

组织块法培养成年兔肌腱细胞*☆

杨光¹, 姜涛², 王振兴¹, 张巨¹

Culture of adult rabbit tenocytes using tissue explant method

Yang Guang¹, Jiang Tao², Wang Zhen-xing¹, Zhang Ju¹

Abstract

BACKGROUND: Culture *in vitro* and understanding the biological characteristics of tenocytes are the premise and foundation to study the mechanism and improve the internal environment of tendon healing.

OBJECTIVE: To culture adult rabbit tenocytes *in vitro* with tissue explant, investigate the morphology, growth and proliferation of tenocytes, and to test the expression of collagen I and collagen III in the cells.

METHODS: After adult New Zealand rabbit flexor tendon was obtained under aseptic condition, the peritenon of tendon was removed. The tendon was divided into small fragments. The fragments were digested with 0.25% trypsin and 0.1% collagenase I for 10–15 minutes. The fragments were transferred into culture flasks after centrifugation. And 1 mL culture medium was added into the flasks after the fragments attaching to the wall. Culture medium was added when the cells showed an adhesive growth, and the medium was replaced every 3 days. When 80%–90% of the cells were in confluence, they were passaged at a ratio of 1:3.

RESULTS AND CONCLUSION: The tenocytes showed an adhesive growth at 10 days, and appearance was star-shaped or irregular shaped. The number of tenocytes was increased and the cell appearance changed to fibroblast-like as went on. Passaged cells were round-shaped at the beginning of cell seeding, the cells attached to the wall after 4–6 hours showed a spindle-shape, and the cells gradually arranged in groups. The growth curve of passage cells showed that: the latent period was the first 4 days, the logarithm period was at 5–6 days, and the platform period was at 7 days. Type I collagen was positive and type III collagen was negative tested by immunofluorescence assay. The results indicated that tenocytes can be successfully isolated and cultured from adult rabbit tendon *in vitro* with tissue explant.

¹Department of Hand Surgery, ²Department of Vascular Surgery, China-Japan Union Hospital of Jilin University, Changchun 130033, Jilin Province, China

Yang Guang☆, Doctor, Attending physician, Department of Hand Surgery, China-Japan Union Hospital of Jilin University, Changchun 130033, Jilin Province, China
yangguang611@163.com

Corresponding author: Zhang Ju, Professor, Master's supervisor, Department of Hand Surgery, China-Japan Union Hospital of Jilin University, Changchun 130033, Jilin Province, China

Yang G, Jiang T, Wang ZX, Zhang J. Culture of adult rabbit tenocytes using tissue explant method. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(24): 4491-4494. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 体外分离培养肌腱细胞, 熟悉其生物学特性是研究肌腱愈合机制、改善肌腱愈合内环境的前提和基础。

目的: 采用组织块法体外培养成年兔肌腱细胞, 观察其细胞形态、生长增殖情况以及 I 型、III 型胶原蛋白的表达。

方法: 无菌条件下取成年新西兰白兔双侧后肢趾屈肌腱, 手术显微镜下剥离、去除肌腱外膜组织, 剪成组织小块, 0.25% 胰蛋白酶和 0.1% 胶原酶 I 消化 10~15 min, 离心去上清, 将组织小块转移到培养瓶中, 贴壁后加入 1 mL 培养液, 待细胞游出贴壁生长时, 再加培养液继续培养, 每 3 d 换液 1 次, 当细胞长到 80%~90% 融合时按 1:3 传代。

结果与结论: 一般 10 d 左右细胞会从组织块游出贴壁生长, 此时细胞多呈星形或不规则形, 随着时间延长细胞逐渐增多, 呈梭形的成纤维细胞样。传代细胞刚接种时圆形, 4~6 h 开始贴壁并伸展为梭形, 排列逐渐规则成群。从传代细胞的生长曲线可看出, 前 4 d 细胞生长较慢, 为潜伏期, 第 5 天后进入快速增殖期, 7 d 以后进入平台期。免疫荧光法证实 I 型胶原染色阳性, 而 III 型胶原染色呈阴性。结果表明采用组织块法可在体外成功培养成年兔肌腱细胞。

Supported by: Foundation of Health Department of Jilin Province, No. 20082050*

Received: 2011-11-15
Accepted: 2011-12-15

关键词: 肌腱细胞; 兔; 生物学性状; 分离; 组织块法; 组织构建

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.24.025

杨光, 姜涛, 王振兴, 张巨. 组织块法培养成年兔肌腱细胞[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(24): 4491-4494. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

肌腱损伤的修复是手外科研究历史最长的

课题之一, 近年随着解剖学研究的深入、外科吻合技术的改进、康复手段的丰富, 临床修复效果有了明显的提高, 但肌腱是体内增殖修复能力极差的组织, 肌腱吻合特别是屈肌腱吻合

吉林大学中日联谊医院,¹手外科,
²血管外科, 吉林省长春市
130033

杨光☆, 男, 1978年生, 吉林省通榆县人, 汉族, 2007年吉林大学毕业, 博士, 主治医师, 主要从事肌腱和周围神经损伤修复研究。
yangguang611@163.com

通讯作者: 张巨, 教授, 硕士生导师, 吉林大学中日联谊医院手外科, 吉林省长春市
130033

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225
(2012)24-04491-04

收稿日期: 2011-11-15
修回日期: 2011-12-15
(20110915005/M·L)

术后发生肌腱粘连的概率很大, 并且容易发生再次断裂, 这些都严重影响临床治疗效果^[1]。因此如何促进损伤肌腱愈合、防止再次断裂、预防肌腱粘连仍是临床上亟待解决的重要问题。肌腱细胞是肌腱的固有细胞^[2], 研究表明其参与的内源性愈合对肌腱愈合至关重要^[3], 故本实验采用组织块法体外分离培养肌腱细胞, 熟悉其生物学特性, 为研究肌腱愈合机制、改善肌腱愈合内环境、构建组织工程肌腱提供前提和基础。

1 材料和方法

设计: 细胞学体外观察实验。

时间及地点: 于2008-07/2009-07在吉林省整形外科重点实验室完成。

材料:

实验动物: 健康雄性成年新西兰白兔10只, 三四个月龄, 体质量2.0~2.5 kg, 由吉林大学基础医学院动物实验中心提供(中心许可证号SCXK-J2003-2001), 实验过程中对动物的处置符合2006年科技部《关于善待实验动物的指导性意见》的规定^[4]。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
DMEM/F-12 培养基	Gibco 公司, 美国
胎牛血清	
胰蛋白酶、胶原酶 I	Invitrogen 公司, 美国
I 型和III型胶原蛋白一抗	Abcam 公司, 英国
CO ₂ 培养箱	Thermo 公司, 德国
净化工作台	吴江市生化净化设备厂
倒置相差显微镜、正置荧光显微镜	LEICA, 德国

实验方法:

肌腱细胞的分离: 氯胺酮(50 mg/kg)肌肉注射麻醉后, 严格无菌条件下切取兔双侧后肢趾屈肌腱1.5 cm, 用无菌PBS洗净血液, 剪去腱鞘, 手术显微镜下剥离、去除肌腱外膜组织, 再用PBS反复冲洗肌腱, 用眼科剪将肌腱剪成1 mm×1 mm×1 mm的组织小块, 置入15 mL离心管, 加入0.25%胰蛋白酶和0.1%胶原酶 I, 放入37 °C的恒温水浴箱中120 r/min振荡消化10~15 min, 之后1 500 r/min离心5 min, 弃上清液, PBS重悬组织块后1 500 r/min离心

5 min, 重复洗1次, 去上清后将消化好的组织小块转移到培养瓶中, 不加培养液, 置入体积分数为5%CO₂的37 °C细胞培养箱中培养, 待4 h组织块贴壁后, 小心加入1 mL DMEM/F-12完全培养液(含体积分数为20%胎牛血清, 1%青、链霉素)浸润组织块, 继续置细胞培养箱中培养。当倒置显微镜观察有较多的细胞由组织块逸出时, 过滤去除组织块, 加培养液继续培养, 每3 d换液1次。

肌腱细胞的传代: 倒置显微镜观察细胞形态和生长情况, 当细胞融合达80%~90%时, 按1:3传代。

I型和III型胶原蛋白免疫荧光法鉴定: 将多聚赖氨酸处理的灭菌盖玻片置于6孔细胞培养板中, 取生长良好, 第2代90%以上融合的贴壁细胞传代至培养板中培养, 待其生长至50%~60%融合时吸走孔中的培养液, PBS洗3次, 预冷的体积分数为80%乙醇固定30 min, 无水乙醇-20 °C下固定30 min, PBS洗5 min×3次, 用0.5%的TritonX-100穿透10 min, PBS洗5 min×3次, 体积分数为10%的羊血清室温封闭1 h, 再加入100 μL的一抗(鼠源性)稀释液, 4 °C过夜。PBS洗5 min×3次, 加入羊抗鼠二抗稀释液, 室温1 h(避光), PBS洗5 min×3次。加入100 μL的DAPI 1~5 min。PBS洗5 min×3次, 取干净的载玻片, 滴60%~90%的甘油封固, 荧光显微镜下观察。

肌腱细胞生长曲线的绘制: 取生长良好的第2代细胞, 传代时计数(4×10⁴/孔)后定量接种于24孔细胞培养板中培养, 每天取3孔计数, 取平均值, 以培养时间做横轴, 细胞数为纵轴, 绘制生长曲线。

主要观察指标: ①肌腱细胞形态。②肌腱细胞I型和III型胶原蛋白表达。③肌腱细胞计数。

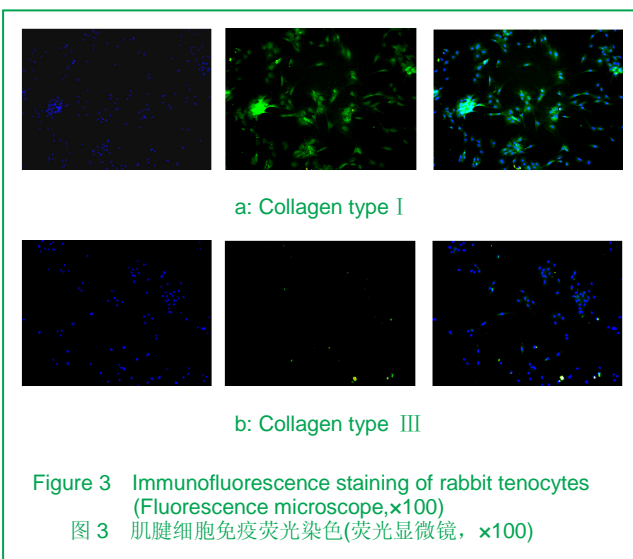
2 结果

2.1 肌腱细胞形态观察 倒置相差显微镜下观察, 一般10 d左右细胞会从组织块游出贴壁生长, 此时细胞多呈星形或不规则形, 随着时间延长, 细胞逐渐增多, 为成纤维细胞样, 呈梭形, 见图1。传代细胞消化后成圆形, 4~6 h

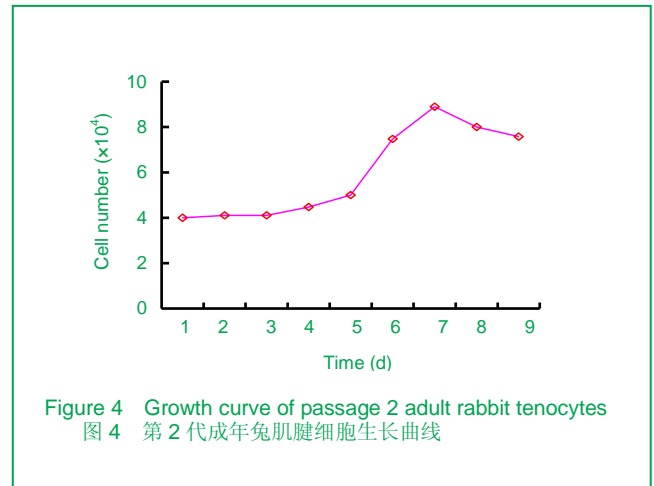
开始贴壁并伸展为梭形纤维细胞样, 排列逐渐规则成群, 见图2。



2.2 肌腱细胞 I 型和 III 型胶原蛋白的表达 免疫荧光法证实 I 型胶原染色阳性, 而 III 型胶原染色呈阴性, 见图 3, 证明所培养细胞为肌腱细胞。



2.3 肌腱细胞的生长曲线 从生长曲线可看出, 前 4 d 细胞生长较慢, 为潜伏期, 第 5 天后进入快速增殖期, 7 d 以后进入平台期, 见图 4。



3 讨论

肌腱是肌肉的延续部分, 由大量平行排列的胶原纤维组成, 其内含有少量的肌腱细胞。肌腱外周由腱外膜包绕, 其部分纤维向肌腱内延伸, 在肌腱束间包绕构成腱内膜, 二者细胞成分被称为腱外膜细胞和腱内膜细胞, 另外近年的研究发现肌腱内还存在数量极为稀少的干细胞^[5]。如何在这些复杂的成分中分离肌腱细胞是很多研究者关心的问题。

根据获取原代细胞的方法不同, 肌腱细胞的培养可分为组织块法和酶消化法。组织块法是将肌腱分成组织小块, 经或不经酶消化处理后进行接种, 由于肌腱组织块中含有腱内膜细胞, 因此所获得的原代肌腱细胞内混有少量腱内膜细胞。酶消化法理论上可获得更为纯净的肌腱细胞, 但肌腱中细胞含量少, 消化时间难以掌握, 获取细胞困难, 能够收集到的原代细胞少^[6]。相比较而言, 组织块法操作简便、成功率高, 因而一些相关研究仍以组织块法获取肌腱细胞^[7-9]。本实验参照国内雷少榕等^[10]的方法以显微外科技术最大限度剥离肌腱外膜组织, 并尽量切取肌腱块的中央部位, 以酶消化后再以组织块法可获取较为纯净的肌腱原代细胞。

文献中对于消化酶的组合以及消化时间的报道并不相同^[8, 11-12], 因此在预实验中, 作者对此进行了摸索, 发现直接将肌腱组织块贴壁培养而不预先酶消化或单独采用胶原酶消化也能获取原代细胞, 但细胞产量少, 所需培养时间长。而采用 0.1% 的 I 型胶原酶+0.25% 的胰蛋白酶对已剪碎的组织小块进行消化的效果最好, 时间应掌握在 10~15 min 之间, 消化时间过短细胞少; 而时间过长, 剪碎后的组织块会粘成一团, 不利于在培养瓶中分散、贴壁。

组织块能否贴壁是细胞培养成功的关键之一。因此实验将消化后的组织块分散均匀的放置培养瓶内后,可暂不加培养液,待4 h左右组织块粘在瓶壁上,再小心加入少量培养液,轻柔翻动培养瓶,使培养液浸润组织块即可,严禁动作过快过大,使组织块漂浮造成原代培养失败,此后也应尽量减少翻动培养瓶,当10 d左右有较多的细胞由组织块逸出时,再加足量培养液并过滤去除组织块。

肌腱细胞和成纤维细胞均起自胚胎时期的中胚层间充质细胞,其形态和生物学特性与成纤维细胞相似,因此也可以认为是一种特化的成纤维细胞。但是不同于其他来源的成纤维细胞,肌腱细胞一般情况下只合成I型胶原,仅在肌腱损伤修复时,会合成少量III型胶原蛋白,因此常通过检测胶原表达情况对所培养细胞进行鉴定^[5-6, 10, 13-14],本实验亦采用免疫荧光染色证实I型胶原染色阳性,而III型胶原染色呈阴性,证明所采用的组织块法培养的细胞为肌腱细胞。

总之,采用这种组织块法可从成年兔肌腱组织中分离培养肌腱细胞,该方法操作简单、成功率高,可为进一步探讨肌腱内源性愈合机制、改善肌腱修复效果、构建组织工程肌腱打下基础。

4 参考文献

- [1] Lilly SI, Messer TM. Complications after treatment of flexor tendon injuries. J Am Acad Orthop Surg. 2006;14(7):387-396.
- [2] Li R. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(3):551-554.
李荣. 组织工程化肌腱在肌腱修复过程中的作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(3):551-554.
- [3] Strickland JW. The scientific basis for advances in flexor tendon surgery. J Hand Ther. 2005;18(2):94-110.
- [4] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30.
中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [5] Zhang J, Wang JH. Characterization of differential properties of rabbit tendon stem cells and tenocytes. BMC Musculoskelet Disord. 2010;11:10.
- [6] Banes AJ, Donlon K, Link GW, et al. Cell populations of tendon: a simplified method for isolation of synovial cells and internal fibroblasts: confirmation of origin and biologic properties. J Orthop Res. 1988;6(1):83-94.
- [7] Xiong Y, Zhang ZZ, Fu XL. Disan Junyi Daxue Xuebao. 2006; 28(17):1761-1764.
熊雁, 张正治, 傅晓岚. 核心蛋白聚糖对兔肌腱细胞增殖及细胞周期的影响[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(17):1761-1764.
- [8] Xu Y, Tang JB. Zhonghua Chuangshang Zazhi. 2003;19(6): 348-351.
徐燕, 汤锦波. 核因子- κ B 诱导激酶和I κ B 激酶在碱性成纤维细胞生长因子作用下基因表达及肌腱细胞增殖[J]. 中华创伤杂志, 2003, 19(6):348-351.
- [9] Pauly S, Klatte F, Strobel C, et al. Characterization of tendon cell cultures of the human rotator cuff. Eur Cell Mater. 2010; 20:84-97.
- [10] Lei SR, Long JH, Huang XY. Zhongguo Xiandai Yixue Zazhi. 2003;13(11):39-41.
雷少榕, 龙剑虹, 黄晓元. 组织块法兔肌腱细胞体外培养观察[J]. 中国现代医学杂志, 2003, 13(11):39-41.
- [11] Cheng CZ, Zhang ZZ, Pan XF, et al. Zhonghua Shiyao Waikexue Zazhi. 2004;21(1):62-64.
程昌志, 张正治, 潘险峰, 等. 胰岛素样生长因子1基因转染对大鼠肌腱细胞生长的促进作用[J]. 中华实验外科杂志, 2004, 21(1):62-64.
- [12] Sun YK, Zhang YL, Sun L, et al. Zhonghua Shouwaikexue Zazhi. 2006;22(3):133-136.
孙燕琨, 张友乐, 孙磊, 等. 深低温冷冻肌腱细胞活性的研究[J]. 中华手外科杂志, 2006, 22(3):133-136.
- [13] Eriksen HA, Pajala A, Leppilahti J, et al. Increased content of type III collagen at the rupture site of human Achilles tendon. J Orthop Res. 2002;20(6):1352-1357.
- [14] Klass BR, Rolfe KJ, Grobbelaar AO. In vitro flexor tendon cell response to TGF- β 1: a gene expression study. J Hand Surg Am. 2009;34(3):495-503.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 吉林省卫生厅基金课题资助项目(20082050)。课题名称为“血小板源性生长因子对肌腱愈合影响的实验研究”。

作者贡献: 实验设计为杨光, 实验实施为姜涛、王振兴, 实验评估为张巨, 资料收集为杨光。杨光成文, 张巨审校, 张巨对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。

本文创新性: 肌腱细胞是肌腱的固有细胞, 在体外分离培养肌腱细胞是研究肌腱愈合机制、影响因素、构建组织工程肌腱的前提和基础。本课题在成年兔肌腱中分离出肌腱细胞, 对所采用的组织块法进行了细致的探讨和研究, 并对培养的肌腱细胞的生物学性状进行观察, 为下一步研究提供可靠的来源。