

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00970

## 联合单层培养和三维培养的两步法培养软骨细胞

郭尚春<sup>1</sup>, 袁 霆<sup>2</sup>, 芮碧宇<sup>2</sup>, 陈 欣<sup>2</sup>, 孙 辉<sup>2</sup>, 张长青<sup>2\*</sup>, 曾炳芳<sup>2</sup>

- 1. 上海交通大学第六人民医院四肢显微外科研究所, 上海 200233
- 2. 上海交通大学第六人民医院骨科, 上海 200233

**[摘要]** **目的** 联合单层培养和三维培养方法, 探讨软骨细胞培养的理想方法。 **方法** 第一步先将软骨细胞进行常规单层培养扩增, 第二步再将单层培养第 4 代软骨细胞包裹于海藻酸钠水凝胶中进行三维培养。通过倒置显微镜定期观察软骨细胞的形态变化; 应用锥虫蓝染色和 LIVE/DEAD<sup>®</sup> Kit 试剂盒检测软骨细胞的活力和细胞增殖; 通过组织化学甲苯胺蓝特异性染色检测细胞外基质的形成变化。 **结果** 单层培养 3 代之前软骨细胞能保持正常的组织学形态, 三维培养能使去分化的 4 代软骨细胞逐渐恢复并持续维持正常的软骨组织表型。单层培养的软骨细胞的 4 代以前的细胞活力保持在 90% 左右, 第 4 代以后开始下降; 三维培养的软骨细胞活力都保持在 90% 以上。在细胞增殖率方面, 单层培养 6 代软骨细胞 (28 d) 总的倍增率是同期三维培养的 44 倍。单层培养的软骨细胞 4 代之后, 其细胞外基质平均染色强度降低 ( $P < 0.05$ ); 三维培养 21 d 和 28 d 后的软骨细胞外基质表达强度与 7 d 时相比升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。 **结论** 先通过单层培养使软骨细胞适宜扩增, 然后将其转入水凝胶中三维培养恢复退变的软骨组织表型, 可达到既扩增自体软骨细胞数目同时又保持正常组织表型的目的, 两步培养法是一种较理想的软骨细胞培养方法。

**[关键词]** 软骨细胞; 细胞培养; 表型; 细胞增殖; 海藻酸钠

**[中图分类号]** R 329.29 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)09-0970-05

### Monolayer culture followed by three-dimensional culture of chondrocytes: a two-step method

GUO Shang-chun<sup>1</sup>, YUAN Ting<sup>2</sup>, RUI Bi-yu<sup>2</sup>, CHEN Xin<sup>2</sup>, SUN Hui<sup>2</sup>, ZHANG Chang-qing<sup>2\*</sup>, ZENG Bing-fang<sup>2</sup>

- 1. Shanghai Institute for Microsurgery of Extremities, Sixth People's Hospital of Shanghai, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China
- 2. Department of Orthopaedics, Sixth People's Hospital of Shanghai, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

**[Abstract]** **Objective** To explore an ideal method for culturing autologous chondrocytes while maintaining their cartilaginous phenotype by combining monolayer culture with three-dimensional culture. **Methods** Chondrocytes were cultured by routine monolayer culture method, then the chondrocytes of fourth passage were seeded into alginate beads for three-dimensional culture following standard protocols. The cell morphology was observed by inverted microscope at predefined time points. The cell viability and proliferation were tested by trypan blue and LIVE/DEAD<sup>®</sup> Kit, respectively. And extracellular matrix formation was examined by toluidine blue staining. **Results** The cartilaginous phenotype of chondrocytes could only be maintained by passage 2 and 3 after monolayer culture. Three-dimensional culture could gradually regain and maintain the cartilaginous phenotype of de-differentiated chondrocytes (P4). Cells of P1-3 by monolayer culture could maintain 90% activity, which decreased from P4. The cytoactivity of cells by three-dimensional culture method was always above 90%. The total doubling rate till P6 by monolayer culture (28 days) was 44 times that by three-dimensional culture. The staining intensity of cartilaginous extracellular matrix was significantly decreased after P4 by monolayer culture ( $P < 0.05$ ). For three-dimensional method, the staining intensities of cartilaginous extracellular matrix at day 21 and 28 were significantly higher than that at day 7 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Monolayer culture allows proper proliferation of chondrocytes, and following three-dimensional culture in alginate beads can regain the cartilaginous phenotype of chondrocytes, thus achieving the aim of both amplification and maintenance of the cartilaginous phenotype.

**[Key words]** chondrocytes; cell culture techniques; phenotype; cell proliferation; alginate

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(9):970-974]

**[收稿日期]** 2010-04-23 **[接受日期]** 2010-06-29

**[基金项目]** 上海市卫生局青年科研项目基金 (2007Y19), 卫生部公益性卫生行业科研专项项目 (200802029), Supported by Youth Foundation of Shanghai Municipal Health Bureau (2007Y19) and Commonweal Health Project of Chinese Health Ministry (200802029).

**[作者简介]** 郭尚春, 助理研究员. E-mail: guo.shangchun@yahoo.com.cn

\* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-64369181, E-mail: zhangcq@shtel.net.cn

1965年Smith<sup>[1]</sup>应用消化法第一次使大规模的软骨细胞培养获得成功,1971年Green<sup>[2]</sup>创建两室消化法进一步提高了软骨细胞的成活率。在取得这些初步进展后,软骨细胞的研究一直未再能取得突破性进展;软骨细胞在保持软骨细胞表型的同时不能连续传代这个问题,至今未能解决<sup>[3]</sup>。使用常规的平面细胞培养技术,3代以内的软骨细胞能够保持正常软骨表型,6~9代的则几乎完全丧失殆尽<sup>[4]</sup>。经过近20年来的研究,科学家们已经确认在三维立体的条件下<sup>[5-6]</sup>,使用海藻酸钠水凝胶、琼脂糖、胶原、生物胶、透明质酸、高分子合成材料等非平面支架培养软骨细胞,能够较强地表达其特异性标志II型胶原酶和糖胺聚糖(GAG)。其中,海藻酸钠水凝胶包裹技术不仅能去分化的软骨细胞产生新分化的软骨特有表型<sup>[7]</sup>,而且能够使其稳定表达长达8个月<sup>[8]</sup>。鉴于平面细胞培养通过传代能够快速获取大量软骨细胞,藻酸钠凝胶三维培养能使失去软骨特异性表型的软骨细胞重新恢复并具有一定的增殖能力,本研究采用两步法培养软骨细胞,探索软骨细胞培养的理想方法。

## 1 材料和方法

1.1 材料 海藻酸钠 A2158(Sigma); II型胶原酶、胰蛋白酶、FBS和F12培养基干粉(Gibco); 锥虫蓝、氯化钙、甲苯胺蓝染色剂(Sigma); LIVE/DEAD<sup>®</sup> Kit for mammalian cells (L-3224, Invitrogen); DM4000B荧光生物显微镜、倒置相差显微镜及照相系统(Leica)。

1.2 软骨细胞的分离培养和扩增 取2~3周龄新西兰白兔,处死后无菌条件下切取双侧的肱骨头、股骨髁负重面全层关节软骨,PBS漂洗后,剪碎并加入0.1% II型胶原酶消化液,置于37℃条件下过夜消化。将软骨细胞悬液400×g离心10 min,加入适量的F12培养液。血细胞计数板计数后,锥虫蓝排斥染色法确定收获软骨细胞的生存比例。用含10% FBS的F12培养液调整细胞密度为(0.5~2)×10<sup>6</sup>/ml,接种于25 cm<sup>2</sup>细胞培养瓶,5% CO<sub>2</sub>、37℃培养箱培养。接种72 h后首次更换培养液,此后每3 d更换1次。当软骨细胞生长至约90%融合时,用含EDTA的0.125%胰蛋白酶消化传代培养。细胞以传代次数分组:第一代(passage 1, P1)组、P2组、P3组、P4组……,共9组。

1.3 软骨细胞的三维培养<sup>[8]</sup> 用1.5%海藻酸钠溶液将离心收获的P4软骨细胞稀释为(6~8)×10<sup>6</sup>/ml,通过21号针头将细胞悬液滴加入胶凝液中,即时形成的微球需在胶凝液中加强交联15 min。生理盐水洗3次后,按每瓶3.5×10<sup>6</sup>细胞转入细胞培养瓶,每3 d更换1次含10% FBS的F12培养液。三维培养后7、14、21、28 d取材观察检测。

1.4 单层培养软骨细胞的细胞活力和增殖率检测 将单个细胞悬液0.2 ml和0.3 ml的PBS、0.5 ml 0.4%的锥虫蓝溶液充分混匀,调整细胞密度约1×10<sup>6</sup>/ml,放置10 min。取细胞悬液20 μl,按照标准计数程序用细胞计数板计数染色细胞至少3次,每次计数细胞不少于500个。细胞生存率(%)=[(全部细胞数-染色细胞数)/全部细胞数]×100%。细胞增殖率=当日每毫升细胞悬液细胞数/每毫升原代细胞接种悬液细胞数。

1.5 三维培养软骨细胞的活力(Live/Dead staining)检测 将LIVE/DEAD<sup>®</sup> Kit试剂盒内的A成分——钙黄绿素乙酰甲酯(calcein-AM)稀释成2 μmol/L; B成分——溴乙吡啶二聚体(ethidium homodimer-1, EthD-1)稀释成4 μmol/L的混合染液。按照说明书配成工作液10 ml,置于-20℃备用,使用前室温融化。取新鲜的海藻酸钠细胞微球(n=5),切成1 mm左右的薄片。于暗室滴加染液,覆盖细胞凝胶薄片,常温下孵育5 min,生物荧光显微镜观察。

1.6 三维培养的软骨细胞增殖率检测 每个时间点取5个海藻酸钠细胞微球,分别用300 ml的0.05% Triton溶解,冻融3次使细胞裂解。按照标准程序用Hoechst33258荧光光谱检测法测量DNA含量。

1.7 组织学甲苯胺蓝特异性染色 将标本用4%多聚甲醛固定24 h,流水过夜冲洗,常规乙醇梯度脱水,透明,石蜡包埋切片,行甲苯胺蓝染色。以染色强度来表示细胞外基质含量。

1.8 统计学处理 计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计分析采用SPSS 12.0软件包,组间比较均采用单因素方差分析,检验水平( $\alpha$ )为0.05。

## 2 结果

2.1 两步法培养的软骨细胞形态学表现 单层培养的软骨细胞接种后12~24 h贴壁,24~36 h后细胞伸展。贴壁24 h后开始增殖,完全融合的原代软骨细胞呈现典型的铺路石样外观(图1A)。P3之后,软骨细胞的形态开始向梭形转化,胞质、胞核结

构的清晰程度、立体感逐渐下降(图1B)。P6之前的软骨细胞经过7~10 d的单层培养能够达到90%以上的融合,完全融合后的软骨仍能呈现典型的铺路石样外观。传至P6~P9,超过半数软骨细胞的形态逐渐呈梭形或成纤维细胞样,10~14 d能达到90%融合,融合后的软骨细胞已失去其典型的铺路石样外观,呈结节样细胞团。P9后,软骨细胞完全失去其本身所特有的圆形或椭圆形细胞学形态,转变为长梭形,传代后增殖缓慢,14 d后才能达到80%~90%融合,融合的细胞呈局部紧密堆积的细胞团。

包裹于海藻酸钠凝胶内三维培养的P4软骨细胞分布均匀,5 d后部分细胞出现分裂相,细胞增殖缓慢。7 d后相差显微镜下可见包裹软骨细胞的软骨囊状结构(图1C)。培养21 d后,有同源细胞群形成。28 d后,相差显微镜下可见部分软骨细胞呈丛状或团状生长,伴有黑色的死亡细胞(图1D)。

**2.2 两步法培养的细胞活力检测** 单层培养的软骨细胞P4前的活力都能够保持在90%左右,各代次细胞的活力检测值差异均没有统计学意义;三维培养的软骨细胞的生存率稳定,一直保持在90%,各时间点的细胞活力差异没有统计学意义(表1)。

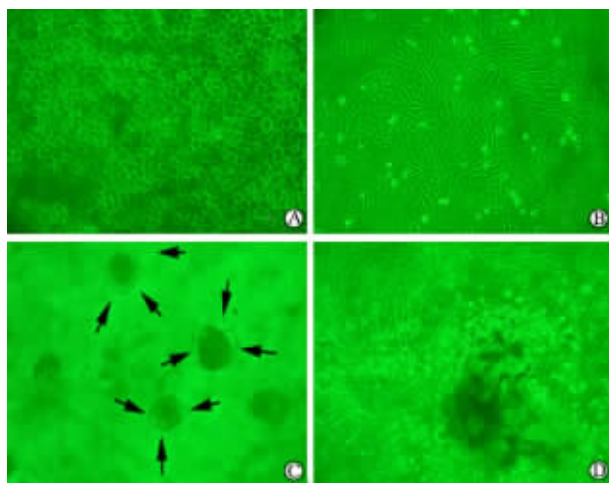


图1 倒置显微镜观察单层培养软骨细胞(A,B)形态和三维培养软骨细胞(C,D)

Fig 1 Chondrocyte cytomorphology during monolayer cell culture(A,B) and

three-dimensional cell culture(C,D) by inverted microscope

A: Typical cobblestone-like primary cultured chondrocyte; B: Polygonal or spindle chondrocytes during P4 monolayer culture; C: Cartilage capsule (arrows indicate) forming after 7 days; D: Some grew into clump or bunch, and some were apoptotic after 28 days. Original magnification:  $\times 100$ (A,B),  $\times 200$ (C),  $\times 40$ (D)

表1 两步法培养的软骨细胞的生物学特征

Tab 1 Biological characteristics of chondrocytes after two-step culture

(n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

Group	Cytomorphology	Cell viability(%)	Cell proliferation rate	Extracellular matrix
P1	Polygonal shape	93.62 $\pm$ 7.91	5.53 $\pm$ 3.65	3.27 $\pm$ 0.43*
P2	Polygonal shape	94.81 $\pm$ 5.91	15.86 $\pm$ 4.12	3.04 $\pm$ 0.38*
P3	Polygonal shape	92.64 $\pm$ 9.94	32.67 $\pm$ 3.28	2.72 $\pm$ 0.21*
P4	Short spindle shape	89.21 $\pm$ 8.81	88.62 $\pm$ 9.86	1.66 $\pm$ 0.12
7 d	Ball shape	92.36 $\pm$ 9.82	1.22 $\pm$ 0.23	2.02 $\pm$ 0.13
14 d	Ball shape	95.76 $\pm$ 8.85	1.68 $\pm$ 0.31	3.99 $\pm$ 0.15
21 d	Isogenous group	96.36 $\pm$ 8.23	1.92 $\pm$ 0.19	5.14 $\pm$ 0.16 $\Delta$
28 d	Clump or bunch	96.26 $\pm$ 9.96	2.45 $\pm$ 0.22	5.49 $\pm$ 0.21 $\Delta$

P: Passage; 7 d, 14 d, 21 d, 28 d; Culture time. \*  $P < 0.05$  vs P4 group;  $\Delta P < 0.05$  vs 7 d group

**2.3 两步法培养的软骨细胞的增殖率** 平面单层培养的软骨细胞经过22 d达到4次传代扩增,细胞总数达到了原代细胞数的(88.62 $\pm$ 9.86)倍。随着传代次数的增加,软骨细胞的生长规律也发生了变化。与原代和P1软骨细胞相比,P4软骨细胞的生长潜伏期已不明显,且倍增点和对数生长期提前。P6软骨细胞的增殖能力明显下降,对数生长期不明显。包裹于海藻酸钠凝胶内的软骨细胞增殖率不同于单层培养的软骨细胞,整个观察期内细胞增殖速率缓慢而平稳,细胞的倍增时间约为28 d,经过28 d的三维培养,细胞总数达到了接种时的(2.45 $\pm$

0.22)倍(表1)。单层培养6代软骨细胞(28 d)总的倍增率是同期三维培养的44倍。

**2.4 组织化学染色检测软骨细胞外基质结果** 单层培养的P3以前的完全融合软骨细胞甲苯胺兰染色强阳性,特异性出现在细胞的周围,而同期未达到完全融合的则染色阴性(图2,P1、P2、P3)。P4、P5完全融合的细胞弱阳性(图2,P4),P6以后的则为阴性(图2,P9)。统计学分析发现P1、P2、P3软骨细胞分泌的细胞外基质含量差异无统计学意义,而在P1、P2、P3软骨细胞分泌的细胞外基质含量与P4比较差异存在统计学意义( $P < 0.05$ ,表1)。

三维培养的 P4 软骨细胞具有甲苯胺蓝染色特异性。7 d 细胞膜上出现微弱的阳性染色(图 3A), 14 d 阳性染色开始出现在细胞膜外围(图 3B), 21 d 后阳性染色成絮团状以细胞为中心分布在细胞外围

(图 3C)。通过对染色强度的分析表明, 21 d、28 d 组的细胞外基质与 7 d 组之间差异存在统计学意义, 其他各组间差异无统计学意义( $P < 0.05$ , 表 1)。

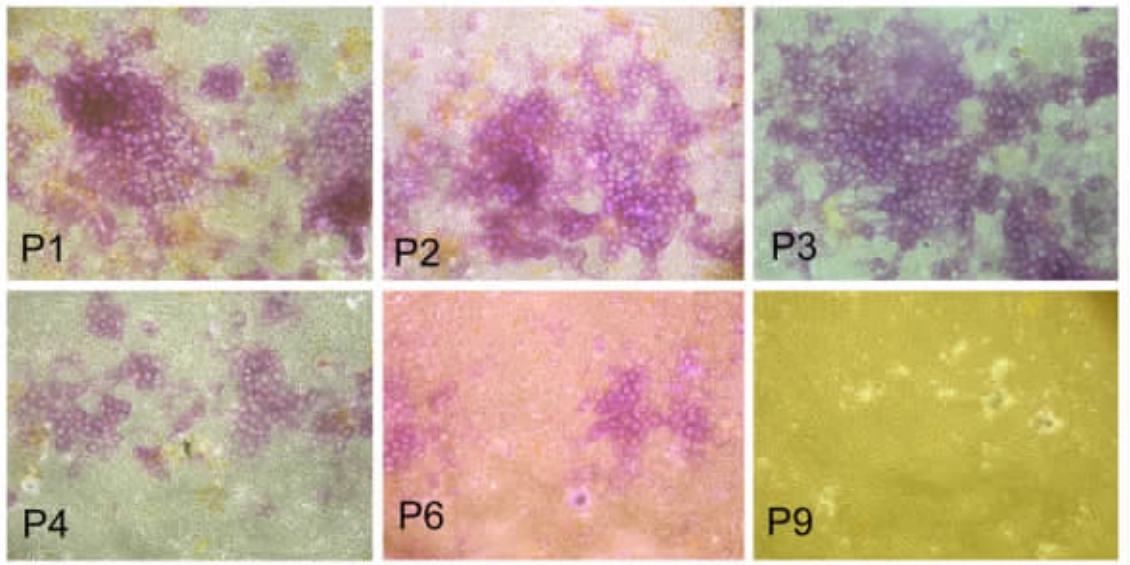


图 2 单层培养软骨细胞的甲苯胺蓝染色

Fig 2 Monolayer culture of chondrocytes observed by toluidine blue staining

P1, P2 and P3 were strongly positive, P4 was weakly positive, P6 was dim-positive, and P9 was negative. Original magnification:  $\times 100$

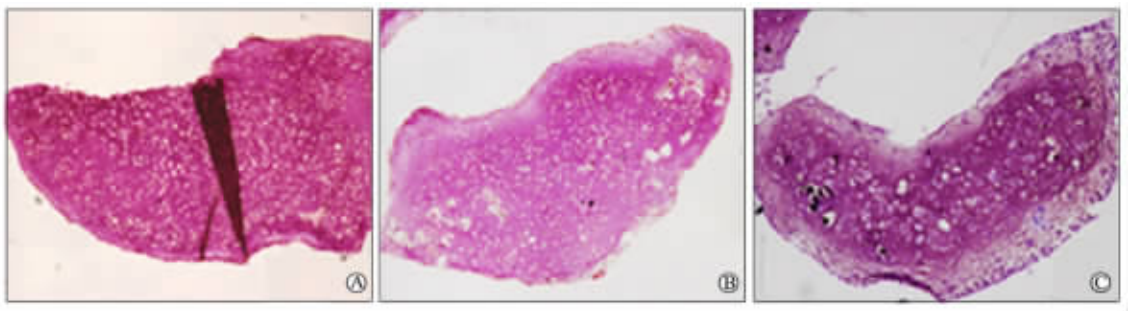


图 3 三维培养的软骨细胞甲苯胺蓝染色

Fig 3 Three-dimensional culture of chondrocyte observed by toluidine blue staining

A: 7 d; B: 14 d; C: 21 d. Original magnification:  $\times 100$

### 3 讨论

通过目前平面单层和立体 2 种细胞培养方法的对比研究, 我们可以看出这 2 种培养方式在软骨细胞的生长、增殖、细胞外基质的分泌等细胞生物学特性方面有着显著不同。

3.1 两步法培养的软骨细胞的形态结构 平面单层培养的软骨细胞传至 P4 后出现了去分化趋势, 当传代至 P8~P10 代时, 即便是处于细胞团中央部分的细胞仍表现为去分化的梭形。而包裹在海藻酸钠水凝胶中的软骨细胞始终保持着软骨细胞所特有的

球形特征, 而保持这种立体结构是软骨细胞正常分泌细胞外基质、维持其正常细胞表型的基本条件<sup>[5]</sup>。

3.2 两步法培养的软骨细胞的活力和增殖能力 平面单层培养软骨细胞增殖能力随着传代次数的增加而呈逐渐下降趋势, 两步法培养的软骨细胞始终都能够保持 90% 的细胞成活率, 单层培养 28 d 的总倍增率仍然是三维培养的 44 倍, 这是平面单层培养软骨细胞最大的优势所在。文献报道以海藻酸盐凝胶为支架, 以  $2 \times 10^6 / \text{ml}$  的密度培养牛软骨细胞, 57 d 后细胞增殖 2.2 倍<sup>[9]</sup>; 在单层培养条件下, 细胞

的增殖情况<sup>[10]</sup>都与我们的观察结果相似。

3.3 两步法培养的软骨细胞的功能状况 平面单层培养 P3 以内的软骨细胞融合时分泌的细胞外基质含量无显著性差异, P3 软骨细胞与 P4 之后存在显著性差别。但细胞增殖率却有着不同的表现, 传代对单层培养的软骨细胞增殖能力的影响主要表现在 P4 以后, P6 的增殖能力明显下降。三维培养能够使去分化的软骨细胞逐渐恢复其特有的分化表型<sup>[5,8]</sup>, 有利于细胞外基质特别是 II 型胶原酶的分泌、合成和沉积<sup>[11]</sup>。有报道经过海藻酸盐水凝胶三维培养 7 d 的软骨细胞启动了软骨特有表型基因<sup>[12]</sup>, 并逐渐开始分泌细胞外基质, 14 d 后新的完整软骨细胞表型便重新建立起来。海藻酸盐水凝胶还能够长时间地保持着软骨细胞不肥大<sup>[8,13]</sup>, 所以说海藻酸盐水凝胶立体静态培养方法培养软骨细胞的优点是能够稳定、持续地恢复软骨特有表型的表达。

软骨细胞两步培养法, 通过单层培养细胞快速增殖提供较大的细胞供应量, 通过三维培养能够使去分化的软骨细胞恢复并维持软骨特有的组织表型, 是一种较为理想的软骨细胞培养方法。

#### [参考文献]

[1] Smith A U. Survival of frozen chondrocytes isolated from cartilage of adult mammals[J]. *Nature*, 1965, 205:782-784.

[2] Green W T Jr. Behavior of articular chondrocytes in cell culture [J]. *Clin Orthop Relate Res*, 1971, 75:248-260.

[3] Liu G, Kawaguchi H, Ogasawara T, Asawa Y, Kishimoto J, Takahashi T, et al. Optimal combination of soluble factors for tissue engineering of permanent cartilage from cultured human chondrocytes[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282:20407-20415.

[4] Benya P D, Shaffer J D. Dedifferentiated chondrocytes re-express the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels[J]. *Cell*, 1982, 30:215-224.

[5] 宋 鸿, 张兰兰, 赵晓军. 藻酸盐凝胶三维培养条件下牛胰岛素-转铁蛋白-硒钠对兔关节软骨细胞表型的影响[J]. *解放军医学杂志*, 2009, 34:159-162.

[6] Lamre F, Steimberg N, Le Griel C, Demignot S, Adolpheet M. Dedifferentiated chondrocytes cultured in alginate beads: restoration of the differentiated phenotype and of the metabolic responses to interleukin-1 $\beta$  [J]. *J Cell Physiol*, 1998, 176:303-313.

[7] 何清义, 李 强, 罗 飞, 许建中. 三维立体培养法诱导去分化软骨细胞 II 型胶原的重新表达[J]. *中华实验外科杂志*, 2007, 24:307-309.

[8] Hüselmann H J, Fernandes R J, Mok S S, Schmid T M, Block J A, Aydelotte M B, et al. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads[J]. *J Cell Sci*, 1994, 107:17-27.

[9] 郭全义, 张 莉, 睦 翔, 袁 玫, 田 玥, 赵 斌, 等. 采用藻酸钙培养法在体外构建工程化关节软骨组织[J]. *中华实验外科杂志*, 2006, 23:877.

[10] Masuda K, Sah R L, Hejna M J, Thonar E J M A. A novel two-step method for the formation of tissue-engineered cartilage by mature bovine chondrocytes: the alginate-recovered-chondrocytes(ARC) method[J]. *J Orthop Res*, 2003, 21:139-148.

[11] 周国顺, 李雄峰, 管国华, 蒋雪生, 黄 胜, 陈成冬, 等. 兔软骨细胞的高密度培养及生物学特征[J]. *浙江医学*, 2008, 30:669-672.

[12] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, Jaiswal R K, Douglas R, Mosca J D, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999, 284:143-147.

[13] Stevens M, Qanadilo H, Langer R, Shastri V. A rapid-curing alginate gel system: utility in periosteum-derived cartilage tissue engineering[J]. *Biomaterials*, 2004, 25:887-894.

[本文编辑] 尹 茶