞。接种于含10%小牛血清的DMEM培养基(青霉素100 u/ml, 链霉素100 μ g/ml, 抗坏血酸50 μ g/ml), 于CO₂孵箱内, 37^oC, 5% CO₂饱和湿度下培养。待细胞长满汇合成单层后开始传代, 本实验传代7次。

1.3 髁突软骨细胞形态学观察

在原代及传代培养过程中定期进行相差显微镜观察及摄影。

1.4 生长曲线绘制

将不同传代髁突软骨细胞按 2×10^4 /孔接种于24孔板。从接种后第1天起, 随机取孔, 以0.25%胰蛋白酶消化后计数, 取均值描绘生长曲线。

1.5 甲苯胺蓝染色

培养软骨细胞甲苯胺蓝染色参照 Takigawa 等人³的方法。

1.6 培养软骨细胞合成II型胶原的免疫检测

取不同传代软骨细胞1瓶(25 ml培养瓶)。用0.25%胰蛋白酶消化获得细胞, 用PBS洗涤两次, 离心弃上清, 加入 $1 \times$ SDS样品缓冲液(50 mmol/L Tris-cl pH 6.8, 100 mmol/L二硫苏糖醇, 2% SDS, 10%甘油)充分混匀, 置100^oC煮沸10 min, 移入冰浴, 离心取上清, -20^oC保存备用。

分别取各传代细胞提取物4 μ l点样于硝酸纤维素膜上, 平行点样不同稀释浓度的成骨细胞(MC-3T3E1)提取物, 室温干燥后装入塑料袋, 加入5 ml封闭液(5%脱脂奶粉, 0.02%叠氮钠, 0.05%吐温-20的PBS), 封袋, 4^oC过夜。PBS洗膜后, 将膜封于含II型胶原单克隆抗体的(1:20稀释)封闭剂, 4^oC振荡下孵育2 h。再次洗膜后, 将膜封于含辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠IgG的封闭液中。封袋后, 室温振荡孵育2 h。室温洗膜10 min。最后将膜置于显色液(4-氯奈酚10 mg, 甲醇3 ml, 10 mmol/L pH 7.6 Tris-cl 17 ml, 3%双氧水15 μ l)显色30 min, 照相记录。

本课题为国家自然科学基金资助项目(编号 39500164)

作者单位: 610041 华西医科大学口腔医学院口腔颌面外科学教研室

1.7 培养软骨细胞 $\text{pro } \alpha(I)$ 、 $\alpha(II)$ 、 $\alpha(III)$ 基因表达的检测

含 I、II、III 型胶原 cDNA 片段重组质粒经转化、鉴定后,大量扩增,经碱裂解法抽提,限制性酶切消化后低熔点琼脂糖凝胶电泳回收特定 cDNA 片段,探针标记按地高辛标记试剂盒说明进行。取不同传代次数的髌突软骨细胞 (2×10^6),提取细胞总 RNA。取各样品总 RNA 2 μg ,与等体积 RNA 稀释液 ($20 \times \text{SSC}$, 37% 甲醛,体积比 3:2), 68 变性 15 min。将样品点样于预先用 $10 \times \text{SSC}$ 浸泡 10 min 尼龙膜, 80 烤膜 2 h。分别与地高辛标记的 I、II、III 型胶原的 cDNA 探针进行预杂交、杂交、显色及灰度扫描。

2 结 果

2.1 传代软骨细胞形态及生长变化

在传代过程中软骨细胞形态改变显著,原代细胞多数为圆形或多角形(图1),自第3代开始出现长梭形细胞,到第6代以后长梭形的成纤维细胞样细胞可占90%以上。细胞重叠生长,呈漩涡状,长满单层时细胞数大于原代培养细胞(图2)。传代软骨细胞生长速度较原代快,细胞倍增时间缩短,通常长满单层的时间为4~6 d(图3)。

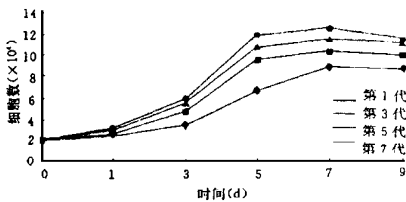


图3 不同代的人髌突软骨细胞生长曲线

2.2 传代细胞 II 型胶原及蛋白多糖的合成

随传代次数增加, II 型胶原合成逐渐减少。至第7代免疫印迹方法已不能检测出细胞裂解液中 II 型胶原(图4)。甲苯胺蓝染色原代细胞着色深,传代后的细胞染色逐渐变浅,说明软骨细胞合成硫酸软骨素蛋白多糖有减少趋势。

2.3 传代软骨细胞 I、II、III 型胶原 mRNA 水平的变化

采用斑点杂交的方法,检测了不同传代细胞总 RNA 中 $\text{pro } \alpha(I)$ 、 $\alpha(II)$ 、 $\alpha(III)$ 的相对水平。结果表明: $\text{pro } \alpha(II)$ mRNA 水平随传代逐渐降低,第7代软骨细胞几乎不能表达 $\text{pro } \alpha(II)$ 。与之相反 $\text{pro } \alpha(I)$ 、 $\alpha(III)$ 随传代次数增加均有显著增加(图5,6)。

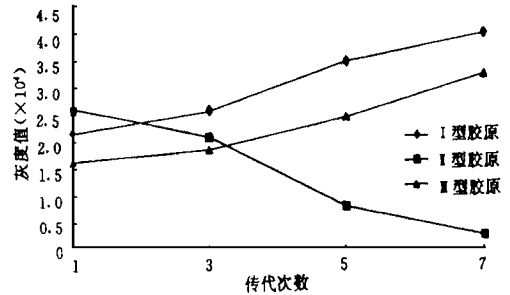


图5 传代过程中软骨细胞胶原基因表达的变化

3 讨 论

软骨来源于未分化的间充质细胞,胚胎时期间充质的中胚层及神经嵴均具有向软骨细胞分化的能力,但只有在特定的条件下,这些细胞才能向软骨细胞分化。目前软骨的分化诱导机制尚不清楚。本研究结果显示在反复传代过程中髌突软骨细胞由多角形占多数转变为长梭形细胞占优势。并且细胞合成特异性 II 型胶原及蛋白多糖的功能逐渐降低, I、III 型胶原的表达逐渐升高。形态改变的软骨细胞伴有其表型特征的丧失,这个转化过程与大关节软骨细胞反分化现象是一致的⁴。

反分化是体外培养软骨细胞发生的一种表型特征的丧失。其发生机理及影响因素目前尚不清楚,但研究显示可能与培养环境的变化及传代次数有关⁵。通常认为只有圆形及多角形的软骨细胞可表达分化的软骨细胞表型,体外反复传代过程中细胞形态发生变化,形状类似于成纤维细胞。这可能是因为体外贴壁培养软骨细胞的细胞骨架发生改变,而这种变化可传递到细胞核基质,导致染色质结构的改变,从而影响相应基因的转录⁶。近来研究表明,许多因素可以调节体外培养软骨细胞的表型特征,如改进培养方法,悬浮或半固体琼脂培养方法⁷,加入某些因子如 BM P_2 、 IGF-I 等均能够达到稳定软骨细胞表型、促进其分化的作用。

髌突软骨有别于其它关节透明软骨,研究表明髌突软骨细胞能够同时表达 I 型及 II 型胶原,而透明软骨细胞只合成 II 型胶原。因而不能单以出现 I 型胶原的合成作为软骨细胞反分化的标准。应结合 II 型胶原、蛋白多糖合成及细胞形态变化作综合评价⁸。

在骨关节病及软骨损伤异常修复中也可伴有软骨细胞合成胶原类型的改变,并失去合成蛋白多糖基质的功能。因反分化的软骨细胞与之相似,因

而可作为骨关节炎病的体外研究模型, 用作探索骨关节炎病的发病机制, 并寻找预防和控制软骨细胞反分化的措施, 以治疗骨关节炎病⁹。

(本文图1、2、4、6见中心插页15)

4 参考文献

- 1 Von Der Mark K, Conrad G. Cartilage cell differentiation. *Clin Orthop Relat Res*, 1979, 139(3): 185~ 205
- 2 焦岩涛, 王大章, 田卫东, 等. 人胚颞颌关节软骨细胞培养及生物学特性研究. *华西口腔医学杂志*, 1997, 15(3): 187~ 189
- 3 Takigawa M, Okada M, Taakano T, et al. Studies on chondrocytes from mandibular condylar cartilage, nasal septal cartilage and sphenoccipital synchondrosis in culture. *J Dent Res*, 1984, 63(1): 19
- 4 曲绵域, 陈慧会, 齐剑刚, 等. 软骨细胞培养过程中细胞反分化的研究. *北京医科大学学报*, 1992, 24(4): 330~ 332
- 5 Gospodarowicz D, Greenburg G, Birdwell CR. Determination of cellular shape by the extracellular matrix and its correction with the control of cellular growth. *Cancer Res*, 1978, 38(11): 4155~ 4171
- 6 Folkman J, Moscona A. Role of cell shape in growth control. *Nature*, 1978, 273(5661): 345~ 347
- 7 Benay PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*, 1982, 30(1): 215~ 224
- 8 Milan SB, Klebe RL, Triplett RG, et al. Characterization of the extracellular matrix of the primate temporomandibular joint. *J Oral Maxillofac Surg*, 1991, 49(2): 381~ 391
- 9 Aigner T, Dudhia J. Phenotypic modulation of chondrocytes as a potential therapeutic target in osteoarthritis: a hypothesis. *Ann Rheum Dis*, 1997, 56(3): 287~ 291
(1999-03-16收稿, 1999-07-07修回)

Phenotypic Changes of Mandibular Condylar Cartilage Cells During Subculture

Jiao Yantao, Wang Dazhang, Han Wenli, et al

College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

Abstract

Objective: To demonstrate the phenotypic changes of mandibular condylar cartilage (MCC) cells during subculture in vitro. **Methods:** MCC cells were harvested from human fetus by digestion of collagenase and cultured in DMEM supplemented with 10% newborn calf serum, then they were passaged when reached confluence. Morphological changes were observed under phase-contrast microscope. Type II collagen, proteoglycan synthesis and type I, II and III procollagen mRNA levels were also studied in serial monolayer cultures. **Results:** During subculture, type II collagen and proteoglycan synthesis were decreased, being accompanied by a lower type II collagen mRNA level. In contrast, type I and III procollagen mRNA levels were elevated progressively. The morphology of polygonal-shaped chondrocytes was lost to the bipolar fibroblastic cells. **Conclusion:** Passage and culture can affect the phenotypic property of MCC cells.

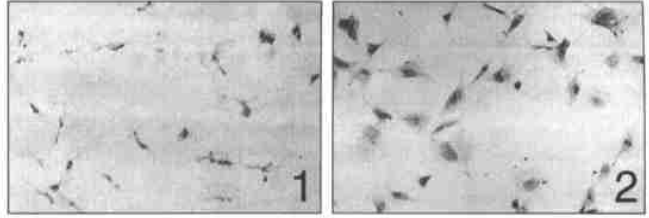
Key words: mandibular condyle cartilage cell culture phenotype

转化生长因子 β 对骨形成蛋白-2基因

转染细胞生物学行为的影响

(正文见第321页)

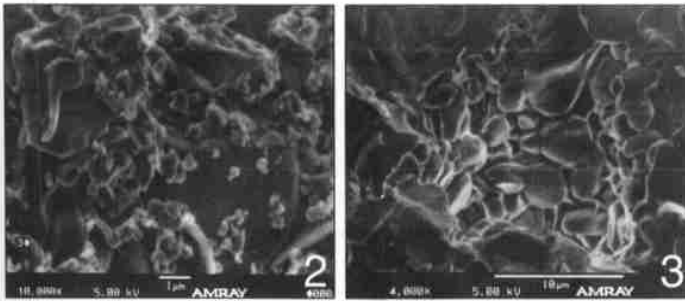
- 图1 转染细胞胞浆呈BMP2 mRNA阳性 原位杂交 $\times 100$
 图2 转染细胞胞浆呈BMP2阳性 免疫组化, 苏木精衬染 $\times 100$



可切削渗透陶瓷氧化铝基体的研究

(正文见第325页)

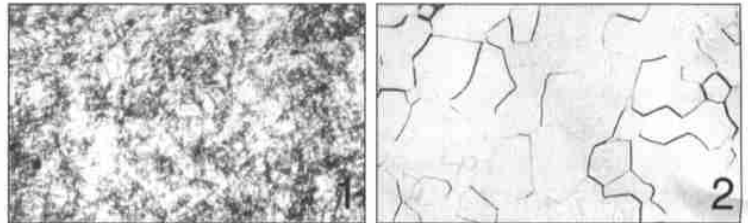
- 图2 G_{s2}组基体断面形貌 氧化铝粉体间呈紧密堆积, 颗粒呈多边形, 有的近乎球形, 粗细颗粒间呈弥散均匀分布
 图3 G_{s3}组基体断面形貌 基体中微细粉体大量熔失, 粗颗粒间颈部生长培接有所改善, 基体保持均匀的多孔结构



牙科用Ti-Zr合金的研制及性能特点

(正文见第329页)

- 图1 Ti-Zr合金金相显微组织结构 $\times 200$
 图2 纯钛合金相显微组织结构 $\times 200$



下颌髁突软骨细胞传代过程中生物学特性变化

(正文见第355页)

| | | |
|---|---|--|
| <p>软骨细胞</p> <p>M₁-3T3E₁</p> | | |
| <p>I型胶原</p> <p>II型胶原</p> <p>III型胶原</p> | | |
| <p>1 3 5 7 (传代次数)</p> <p>1 3 5 7 (传代次数)</p> | <p>图1 原代培养的人髁突软骨细胞多数为多角形或圆形 $\times 100$ 图4 传代人髁突软骨细胞II型胶原的免疫印迹</p> | <p>图2 第5代人髁突软骨细胞多数为长梭形 $\times 100$ 图6 传代人髁突软骨细胞前胶原基因表达的变化</p> |