

改良贴壁组织块法与改良 I 型胶原酶消化对成骨细胞增殖效果的比较研究

倪 滔, 张文丽, 罗应伟
(昆明医科大学口腔医学院, 云南昆明 650031)

[摘要] **目的** 比较改良贴壁组织块法与改良 I 型胶原酶消化对 SD 大鼠颞下颌关节髁突软骨下骨成骨细胞的增殖效果. **方法** 取 10 只出生 1~3 d SD 大鼠颞下颌关节髁突软骨下骨, 将骨片平分 2 份, 分别采用改良贴壁组织块法和改良 I 型胶原酶消化法培养颞下颌关节髁突成骨细胞, 并标记为 I 组和 II 组, 通过细胞形态学观察、HE 染色、ALP 染色鉴定成骨细胞. 取第 4 代成骨细胞进行细胞计数、MTT 生长曲线及流式细胞仪周期分析, 比较 2 种原代培养方法对成骨细胞增殖能力的异同. **结果** (1) I 组和 II 组培养的细胞经鉴定均为成骨细胞; (2) II 组成骨细胞总量约为 I 组细胞总量的 1.5 倍; (3) II 组成骨细胞 MTT 生长曲线较 I 组细胞提前 2 d 进入对数生长期及达到生长高峰; (4) 2 组细胞在达到第 4 代时, 细胞周期含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$). **结论** 改良贴壁组织块法和改良 I 型胶原酶消化法均适用于颞下颌关节软骨下骨成骨细胞的培养, 但改良 I 型胶原酶消化法可以更快更有效地获得大量成骨细胞.

[关键词] 改良贴壁组织块法; 改良 I 型胶原酶消化法; 髁突; 成骨细胞; 增殖; 细胞周期

[中图分类号] R331 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2014) 06 - 0023 - 06

Comparison of Effects of Two kinds of Culture Methods on Proliferation of Osteoblast

NI Tao, ZHANG Wen-li, LUO Ying - wei

(School of Stomatology, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650031, China)

[Abstract] **Objective** To compare the effects of improved tissue explants adherent method and improved type-I collagen enzyme digestion method on proliferation of condylar subchondral bone osteoblasts of SD rat's Temporal mandibular joint (TMJ). **Methods** Ten neonatal (1-3 d) SD rats were executed and their TMJ condylar were fetched out. The bone fragments were equally divided into 2 parts and names group I and group II. Group I was cultured by tissue explants adherent method, and Group II by type-I collagen enzyme digestion method. The cell shape, HE staining, ALP staining were used to identify osteoblast. The cells counting, MTT growth curve and cell cycle analysis of the fourth generation of osteoblast were observed. **Results** (1) Identification: Group I and Group II had positive expression, the cells were osteoblasts. (2) Cell counting: Group II had about 1.5 times as many cells as comparing with group I. (3) MTT growth curve: The cells of Group II entered logarithmic phase and summit of growth in two days in advance comparing with group I. (4) Cell cycle analysis: There was no significant difference in 2 groups ($P > 0.05$). **Conclusion** Improved tissue explants adherent method and Type-I collagen enzyme digestion method are suitable for condylar subchondral bone osteoblasts culture of SD rat's TMJ, but improved type-I collagen enzyme digestion method can get more osteoblasts in short time and can provide more cells for laboratory investigation.

[Key words] Improved tissue explants adherent method; Improved type-I collagen enzyme digestion method; Temporal mandibular joint; Osteoblast; Proliferation; Cell cycle

[基金项目] 云南省应用基础研究基金资助项目 (2010ZC116); 昆明医科大学研究生创新基金资助项目 (2013N04)

[作者简介] 倪滔 (1988~), 女, 云南文山州人, 在读硕士研究生, 主要从事口腔基础医学研究工作.

[通讯作者] 罗应伟. E-mail: ywydy@sina.com

成骨细胞 (Osteoblast) 作为维持骨代谢平衡和骨损伤修复的关键细胞, 其能特异性分泌多种生物活性物质, 调节并影响骨的形成和重建过程. 随着骨代谢、骨骼疾病的深入研究, 成骨细胞的体外培养技术亦得到了广泛发展. 现今成骨细胞的原代取材方法主要包括改良贴壁组织块法和改良 I 型胶原酶消化法, 二者均能分离得到成骨细胞^[1].

然而关于 2 种方法在原代细胞培养方面的优劣, 国内外学者意见不一^[2,3], 为了进一步明确 2 种培养方法对成骨细胞培养能力的异同, 本实验拟通过对比观察改良贴壁组织块培养法和改良 I 型胶原酶消化法对成骨细胞培养中的增殖效果, 以期建立一种更简便、增殖更快、纯度更高的原代培养方法, 为骨组织成骨细胞的深入研究奠定基础.

1 材料与方法

1.1 主要试剂

DMEM-F12 培养基 (HyClone), 胎牛血清 (Solarbio)、青霉素-链霉素溶液 (100X) (碧云天生物技术研究所)、0.25% 胰蛋白酶 (Solarbio)、PBS 缓冲液 (吉诺生物医药技术有限公司)、I 型胶原酶 (Sigma 公司)、MTT (Sigma 公司)、二甲基亚砜 (DMSO) (Sigma 公司)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 试剂盒 (福州迈新生物技术开发有限公司).

1.2 实验动物

新生 1~3 d 的 SD 大鼠 10 只, 雌雄不限, 清洁级, 由昆明医科大学实验动物中心提供, 许可证号: SXCK (滇) 2005-0008.

1.3 主要设备和仪器

超净工作台 (AIRTECH)、二氧化碳恒温培养箱 (美国 Thermo 公司)、光学显微镜 (德国 Leica 公司)、倒置相差显微镜及显微拍摄系统 (德国 Leica 公司)、25 mL 培养瓶 (美国 Corning 公司)、酶标仪 (奥地利 ECAN 公司).

1.4 方法

1.4.1 取材 将新生 1~3 d 的 SD 大鼠置于 75% 乙醇中浸泡 3~5 min, 用无菌生理盐水和蒸馏水反复冲洗数次洗去乙醇, 于无菌操作台分离出颞下颌关节, 清除肌肉、骨膜及纤维结缔组织, 去除软骨层, 获取软骨下骨. 用 PBS 清洗 3 次后, 将软骨下骨剪碎成 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小的碎块, 再次 PBS 冲洗至骨块发白, 加适量双抗 10 min.

弃去液体, 将骨片置于消毒过滤纸上吸除表面水分, 置于天平上平均分为 2 份并标记为 I 组和 II 组.

1.4.2 改良贴壁组织块法 (I 组) 取 I 组骨片加入适量胰酶, 37 °C 下搅拌消化 15 min, 弃消化液, 完全培养基终止消化和反复吹打清洗后, 将组织块均匀铺在 25 mL 培养瓶底, 加入少量含 15% 的完全培养基, 倒置于 37 °C 含 5% CO₂ 的培养箱中培养, 4 h 后小心转正培养瓶, 并加入培养基 3~4 mL, 继续培养, 次日换液, 以后每 3 d 换液 1 次. 均待细胞生长至融合状态时传代, 每次传代严格采用差速贴壁法进行纯化, 并记录细胞生长时间及细胞计数, 取第 4 代成骨细胞用于实验检测并爬片固定.

1.4.3 改良 I 型胶原酶消化法 (II 组) 取 II 组骨片加入适量胰酶, 37 °C 下搅拌消化 15 min, 1 000 r/min 离心 5 min 后 PBS 冲洗, 再次离心, 弃消化液加入 0.1% I 型胶原酶 5 mL, 消化 90 min, 期间每 15 min 振荡 1 次, 加入完全培养基离心后加入适量含 15% 的完全培养基, 吹打骨块和消化下来的细胞团块, 使更多成骨细胞游离出来, 吹散细胞沉淀后, 将细胞转入 25 mL 培养瓶中. 次日换液, 以后每 3 d 换液 1 次. 均待细胞生长至融合状态时传代, 每次传代严格采用差速贴壁法进行纯化, 并记录细胞生长时间及细胞计数, 取第四代成骨细胞用于实验检测并爬片固定.

1.5 指标观察

1.5.1 倒置显微镜逐日观察 细胞原代培养及汇合后传代生长情况, 并拍照记录其形态特征.

1.5.2 HE 染色 经固定后的细胞爬片, 蒸馏水中浸湿, 放入苏木素中 10 min, 自来水冲洗数次, 用 0.5% 稀盐酸酒精处理 10 s, 自来水浸洗数次, 置于温水中数秒, 伊红染色 2~3 min, 95% 酒精 2 min, 依次使用酒精 I (70%)、酒精 II (80%)、酒精 III (95%) 各处理 2 min 进行梯度脱水, 最后用二甲苯 I、二甲苯 II 各处理 5 min 透明, 自然干燥, 封片.

1.5.3 碱性磷酸酶 (ALP) 染色 经固定后的细胞爬片, PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min, 甩干 PBS 液, 每张切片加 50 μL 曲拉通 X-100 液, 室温孵育 10 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min, 3% H₂O₂ 孵育 15 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 3 min, 按照免疫组化试剂盒染色步骤进行, 最后自来水冲洗、复染、脱水、透明、封片.

1.5.4 细胞计数 分别取 I、II 组适量细胞悬液, 置于计数板上计数. 每次分别重复计数 3 次. 公式为:

$$\text{细胞数 (个/mL)} = \frac{4 \text{ 个大格细胞数}}{4} \times 1000 \times \text{稀释倍数}$$

1.5.5 MTT 生长曲线绘制 取 I、II 组第 4 代对数生长期成骨细胞, 分别常规 PBS 冲洗, 胰酶消化后离心 1 000 r/min, 5 min, 培养基重悬接种到 96 孔板, 接种密度为 1×10^4 个/mL, 每孔 100 μ L, 3 d 换液 1 次. 从第 2 天开始, 连续 9 d 用 MTT 法测定光密度值, 即每天同一时间向每组 96 孔板中加入 0.5 mg/mL MTT 溶液 10 μ L, 37 $^{\circ}$ C 培养箱中继续培养 4 h, 吸弃孔内上清液后, 每孔加入 150 μ L 二甲亚砜 (DMSO), 将 96 孔板置于摇床上振荡 10 min, 然后用酶联免疫检测仪检测 490 nm 吸光度值并记录绘制生长曲线.

1.5.6 流式细胞周期测定 取 I、II 组第 4 代对数生长期成骨细胞, 分别常规 PBS 冲洗, 胰酶消化后离心 1 000 r/min, 5 min, 加入 4 $^{\circ}$ C PBS 2 mL 重悬细胞并再次离心 2 次, 弃上清液后缓慢加入 0.7 mL -20 $^{\circ}$ C 冷无水乙醇, 并充分混匀细胞, 静置固定 3 ~ 5 min 后加入 4 $^{\circ}$ C PBS 0.3 mL, 混匀后 4 $^{\circ}$ C 保存固定 30 min 以上, 离心弃固定液, 经 RNA 酶 (10 μ g/mL) 和 1% Triton X-100 处理 30 min 后, 碘化丙啶染色 (10 μ g/mL) 30 min, 以流式细胞仪检测细胞 DNA 含量和细胞周期.

1.6 统计学处理

应用 SPSS 统计软件进行统计分析, 图表均采用 Microsoft Excel 2003 制作, 计量资料首先进行正态性检验, 复合正态分布数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 2 组之间的比较采用 *t* 检验, 检验水准以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 形态学观察比较

2 组细胞形态无明显差别, 在贴壁时均较小, 呈

星形、三角形及短梭形, 胞核不明显, 随着细胞生长分化, 形态以多角形、长梭形为主, 胞核明显增大, 细胞表面有突触并相互之间连结 (图 1、图 2).

2.2 HE 染色

2 组细胞以多角形、立方形、长梭形为主, 多有突起, 胞核明显有 1 ~ 3 个, 胞核呈圆形或椭圆形, 居中或偏于一侧, 嗜碱性, 胞质清晰嗜酸性, HE 染色 2 组细胞形态无明显差异 (图 3).

2.3 ALP 染色

2 种方法培养的成骨细胞 ALP 免疫组化染色细胞膜及包浆内颗粒呈阳性反应, 胞质内见大量棕色颗粒, 2 组细胞阳性反应无明显差异 (图 4).

2.4 细胞计数

重复 3 次计数结果显示, I 型胶原酶消化法细胞生长数量较多, 平均为 8.37×10^5 , 组织法细胞生长数量较少, 平均为 5.53×10^5 , 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 其总量为贴壁法细胞总量的 1.5 倍左右 (表 1).

2.5 2 种培养方法成骨细胞的增殖曲线测定

用 MTT 法检测细胞增殖活力的生长曲线结果显示, 改良贴壁组织块法培养的成骨细胞在接种后 4 ~ 7 d 进入对数生长期, 第 8 d 达到峰值, 此后进入平台期及生长衰减期; 改良 I 型胶原酶消化法培养的成骨细胞在接种后 3 ~ 4 d 进入对数生长期, 第 5 天达到峰值, 此后进入平台期及生长衰减期 (图 5).

2.6 2 种培养方法成骨细胞的流式细胞周期测定

流式细胞仪检测 2 种培养法的成骨细胞生长周期, 其结果表明: 改良贴壁组织块法培养的第四代成骨细胞 G_0/G_1 期比例为 $(62.90 \pm 3.15)\%$, $G_2/S/M$ 期比例 $(37.10 \pm 3.15)\%$; 改良 I 型胶原酶消化所培养细胞 G_0/G_1 期比例 $(59.33 \pm 9.57)\%$, $G_2/S/M$ 期比例 $(40.67 \pm 9.57)\%$, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 6.



图 1 2 种培养方法原代培养 ($\times 40$)

Fig. 1 Two methods of primary culture ($\times 40$)

A: 改良贴壁组织块法; B: 改良 I 型胶原酶消化.



图 2 2 种培养方法第 4 代成骨细胞 ($\times 100$)

Fig. 2 The fourth generation of osteoblasts cultured by two methods ($\times 100$)

A:改良贴壁组织块法; B:改良 I 型胶原酶消化.



图 3 2 种培养方法第 4 代成骨细胞 HE 染色 ($\times 100$)

Fig. 3 The HE staining of the fourth generation of osteoblasts cultured by two methods ($\times 100$)

A:改良贴壁组织块法; B:改良 I 型胶原酶消化.

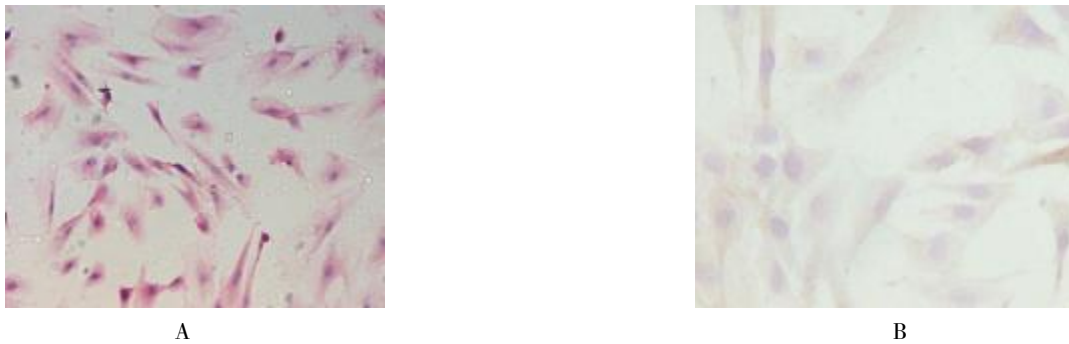


图 4 2 种培养方法第 4 代成骨细胞 ALP 染色 ($\times 100$)

Fig. 4 The ALP staining of the fourth generation of osteoblasts cultured by two methods ($\times 100$)

A:改良贴壁组织块法; B:改良 I 型胶原酶消化.

表 1 2 种方法培养成骨细胞计数结果比较 (个/mL)

Tab. 1 The cell counting of the osteoblasts cultured by two methods (个/mL)

组 别	第 1 次	第 2 次	第 3 次
组织法 (I 组)	5.20×10^5	5.9×10^5	5.50×10^5
酶消化 (II 组)	$7.90 \times 10^{5*}$	$8.8 \times 10^{5*}$	$8.40 \times 10^{5*}$

与 I 组比较, $*P < 0.05$.

义,说明当成骨细胞纯化至第 4 代时,2 种原代培养方法获得的同一类型细胞增殖活性相当。

对 2 种培养细胞进行细胞计数及 MTT 生长曲线绘制发现,改良 I 型胶原酶消化培养的成骨细胞数量较改良贴壁组织块法多,且细胞更快进入快速生长期及达到生长高峰。组织块贴壁法需要组织粘附后才能逐渐游离细胞,并且组织块一旦脱落则细胞爬出量变少,相互连结作用减弱,细胞生长相对缓慢;而用 I 型胶原酶处理组织块后即可见大量细胞游离出来,密度大的细胞量一方面贴壁多,另一方面细胞相互连结作用强,使其生长迅速。另外,骨组织中成骨细胞外富含 I 型胶原的基质,I 型胶原酶可通过整合素对成骨细胞发挥促分化和促细胞间的粘附作用^[9],调节细胞的代谢生长,加速骨组织中成骨细胞的游离生长,因此改良 I 型胶原酶消化在短期内获得更多的成骨细胞。

本研究的实验结果表明,改良贴壁组织块法及改良 I 型胶原酶消化均适用于颞下颌关节软骨下骨成骨细胞的培养,2 种方法获得的成骨细胞在稳定状态下可以表现出相似的增殖效果,但改良 I 型胶原酶消化具有方法快速简便、特异性高、细胞产出量高、细胞生长速度快等优点,在短期内可以更有效地提供更多的实验研究细胞。

[参考文献]

- [1] 王卫华. 成骨细胞体外培养方法研究进展[J]. 国外医学口腔医学分册,1996,23(9):287-291.
- [2] ORRISS I R,TAYLOR S E,AMETT T R. Rat osteoblast cultures[J]. *Methods Mol Biol*,2012,816(1):31-41.
- [3] ASTRID D ,BAKKER JENNEKE KLEIN-NULEND. Bone research protocols [J]. Amsterdam:Methods Mol Biol,2012,816:19-29.
- [4] 王双利,查振刚,刘宁,等. 改进酶消化法培养SD大鼠成骨细胞及其鉴定[J]. *实用医学杂志*,2008,24(6):915-918.
- [5] RI弗雷谢尼.动物细胞培养—基本技术指南[M]. 第5版. 北京:科学出版社,2008:241-243.
- [6] ISABEL R,ORRISS GILLIAN E,KNIGHT SAM RANASINGHE,et al. Osteoblast responses to nucleotides increase during differentiation [J]. *Bone*,2006,39(2):300-309.
- [7] R.I.弗雷谢尼.动物细胞培养—基本技术指南[M]. 第5版. 北京:科学出版社,2008:255-257.
- [8] KUMAR A,WEBSTER T J,BISWAS K,et al. Flow cytometry analysis of human fetal osteoblast fate processes on spark plasma sintered hydroxyapatite-titanium biocomposites[J]. *J Biomed Mater Res A*,2013,101(10):2925-2938.
- [9] HASEGAWA Y,SHIMADA K,SUZUKI N,et al. The in vitro osteogenic characteristics of primary osteoblastic cells from a rabbit alveolus [J]. *J Oral Sci*,2008,50(4):427-434.

(2014-03-14 收稿)

(上接第 8 页)

- European Journal of Medicinal Chemistry, 2011, 46: 1997-2002.
- [9] 邹澄,赵庆,郝小江,等. 丰产易得天然产物结构改造值得重视 [J]. *中国民族民间医药杂志*,2004,68(3):135-137.
 - [10] 魏均娴,陈业高,张红彬,等. 达玛烷型皂苷人参低元醇衍生物及制备方法[P].中国:ZL93.1.08189.0,1995.1.
 - [11] 张春桃,卢茂芳,刘恒言. DCC/DMAP催化制备乙酰阿魏酸苯丙醇酯[J]. *中国实用医药*,2010,5(23):37-38.
 - [12] 魏均娴,杜元冲. 三七—现代科学研究及应用[M]. 昆明:云南科技出版社,1996:58.

(2014-03-05 收稿)