

不同周龄大鼠软骨细胞活性对比

王玉文 徐丛*

承德医学院附属医院

DOI:10.12238/bmtr.v7i1.11793

[摘要] 背景: 关节疾病的发生与软骨细胞的活性变化密切相关。目的: 本研究旨在探寻不同周龄SD大鼠的细胞活力的差异。方法: 通过胰蛋白酶-II型胶原酶序贯法提取软骨细胞, 细胞划痕实验观测2、4、8周龄大鼠软骨细胞的迁移能力改变。结果: 对比来自较大周龄大鼠的软骨细胞, 小周龄者具有更好的生长速率以及迁移能力。结论: 2周龄的软骨细胞具有更好的细胞活性, 迁移能力, 能更便捷有效地为骨关节疾病基础研究提供更稳定的原代种子细胞。

[关键词] 软骨细胞; 活力; 不同周龄

中图分类号: Q2 文献标识码: A

Comparison of chondrocyte activity in rats of different week age

Yuwen Wang Cong Xu*

Unit: Affiliated Hospital of Chengde Medical University

[Abstract] BACKGROUND: The development of joint disease is closely related to changes in chondrocyte vitality. OBJECTIVE: The aim of this study was to investigate differences in cell vitality in SD rats of different weekly ages. METHODS: Chondrocytes were extracted by the sequential trypsin-II-collagenase method, and changes in the migratory ability of chondrocytes from 2-, 4- and 8-week-old rats were observed in the cell scratch assay. RESULTS: Compared with chondrocytes from older rats, chondrocytes from younger rats had better growth rates and migratory abilities. CONCLUSION: Chondrocytes from 2-week-old rats have better cell vitality and migration ability, which can provide more stable primary seed cells for basic research on osteoarthritic diseases more conveniently and effectively.

[Key words] chondrocyte; vitality; different ages

前言

在骨骼与关节疾病中, 软骨细胞扮演着重要的角色, 且是关节软骨的唯一细胞类型, 负责维持软骨的稳态和功能^[1]。软骨细胞能够合成并分泌包括胶原蛋白, 蛋白聚糖等细胞外基质成分, 并且能够通过分泌细胞因子和生长因子, 调节软骨细胞外基质的合成与降解的平衡, 这些功能对于维持软骨结构的稳定性和弹性以及关节内环境的健康至关重要^[2,3]。而关节软骨受损后, 由于关节内缺乏血管和神经的营养, 组织供养不足, 软骨细胞本身的增殖能力受到较大限制^[4]。

软骨细胞功能的失衡会导致多个骨骼疾病的发展, 尤其是在骨关节炎(Osteoarthritis, OA)疾病中, 软骨细胞的功能失调会导致基质再生与降解的失衡, 最终导致软骨的破坏, 而在骨质疏松和骨肿瘤等疾病中, 软骨细胞同样存在细胞功能的改变^[5,6]。因此, 靶向软骨细胞的治疗方法成为了关键, 也是药物研究的基础, 探索软骨细胞体外培养的研究, 获取不同状态供体下软骨细胞的活力, 为后续基础研究选取较合适的种子细胞就显得

更有意义。在此次实验中, 通过比较不同周龄的大鼠中获取的软骨细胞的增殖活力以及迁移能力和生长能力的不同, 以期软骨细胞组织工程的基础研究提供一个良好的种子细胞获取的实践基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

该项目实验动物由承德医学院附属医院中心实验室动物中心提供, 分别从2, 4, 8周龄的雄性SD大鼠中提取软骨细胞进行培养并按照周龄分组进行实验和观测。

1.1.2 主要试剂和仪器

DMEM低糖培养基(Gibco); 特级胎牛血清(Vivacell); 0.25% EDTA-胰蛋白酶(TBD); CCK-8试剂(SparkJed); 胶原酶II(Sigma); 15ml尖底离心管、50ml、尖底离心管、T₂₅细胞培养瓶(广州洁特); 酶标仪、倒置相差显微镜(Thermo); CO₂培养箱(中国白洋)。

1.2 方法

1.2.1 软骨细胞的提取、培养和传代

选取2, 4, 8周龄的雄性SD大鼠, 用异氟烷麻醉后脊髓离断处死。将处死的大鼠放入75%乙醇溶液中浸泡15分钟后取出, 在无菌环境下剪开并充分暴露膝关节, 用刀片分离膝关节处软骨并将软骨组织剪碎至1mmX1mm的小块, 之后无菌PBS冲洗3次; 将软骨组织转移至5倍体积的胰蛋白酶中消化30min, 离心后更换0.2%胶原酶II并放置于37℃无菌环境下进行消化6h。将消化离心之后的软骨细胞接种至T25培养瓶中, 放入37℃、5%CO2培养箱中进行培养。培养过程中, 根据细胞状态每隔2-3天更换1次培养基, 待细胞汇合度达到80%时进行细胞传代。

1.2.2 软骨细胞的形态学及生长速率观察

培养的原代软骨细胞及之后传代的细胞, 在倒置相差显微镜下观察各周龄组软骨细胞的形态和结构, 记录不同周龄组别中软骨细胞汇合度达到80%时所用的时间并记录。

1.2.3 不同周龄组别中软骨细胞迁移能力的差异比较

选取第二代生长状况良好的软骨细胞, 以 5×10^5 个/孔接种于六孔板中培养24h至细胞汇合度达到100%。取用200 μ l移液枪头制造细胞划痕, PBS清洗3次, 更换不含胎牛血清的培养基, 将划痕之后的各组细胞放置于显微镜下拍照, 记录0h, 随后将细胞放置于培养箱中继续培养24h。24h后再次拍照并记录24h, 以ImageJ软件分析不同周龄组别的软骨细胞的迁移能力, 比较其差异。

2 结果

2.1 不同周龄组别软骨细胞形态学观察及培养

原代软骨细胞接种于T25细胞培养瓶中, 细胞呈现圆形, 大小不一致, 均匀得悬浮于培养基中。因软骨细胞贴附速度较为缓慢, 于接种后12h逐渐贴壁, 24h后进行再次观察, 可见贴壁细胞呈现三角形、鱼眼状、梭形、多角形等形态, 细胞具有较好的折光性且有较好的通透性, 镜下可见细胞边缘具有较高的光泽度。待生长数日后观察可见大量软骨细胞成簇样或鱼群状排列生长, 包浆丰富饱满, 胞质内可见部分颗粒物质, 胞核清晰。选择同时期的三组大鼠软骨细胞, 可以明显发现2周龄的大鼠软骨细胞生长更快, 细胞量更多, 且形态更好。见图1。2, 4, 8周龄的大鼠原代软骨细胞分别在第6-8天, 10-12天, 13-16天细胞汇合度达到80%, 将三组进行对比, 差异具有统计学意义($P < 0.01$)。将细胞传至第二、三代时, 软骨细胞的生长速率相比较于原代细胞有了较为明显的提升, 细胞的形态与原代细胞大致相似, 细胞边缘依然有较高光泽度, 胞质胞核清晰。第三代时2, 4, 8周龄的大鼠软骨细胞分别在3-4天, 5-7天, 8-9天, 将三组进行比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图2。

2.2 不同周龄组别大鼠软骨细胞迁移能力比较。

将第二代生长良好的软骨细胞接种与6孔板后, 分别对2, 4, 8周龄的大鼠软骨细胞进行0h与24h的划痕拍照, 对比4周和8周龄的软骨细胞, 2周龄的软骨细胞具有更好的迁移能力, 其24h的平均迁移率达到67%, 而4周龄与8周龄的大鼠软骨细胞的

24h平均迁移率分别为41%和23%, 对三组进行统计学分析, 比较结果显示具有统计学意义($P < 0.01$)。见图3。

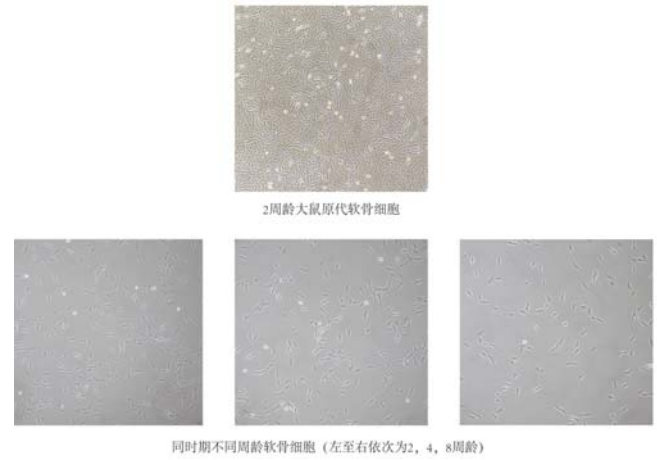


图1 大鼠原代软骨细胞(100x)(上1)与同时期2, 4, 8周龄大鼠软骨细胞(100x)(下3)

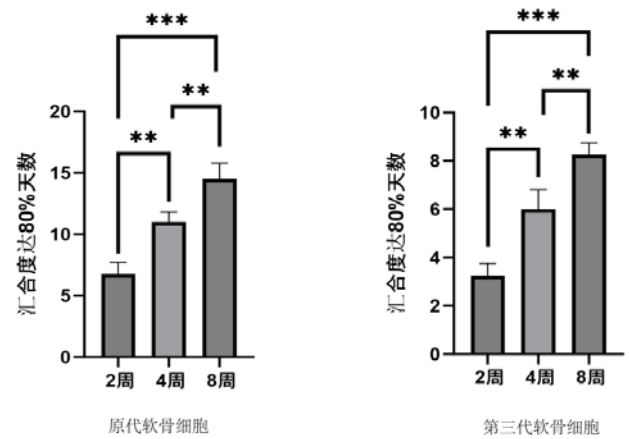


图2 2、4、8周龄大鼠软骨细胞汇合度达到80%生长速度比较

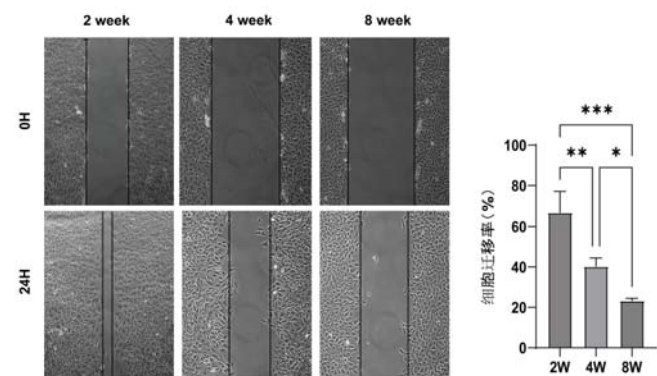


图3 三组不同周龄大鼠软骨细胞迁移能力对比

3 讨论

在骨关节疾病中, 软骨细胞的功能失调被认为是关键因素之一。软骨细胞是成熟软骨中唯一的细胞类型, 负责合成和维持细胞外基质的组成, 包括胶原和蛋白聚糖。软骨细胞本身的活性

直接关系到关节的功能与稳态,由于软骨组织周围神经和血管的缺乏,软骨组织的自我修复能力受到极大的限制,因而引起骨关节炎等多种关节疾病的发生^[7,8]。近来,有研究表明,软骨细胞的增殖能力会随着年龄的增长而降低,老年捐赠者的软骨细胞表现出减少的增殖能力和生产透明软骨的能力,且该增殖能力和迁移能力在不同年龄段的个体间差异显著,这就为开发针对骨关节炎的治疗策略提供了一个很好的方向^[9]。软骨细胞作为骨关节炎治疗的靶向细胞,相比较于动物模型所花费的成本过高,通过细胞层次的先期研究论证能为生物治疗研究,药物研究,材料工程研究提供一个很好的实验研究基础,在减少成本的同时获取初步的实践结果。因而,针对选取合适细胞活力的研究,对比探明不同周龄供体的软骨细胞活力,可为往后的软骨种子细胞的选取提供更优的选择。

本研究比较了不同周龄SD大鼠软骨细胞的活性以及迁移能力。通过提取并培养2、4和8周龄的大鼠软骨细胞,我们观察到不同周龄组别的细胞迁移能力和生长速率存在显著差异。具体来说,我们的结果显示,2周龄的大鼠软骨细胞表现出更为优越的生长速率和迁移能力,这为今后在软骨细胞组织工程研究中选择合适的种子细胞提供了较为肯定的基础数据。这些数据结果的发现可能与软骨细胞中生长因子以及细胞信号通路的活性变化相关。例如,早期阶段发育时,细胞通常会有较高水平生长因子的表达,如转化生长因子 β 以及表皮生长因子 α ,这些因子在促进细胞增殖和迁移能力方面起着至关重要的作用,而2周龄的软骨细胞中相应的生长因子可能表达较为活跃^[10]。此外,2周龄的软骨细胞可能具有更高的细胞外基质合成能力,进一步促进了软骨细胞的生长和分裂。因此,理解这些分子基质将为关节疾病的治疗提供新的见解以及为开发新的干预策略提供理论基础。

综上所述,本研究的结果表明,通过胰蛋白酶-II型胶原酶序贯法能够提取并培养软骨细胞,在相同的提取方法以及培养条件之下,2周龄SD大鼠的软骨细胞具备更高的细胞活性和迁移能力,且生长速率明显优于4周龄和8周龄大鼠的软骨细胞,能更快的为下一步的基础研究提供更优质的细胞来源。

[参考文献]

- [1]BoIducJA, Collins J A, Loeser R F. Reactive oxygen species, aging and articular cartilage homeostasis[J]. *Free Radical Biology & Medicine*,2019,132:73-82.
- [2]Gilbert S J, Bonnet C S, Blain E J. Mechanical cues: bidirectional reciprocity in the extracellular matrix drives

mechano-signalling in articular cartilage[J]. *International Journal of Molecular Sciences*,2021,22(24):13595.

[3]Akkiraju H, Nohe A. Role of chondrocytes in cartilage formation, progression of osteoarthritis and cartilage regeneration[J]. *Journal of Developmental Biology*, 2015, 3(4): 177-192.

[4]Chen H, Tan X-N, Hu S, et al. Molecular mechanisms of chondrocyte proliferation and differentiation[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*,2021,9:664168.

[5]Yin K,Zhang C,Deng Z,et al.FAPs orchestrate homeostasis of muscle physiology and pathophysiology[J]. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*,2024,38(24):e70234.

[6]Sun M M-G, Beier F. Chondrocyte hypertrophy in skeletal development, growth, and disease[J]. *Birth Defects Research.Part C, Embryo Today: Reviews*, 2014,102(1):74 - 82.

[7]Fernández-Pernas P, Barrachina L, Marquina M, 等. Mesenchymal stromal cells for articular cartilage repair: preclinical studies[J]. *European Cells & Materials*,2020,40:88-114.

[8]Herman K,Gobbi A.Evidence-based approach to orthobio logics for osteoarthritis and other joint disorders[J]. *Physi cal Medicine and Rehabilitation Clinics of North America*, 2023, 34(1):71-81.

[9]Shen H, He Y, Wang N, et al. Enhancing the potential of aged human articular chondrocytes for high-quality cartilage regeneration[J]. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2021,35(3):e21410.

[10]Praxenthaler H,Krämer E,Weisser M,et al.Extracellular matrix content and wnt/ β -catenin levels of cartilage determine the chondrocyte response to compressive load[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, 2018, 1864(3):851-859.

作者简介:

王玉文(1997--),男,汉族,四川江油人,硕士,研究方向:关节外科方向。

徐丛(1975--),男,汉族,河北承德人,硕士,教授,研究方向:运动医学方向。