

老年小鼠踝关节软骨细胞体外分离及培养鉴定

<https://doi.org/10.12307/2022.909>贾彩霞^{1, 2, 3}, 何斯^{2, 3, 4}, 哈小琴^{2, 3}

投稿日期: 2021-10-20

采用日期: 2021-12-10

修回日期: 2022-01-24

在线日期: 2022-02-17

中图分类号:

R446; R496; R318

文章编号:

2095-4344(2022)32-05097-05

文献标识码: A

文章快速阅读:

文章特点一

△老年小鼠小关节(踝关节)软骨细胞分离培养;
△实验室改良软骨细胞提取方法。

提取: 胰酶加II胶原酶, 阶段性血清保护。

鉴定: 细胞形态; 甲苯胺蓝染色; II型胶原免疫荧光染色; 硫酸糖胺多糖水平测定; 增殖曲线。

结论: 原代、第1代和第2代软骨细胞生物学特性良好, 第1代最好。

文题释义:

软骨细胞: 位于软骨基质内的腔隙, 即软骨陷窝, 包括幼稚软骨细胞和成熟软骨细胞, 幼稚软骨细胞单个分布于软骨周边, 细胞小, 扁圆形, 随着细胞逐渐长大, 会呈现圆或椭圆形, 核小, 即成熟软骨细胞。2-8个成熟软骨细胞会聚集成群, 位于软骨中央, 称为同源细胞群, 是由一个幼稚软骨细胞分裂而成。

贴壁细胞: 这类细胞的生长必须有可以贴附的支持物表面, 并且依靠自身分泌的或培养基中添加的贴附因子才能生长繁殖, 其贴附后的形态一般为成纤维细胞样或上皮细胞样。它的生长过程一般包括游离期、贴壁期、潜伏期、对数期、平台期和衰退期。

摘要

背景: 老年小鼠的关节软骨本身存在一定的磨损, 提取难度较大; 尤其是踝关节等难以分离关节软骨面的小关节软骨细胞的提取方法更加少见。

目的: 探究实验室改良两步酶消化法提取老年小鼠踝关节软骨细胞的效果, 体外培养观察并评价其生物学特性。

方法: 选取46周龄老年BALB/c雄性小鼠踝关节, 通过实验室改良的0.25%胰酶EDTA、2 g/L II型胶原酶两步酶消化法顺序进行分离提取及体外培养。使用倒置显微镜观察细胞生长形态, 锥虫蓝染色并计数原代贴壁细胞, 甲苯胺蓝和II型胶原免疫荧光染色, 二甲基亚甲基蓝显色法测定原代贴壁细胞培养液和消化液中硫酸糖胺多糖水平, CCK-8试剂盒检测软骨细胞增殖进行软骨细胞生物学特性鉴定及评价。

结果与结论: ①关节软骨经两步酶消化后, 细胞全部解离释放, 老年小鼠每个踝关节平均收获 9×10^5 个原代贴壁细胞; 原代及第1代、第2代细胞贴壁形态为梭形和多角形; ②细胞甲苯胺蓝染色可见蓝紫色易染颗粒, II型胶原免疫荧光染色可见红色荧光阳性表达; ③原代细胞培养液和消化液中硫酸糖胺多糖分别为 (42.41 ± 15.00) , (65.63 ± 10.00) mg/L; 阴性对照中硫酸糖胺多糖分别为 (0.35 ± 3.78) , (0.21 ± 2.56) mg/L; ④原代细胞第6天细胞数量达到最大, 第1代和第2代细胞第5天达到最大, 同一时间点, 第1代细胞的细胞活力大于第2代细胞和原代细胞; ⑤结果证实: 实验室改良的两步酶消化法可成功分离老年小鼠踝关节软骨细胞, 贴壁细胞纯度高、数量多, 可成功合成和分泌II型胶原及蛋白聚糖, 具有良好的生物学特性, 其中第1代软骨细胞的活力最高, 第2代次之, 可用于实验研究。

关键词: 老年小鼠; 踝关节; 软骨细胞; 酶消化法; 细胞培养

In vitro isolation, culture and identification of chondrocytes from the ankle joint of aged miceJia Caixia^{1, 2, 3}, He Si^{2, 3, 4}, Ha Xiaojin^{2, 3}

¹School of Public Health, Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China; ²The 940th Hospital of Joint Logistics Support Force of PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China; ³Key Laboratory of Stem Cell and Gene Medicine of Gansu Province, Lanzhou 730050, Gansu Province, China; ⁴The Second Clinical Medical College of Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Jia Caixia, Master candidate, School of Public Health Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu Province, China; The 940th Hospital of Joint Logistics Support Force of PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China; Key Laboratory of Stem Cell and Gene Medicine of Gansu Province, Lanzhou 730050, Gansu Province, China

Corresponding author: Ha Xiaojin, MD, Professor, Chief physician, The 940th Hospital of Joint Logistics Support Force of PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China; Key Laboratory of Stem Cell and Gene Medicine of Gansu Province, Lanzhou 730050, Gansu Province, China

Abstract

BACKGROUND: Knee cartilage loss certainly occurs in aged mice, so it is difficult to extract the articular cartilage from the mice. In particular, it is difficult and rarely reported to extract chondrocytes from the small joint on the articular cartilage surface of the ankle joint.

¹ Lanzhou University School of Public Health, Lanzhou 730000; ² The 940th Hospital of Joint Logistics Support Force of PLA, Lanzhou 730050; ³ Key Laboratory of Stem Cell and Gene Medicine of Gansu Province, Lanzhou 730050; ⁴ Lanzhou University Second Clinical Medical College, Lanzhou 730000

First author: Jia Caixia, female, 1996 year born, Lanzhou University graduate student, Han nationality, Lanzhou University graduate student, mainly engaged in stem cell repair of damaged tissue organ basic and application research.

Corresponding author: Ha Xiaojin, PhD, professor, chief physician, The 940th Hospital of Joint Logistics Support Force of PLA, Lanzhou 730050; Key Laboratory of Stem Cell and Gene Medicine of Gansu Province, Lanzhou 730050

<https://orcid.org/0000-0002-9337-7581> (贾彩霞)

基金资助: 甘肃省拔尖领军人才培养(2020808), 项目负责人: 哈小琴; 中央高校基本科研业务费项目(31920200020), 项目负责人: 哈小琴; 兰州市人才培养创新创业项目(2016-RC-61), 项目负责人: 哈小琴

引用本文: 贾彩霞, 何斯, 哈小琴. 老年小鼠踝关节软骨细胞体外分离及培养鉴定 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(32):5097-5101.



OBJECTIVE: To explore the effect of an improved two-step enzyme digestion method to extract chondrocytes from the ankle joint of aged mice, and to observe and evaluate their biological characteristics *in vitro*.

METHODS: The ankle joints of 46-week-old mice were selected, separated and extracted sequentially by the improved two-step enzymatic digestion method in the laboratory with 0.25% pancreatin EDTA and 2g/L type II collagenase. Extracted cells were cultured *in vitro* and cell growth morphology was observed with an inverted microscope. After trypan blue staining, the number of primary adherent cells was calculated. Toluidine blue and type II collagen immunofluorescence staining was conducted. Chromogenic method using dimethyl methylene blue was used to determine the content of glycosaminoglycan sulfate in the primary adherent cell culture and digestive fluid. Proliferation of chondrocytes was detected using cell counting kit-8 to identify and evaluate the biological characteristics of chondrocytes.

RESULTS AND CONCLUSION: After the two-step enzymatic digestion of the articular cartilage, all cells were dissociated and released. An average of 9×10^5 primary adherent cells were harvested from each ankle joint of aged mice. Primary cells and the first- and second-generation cells displayed spindle and polygonal morphology. Toluidine blue staining showed blue-purple particles that were easily dyed. Type II collagen immunofluorescence staining revealed the positive expression of red fluorescence. The contents of glycosaminoglycan sulfate in the primary adherent cell culture fluid and digestive fluid were (42.41 ± 15.00) and (65.63 ± 10.00) mg/L, which were (0.35 ± 3.78) and (0.21 ± 2.56) mg/L in the negative control culture fluid and digestive fluid, respectively. The number of primary cells reached the maximum on the 6th day, and the number of the first- and second-generation cells reached the maximum on the 5th day. Meanwhile, the cell viability of the first-generation cells was greater than that of the second-generation cells and the primary cells. To conclude, the improved two-step enzymatic digestion method can successfully isolate chondrocytes from the ankle joint of aged mice. Large amounts of adherent cells with high purity and good biological characteristics can successfully synthesize and secrete type II collagen and proteoglycan. The first-generation chondrocytes have the highest viability, followed by the second-generation cells, which can be used for experimental research.

Key words: aged mice; ankle joint; chondrocyte; enzyme digestion method; cell culture

Funding: the Top-notch and Leading Talents in Gansu Province, No. 2020808 (to HXQ); the Fundamental Research Funds for the Central Universities, No. 3192020020 (to HXQ); Lanzhou Municipal Talent Training Innovation and Entrepreneurship Project, No. 2016-RC-61 (to HXQ)

How to cite this article: JIA CX, HE S, HA XQ. *In vitro* isolation, culture and identification of chondrocytes from the ankle joint of aged mice. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(32):5097-5101.

0 引言 Introduction

目前,国内外软骨细胞的提取多集中于临床关节损伤患者的软骨组织,以及山羊、兔、大鼠等较大动物的股骨、肱骨、肋骨关节等大关节,且动物周龄小,多为幼年期^[1-10]。在体外骨性关节炎等关节损伤实验研究中,多是为诱导建立软骨细胞损伤模型,其病理损伤发生发展过程与中老年人关节软骨细胞损伤的病理进程会存在一定的偏差^[9]。而老年小鼠的关节软骨和中老年人关节软骨的变化过程较为一致,随着年龄的增长和外界因素的刺激关节软骨磨损,发生退行性病变,从而导致骨性关节炎等关节损伤疾病的发生^[11-25]。因此,提取老年小鼠的关节软骨细胞用于探究好发于中老年人的关节退行性病变过程,以及寻找软骨损伤修复的有效手段,其病理生理特征更加符合,结果也更加合理。但是,老年小鼠的关节软骨本身存在一定的磨损,提取难度较大,相关提取方法的研究较少,尤其是踝关节等难以分离关节软骨面的小关节软骨细胞的提取方法更加少见。

课题组参考现有文献报道的软骨细胞分离方法^[2-3, 26-34],再结合老年小鼠踝关节的解剖特点及生理特点,在此次实验中改良了酶的作用时间、离心参数、基础培养液的配比,采用0.25%胰酶 EDTA、2 g/L 的 II 型胶原酶两步酶消化法提取老年小鼠踝关节软骨细胞。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞培养实验观察。

1.2 时间及地点 实验于 2021 年 8-10 月在中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院完成。

1.3 材料

1.3.1 主要试剂 杜氏改良 Eagle 培养基 / 营养混合物 F-12Ham(Sigma, 美国); 0.25% 胰酶 EDTA(天津灏洋, 中国); 胎牛血清(赛维, 中国); 青霉素-链霉素溶液(碧云天, 中国); 格氏平衡盐溶液(中科迈晨, 中国); II 型胶原酶

(索莱宝, 中国); 体液糖胺多糖(GAG)总含量二甲基亚甲基蓝(DMMB)比色法定量检测试剂盒(上海杰美基因, 中国); CCK-8 试剂盒(Biosharp, 中国)。

1.3.2 主要仪器 细胞培养箱、生物安全柜(Thermo Fisher, 美国); 倒置显微镜(徕卡, 德国); 离心机(湘仪, 中国)。

1.3.3 试剂配制 基础培养液: 体积分数 30% 胎牛血清 +1% 青霉素-链霉素溶液 +69% 杜氏改良 Eagle 培养基 / 营养混合物 F-12Ham; 2 g/L II 型胶原酶: 100 mg II 型胶原酶 +50 mL 杜氏改良 Eagle 培养基 / 营养混合物 F-12Ham。

1.3.4 实验动物 3 只 46 周龄 BALB/c 雄性小鼠, 由联勤保障部队第九四〇医院动物实验中心提供, SPF 级, 实验动物使用许可证号: SYXK(军)2017-0047, 实验动物生产许可证号: SCXK(军)2017-0023, 实验动物批号: 20210506, 平均体重 29.3 g, SPF 级环境饲养, 正常饮食饮水。

1.4 实验方法

1.4.1 取材 将小鼠按体质量 10 mg/kg 的剂量用 0.1% 戊巴比妥钠麻醉, 剪取后肢完整踝关节 6 个, 踝关节上下保留 3 mm, 放入体积分数 75% 乙醇中浸泡 30 min。

1.4.2 实验室改良两步酶消化法提取软骨细胞 无菌环境下, 格氏平衡盐溶液洗去踝关节上的体积分数 75% 乙醇, 于放大镜下, 在加入了基础培养液的培养皿中剥去皮毛, 用手术刀切去韧带和肌肉组织, 剪去多余骨头, 保留踝关节完整的 4 个关节软骨面, 处理完的踝关节软骨组织大小约为 1 mm×0.25 mm×1 mm。

止血钳夹碎软骨组织, 反复多次, 直至无硬颗粒, 移入 35 mm² 培养皿中, 第 1 步: 加入已在 37 °C 中温育 30 min 的 0.25% 胰酶 EDTA 1 mL, 在体积分数 5% CO₂ 37 °C 细胞培养箱中消化 15 min。将消化液经 70 μm 细胞筛过滤到已加入基础培养液的 50 mL 离心管中, 800×g 8 min 离心, 弃去上清, 加入 2 mL 基础培养液悬浮细胞沉淀。第 2 步: 在培养皿中加入 2 g/L II 型胶原酶 1 mL, 放入体积分数 5% CO₂ 37 °C 细

胞培养箱中消化。5 min 后，取出培养皿，吹打 1 min，将消化液经 70 μm 细胞筛过滤到已加入基础培养液的 50 mL 离心管中，800 \times g 8 min 离心，弃去上清，加入 2 mL 基础培养液悬浮细胞沉淀。培养皿中加入 2 g/L II 型胶原酶 1 mL，放入体积分数 5%CO₂ 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱继续消化，5 min 后，重复上述步骤，直至大体观察到组织消化成少许絮状纤维，镜下观察纤维中无包裹的细胞为止。消化时长为 4 h。细胞悬浮液混匀放入体积分数 5%CO₂ 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中培养，4 h 后观察，待细胞爬满至 80% 时传代，传代后的第 1 代和第 2 代细胞 1 050 r/min 离心 5 min 收集，继续于体积分数 5%CO₂ 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中培养，8 h 后观察。

小鼠软骨细胞的培养及鉴定

研究目的:	探究实验室改良两步酶消化法提取老年小鼠踝关节软骨细胞的效果，体外培养观察并评价其生物学特性
细胞来源:	小鼠软骨细胞来自 BALB/c 雄性小鼠踝关节
添加材料:	0.25% 胰酶 EDTA，基础培养液，2 g/L II 型胶原酶
原代培养时间:	消化时长为 4 h，细胞悬浮液混匀放入体积分数 5%CO ₂ 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中培养，4 h 后观察
细胞传代:	原代细胞 6 d 传代 1 次，第 1 代和第 2 代细胞 5 d 传代 1 次
细胞鉴定:	倒置显微镜观察细胞生长形态；锥虫蓝染色并计数原代贴壁细胞；甲苯胺蓝和 II 型胶原免疫荧光染色，二甲基亚甲蓝显色法测定原代贴壁细胞培养液和消化液中硫酸糖胺多糖水平；CCK-8 细胞增殖检测进行软骨细胞生物学特性鉴定
伦理学批准:	实验方案经中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院动物实验伦理委员会批准 (2020KYLL042)

1.4.3 甲苯胺蓝染色 取生长至第 7 天的原代软骨细胞，弃去培养液，PBS 漂洗 3 次，40 g/L 多聚甲醛于 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 24 h。蒸馏水清洗 3 次，洗去 40 g/L 多聚甲醛后，加入 1% 甲苯胺蓝染色液，静置 1 h，蒸馏水洗去甲苯胺蓝染色液，体积分数 95% 乙醇脱水，中性树胶封固，倒置显微镜下观察。

1.4.4 II 型胶原免疫荧光染色 取 2 cm \times 2 cm 正方形盖玻片，在体积分数 75% 乙醇中浸泡 6 h 后取出，待乙醇挥发后，放置于 6 孔板中。取原代软骨细胞，以 2 \times 10⁵/孔的细胞密度接种于 6 孔板，体积分数 5%CO₂ 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱培养，2 d 换液 1 次，待细胞爬满至 80% 时，弃去培养液，PBS 轻柔漂洗 3 次，缓缓加入 3 mL 40 g/L 多聚甲醛，常温固定 15 min，加入 80 μL 破膜工作液，室温孵育 20 min，PBS 漂洗 3 次，3% BSA 室温封闭 30 min，加入兔抗 II 型胶原单克隆抗体，4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜，再加入 Cy3 标记的山羊抗兔 IgG 多克隆抗体，室温孵育 50 min，PBS 清洗，DAPI 复染细胞核，避光孵育 10 min，封固，荧光显微镜下拍照观察。

1.4.5 二甲基亚甲蓝显色法测定原代贴壁细胞外基质中硫酸糖胺多糖水平 收集生长至第 7 天的原代贴壁细胞培养液 6 mL，贴壁细胞用 0.25% 胰酶 EDTA 消化，基础培养液终止，共收集细胞消化液 6 mL。阴性对照使用基础培养液和添加了 0.25% 胰酶 EDTA 的基础培养液，0.25% 胰酶 EDTA 添加比例

与细胞消化液中的一致。使用体液糖胺多糖总含量二甲基亚甲蓝比色法定量检测试剂盒，按照说明书测定细胞培养液和细胞消化液及阴性对照中的硫酸糖胺多糖水平。

1.4.6 细胞增殖检测 取原代、第 1 代及第 2 代软骨细胞，以 2 \times 10⁴/孔的细胞密度接种于 96 孔板，每代细胞做 5 个复孔，在体积分数 5%CO₂ 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱培养过夜后，每天同一时间加入混有 20 μL CCK-8 溶液的基础培养液，于体积分数 5%CO₂ 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱培养 2 h 后，在酶标仪 450 nm 波长处检测吸光度值，连续 7 d，以时间为横坐标、吸光度值为纵坐标，绘制不同代数软骨细胞的增殖曲线。

1.5 主要观察指标 ①组织消化结果；②细胞形态；③甲苯胺蓝染色、II 型胶原免疫荧光染色结果；④细胞培养液和消化液中硫酸糖胺多糖水平；⑤细胞增殖曲线。

1.6 统计学分析 GraphPad Prism 8.0.1 软件进行数据分析及统计图绘制，近似服从正态分布的定量资料使用 $\bar{x}\pm s$ 描述。

2 结果 Results

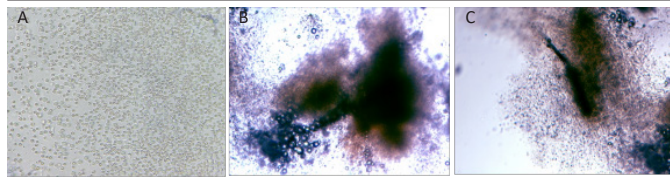
2.1 倒置显微镜下观察组织消化结果 第 1 步消化完后，镜下可见少许游离细胞，呈圆球形、透亮、大小较均一，组织块相互黏着，组织块中包裹的细胞较少。第 2 步消化 30 min 后，消化液中可见大量游离细胞，见图 1A；细胞呈圆球形、透亮、大小较均一，组织块依旧相互黏着，其中可见较多包裹的细胞团，少许组织块边缘可见马鬃样排列的粗大纤维，见图 1B, C。4 h 时，大体可见培养皿中组织已成散在絮状纤维，镜下可见大量马鬃样排列粗大纤维，纤维中未见包裹的细胞，消化液中可见大量游离细胞，呈圆球形、透亮、大小较均一，此时，消化液黏稠、透光度差。

2.2 培养计数结果及倒置显微镜下观察细胞形态 原代细胞于 8-48 h 后开始贴壁，此时大部分细胞仍是圆球形、透亮，少部分细胞已伸展，见图 2A。72 h 之后，大部分细胞开始铺伸，伸出生长突，呈扇形，有的细胞可伸出多个伪足，此时细胞在镜下呈三角形、多角形或梭形，细胞内可看到两三个核仁，呈圆形；其余小部分细胞为圆球形、透亮、胞体丰满、胞浆均匀，胞内可见折光颗粒。96 h 后，细胞均已铺伸成梭形，见图 2B。原代贴壁细胞消化后，进行锥虫蓝试剂染色细胞计数板计数，老年小鼠 6 个踝关节活细胞总数为 5.4 \times 10⁶ 个。第 1 代和第 2 代细胞 4 h 后贴壁，12 h 后均铺伸成梭形。

2.3 甲苯胺蓝染色结果 倒置显微镜下，细胞核呈圆形、深蓝色，胞浆浅蓝色，其内可见蓝紫色异染颗粒，见图 3A。

2.4 II 型胶原免疫荧光染色结果 荧光显微镜下，可见蓝色细胞核，周围有明显呈红色荧光的 II 型胶原阳性表达，分布于细胞膜及细胞浆中，见图 3B。

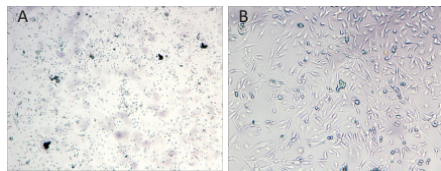
2.5 原代贴壁细胞培养液和消化液中硫酸糖胺多糖水平 硫酸糖胺多糖标准品标准曲线方程为 $y=0.139 2x+0.128 5$ ($R^2=0.988 3$)；原代细胞培养液和消化液中硫酸糖胺多糖水平分别为 (42.41 \pm 15.00)，(65.63 \pm 10.00) mg/L；阴性对照中硫酸糖胺多糖水平分别为 (0.35 \pm 3.78)，(0.21 \pm 2.56) mg/L。



图注：图 A 为消化液中游离细胞；B 可见包裹大量细胞团的粗大纤维网；C 可见细胞脱落后马鬃样排列的粗大纤维

图 1 | 倒置显微镜下观察组织消化结果 (×200)

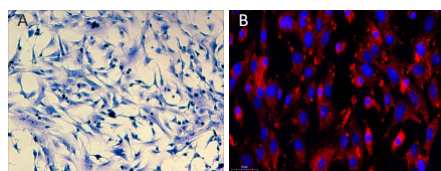
Figure 1 | Observation of tissue digestion under an inverted microscope (×200)



图注：图 A 为 8-48 h 后贴壁软骨细胞 (×40)；B 为 96 h 后铺伸成梭形的软骨细胞 (×100)

图 2 | 倒置显微镜下观察原代细胞形态

Figure 2 | Cell morphology under an inverted microscope

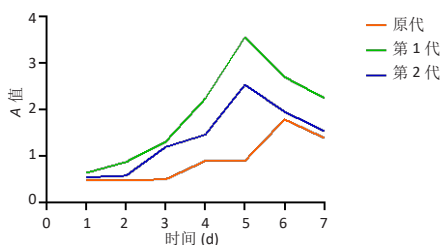


图注：图 A 为甲苯胺蓝染色，细胞核呈圆形，可见蓝紫色易染颗粒；B 为免疫荧光染色，可见原代软骨细胞中 II 型胶原阳性表达

图 3 | 倒置显微镜下细胞甲苯胺蓝染色 (×100) 和荧光显微镜观察 II 型胶原免疫荧光染色 (×200)

Figure 3 | Toluidine blue staining (×100) under an inverted microscope and immunofluorescence staining of type II collagen under a fluorescence microscope (×200)

2.6 细胞增殖曲线 原代软骨细胞增殖较缓慢，前 5 d 时间里，细胞多呈梭形网状交织分布，第 6 天时，细胞数量可达最大，呈铺路石样铺满孔底。第 1 代和第 2 代软骨细胞增殖速度大致相同，细胞数量均在第 5 天达到最大，但在同一时间里，第 1 代软骨细胞的活力高于第 2 代软骨细胞，高于原代软骨细胞，见图 4。



图注：图为软骨细胞的增殖及细胞活力变化

图 4 | 软骨细胞增殖曲线

Figure 4 | Proliferation curve of chondrocytes

3 讨论 Discussion

此次实验发现，第 1 步 0.25% 胰酶 EDTA 消化后，已经有游离软骨细胞，镜下观察到其具有典型的软骨细胞形态，呈圆球形、透亮。第 2 步 II 型胶原酶消化时，每 5 min 移取消化液于基础培养液中并离心悬浮，可保护细胞免受酶的毒性损伤，减少细胞死亡率和贴壁失败率。细胞离心过程中发现，常用的 1 000 r/min 5 min 离心条件离心原代细胞时，上清中会漂浮较多细胞，采用 800×g 8 min 时可将所有消化下

来的原代细胞离心聚集。第 1 代和第 2 代细胞在 1 050 r/min 5 min 时可成功离心。

细胞培养中发现，软骨细胞贴壁时间最短为 4 h，最长为 72 h，大部分细胞的贴壁时间集中于 8-48 h。组织刚消化完时，镜下可见大量细胞，在后续培养过程中，细胞大部分能贴壁，少部分一直悬浮，锥虫蓝试剂检测悬浮细胞未蓝染，未贴壁细胞为活细胞，离心该部分细胞，在新培养皿中培养，细胞成功贴壁，由此可见，之前未贴壁原因为细胞密度过大。

小鼠的踝关节软骨面非常小，单凭大体观察分离难度很大，而老年小鼠的关节软骨本身有一定的损伤，要分离完整单一的软骨面非常难实现，因此，此次实验中软骨面的分离全程在放大镜下进行。对细胞的培养计数和形态观察、甲苯胺蓝染色及 II 型胶原免疫荧光染色结果表明，此次实验采用的老年小鼠踝关节软骨取样方法及实验室改良的两步酶消化法可获得大量高纯度的老年小鼠踝关节软骨细胞，且原代细胞贴壁铺伸能力好，可合成和分泌 II 型胶原，其分布主要位于细胞膜和细胞浆。对贴壁软骨细胞培养液和消化液中硫酸糖胺多糖的含量测定结果也表明，该方法获得的老年小鼠踝关节软骨细胞具有良好的合成和分泌蛋白多糖聚体的生物学特性，而软骨细胞的增殖曲线也显示，第 1 代细胞的活力是最好的，其次是第 2 代，并且第 1、2 代细胞的生长速度也比原代要快。不过，该研究只是做了老年小鼠踝关节软骨细胞的提取分离和鉴定，没有进一步做其他功能方面的验证，也没有进一步探究机制，所以，它是否可作为种子细胞及在体内、外实验中较好地用于机制研究，还待进一步实验验证。

现有常用软骨细胞提取方法是沿用 GREEN 法^[27]、KLAGSBRUN 法^[28]、SHINOMURA 法或对其改良^[29]，消化时间 3-24 h 不等。软骨取材主要是人的软骨，以及兔、牛、羊、猪、狗、马和鸡等大型动物，大鼠和小鼠也有研究，这些动物软骨取材多集中于大关节，或多为幼年动物。然而，这些软骨取材消化提取的软骨细胞，其增殖能力依然有限，扩增达到一定量后会去分化或增殖衰老，分泌 II 型胶原和蛋白多糖聚体的活性在第 2 代就会出现明显的下降，到第 3 代和第 4 代时生物学功能已严重衰退^[35-41]，不论是在临床上作为种子细胞进行软骨修复，或是在实验中进行软骨损伤发生发展机制研究及治疗手段的探究，其体外培养的局限性使得软骨细胞仍需要在来源和分离提取条件上不断去探索。

老年小鼠年龄大，各器官及相应功能衰退，本身会自发一些疾病，其病理发展特征与中老年人慢性退行性疾病的病理特征更加相似和符合，而好发于中老年人负重小关节的退行性骨性关节炎和其他关节损伤疾病，相较于幼年鼠，其与老年小鼠小关节软骨细胞的退行性病变与损伤更为相似。因此，成功分离提取数量大、纯度高、生物学特性良好的老年小鼠踝关节软骨细胞，可为探究骨性关节炎等好发于中老年人关节软骨退行性病变的机制，和寻找确切有效的治疗手段提供一个参考依据。此外，也可作为种子细胞，进行软骨组织工程的研究，为软骨损伤的修复重建提供一个参考依据。

作者贡献: 实验设计和评估为哈小琴, 实验实施为贾彩霞和何斯, 数据分析和文章撰写为贾彩霞。实验评估非盲法评估。

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中不存在利益冲突。

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 4.0”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。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 文章撰写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》, 出版前经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次文字和图表查重, 经小同行外审专家双盲审稿, 同行评议认为符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] ZHANG Y, GUO WM, WANG MG, et al. Co-culture systems-based strategies for articular cartilage tissue engineering. *J Cell Physiol.* 2018;233(3):1940-1951.
- [2] WANG HR, ZHU ZH, WU JN, et al. Effect of type II diabetes-induced osteoarthritis on articular cartilage aging in rats: A study in vivo and in vitro. *Exp Gerontol.* 2021;150:111354.
- [3] LIAO YH, LONG JS T, GALLO CJR, et al. Isolation and Culture of Murine Primary Chondrocytes: Costal and Growth Plate Cartilage. *Methods Mol Biol.* 2021;2230:415-423.
- [4] WANG RK, JIANG W, ZHANG L, et al. Intra-articular delivery of extracellular vesicles secreted by chondrogenic progenitor cells from MRL/MpJ superhealer mice enhances articular cartilage repair in a mice injury model. *Stem Cell Res Ther.* 2020;11(1):1-14.
- [5] RUAN G, XU J, WANG K, et al. Associations between knee structural measures, circulating inflammatory factors and MMP13 in patients with knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2018;26(8):1063-1069.
- [6] TAN SHARON SH, TJIO CKE, WONG JRY, et al. Mesenchymal Stem Cell Exosomes for Cartilage Regeneration: A Systematic Review of Preclinical In Vivo Studies. *Tissue Eng Part B Rev.* 2018;233(3):1940-1951.
- [7] KAROL J, ALINA J, BARBARA B. Cell cultures in drug discovery and development: The need of reliable in vitro-in vivo extrapolation for pharmacodynamics and pharmacokinetics assessment. *J Pharm Biomed Anal.* 2018;147:297-312.
- [8] LAVENDER C, SINAADIL SA, SINGH V, et al. Autograft Cartilage Transfer Augmented With Bone Marrow Concentrate and Allograft Cartilage Extracellular Matrix. *Arthrosc Tech.* 2020;9(2):e199-e203.
- [9] ALTMAN RD, MANJOO A, FIERLINGER A, et al. The mechanism of action for hyaluronic acid treatment in the osteoarthritic knee: a systematic review. *BMC Musculoskeletal Disord.* 2015;16:321.
- [10] CHANG KV, HUNG CY, ALIWARGA F, et al. Comparative effectiveness of platelet-rich plasma injections for treating knee joint cartilage degenerative pathology: a systematic review and meta-analysis. *Arch Phys Med Rehabil.* 2014;95(3):562-575.
- [11] ZHOU QF, CAI YZH, JIANG YZ, et al. Exosomes in osteoarthritis and cartilage injury: advanced development and potential therapeutic strategies. *Int J Biol Sci.* 2020;16(11):1811-1820.
- [12] XIE F, LIU YL, CHEN XY, et al. Role of MicroRNA, LncRNA, and Exosomes in the Progression of Osteoarthritis: A Review of Recent Literature. *Orthop Surg.* 2020;12:708-716.
- [13] LI JS, DING ZY, LI YZ, et al. BMSCs-Derived Exosomes Ameliorate Pain Via Abrogation of Aberrant Nerve Invasion in Subchondral Bone in Lumbar Facet Joint Osteoarthritis. *J Orthop Res.* 2020;38(3):670-679.
- [14] ZHANG R, MA J, HAN J, et al. Mesenchymal stem cell related therapies for cartilage lesions and osteoarthritis. *Am J Transl Res.* 2019;11(10):6275-6289.
- [15] RYU JH, CHUN JS. Opposing roles of WNT-5A and WNT-11 in interleukin-1beta regulation of type II collagen expression in articular chondrocytes. *J Biol Chem.* 2006;281(31):22039-22047.
- [16] KOROSTYNSKI M, MALEK N, PIECHOTA M, et al. Cell-type-specific gene expression patterns in the knee cartilage in an osteoarthritis rat model. *Funct Integr Genomics.* 2018;18(1):79-87.
- [17] WATT FE. Osteoarthritis biomarkers: year in review. *Osteoarthritis Cartilage.* 2018;26(3):312-318.
- [18] MI B, LIU G, ZHOU W, et al. Identification of genes and pathways in the synovia of women with osteoarthritis by bioinformatics analysis. *Mol Med Rep.* 2018;17(3):4467-4473.
- [19] MOON SM, SA LE, HAN SH, et al. Aqueous extract of codium fragile alleviates osteoarthritis through the MAPK/NF- κ B pathways in IL-1 β -induced rat primary chondrocytes and a rat osteoarthritis model. *Biomed Pharmacother.* 2018;97:264-270.
- [20] LI ZM, LI M. Improvement in orthopedic outcome score and reduction in IL-1 β , CXCL13, and TNF- α in synovial fluid of osteoarthritis patients following arthroscopic knee surgery. *Genet Mol Res.* 2017;16(3):16039487.
- [21] WALY NE, REFAIY A, ABOREHAB NM. IL-10 and TGF- β : roles in chondroprotective effects of glucosamine in experimental osteoarthritis?. *Pathophysiology.* 2017;24(1):45-49.
- [22] BARRETO G, SENTURK B, COLOMBO L, et al. Lumican is upregulated in osteoarthritis and contributes to TLR4-induced pro-inflammatory activation of cartilage degradation and macrophage polarization. *Osteoarthritis Cartilage.* 2020;28(1):92-101.
- [23] MORELAND LW. Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action. *Am J Transl Res.* 2003;5(2):54-67.
- [24] 郑晓芬. 骨关节炎发病机制和治疗的最新进展 [J]. *中国组织工程研究*, 2017,21(20):3255-3262.
- [25] HOSEIN PJ, MARAGULIA JC, SALZBERG MP, et al. A multicentre study of primary breast diffuse large B-cell lymphoma in the rituximab era. *Br J Haematol.* 2014;165(3):358-363.
- [26] ZHAO C, JIN YP, WEN M, et al. Exosomes from adipose-derived stem cells promote chondrogenesis and suppress inflammation by upregulating miR-145 and miR-221. *Mol Med Rep.* 2020;21(4):1881-1889.
- [27] GREEN WT. Behavior of articular chondrocytes in cell culture. *Clin Orthop.* 1971;75:248-260.
- [28] KLAGSBRUN M. Large-scale preparation of chondrocytes. *Methods Enzymol.* 1979;58:560-564.
- [29] SHIMOMURA Y, YONEDA T, SUZUKI F. Osteogenesis by chondrocytes from growth cartilage of rat rib. *Calcif Tissue Res.* 1975;19:179-187.
- [30] QI H, LIU DP, XIAO DW, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells inhibit mitochondrial dysfunction-induced apoptosis of chondrocytes via p38, ERK, and Akt pathways. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2019;55(3):203-210.
- [31] 魏钰, 魏民. 人骨关节炎软骨细胞的体外分离与培养 [J]. *中国组织工程研究*, 2019,23(25):4056-4061.
- [32] 李文辉. 软骨组织工程种子细胞及其培养方法 [J]. *中华创伤骨科杂志*, 2003,5(3):90-92.
- [33] 杜国庆, 桑晓文, 王楠, 等. 大鼠半月板纤维软骨细胞的体外培养和生物学特征鉴定 [J]. *现代生物医学进展*, 2019,19(15):2829-2833.
- [34] NIPHA C, PHONGSAKORN K, PARINYA N. Three-dimensional cell culture systems as an in vitro platform for cancer and stem cell modeling. *World J Stem Cells.* 2019;11(12):1065-1083.
- [35] 刘小荣, 张笠, 高武, 等. 新西兰兔关节软骨细胞分离培养与鉴定的实验研究 [J]. *国际检验医学杂志*, 2012,33(19):2307-2308.
- [36] RODRIGUES A, PAP S. The effect of long-term culture on the ability of human articular chondrocytes to generate tissue engineered cartilage// Stard GB, Horch R, Tanczos E (eds). *Biological matrices And tissue Reconstruction.* 1998:163-168.
- [37] SCHIPHOF D, VAN DEN DRIEST JJ, RUNHAAR J. Osteoarthritis year in review 2017: rehabilitation and outcomes. *Osteoarthritis Cartilage.* 2018;26(3):326-340.
- [38] DEHNE T, KARLSSON C, RINGE J, et al. Chondrogenic differentiation potential of osteoarthritic chondrocytes and their possible use in matrix-associated autologous chondrocyte transplantation. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(5):R133.
- [39] HE P, ZHANG Z, LIAO W, et al. Screening of gene signatures for rheumatoid arthritis and osteoarthritis based on bioinformatics analysis. *Mol Med Rep.* 2016;14(2):1587-1593.
- [40] LIU Y, JING J, YU H, et al. Expression profiles of long non-coding RNAs in the cartilage of patients with knee osteoarthritis and normal individuals. *Exp Ther Med.* 2021;21(4):365-375.
- [41] GIBSON AL, HUI MC, FOOTE AT, et al. Wnt7a inhibits IL-1 β induced catabolic gene expression and prevents articular cartilage damage in experimental osteoarthritis. *Sci Rep.* 2017;7:41823.

(责任编辑: WZH, ZN, ZJP)