

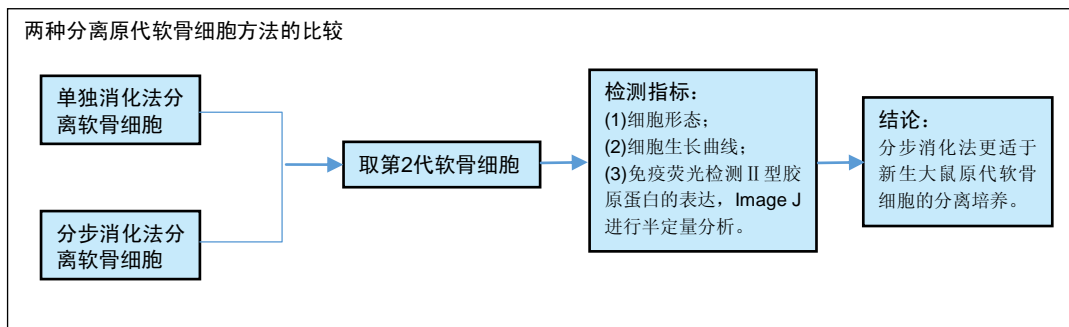
# 比较单独消化法及分步消化法培养新生大鼠原代软骨细胞的生物学特性

邓林峡<sup>1</sup>, 余慕雪<sup>1</sup>, 潘思年<sup>2</sup>, 郭楚怡<sup>1</sup>, 丘小汕<sup>1</sup>, 曹志毓<sup>3</sup>(<sup>1</sup>中山大学附属第一医院儿科, 广东省广州市 510080; <sup>2</sup>中山大学附属第三医院儿科, 广东省广州市 510630; <sup>3</sup>中山大学中山医学院, 广东省广州市 510080)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0962

ORCID: 0000-0002-1122-3918(余慕雪)

文章快速阅读:



邓林峡, 女, 1993 年生, 江西省新余市人, 中山大学附属第一医院儿科在读硕士, 主要从事新生儿骨骼生长方面的研究。

通讯作者: 余慕雪, 主任医师, 博士, 硕士生导师, 中山大学附属第一医院儿科, 广东省广州市 510080

中图分类号:R394.2

文献标识码:B

稿件接受: 2018-04-04



## 文题释义:

**原代软骨细胞体外培养:** 是研究骨骼生长的重要方法之一。由于研究目的的不同, 实验选取的物种以及物种的年龄段、软骨部位都不尽相同。新生儿期动物关节软骨是研究骨骼线性生长的较好细胞来源, 然而新生儿期动物关节软骨分离难度系数大。原代软骨细胞的分离主要是采用机械剪切法和酶消化法将软骨细胞从细胞基质中释放出来。

**酶消化法:** 包括单独消化法和分步消化法, 单独消化法操作简单, 但难以得到高纯度的软骨细胞; 分步消化法可有效防止成纤维细胞的污染, 但对细胞有一定的损伤。为此, 作者就两种方法所得软骨细胞的纯度、形态、增殖能力、蛋白表达等情况进行了观察和分析, 旨在建立一种可靠稳定的新生大鼠软骨细胞分离培养方法, 为骨骼线性生长程序化研究提供实验基础。

## 摘要

**背景:** 原代软骨细胞体外培养是研究骨骼生长的重要方法之一。目前原代软骨细胞的分离方法主要有单独消化法和分步消化法, 但两种方法对软骨细胞生物学性能的影响尚不清楚。

**目的:** 比较两种方法对新生大鼠软骨细胞生物学性能的影响, 为软骨发育的程序化研究提供实验基础。

**方法:** 无菌条件下取出新生 SD 大鼠关节软骨, 分别采用 II 型胶原蛋白酶单独消化法、胰蛋白酶和 II 型胶原蛋白酶分步消化法分离软骨细胞, 并进行体外培养。光学显微镜下观察软骨细胞的形态, CCK-8 法检测软骨细胞的增殖活性, 半定量免疫荧光分析软骨细胞的 II 型胶原蛋白表达。

**结果与结论:** ①单独消化法和分步消化法都可以得到大量软骨细胞, 但分步消化法较单独消化法所得软骨细胞的纯度更高; ②光学显微镜下观察, 两种方法消化所得细胞在形态学上无明显差异; ③单独消化法所得细胞生长速度更快; ④免疫荧光半定量分析显示两种方法所得软骨细胞 II 型胶原蛋白表达一致; ⑤以上结果表明, 分步消化法更适于新生大鼠原代软骨细胞的分离培养。

## 关键词:

原代软骨细胞; 细胞培养; II 型胶原蛋白酶; 胰蛋白酶; 半定量免疫荧光; 细胞增殖; 生长曲线; II 型胶原蛋白; 干细胞; 广东省自然科学基金

## 主题词:

软骨细胞; 细胞, 培养的; 胰蛋白酶; 胶原酶类; 胶原 II 型; 组织工程

## 基金资助:

广东省自然科学基金(2015A030313148); 广东省科技计划项目(2012B031800077, 2011B031800143); 国家级大学生创新训练计划项目(201701101)

## Biological properties of primary chondrocytes isolated by one-step digestion versus stepwise digestion in newborn rats

Deng Lin-xia<sup>1</sup>, Yu Mu-xue<sup>1</sup>, Pan Si-nian<sup>2</sup>, Guo Chu-yi<sup>1</sup>, Qiu Xiao-shan<sup>1</sup>, Cao Zhi-yu<sup>3</sup> (<sup>1</sup>Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China;

<sup>2</sup>Department of Pediatrics, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510630,

Guangdong Province, China; <sup>3</sup>Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080,

Guangdong Province, China)

Deng Lin-xia, Master candidate, Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

Corresponding author: Yu Mu-xue, Ph.D., M.D., Chief physician, Master's supervisor, Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, Guangdong Province, China

## Abstract

**BACKGROUND:** *In vitro* culture of primary chondrocytes is one of the most important methods to study the bone growth. Currently, the main methods of primary chondrocyte separation are one-step digestion and stepwise digestion. However, the biological properties of chondrocytes isolated by these two methods have not been well documented.

**OBJECTIVE:** To compare the biological properties of chondrocytes in newborn rats isolated using these two methods and to provide experimental basis for the programmed study of cartilage development.

**METHODS:** Articular cartilage of newborn SD rats was removed under aseptic conditions. Chondrocytes were isolated by one-step digestion (type II collagen) and stepwise digestion (type II collagen and trypsin). Primary culture and subculture were performed. Cell morphology was observed under light microscope, cell proliferation was detected by cell counting kit-8 assay, and the expression of type II collagen of chondrocytes was analyzed by semi-quantitative immunofluorescence.

**RESULTS AND CONCLUSION:** A large number of chondrocytes were yielded by two digestion methods, but the purity of chondrocytes obtained by stepwise digestion method was higher than that by one-step digestion method. Under the light microscope, there was no significant difference in the cell morphology between the two groups. The growth of chondrocytes obtained by one-step digestion was faster than that by stepwise digestion method. Results from the semi-quantitative immunofluorescence analysis showed that the chondrocytes obtained by these two digestion methods showed the same ability to express type II collagen. These findings indicate that compared with one-step digestion, stepwise digestion is more suitable for primary chondrocytes isolation in newborn rats.

**Subject headings:** Chondrocytes; Cells, Cultured; Trypsin; Collagenases; Collagen Type II; Tissue Engineering

**Funding:** Guangdong Provincial Natural Science Foundation, No. 2015A030313148; Guangdong Province Science and Technology Project, No. 2012B031800077, 2011B031800143; National Student's Platform for Innovation Training Program, No. 201701101

## 0 引言 Introduction

原代软骨细胞体外培养是研究骨骼生长的重要方法之一。常用的原代软骨细胞来源有小鼠、大鼠、猪、兔以及人关节软骨或肋软骨等等, 由于研究目的的不同, 实验选取的物种以及物种的年龄段、软骨部位都不尽相同<sup>[1-5]</sup>。新生儿期动物关节软骨是研究骨骼线性生长的较好细胞来源, 然而新生儿期动物关节软骨分离难度系数大。目前, 原代软骨细胞分离方法主要有II型胶原蛋白酶单独消化法<sup>[6-7]</sup>、胰蛋白酶和II型胶原蛋白酶分步消化法<sup>[8-10]</sup>。单独消化法操作简单, 但难以得到高纯度的软骨细胞; 分步消化法可有效防止成纤维细胞的污染, 但对细胞有一定的损伤。为此, 作者就两种方法所得软骨细胞的纯度、形态、增殖能力、蛋白表达等情况进行了观察和分析, 旨在建立一种可靠稳定的新生大鼠软骨细胞分离培养方法, 为骨骼线性生长程序化研究提供实验基础。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 体外细胞学观察实验。

1.2 时间及地点 于2017年1至12月在中山大学第一附属医院科研楼儿科实验室完成。

1.3 材料 该实验经中山大学附属第一医院医学伦理委员会批准。SPF级新生SD大鼠(中山大学附属第一医院动物实验中心提供, 出生时间小于24 h)。DMEM/F12培养基(Hyclone公司); 胎牛血清(Biological Industries公司); 胰蛋白酶(Life公司); II型胶原蛋白酶(Sigma公司); II型胶原蛋白单克隆抗体(Abcam公司); alexa fluor 594标记山羊抗鼠IgG(H+L)(Life公司); DAPI(Sigma公司); CCK-8试剂盒(DOJINDO公司); 研究级活细胞倒置成像系统(AXIO OBSERVER Z1, ZEISS公司); 荧光倒置显微镜(BX63, Olympus公司); 酶标仪(ELX800, 伯腾)。

1.4 实验方法

1.4.1 软骨细胞单独消化法 将新生大鼠颈椎脱臼处死后, 放入体积分数为75%的乙醇中浸泡10 min; 手术显微

镜下取出关节软骨, PBS洗3次; 眼科剪将其剪碎至1 mm<sup>3</sup>大小, PBS洗3次; 加入0.2% II型胶原蛋白酶2 mL, 37 °C水浴箱消化4 h, 以150目不锈钢网过滤; 1 000 r/min离心5 min; 弃上清液, 加入含体积分数10%胎牛血清的完全培养基, 锥虫蓝染色计数细胞活力(≥90%方可继续实验); 将细胞悬液接种于培养皿中, 置于37 °C、体积分数5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养, 待培养皿中的细胞长至50%–60%密度时进行1:3消化传代。

1.4.2 软骨细胞分步消化法 将新生大鼠颈椎脱臼处死后, 放入体积分数为75%的乙醇中浸泡10 min; 手术显微镜下取出关节软骨, PBS洗3次, 眼科剪将其剪碎至1 mm<sup>3</sup>大小, PBS洗3次; 加入0.25%胰蛋白酶3 mL, 37 °C水浴箱消化30 min, 体积分数为20%胎牛血清终止消化; 充分吹打混匀, 静置, 去上清液, PBS洗3次; 加入0.2% II型胶原蛋白酶2 mL, 37 °C水浴箱消化4 h, 150目不锈钢网过滤, 1 000 r/min离心5 min; 弃上清液, 加入含体积分数10%胎牛血清的完全培养基, 锥虫蓝染色计数细胞活力(≥90%方可继续实验); 将细胞悬液接种于培养皿中, 置于37 °C、体积分数5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养, 待培养皿中的细胞长至50%–60%密度时进行1:3消化传代。

1.4.3 软骨细胞的免疫荧光鉴定 将第2代软骨细胞接种到无菌玻片上, 待细胞长至50%–60%时, 取出细胞爬片, PBS洗3次, 每次5 min; 40 g/L多聚甲醛固定30 min, PBS洗3次, 每次5 min; 加入0.3%Triton X-100, 室温放置15 min, PBS洗3次, 每次5 min; 室温下体积分数5%山羊血清封闭1 h, 不洗, 加入1:500一抗(II型胶原蛋白单克隆抗体)4 °C冰箱孵育过夜; 第2天将玻片用PBS洗3次, 每次5 min; 加入1:1 000荧光二抗(alexa fluor 594标记山羊抗鼠IgG(H+L))室温避光孵育1 h(以下操作都避光), 用PBS洗3次, 每次5 min; DAPI常温染色15 min, PBS洗3次, 每次5 min; 最后, 封固拍照。

1.4.4 细胞生长曲线绘制 取第2代软骨细胞, 用0.25%胰蛋白酶消化传代; 将细胞浓度为1×10<sup>7</sup> L<sup>-1</sup>的细胞悬液接

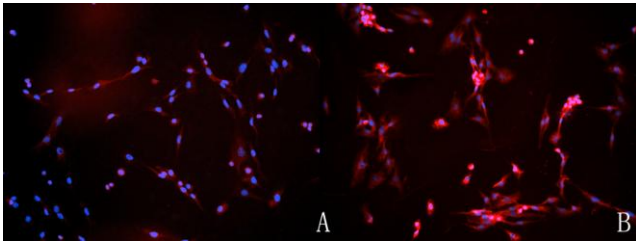


图1 新生SD大鼠软骨细胞鉴定(荧光显微镜, ×200)  
Figure 1 Identification of chondrocytes from newborn rats (fluorescence microscope, ×200)

图注: 图中A为II型胶原蛋白酶单独消化法所得软骨细胞, II型胶原蛋白表达量较少, 且有少量细胞不表达II型胶原蛋白, 在显微镜下只见蓝色细胞核; B为胰蛋白酶和II型胶原蛋白酶分步消化法所得软骨细胞, II型胶原蛋白表达丰富, 所有细胞均表达II型胶原蛋白。

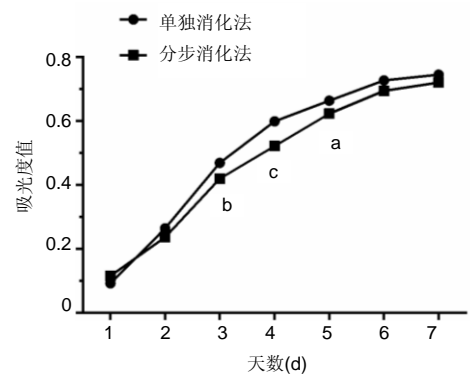


图3 新生SD大鼠软骨细胞生长曲线

Figure 3 Growth curve of chondrocytes from newborn rats

图注: 与胰蛋白酶和II型胶原蛋白酶分步消化法所得的软骨细胞比较, II型胶原蛋白酶单独消化法所得的软骨细胞生长稍快, 在第3, 4, 5天时两组比较差异有显著性意义(<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$ , <sup>c</sup> $P < 0.005$ )。

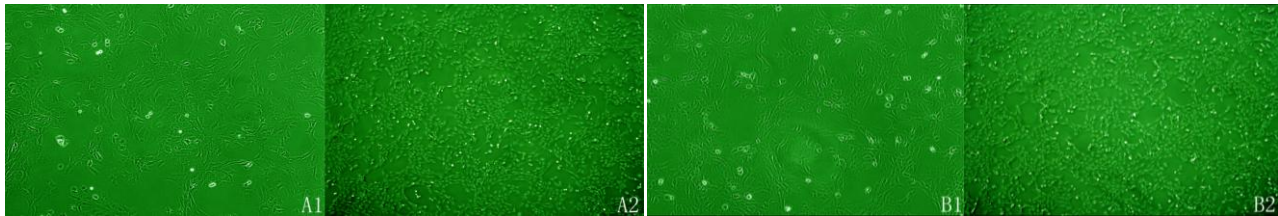


图2 新生SD大鼠软骨细胞形态

Figure 2 Morphological observation of chondrocytes from newborn rats

图注: 图中A1和A2分别为II型胶原蛋白酶单独消化法所得的软骨细胞(A1: ×100, A2: ×40); B1和B2分别为胰蛋白酶和II型胶原蛋白酶分步消化法所得的软骨细胞(B1: ×100, B2: ×40)。

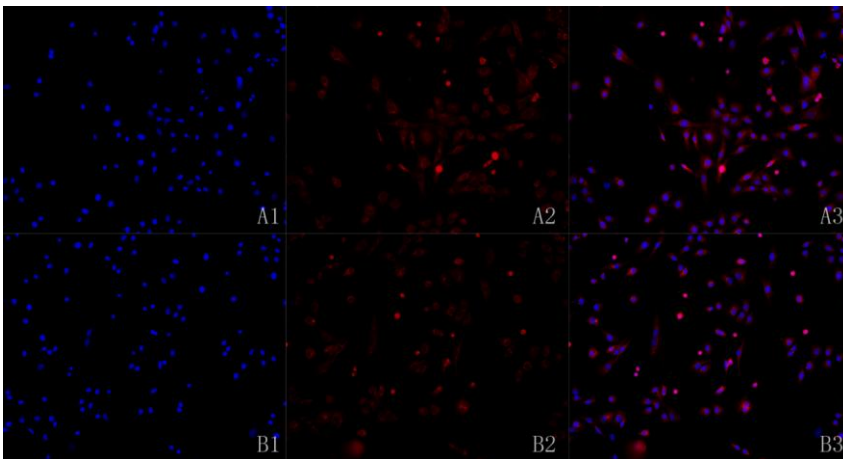


图4 软骨细胞培养第2天II型胶原蛋白的表达(荧光显微镜, ×100)

Figure 4 Expression of type II collagen in chondrocytes after 2 days of culture (fluorescence microscope, ×100)

图注: 图中A为II型胶原蛋白酶单独消化法所得的软骨细胞(A1为DAPI, A2为II型胶原蛋白, A3由A1、A2合成); B为胰蛋白酶和II型胶原蛋白酶分步消化法所得的软骨细胞(B1为DAPI, B2为II型胶原蛋白, B3由B1、B2合成)。

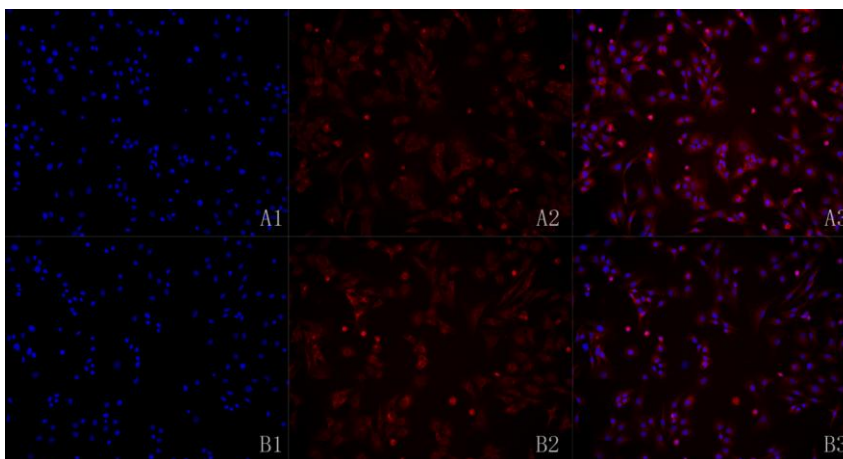


图5 软骨细胞培养第4天II型胶原蛋白的表达(荧光显微镜, ×100)

Figure 5 Expression of type II collagen in chondrocytes after 4 days of culture (fluorescence microscope, ×100)

图注: 图中A为II型胶原蛋白酶单独消化法所得的软骨细胞(A1为DAPI, A2为II型胶原蛋白, A3由A1、A2合成); B为胰蛋白酶和II型胶原蛋白酶分步消化法所得的软骨细胞(B1为DAPI, B2为II型胶原蛋白, B3由B1、B2合成)。

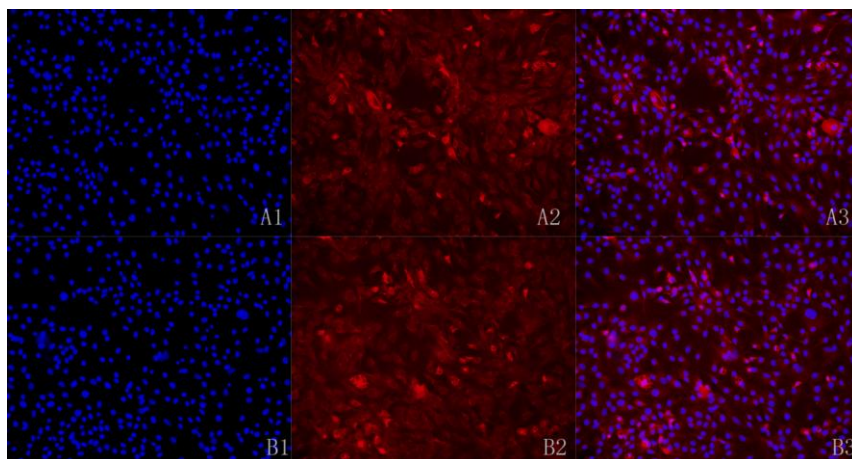


图6 软骨细胞培养第6天II型胶原蛋白的表达(荧光显微镜, ×100)

Figure 6 Expression of type II collagen in chondrocytes after 6 days of culture (fluorescence microscope, ×200)

图注: 图中A为II型胶原蛋白酶单独消化法所得的软骨细胞(A1为DAPI, A2为II型胶原蛋白, A3由A1、A2合成); B为胰蛋白酶和II型胶原蛋白酶分步消化法所得的软骨细胞(B1为DAPI, B2为II型胶原蛋白, B3由B1、B2合成)。

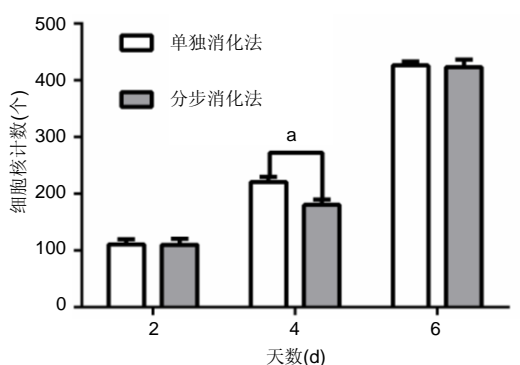


图7 半定量免疫荧光检测培养不同时间软骨细胞数量

Figure 7 Semi-quantitative immunofluorescence detection of chondrocyte number at different time of culture

图注: 随机取10张不同培养时间的免疫荧光照片, 通过Image J进行细胞核计数, 发现第4天差异有显著性意义( $^aP < 0.005$ ), II型胶原蛋白酶单独消化法所得软骨细胞数量更多, 第2, 6天差异无显著性意义。

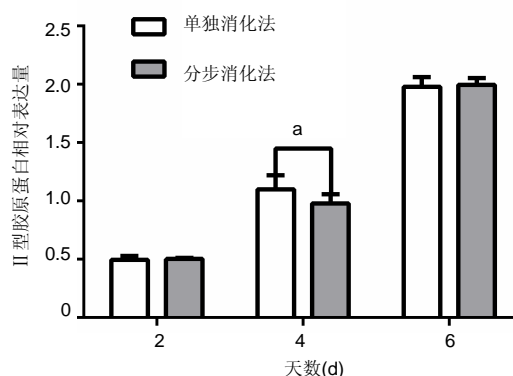


图8 半定量免疫荧光检测培养不同时间II型胶原蛋白相对表达量

Figure 8 Semiquantitative immunofluorescence detection of the relative expression of type II collagen in chondrocytes at different time of culture

图注: 随机取10张不同培养时间的免疫荧光照片, 通过Image J进行荧光密度分析, 发现第4天差异有显著性意义( $^aP < 0.05$ ), II型胶原蛋白酶单独消化法所得软骨细胞表达II型胶原蛋白的量稍多, 第2, 6天差异无显著性意义。

种于96孔板中, 每孔100  $\mu$ L, 设置5个重复孔, 置于37  $^{\circ}$ C、体积分数5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养; 24 h后加入10  $\mu$ L CCK-8试剂, 放入37  $^{\circ}$ C、体积分数5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育1 h, 使用酶标仪测量450 nm处吸光度值。连续检测7 d, 以吸光度值的平均值为纵坐标、细胞培养天数为横坐标描绘生长曲线。

1.4.5 半定量免疫荧光检测II型胶原蛋白表达 将两种方法得到的第2代软骨细胞接种到无菌玻片上, 分别在第1, 2, 3, 4, 5, 6天取出制备好的细胞爬片, 免疫荧光方法同上, 荧光显微镜采集荧光图像时, 各参数均调为手动, 统一设置曝光值、光圈大小、对比度、白平衡。每天随机采集10张图像, 使用Image J软件进行细胞核计数以及半定量荧光密度分析。

1.5 主要观察指标 ①软骨细胞形态及免疫荧光鉴定结果; ②软骨细胞生长增殖能力; ③软骨细胞II型胶原蛋白表达。

1.6 统计学分析 采用SPSS 13.0统计软件包进行分析,

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用非配对t检验,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

2.1 软骨细胞鉴定结果 软骨细胞特异性表达II型胶原蛋白, 在荧光显微镜下呈红色, 胞核呈蓝色, 将胞质与胞核图片合成后可见典型的软骨细胞形态。

II型胶原蛋白酶单独消化法所得的软骨细胞, II型胶原蛋白表达量较少, 且有少量细胞不表达II型胶原蛋白, 在显微镜下只见蓝色细胞核(图1A)。

胰蛋白酶和II型胶原蛋白酶分步消化法所得的软骨细胞, II型胶原蛋白表达丰富, 所有细胞均表达II型胶原蛋白(图1B), 这提示分步消化法所得软骨细胞纯度较单独消化法纯度更高。

2.2 软骨细胞形态 倒置相差显微镜下观察, 单独消化法与分步消化法所得悬浮细胞肉眼可见无差异, 圆球形, 体积较小, 大小均一, 折光性较强; 锥虫蓝染色显示, 90%

以上细胞不着色, 为活细胞。

II型胶原蛋白酶单独消化法分离的细胞培养6 h后开始贴壁, 绝大部分24 h内贴壁, 48 h生长加速, 96 h后已经基本铺满皿底, 细胞呈多形态, 有多角形、扁圆形、多角形、长梭形(图2A)。

胰蛋白酶和II型胶原蛋白酶分步消化法分离的细胞培养9-12 h后开始贴壁, 绝大部分24 h内贴壁, 48 h后生长加速, 96 h后细胞已经基本铺满皿底, 细胞呈典型的“铺路石”状, 兼见多角形、扁圆形、多角形, 少数呈长梭形(图2B)。

**2.3 软骨细胞的增殖能力** CCK-8法检测显示, 培养1-7 d时, 两种消化法分离的细胞生长曲线都呈不典型“S”型。接种后1 d开始增长, 2 d后呈指数增长, 4 d后增殖速度减慢, 约第6天细胞数达最大, 第7天生长受到接触抑制的影响, 细胞增殖进入平台期。分步消化法分离的细胞增殖速度略低于单独消化法分离的细胞, 第3, 4, 5天差异有显著性意义(图3)。

**2.4 免疫荧光半定量分析结果** 随机取10张不同培养时间的免疫荧光照片(图4-6), 通过Image J进行细胞核计数和荧光密度分析, 第4天时, 单独消化法比分步消化法所得软骨细胞数量更多, 其差异有显著性意义; 第2, 6天时细胞数量基本一致, 差异无显著性意义(图7)。两种方法所得软骨细胞的II型胶原蛋白表达量都随培养时间的延长而增加, 第4天时, 单独消化法比分步消化法所得软骨细胞的II型胶原蛋白表达量稍多, 其差异有显著性意义, 第2, 6天时基本一致, 差异无显著性意义(图8)。

### 3 讨论 Discussion

骨骼的生长发育是通过膜内成骨和软骨内成骨两种途径实现的<sup>[11]</sup>, 在脊椎动物中, 大多数的骨骼都是通过软骨内成骨形成<sup>[12]</sup>。软骨内成骨开始于间充质干细胞的聚集、增殖, 间充质干细胞分化为软骨细胞以及软骨细胞凋亡、细胞间质矿化<sup>[13-16]</sup>, 其中有复杂的调控网络, 它受基因、转录因子、生长因子、细胞-细胞基质相互作用和表观遗传学的调控<sup>[17-22]</sup>, 需要各个转录因子和信号通路的协调统一<sup>[23-24]</sup>。分化的软骨细胞会特异性表达II型胶原蛋白<sup>[25]</sup>。建立新生大鼠软骨细胞的程序化培养体系只是研究骨骼线性生长的第一步。

关节软骨是一种结缔组织, 由特殊的细胞基质组成, 其中II型胶原蛋白是细胞基质的主要成分<sup>[26]</sup>。原代软骨细胞的分离主要是采用机械剪切法和酶消化法将软骨细胞从细胞基质中释放出来<sup>[27]</sup>。酶消化法包括单独消化法和分步消化法<sup>[28-29]</sup>, 单独消化法是指单独运用II型胶原蛋白酶消化软骨组织, 分步消化法是指胰蛋白酶和II型胶原蛋白酶相结合消化软骨组织。胰蛋白酶是哺乳动物胃肠产生的肽链内切酶, 具有水解活性, 广泛用于细胞培养技术中<sup>[30-31]</sup>。II型胶原蛋白酶可以特异性水解II型胶原蛋白, 对软骨细

胞的细胞间质有消化作用。作者就两种方法所得软骨细胞的纯度、形态、增殖能力、II型胶原蛋白表达进行了观察和分析。

单独消化法和分步消化法都可以得到大量软骨细胞, 但分步消化法较单独消化法所得软骨细胞纯度更高。CCK-8法检测两种方法所得软骨细胞的增殖活性, 结果显示单独消化法所得细胞生长速度更快, 其原因可能是由于从新生大鼠四肢分离出来的软骨组织块上黏附有成纤维细胞、肌源性细胞和少量的血细胞。胰蛋白酶具有水解活性, 对细胞膜蛋白具有损伤<sup>[32]</sup>, 暴露于胰蛋白酶中时间过长将导致细胞死亡。成纤维细胞外没有致密的细胞基质保护, 在胰蛋白酶中不能存活。成纤维细胞与软骨细胞都属于贴壁细胞, 两者形态相似, 以不规则形状为主<sup>[33]</sup>, 镜下难以辨别, 而成纤维细胞贴壁时间短, 增殖速度快, 成纤维细胞污染对实验结果有一定影响。胰蛋白酶对软骨细胞也有一定影响, 可能延长贴壁时间, 并减慢增殖速度。

采用II型胶原蛋白单独消化时, 应注意将新生大鼠关节软骨从关节囊中分离过程中, 减少结缔组织残留, 避免成纤维细胞污染。采用分步消化法分离原代软骨细胞需要控制好胰蛋白酶的时间, 消化时间过长很容易损伤细胞的活性, 消化时间过短又会降低细胞的产出率, 不同年龄、不同物种由于软骨细胞基质中各成分和比例不同, 酶消化的时间也各不相同<sup>[8-10]</sup>。实验发现, 0.25%胰蛋白酶消化30 min新生大鼠软骨组织, 可以有效的将软骨组织块外面包裹的结缔组织消化下来, 并将成纤维细胞杀死。

综上所述, 单独消化法和分步消化法都可以得到大量软骨细胞, 但分步消化法较单独消化法所得软骨细胞纯度更高。光学显微镜下观察, 两种方法消化所得细胞在形态学上无明显差异。CCK-8法检测显示单独消化法所得细胞生长速度更快。免疫荧光半定量分析显示两种方法所得软骨细胞II型胶原蛋白表达一致。因此, 在分离新生大鼠软骨细胞, 进行骨骼线性生长研究时, 如果需要进一步提高软骨细胞的纯度, 单独消化法应该是相对较好的选择。

**作者贡献:** 实验设计为第一作者和通讯作者, 实施为全体作者, 第一作者成文, 通讯作者审核, 盲法评估。

**经费支持:** 该文章接受了“广东省自然科学基金(2015A030313148)”、“广东省科技计划项目(2012B031800077)”、“广东省科技计划项目(2011B031800143)”、“国家级大学生创新训练计划项目(201701101)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程, 不存在利益冲突。

**伦理问题:** 研究对象采用来自动物的细胞, 符合相关伦理学要求, 文章的撰写与编辑修改后文章遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

**文章查重:** 文章出版前已经过CNKI反剽窃文献检测系统进行3次查重。

**文章外审:** 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

**作者声明:** 第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担

责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享3.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

- [1] Rosenthal AK, Gohr CM, Mitton-Fitzgerald E, et al. Autophagy modulates articular cartilage vesicle formation in primary articular chondrocytes. *J Biol Chem.* 2015;290(21):13028-13038.
- [2] Yan B, Zhang Z, Jin D, et al. mTORC1 regulates PTHrP to coordinate chondrocyte growth, proliferation and differentiation. *Nat Commun.* 2016;7:11151.
- [3] Choi H, Choi Y, Kim J, et al. Longitudinal bone growth is impaired by direct involvement of caffeine with chondrocyte differentiation in the growth plate. *J Anat.* 2017;230(1):117-127.
- [4] Chang LH, Wu SC, Chen CH, et al. Parathyroid hormone 1-34 reduces dexamethasone-induced terminal differentiation in human articular chondrocytes. *Toxicology.* 2016;368-369:116-128.
- [5] Li H, Li X, Liu G, et al. Bauhinia championi (Benth.) Benth. polysaccharides upregulate Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in chondrocytes. *Int J Mol Med.* 2013;32(6):1329-1336.
- [6] 刘振峰,方锐,孟庆才. II型胶原酶消化法可短时间获得大量纯化大鼠关节软骨细胞[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(50): 9323-9326.
- [7] 韦宋谱,张晓钢,丁道芳,等. 一种获取具有旺盛增殖力的大鼠软骨细胞培养方法[J]. 上海中医药杂志, 2012, 46(7):8-12.
- [8] 于莹,艾虹,刘天悦,等. 周期性单轴压力对大鼠髌突软骨细胞结缔组织生长因子表达的影响[J]. 口腔材料器械杂志, 2015, 24(4):181-185.
- [9] Zhang Q, Deng S, Sun K, et al. MMP-2 and Notch signal pathway regulate migration of adipose-derived stem cells and chondrocytes in co-culture systems. *Cell Prolif.* 2017;50(6):e12385.
- [10] Xu XX, Zhang XH, Diao Y, et al. Achyranthes bidentate saponins protect rat articular chondrocytes against interleukin-1 $\beta$ -induced inflammation and apoptosis in vitro. *Kaohsiung J Med Sci.* 2017;33(2):62-68.
- [11] Kobayashi T, Kronenberg H. Minireview: transcriptional regulation in development of bone. *Endocrinology.* 2005;146(3):1012-1017.
- [12] Beier F. Cell-cycle control and the cartilage growth plate. *J Cell Physiol.* 2005;202(1):1-8.
- [13] Kozhemyakina E, Lassar AB, Zelzer E. A pathway to bone: signaling molecules and transcription factors involved in chondrocyte development and maturation. *Development.* 2015;142(5):817-831.
- [14] Tsang KY, Chan D, Cheah KS. Fate of growth plate hypertrophic chondrocytes: death or lineage extension. *Dev Growth Differ.* 2015;57(2):179-192.
- [15] Ogawa H, Akiyama H. Analysis of Musculoskeletal Systems and Their Diseases. Regulation of chondrogenesis and cartilage regeneration by molecular and developmental biology. *Clin Calcium.* 2015;25(8):1116-1124.
- [16] Sun MM, Beier F. Chondrocyte hypertrophy in skeletal development, growth, and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2014;102(1):74-82.
- [17] Wang M, Man XF, Liu YQ, et al. Dysfunction of collagen synthesis and secretion in chondrocytes induced by wisp3 mutation. *Int J Endocrinol.* 2013;2013:679763.
- [18] Usmani SE, Pest MA, Kim G, et al. Transforming growth factor alpha controls the transition from hypertrophic cartilage to bone during endochondral bone growth. *Bone.* 2012;51(1):131-141.
- [19] Tian Y, Guo R, Shi B, et al. MicroRNA-30a promotes chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells through inhibiting Delta-like 4 expression. *Life Sci.* 2016;148:220-228.
- [20] Liu Q, Zhang X, Hu X, et al. Circular RNA Related to the Chondrocyte ECM Regulates MMP13 Expression by Functioning as a MiR-136 'Sponge' in Human Cartilage Degradation. *Sci Rep.* 2016;6:22572.
- [21] Allen JL, Cooke ME, Alliston T. ECM stiffness primes the TGF $\beta$  pathway to promote chondrocyte differentiation. *Mol Biol Cell.* 2012;23(18):3731-3742.
- [22] Sheng MH, Zhou XD, Bonewald LF, et al. Disruption of the insulin-like growth factor-1 gene in osteocytes impairs developmental bone growth in mice. *Bone.* 2013;52(1):133-144.
- [23] Yeung Tsang K, Wa Tsang S, Chan D, et al. The chondrocytic journey in endochondral bone growth and skeletal dysplasia. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2014;102(1):52-73.
- [24] Li J, Dong S. The Signaling Pathways Involved in Chondrocyte Differentiation and Hypertrophic Differentiation. *Stem Cells Int.* 2016;2016:2470351.
- [25] Choi H, Choi Y, Kim J, et al. Longitudinal bone growth is impaired by direct involvement of caffeine with chondrocyte differentiation in the growth plate. *J Anat.* 2017;230(1):117-127.
- [26] Heinegård D, Saxne T. The role of the cartilage matrix in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2011;7(1):50-56.
- [27] 潘思年,杜敏联,马华梅,等. 大鼠胫骨生长板软骨细胞的体外培养及鉴定[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2009, 30(z2):1-5,10.
- [28] Mellor LF, Baker TL, Brown RJ, et al. Optimal 3D culture of primary articular chondrocytes for use in the rotating wall vessel bioreactor. *Aviat Space Environ Med.* 2014;85(8):798-804.
- [29] Xu XX, Zhang XH, Diao Y, et al. Achyranthes bidentate saponins protect rat articular chondrocytes against interleukin-1 $\beta$ -induced inflammation and apoptosis in vitro. *Kaohsiung J Med Sci.* 2017;33(2):62-68.
- [30] Avila-Rodríguez D, Paisano-Cerón K, Valdovinos-Ramírez I, et al. Three-dimensional Alginate-bead Culture of Human Pituitary Adenoma Cells. *J Vis Exp.* 2016;(108):53637.
- [31] Bhuyan MK, Rodriguez-Devora J, Tseng TL, et al. Photovoltaic surfaces enable clonal myoblastic cell release using visible light as external stimulation. *Biotechnol J.* 2016;11(3):393-398.
- [32] Huang HL, Hsing HW, Lai TC, et al. Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. *J Biomed Sci.* 2010;17:36.
- [33] 秦苏萍,李慧,李小翠,等. CIA大鼠滑膜成纤维细胞的原代培养及鉴定[J]. 免疫学杂志, 2014, 30(12): 1096-1099.