

大鼠膝骨关节炎滑膜细胞原代培养*

袁 琴¹ 阚卫兵^{1△} 宋朋飞¹ 张 隆¹ 王拥军²

(1.上海中医药大学附属普陀医院伤骨科 上海 20006 ;上海中医药大学脊柱病研究所 上海 200032)

摘要 目的 :建立原代培养膝骨关节炎大鼠滑膜细胞的方法。方法 :取膝骨关节炎大鼠膝关节滑膜组织 ,用酶消化法消化、分离细胞 ,用 DMEM 培养液进行培养并传代 ,观察滑膜细胞生长状况、并用细胞形态学及细胞免疫化学鉴定。结果 :用酶消化法培养膝骨关节炎滑膜细胞 ,方法简单、成功率高、细胞形态典型。结论 :单一的胶原酶消化法是一种有效的滑膜细胞原代培养的方法 ,可以满足一般实验需求。

关键词 滑膜细胞 ;体外培养 膝骨关节炎

中图分类号 :Q95-3 R68 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2012)02-253-03

Primary Culture of Rats Synoviocytes with Knee of Osteoarthritis*

YUAN Qin¹, KAN Wei-bing^{1△}, ZHANG Long¹, SONG Peng-fei¹, WANG Yong-jun²

(1 Department of orthopedic injuries, Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine,200062 ,Shangshai, China;

2 Institute of Spine Disease ,Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 200032, Shangshai, China)

ABSTRACT Objective: To develop a digestive method to obtain rats synoviocytes with knee of Osteoarthritis. Methods: Rats of OA joint synovial layers were cut into small pieces and digested with collagenase. Cell suspension was cultured in DMEM containing 20% fatal bovine serum. Cells were identified by morphology and immunochemistry analysis. Results: The appearance of synoviocytes is typical and the method is simple. Conclusions: Single collagenase digestion is effective for isolation of synoviocytes, and can satisfy the general test requirements.

Key words: Synoviocytes ;Culture in vitro ;Knee Osteoarthritis

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R68 Document code: A

Article ID:1673-6273(2012)02-253-03

前言

滑膜组织是位于关节腔内面的内衬结构 ,各种关节内疾病均会累及滑膜。而滑膜细胞是维持关节正常功能的重要组织结构 ,同时在各种关节疾患中也是主要病变部位。骨关节炎(OA)以关节软骨退行性变为特征 ,其病理改变累及关节的各个组成部分 ,但绝不仅局限于软骨 ,还包括软骨下骨、滑膜、半月板和韧带。各组成部分的病理改变相互影响 ,相互作用 ,共同加速关节的退变^[1]。近几年来随着对 OA 的深入研究 ,发现 OA 不仅仅是关节软骨的病变 ,滑膜也参与了 OA 的整个病变过程。体外滑膜细胞培养可以有效地模拟体内细胞的生长环境 ,并能确切地了解单一或多元因素对滑膜细胞的影响 ,其方法已为一种基础研究手段。因此滑膜细胞的体外培养是研究其正常形态结构和功能 ,及其在相应关节病中的作用和影响的前提和基础。原代细胞培养主要有机械分散法、组织块培养法和酶消化法。本实验在学习、总结前人经验的基础上 ,采用单独酶消化法培养大鼠膝骨关节炎滑膜细胞。

1 材料与方法

1.1 材料

- 1.1.1 动物 清洁级 wistar 大鼠 ,体重 140-150g ,由上海医药工业研究院动物中心提供。
- 1.1.2 主要设备 超净工作台 ,上海博迅 ;CO₂ 培养箱 ,美国 Nu-aire 公司生产 ;酶标仪 ,Sunrise A-5082 型 ,产自澳大利亚 TECAN 公司 ;台式自动平衡离心机 ,长沙平凡仪表有限公司 ;倒置相差显微镜 ,德国 LEICA 公司生产。
- 1.1.3 主要器械 眼科剪、眼科镊、培养瓶、培养皿、离心管、手术剪、止血钳、咬骨钳、弹簧刀、5ml 注射器。
- 1.1.4 主要试剂 DMEM 培养基(Invitrogen Corporation)、青霉素及庆大霉素(华北制药)、L- 谷氨酰胺(进口分装 BR)、EDTA- 胰酶消化液、胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司)、 型胶原酶(Sigma)。
- 1.2 方法
- 1.2.1 大鼠膝骨关节炎模型 采用改良 Hulth 模型 ,此为经典手术造模方式 ,具体步骤为 :将动物麻醉后仰卧于手术台上 ,无菌条件下取膝关节内侧纵切口长约 2cm ,显露膝关节 ,然后切断前后交叉韧带及内侧副韧带 ,保留关节软骨面。术后不固定伤肢 ,自由活动。术后给予抗生素腹腔注射一周 ,预防感染。
- 1.2.2 大鼠滑膜组织的取材 大鼠脱臼处死 ,置于 75%酒精浸泡 2 min ,膝关节局部酒精消毒于膝关节正中纵行切开皮肤 ,分

* 基金项目 :上海市教委课题资助(08cz041) ;上海市教委高校创新团队课题资助[沪教委科(2009)6 号] ;

上海普陀区科委卫生系统自主创新基金资助

作者简介 :袁琴(1984-) ,女 ,硕士研究生 ,本科 ,研究方向 :中医药治疗膝骨关节炎的基础研究

△通讯作者 :阚卫兵 副主任医师 ,博士研究生 ,研究方向 :中医药治疗膝骨关节炎的基础研究

(收稿日期 :2011-06-09 接受日期 :2011-07-03)

离肌肉,露出膝盖骨,继续向下分离,可见平滑光亮的滑膜组织,用手术剪分离关节囊的滑膜层和纤维层,然后取出滑膜层组织。用同法采集另一侧膝关节滑膜层组织。将获取的滑膜组织放于装有含双抗的生理盐水中。

1.2.3 胶原酶消化法培养滑膜细胞 ①将分离的滑膜组织用含双抗的 PBS 液浸泡 5 min 后,再用 PBS 液漂洗 3 次放入培养皿中 ②用眼科剪剪碎滑膜组织成 1mm×1mm 的小块,送入培养瓶中,然后加入含 10%胎牛血清的 型胶原酶约 6ml(胶原酶浓度为 4 mg / ml)进行消化,瓶口拧紧放入培养箱中。消化过程中每隔 1 h 振摇一次培养瓶;③待消化 3h 后,取出培养瓶,吹打混匀细胞悬液,将其转入离心管中,1000rpm 离心 10min,弃部分含有脂肪细胞上清液约 1-2 ml,再加入 2ml DMEM 培养液混匀后,200 目筛网过滤,将过滤液转至离心管 1200rpm 离心 10min ④弃上清液,加 DMEM 培养液 4ml 吹打混匀细胞沉淀,然后转入干净的培养瓶中,另加 1ml 胎牛血清(20% 终浓度),置于培养箱中培养。次日去掉未贴壁的细胞。2-3d 更换 1 次培养液,倒置显微镜下观察细胞生长状况。

1.2.4 滑膜细胞免疫化学鉴定 把细胞固定后滴加在载玻片上,用免疫染色洗涤液(P0106)洗涤两次,每次 5 分钟,加入免疫染色封闭液(P0102),封闭 60 分钟,加入稀释好的一抗,室温或 4℃在侧摆摇床上缓慢摇动孵育一小时,洗涤后加入稀释好的二抗,再加入洗涤液,洗涤 5 分钟,共洗涤 3 次,然后荧光显微镜下观察。

2 结果

从 OA 滑膜组织分离得到的滑膜细胞在培养箱中培养 48h 后,可见少量细胞呈梭形生长(图 1)。之后逐渐增多并铺满瓶底,6 天左右可以传代。传代细胞再培养 4 天左右可以再次传代。滑膜细胞贴壁初期呈网状分布生长,以后随细胞数量的增长逐渐紊乱无明显方向性排列特征,细胞形态以梭形为主,两极胞突细长,末端多与邻近细胞连接并交织呈网,网间散布有较多。倒置显微镜下观察,认为本实验的滑膜细胞为成纤维样滑膜细胞。免疫荧光学鉴定滑膜细胞胞浆中 vimentin 呈阳性表达(见图 2)。

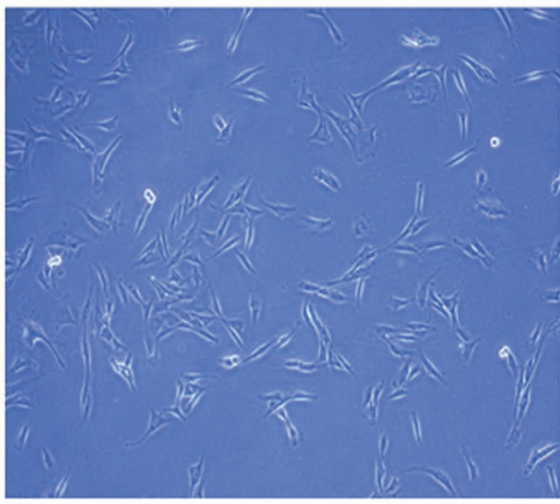


图 1 OA 滑膜细胞原代培养 48 小时后生长状态

Fig.1 Primary OA synoviocytes culture, the growth state after 48 hours

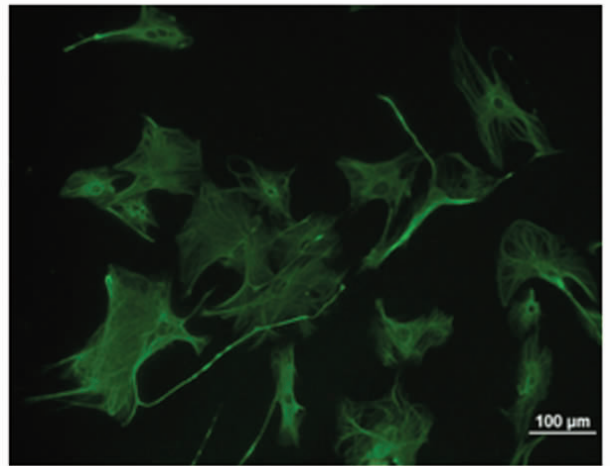


图 2 OA 滑膜细胞胞浆中 vimentin 表达情况 t

Fig.2 The expression of vimentin in OA synoviocytes cytoplasm

3 讨论

滑膜细胞是构成滑膜层的最大细胞群体,是维持关节正常功能的重要组织结构,它包埋在颗粒状无定性的基质中,基质内有分散的纤维分布。滑膜由 A 型(巨噬样滑膜细胞)、B 型(成纤维样滑膜细胞)以及 C 型(树突细胞样滑膜细胞)细胞组成^[2]。骨关节炎的主要病变是关节软骨退变与破坏,然而,对于骨关节炎的结构及症状进展而言,继发于软骨病变后的滑膜炎也是至关重要的,而且在膝关节炎全膝关节成型术患者中,滑膜炎严重程度与现行功能障碍及残疾程度密切相关^[3]。在 OA 的早期,滑膜的增生和纤维化,分泌炎症介质和软骨降解酶,可能是 OA 发病的重要因素,随着 OA 的进一步发展,滑膜始终参与其病理过程^[4]。Hayashi D 等研究表明,现代成像技术已经证明滑膜炎病理改变在骨关节炎早期和晚期很普遍,滑膜炎逐渐被公认为是骨关节炎病理生理学的重要特征^[5]。滑膜成纤维细胞是滑膜组织最活跃的组成细胞,它可通过自分泌或旁分泌方式产生大量的炎症细胞因子及免疫反应介质,加速软骨基质的降解,是引起各种临床症状的主要因素^[6]。OA 关节滑膜中滑膜下层成纤维细胞增殖,尤其是包绕血管的纤维增生,从而造成滑膜的血管通透性下降,阻碍滑液与血浆正常的交换,使关节内滑液成分不能得到血液中氧和营养物质。关节内软骨细胞缺乏营养而功能萎缩,合成基质能力下降,对力的缓冲能力继续下降,软骨细胞生存的微环境进一步恶化^[7]。发生于骨关节炎早期及晚期的滑膜炎与邻近软骨改变有相关性,这与类风湿性关节炎中观察到的结果相一致,滑膜炎所产生的代谢物及促炎介质(如:细胞因子类、NO、PE(2)、神经肽类等)可以改变软骨基质降解与修复平衡,进而产生过量的蛋白水解酶,最终导致软骨破坏,软骨的改变反过来又可以使滑膜炎扩大化,引起恶性循环^[8]。

近年来已有不少关于骨关节炎滑膜的研究,Blom AB 等证实,在实验性小鼠骨关节炎中,Wnt-induced signaling protein 1 (WISP-1)在滑膜及软骨中表达显著上升,在人类骨关节炎中亦如此^[9]。Wu H 等研究表明,在 OA 病程进展中,MMP-1 在其滑膜及软骨中的表达稳定上升,但是在 OA 早期阶段,MMP-1 在软骨中上升是先于滑膜的,表明 OA 病理发生是始于软骨的,

但滑膜炎也参与了软骨降解过程,尤其是在 OA 中后期^[10]。吕大鹏^[11]等采用 SABC 免疫组织化学染色法分别对检测正常膝关节滑膜与重度骨性关节炎患者膝关节滑膜中 MMP-7 的表达,证明 MMP-7 在骨性关节炎患者滑膜中高表达。阚卫兵^[12]等运用基因芯片技术在家兔膝关节骨性关节炎滑膜组织中发现 MMP-7 的表达比正常家兔高。因此, MMP-7 在 OA 滑膜的退变的病理过程中起着一定的作用。总而言之,滑膜在骨关节炎中的作用日益凸显出来,滑膜的研究成为现今骨关节炎研究的热点之一。

因此,体外滑膜细胞的培养为研究关节疾病的发病机制、病理变化以及药物治疗提供一个实验平台。自 1933 年 Vaube 首次培养出滑膜细胞,国内外学者对此进行了广泛的探索^[13]。目前滑膜细胞原代培养方法最常用的有酶消化法和组织块培养法,两者各有利弊,组织块培养法可直接获取成纤维样滑膜细胞(不含有巨噬细胞样滑膜细胞),但是组织块种植困难,贴附不牢,易脱落,培养周期长,需 2~3 周,消化时间不易控制,如消化酶浓度过大或时间过长,细胞膜受损导致细胞死亡,细菌易污染,成功率下降。酶消化法属于化学法,操作简单,细胞成活率较高。不足是需要的胶原酶较昂贵,且消化酶的种类浓度不同,不好控制,浓度大,时间长,细胞膜受损,浓度小、时间短则不易产生细胞,短时间内难以达到实验所需数量,过筛网时堵塞网孔,培养比较困难。也有研究者采用酶消化与胰蛋白酶联合消化法来培养滑膜细胞。顿耀艳等取大鼠关节滑膜组织,采用酶消化法成功分离出大鼠滑膜细胞,其细胞形态典型,证明了单一的胶原酶消化法是一种有效的滑膜细胞原代培养的方法^[14]。张晓明等采用组织块培养法成功培养出佐剂性关节炎(AA)大鼠滑膜细胞,且滑膜细胞符合成纤维细胞的形态特征,呈长梭行极性生长,可作为进一步实验研究的靶细胞^[15]。陈相等取人滑膜组织采用机械分离、复合酶消化后再将组织块塑料孔板倒贴法,差速贴壁法纯化后,成功分离了人滑膜细胞,为进一步研究提供良好的实验模型^[16]。细胞符合本实验采用型胶原酶消化法,成功培养了 OA 大鼠膝关节滑膜细胞,简单易操作且实验成本较低。以下是笔者在本实验过程中总结的些许经验:(1)取材必须保证无菌操作,取材后应立即进行分离消化;(2)滑膜组织需仔细修剪,以剔除滑膜下层组织,且剪碎成 1mm×1mm 的小块利于组织消化;(3)为保证消化充分,在消化过程中需不间断敲打组织碎片;(3)用于实验的细胞以原代或 2-3 代为好,传代超过 3 次后会出现细胞老化现象,4-5 代细胞增殖活性显著下降;(4)细胞培养关键之一就是控制污染,特别是取材时尤其应该保证无菌,所有接触细胞的试管、培养器皿均应保证无菌,所有液体试剂均应高压消毒,过滤除菌为宜;(5)细胞营养是为了使滑膜细胞更好地生长,但必须控制在合理范围内。原代培养时加入 20%胎牛血清,传代后调整为 10%,排除过多的血清对细胞生长的干扰抑制作用,Hou 等认为用 10%人 AB 型血清的 DMEM 培养效果最好^[17]。(6)组织消化后,细胞过滤会堵塞网孔,因此应多备用几个滤网,而且需仔细清洗过滤网;(8)型胶原酶成功消化滑膜组织,但是酶对细胞有一定的毒性作用,关键在于胶原酶的浓度与作用时间的掌握;(9)在细胞实验时,保证有足够的细胞数量一次性完成实验指标的检测,能有效的消除由于多次取材的细胞性能可能有差

异而带来的批间误差,真实的反映结果。

胶原酶消化法是一种相对简单、易行、容易掌握的滑膜细胞获得方法,可以满足一般的实验需求,但是其操作步骤相对较多,对一个初次培养的技术人员来讲,操作过程中的细致、规范性以及熟练程度尤为重要,希望我们的一点经验可以为相同研究领域的同道提供一点可以借鉴的经验,为膝骨关节炎的基础研究有所帮助。

参考文献(References)

- [1] Abramson SB, Attur M, Yazici Y. Prospects for disease modification in osteoarthritis[J]. Nat Clin Pract Rheumatol, 2006, 2(6):304-312
- [2] 蒋明,朱立平,林孝义.风湿病学[M].北京:科学出版社,1995:774-775
- [3] Jiang Mingm Zhu Li-Ping, Lin Xiao-Yi. Rheumatology [M]. Beijing, Science Press, 1995:774-775
- [3] Liu L, Ishijima M, Futami I, et al. Correlation between synovitis detected on enhanced-magnetic resonance imaging and a histological analysis with a patient-oriented outcome measure for Japanese patients with end-stage knee osteoarthritis receiving joint replacement surgery[J]. Clin Rheumatol, 2010, 29(10):1185-1190
- [4] 汤继文,刘新宇.骨关节病的诊治[J].山东医药,2000,40(15):43-44
- [4] Tang Ji-Wen, Liu Xin-Yu. Diagnosis and treatment of osteoarthritis [J]. Shandong medicine, 2000, 40 (15):43-44
- [5] Hayashi D, Roemer FW, Katur A, et al. Imaging of Synovitis in Osteoarthritis: Current Status and Outlook [J]. Semin Arthritis Rheum, 2011 Feb 2. [Epub ahead of print]
- [6] 杜国辉,贺艳丽,陈建英等.骨关节炎早期诊断的生化指标[J].中国生化药物杂志,2009,30(3):209-211
- [6] Du Guo-Hui, He Yan-Li, Chen Jian-Ying, et al. Early diagnosis of biochemical indicators in osteoarthritis[J]. Chinese Journal of biochemical drugs, 2009, 30 (3):209-211
- [7] 王鑫,史晨辉,赵瑾等.骨关节炎滑膜组织中 uPA、uPAR、PAI-1 mRNA 及蛋白的表达及其临床意义 [J]. 临床骨科杂志,2009,12(2):217-221
- [7] Wang Xin, Shi Chen-Hui, Zhao Jin, et al. uPA, uPAR, PAI-1 mRNA and protein expression and clinical significance in synovial tissue of Osteoarthritis[J]. Clinical Orthopaedics, 2009, 12 (2):217-221
- [8] Sellam J, Berenbaum F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis [J]. Nat Rev Rheumatol, 2010, 6(11):625-635
- [9] Brockbank SM, Van Lent PL. Nvolvement of the Wnt signaling pathway in experimental and human osteoarthritis: prominent role of Wnt-induced signaling protein 1 [J]. Arthritis Rheum, 2009, 60(2):501-512
- [10] Wu H, Du J, Zheng Q. Expression of MMP-1 in cartilage and synovium of experimentally induced rabbit ACLT traumatic osteoarthritis: immunohistochemical study[J]. Rheumatol int, 2008, 29(1):21-26
- [11] 吕大鹏,白伦浩,孔冉冉等.MMP-7、MMP-9 及其抑制剂 TIMP-3 在骨性关节炎患者膝关节滑膜中的表达和意义[J].中国医科大学学报,2009,38(4):284-285
- [11] Lv Da-Peng, Bai Lun-Hao, Kong Ran-Ran, et al. Expression and significance of MMP-7, MMP-9 and its inhibitor TIMP-3 in patients with knee osteoarthritis synovial[J]. China Medical University, 2009, 38 (4):284-285

(下转第 290 页)

参考文献(References)

- [1] Cihier WB, et al. A randomized trial of the effect of early cardiac serum marker availability on reperfusion therapy in patients with AMI [J]. JACC, 2000, 36: 1500-1506
- [2] Eills QS, et al. Death following creatine kinase-MB elevation after coronary intervention [J]. Circulation, 2002; 106: 1205-1210
- [3] Yan AT, et al. Troponin is more useful than creatine kinase in predicting 1-year mortality among ACS Pts [J]. Eur Heart J, 2004, 25: 2006-2012
- [4] Abbo KM, Dooris M, Glazier S, et al. Features and outcome of no-reflow after percutaneous coronary intervention [J]. Am J Cardiol, 1995, 75: 778-782
- [5] Topol EJ, Yadav JS. Recognition of the importance of embolization in atherosclerotic vascular disease [J]. Circulation 2000; 101: 570-580
- [6] Piana RN, Paik GY, Moscucci M, et al. Incidence and treatment of no-reflow after percutaneous coronary intervention [J]. Circulation, 1994, 89: 2514-2518
- [7] Ambrosio G, Weisman HF, Mannisi JA, et al. Progressive impairment of regional myocardial perfusion after initial restoration of postischemic blood flow [J]. Circulation, 1989, 80: 1846-1861
- [8] Przyklenk K, Bauer B, Klöner RA. Reperfusion of hibernating myocardium: contractile function, high-energy phosphate content, and myocyte injury after 3 hours of sublethal ischemia and 3 hours of reperfusion in the canine model [J]. Am Heart J, 1992, 123: 575-588
- [9] Giugliano GR, Kuntz Richard, Popma JJ, et al. Determinants of 30-day adverse events following saphenous vein graft intervention with and without a distal occlusion embolic protection device [J]. Am J Cardiol, 2005, 95: 173-177
- [10] Orrego PS, Delgado A, Piccalo G, et al. Distal protection in native coronary arteries during primary angioplasty in acute myocardial infarction: single-center experience [J]. Catheter Cardiovasc Interv, 2003, 60: 152-158
- [11] Li SS, Lam CW, So YC, et al. The use of a distal occlusion balloon protection device in acute coronary syndrome [J]. Int Cardiol, 2003, 92: 281-284
- [12] Cihier WB, et al. A randomized trial of the effect of early cardiac serum marker availability on reperfusion therapy in patients with AMI [J]. JACC, 2000, 36: 1500-1506
- [13] Eills QS, et al. Death following creatine kinase-MB elevation after coronary intervention [J]. Circulation, 2002, 106: 1205-1210
- [14] Pruiier F, Nguyen HCP, Boulet S, et al. Coronary blood flow assessment after successful angioplasty for AMI [J]. Circulation, 2004, 110: 3527-3533
- [15] Muller M, Bardorff S, Lehrke N, et al. Predictive of admission CTNI in AMI [J]. Circulation, 2001, 104: 630-635
- (上接第 255 页)
- [12] 阚卫兵, 袁琴, 宋鹏飞. 自拟补肾活血方对家兔膝关节骨性关节炎模型滑膜组织 MMPs 的影响 [J]. 广西中医药, 2011, 2(34): 57-59
Kan Wei-Bing, Yuan Qin, Song Peng-Fei. Effects of Self-side Bushenhuoxue to MMPs in synovial tissue of rabbit knee osteoarthritis model [J]. Guangxi Traditional Chinese Medicine, 2011, 2(34): 57-59
- [13] Vaubel E. The form and function of synovial cells in tissue cultures: morphology of the cells under varying conditions [J]. J Exp Med, 1933, 58(1): 63-83
- [14] 顿耀艳, 袁丁, 张长城. 大鼠滑膜细胞原代培养的研究 [J]. 实用医学进修杂志, 2007, 35(2): 126-128
Dun Yao-Yan, Yuan Ding, Zhang Chang-Cheng. Study on primary Culture of Rats Synoviocytes [J]. Journal of Practical Medical Education, 2007, 35(2): 126-128
- [15] 张晓明, 陈飞虎, 黄学应等. 佐剂性关节炎大鼠成纤维样滑膜细胞的体外培养与鉴定 [J]. 解剖学杂志, 2007, 30(6): 770-773
Zhang Xiao-Ming, Chen Fei-Hu, Huang Xue-Ying, et al. Culture in vitro and identification of fibroblast-like synovial cells in rat adjuvant arthritis [J]. Anatomy, 2007, 30(6): 770-773
- [16] 陈相, 孙晋民, 李继光等. 滑膜细胞原代体外培养体系的建立 [J]. 医学理论与实践, 2009, 22(9): 1027-1029
Chen Xiang, Sun Jin-Min, Li Ji-Guang, et al. System Construction of Human Primary Synovial Cell in Vitro [J]. Medical theory and practice, 2009, 22(9): 1027-1029
- [17] Hou FF, Boyce J, Zhang Y, et al. Phenotypic and functional characteristics of macrophage-like cells differentiated in pro-inflammatory cytokine-containing cultures [J]. Immunol Cell Biol, 2000, 78(3): 205-213