



改良组织块法分离培养兔成纤维样滑膜细胞

陈芳¹, 刘琴¹, 王丽平¹, 陈利峰², 张宜¹

(1. 解放军广州军区武汉总医院医学实验科, 武汉 430070;
2. 解放军广州军区武汉总医院中西医结合科, 武汉 430070)

【摘要】目的 通过改良组织块细胞培养法,建立一种简单、可行的兔成纤维样滑膜细胞体外培养方法。方法 无菌条件下取正常兔膝关节滑膜组织,剔净后剪成碎块,用灭菌滤纸吸掉组织上附着的水分,碎片接种于培养皿,观察细胞生长状况及形态特征。取第3代对数期细胞,用CCK-8法绘制其生长曲线,并用免疫荧光法检测波形蛋白的表达情况。**结果** 体外培养的兔成纤维样滑膜细胞形态为长梭形纤维样,细胞生长力较旺盛,生长曲线为典型的“S”型,免疫荧光检测显示第3代细胞强表达波形蛋白。**结论** 改良组织块法可以分离培养出兔成纤维样滑膜细胞,方法简便,成功率高,满足实验要求。

【关键词】 改良组织块法;兔成纤维滑膜细胞;分离;培养

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 04-0075-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.04.014

Primary culture of rabbit fibroblast-like synoviocytes using an improved explant culture method

CHEN Fang¹, LIU Qin¹, WANG Li-ping¹, CHEN Li-feng², ZHANG Yi¹

(1. Department of Medical Experiments, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Command, Wuhan 430070, China;
2. Department of Integrated Traditional and Western Medicine, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Command, Wuhan 430070, China)

【Abstract】 Objective To establish an easier and better method for primary culture of rabbit fibroblast-like synoviocytes (FLS) by modified tissue cell culture. **Method** Healthy rabbit joint synovial layers were cut into small pieces and siphoned off water attached on the tissue with sterile filter paper and then cultured. The growth status and morphology were observed. The growth curve of the 3rd passage cells was measured by CCK-8 assay, and the expression of vimentin was detected by immunocytochemistry. **Results** The FLS cultured in vitro exhibited a spindle-shaped appearance and could rapidly expand. The cell growth curve was typical of S type, and the cells highly expressed vimentin. **Conclusions** Primary culture of rabbit FLS by the improved explant culture method is successfully established. The method is simple and highly efficient. It provides a new method for isolation of FLS.

【Key words】 Improved explant culture method; Rabbit fibroblast-like synoviocytes; Isolation; Culture

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以多关节滑膜炎为主要特征的慢性、系统性自身免疫性疾病,其确切的病因还不完全确定,该病主

要侵犯全身各处关节,致残率很高,严重危害着人类健康。关节囊分为内外两层,外层为结缔组织,内层较疏松,称为滑膜,滑膜表面有 2~4 层扁平或

[作者简介] 陈芳 (1979 -), 女, 主要研究方向: 细胞生物学及药效学研究, E-mail: wpcf401717@163.com。

[通讯作者] 张宜 (1966 -), 男, 主任药师, 主要研究方向: 药剂学及药物信息学研究, E-mail: hbpizy@tom.com。

立方形的上皮样结缔组织细胞,即为滑膜细胞,成纤维细胞样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocytes, FLS)为滑膜中最主要的细胞,它参与滑膜增生和组织蛋白酶的分泌,与 RA 晚期关节损伤有着密切的关系^[1,2]。关节滑膜是 RA 发病的靶器官,滑膜过度增生、增厚是造成关节损伤的主要病理基础之一^[3,4]。因此,建立 FLS 的体外培养方法是探寻 RA 发病机制与体外筛选药物的重要手段。本研究应用改良组织块法,体外分离培养兔成纤维样滑膜细胞,并从细胞形态学、波形蛋白免疫荧光染色等方面予以鉴定,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

试剂及仪器	来源
DMEM 高糖培养基	Hyclone
胎牛血清	杭州四季青生物工程材料有限公司
胰酶	碧云天
青霉素-链霉素双抗	Hyclone
PBS	Hyclone
CCK-8	碧云天
小鼠 Vimentin 抗体	武汉博士德生物工程有限公司
倒置显微镜	日本奥林巴斯
CO ₂ 细胞培养箱	日本 SANYO 仪器 MCO-175
生物安全柜	海尔
倒置荧光显微镜	日本奥林巴斯
细胞计数器	香港基因生物医学科技有限公司
酶标分析仪	深圳雷杜生命科学股份有限公司

实验动物:健康新西兰大白兔 3 只,雌雄不限,体质量 2.5 ~ 3.0 kg,清洁级,由武汉市新洲区万千佳禾实验动物养殖场提供【SCXK(鄂)2011-0011】,本实验在广州军区武汉总医院医学实验科动物实验设施内进行【SYXK(鄂)2014-0082】。实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。

1.2 方法

1.2.1 成纤维样滑膜细胞的分离培养:新西兰大白兔一只,耳缘静脉注射空气处死。75% 酒精浸湿膝关节,去皮,1% 碘伏与 75% 酒精依次消毒,分离肌肉,露出膝盖骨,继续向下分离,找出关节囊,用手术剪分离关节囊的滑膜层和纤维层,取出平滑光亮的滑膜层组织,将滑膜组织放入含 100 U/mL 青霉素、0.1 mg/mL 链霉素的 PBS 中。移入超净台中,用含 100 U/mL 青霉素、0.1 mg/mL 链霉素的 PBS 洗 3 次,用灭菌滤纸吸掉组织上附着的水分,剪成 1 ~ 5 mm³ 大小,置入 3.5 cm 平皿中,每皿 7 ~ 8 块滑膜组织块,温箱内放置 5 min 后,加入 1 mL 含 100

U/mL 青霉素、0.1 mg/mL 链霉素、10% 胎牛血清的 DMEM-H 培养液,放入 37℃、5% CO₂ 培养箱内培养。培养 24 h 后每皿轻轻补加 1 mL 含 100 U/mL 青霉素、0.1 mg/mL 链霉素、10% 胎牛血清的 DMEM-H 培养液,倒置显微镜下观察细胞的生长形态并照相。4 ~ 5 d 后进行首次换液,12 ~ 14 d 后细胞达到 90% 融合,用含 0.25% EDTA 的胰酶进行 1:2 传代。

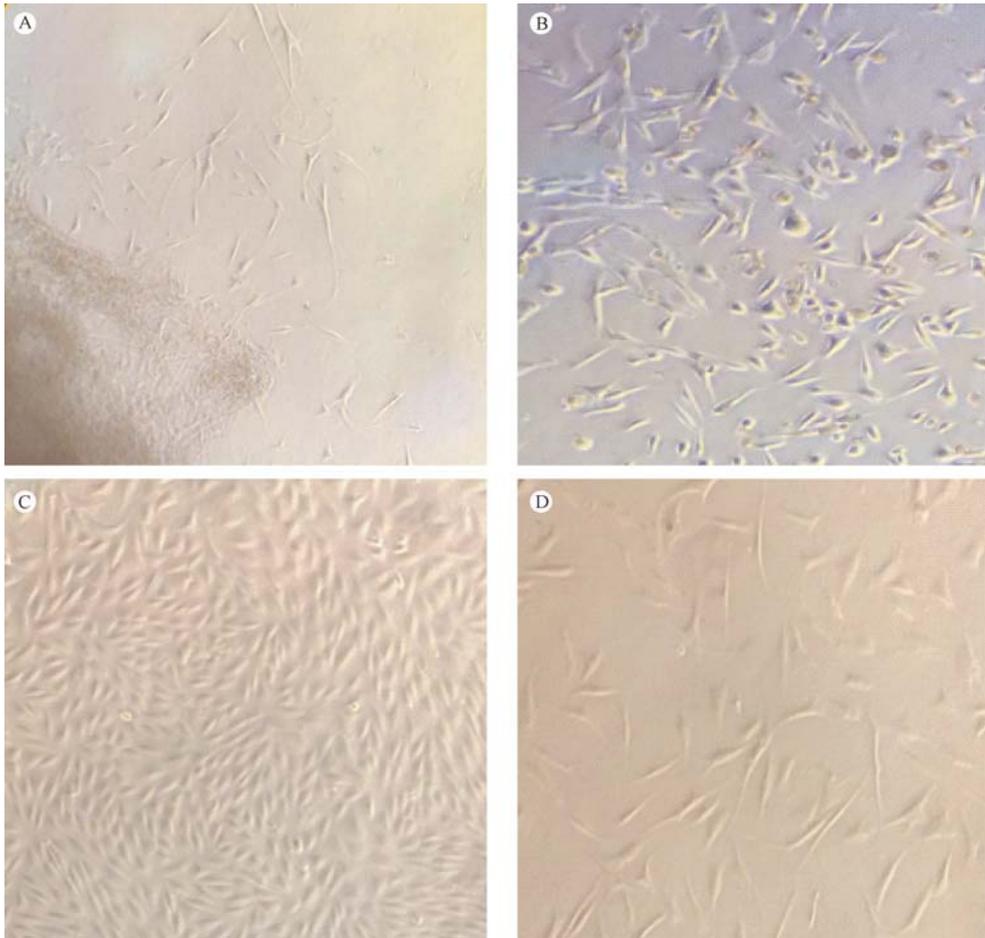
1.2.2 细胞生长曲线的测定:取第 3 代细胞,按 1 × 10³/孔接种到 96 孔培养板内,每组设置 5 个复孔,放在 37℃、5% CO₂ 培养箱内培养,分别于培养 1、2、3、4、5、6、7d 后随机取出一组,按照 CCK-8 试剂盒操作说明,在酶标仪上检测每孔 A 值,绘制细胞生长曲线。

1.2.3 细胞鉴定:取第 3 代细胞,按 1 × 10⁵/孔接种含有爬片的 6 孔板中,细胞培养 48 h 后,吸出培养液,用 PBS 洗 2 遍,加入 4% 多聚甲醛固定液于 4℃ 固定 30 min。PBS 洗 3 次,0.5% Triton X-100 室温通透 20 min。PBS 浸洗玻片 3 次,每次 3 min,吸水纸吸干 PBS,在玻片上滴加山羊血清,室温封闭 30 min。吸水纸吸掉封闭液,不洗,滴加足够量的 vimentin 一抗(1:100 稀释)并放入湿盒,4℃ 孵育过夜。PBS 洗 3 次,吸水纸吸干爬片上多余液体,滴加稀释好的荧光(Cy3)标记羊抗小鼠 IgG(1:100 稀释),湿盒中 20℃ ~ 37℃ 孵育 1 h, PBS 洗 3 次。滴加 DAPI 避光孵育 5 min,进行染核, PBST 5 min × 4 次洗去多余的 DAPI。用吸水纸吸干爬片上的液体,用含抗荧光淬灭剂的封片液封片,然后在荧光显微镜下观察采集图像。

2 结果

2.1 细胞形态观察

改良组织块贴壁接种 3 ~ 4 d 后,在光学显微镜下可见组织块周围有大量的亮点,少量细胞生长,有长梭形、圆形和不规则的多角形,但以长梭形为主(图 1A)。7 ~ 8 d 后,在光学显微镜下可见大量细胞生长,细胞形态以长梭形为主,仍然存在少数多角形和圆形细胞(图 1B)。9 ~ 10 d 后用 1 mL 枪头轻轻吸出组织块。15 ~ 20 d,细胞数量明显增多,达到 90% 融合,形态为以典型的长梭形为主(图 1C)。培养出来的细胞传至 P3 时,可见成纤维细胞样细胞多为长梭形且分布均匀(图 1D)。



注:A. 原代培养 3~4 d; B. 原代培养 7~8 d; C. 原代培养 15~20 d; D. 第 3 代细胞。

图 1 原代兔成纤维样滑膜细胞培养(×10)

Note: A. Primary culture for 3-4 days; B. Primary culture for 7-8 days; C. Primary culture for 15-20 days; D. The third passage cells.

Fig. 1 Primary culture of rabbit fibroblast-like synoviocytes(×10)

2.2 免疫荧光观察

免疫荧光检测结果显示,改良组织块法分离得到的细胞表达中胚层组织特征性波形蛋白,用千屏

图像采集系统分析细胞的阳性率达 98% 以上(图 2)。

2.3 细胞生长曲线

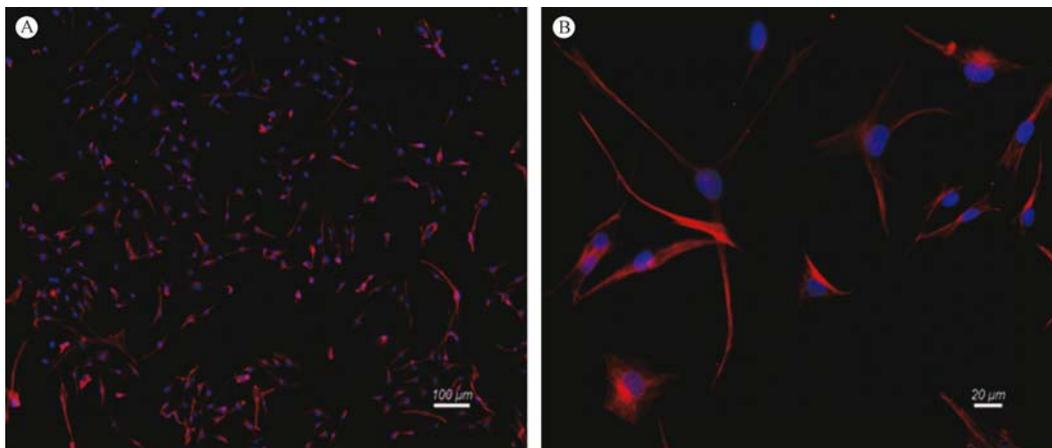


图 2 免疫荧光检测兔成纤维样滑膜细胞胞浆中波形蛋白表达情况(A×10; B×40)

Fig. 2 The expression of vimentin in rabbit fibroblast-like synoviocytes by immunofluorescence staining(A×10; B×40)

通过 CCK-8 法检测 P3 兔成纤维样滑膜细胞增殖能力, 绘制出来的细胞生长曲线呈现典型的“S”形(图 3)。传代后第一天细胞数量有所减少, 经过 2 d 潜伏期后在 4 d 进入对数生长期, 随着培养时间的增加而增殖, 第 7 天进入平台期后, 细胞生长稳定, 最后达到衰老。

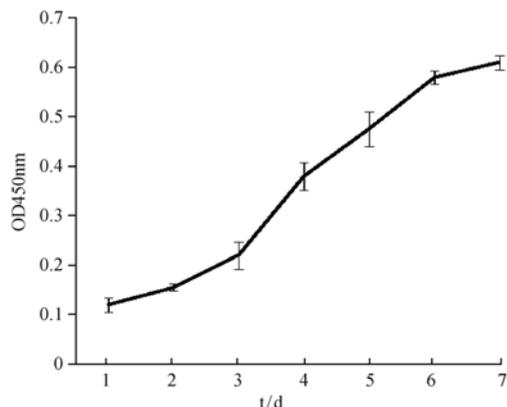


图 3 兔成纤维样滑膜细胞生长曲线

Fig. 3 The growth curve of rabbit fibroblast-like synoviocytes

3 讨论

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。本实验在传统的组织块培养法的基础上进行改进, 从新西兰大白兔膝关节中分离得到滑膜组织, 剪成 1 ~ 5 mm³ 大小, 在组织块置于 3.5 cm 培养皿之前, 用灭菌滤纸吸掉组织上附着的水分, 温箱内放置 5 min 后, 加入 1 mL 含 100 U/mL 青霉素、0.1 mg/mL 链霉素、10% 胎牛血清的 DMEM-H 培养液, 放入 37℃、5% CO₂ 培养箱内培养。培养 24 h 后每皿轻轻补加 1 mL 含 100 U/mL 青霉素、0.1 mg/mL 链霉素、10% 胎牛血清的 DMEM-H 培养液, 37℃、5% CO₂ 条件下培养, 3 ~ 4 d 后, 在光镜下可见组织块边缘有很多圆形的亮点, 长出少数细胞形态多为典型的长梭形, 偶见多角形和圆形, 15 ~ 20 d 即可达到 90% 融合, 细胞形态以典型的长梭形为主。通过胰蛋白酶消化传代后, 大量成纤维细胞样细胞均匀分布。本实验培养出的第 3 代兔成纤维样滑膜细胞呈现典型的“S”形, 与文献报道一致^[5]。传至 5 ~ 6 代后, 细胞逐渐老化, 7 ~ 8 代后活性几乎丧失, 老化停止增殖, 建议采用 3 ~ 4 代细胞进行相关实验。

成纤维样滑膜细胞细胞表面标记物有: 尿二核苷磷酸葡萄糖脱氢酶 (uridine diphosphoglucose dehydrogenase, UDPGD), 钙粘蛋白-11 (cadherin-

11), CD14, CD44, 促衰变因子 (decay accelerating factor, DAF/CD55/mAb67), 脯氨酸羟化酶、Thy-1/CD90, 血管细胞粘附因子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1/CD106), 波形蛋白 (vimentin) 等, 其中 vimentin、Thy-1/CD90、脯氨酸羟化酶是各种成纤维细胞的标记物^[6-8]。实验选用最常用波形蛋白来鉴定成纤维样滑膜细胞。通过免疫荧光检测结果显示 P3 兔成纤维滑膜细胞表达 vimentin, 与袁琴等人报道的相符^[9]。

滑膜细胞主要包括巨噬样滑膜细胞和成纤维样滑膜细胞, 其中主要为成纤维样滑膜细胞^[10]。原代培养细胞多利用自然纯化法获得较高纯度的细胞, 即利用成纤维样滑膜细胞可以贴壁生长、贴壁能力较强、增殖速度较快的特性, 通过优势生长、多次消化传代来去除非成纤维型细胞和不健康的成纤维细胞, 从而获得较高纯度的成纤维样滑膜细胞^[11]。千屏图像采集系统分析免疫荧光检测结果发现 vimentin 的阳性率高达 98%, 与丁娟等人分离的人成纤维样滑膜细胞 vimentin 阳性率相符^[12], 说明通过多次传代可以得到高纯度的兔成纤维样滑膜细胞。

该实验采用改良组织块法成功分离培养出兔成纤维样滑膜细胞, 与传统的组织块贴壁法相比, 最大的优点就是大大缩短了组织块贴壁时间且操作简单, 组织块置于培养皿之前进行了吸水处理后, 只需要放置培养箱 5 min 后, 就可以很牢固贴在培养皿上, 之后加一半培养液即可, 24 h 候后补加剩下的一半培养液就行了, 而传统组织块法由于没有进行吸水处理, 组织块贴壁时间需要 2 ~ 4 h, 并且贴得不够牢固, 稍微操作不当组织块就会漂浮起来, 就很难长出细胞。但在采用改良组织块法分离培养兔成纤维滑膜细胞的过程中也有一些注意事项: (1) 取材比较繁琐所耗时间过长, 取材必须保证无菌操作下进行, 实验前应进行严格消毒; (2) 由于取材时间较长, 最好在冰块上取材, 这样温度恒定不丧失组织块细胞活性, 取材后立即进行培养; (3) 滑膜组织块的接种量也是成功培养出兔成纤维滑膜细胞的关键, 如一个 3.5 cm 培养皿加入 7 ~ 8 块剪碎的组织块即可, 太多组织块, 没有细胞生长的空间, 太少组织块, 细胞的量太少, 满足不了后续实验。(4) 由于滑膜位于关节囊的内层, 在取材的过程中操作要特别仔细和小心, 否则很容易取错滑膜, 导致杂细胞过多, 实验不成功。(下转第 85 页)

趣,增强了实验动物学教学的应用性。

参考文献:

- [1] 田枫,康爱君,郑振辉. 不同层次需求的实验动物学教学特点 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(9): 78-82.
- [2] 王大鹏,周丽君. 实验动物学与转化医学[J]. 转化医学杂志, 2013, 12(6):382-394.
- [3] 师长宏,张海,王四旺,等. 四阶段四层次医学实验动物学教学模式的建立 [J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(26):

5160-5162.

- [4] 师长宏,张海,王四旺,等. 三维医学实验动物学教学体系的建立 [J]. 基础医学教育, 2012, 14(4): 289-290.
- [5] 王芳. 医学实验动物学实验教学与科研的有机结合[J]. 基础医学教育, 2013, 5(11): 1016-1017.
- [6] 江鹰,张彩勤,师长宏. 科研模型促实验动物学教学的探索 [J]. 中华高血压杂志, 2015, 23(2): 528-529.

[修回日期]2015-11-16

(上接第 40 页)

积,心肌严重纤维化,导致心肌顺应性下降,形成不可逆的心力衰竭。

参考文献:

- [1] Kim TT, Dyck JR. Is AMPK the savior of the failing heart? [J]. Trends Endocrinol Metab, 2015, 26(1): 40-48.
- [2] 刘宝辉,李明凯,罗晓星,等. 心力衰竭实验动物模型构建方法研究 [J]. 中国心血管杂志, 2013, 18(3): 233-236.
- [3] 芦玲巧,曾翔俊,郝刚. 大鼠心力衰竭模型的构建与鉴定 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(8): 22-25.
- [4] 焦宏,王晓玲,陈彦静,等. 参麦注射液对肥厚心肌大鼠左心室乳头肌电活动的影响 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(15): 2956-2959.
- [5] deAlmeida AC, van Oort RJ, Wehrens XH. Transverse aortic constriction in mice [J]. J Vis Exp, 2010, 38: 1729.
- [6] 廉洪建,冯玄超,啜文静,等. 创伤较小的小鼠主动脉弓缩窄术的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(2): 42-45.
- [7] Hall C. NT-ProBNP: the mechanism behind the marker [J]. J Cardiac Fail, 2005, 11(5): 81-83.

- [8] Grewal J, McKelvie R, Lonn E, et al. BNP and NT-proBNP predict echocardiographic severity of diastolic dysfunction [J]. Eur J Heart Fail, 2008, 10(3): 252-259.
- [9] McDonagh TA, Holmer S, Raymond I, et al. NT-proBNP and the diagnosis of heart failure: a pooled analysis of three European epidemiological studies [J]. Eur J Heart Fail, 2004, 6(3): 269-273.
- [10] Gajarsa JJ, Kloner RA. Left ventricular remodeling in the post-infarction heart: a review of cellular, molecular mechanisms, and therapeutic modalities [J]. Heart Failure Rev, 2011, 16(1): 13-21.
- [11] Wollert KC, Drexler H. Regulation of cardiac remodeling by nitric oxide: focus on cardiac myocyte hypertrophy and apoptosis [J]. Heart Fail Rev, 2002, 7(4): 317-325.
- [12] Liu L, Wang C, Sun D, et al. Calhex231 ameliorates cardiac hypertrophy by inhibiting cellular autophagy in vivo and in vitro [J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 36(4): 1597-1612.

[修回日期]2016-01-12

(上接第 78 页)

参考文献:

- [1] 邹仲之,等. 组织学与胚胎学[M]. 北京;人民卫生出版社, 2004:54-55.
- [2] Turner JD, Filer A. The role of the synovial fibroblast in rheumatoid arthritis pathogenesis [J]. Curr Opin Rheumatol, 2015,27(2):175-182.
- [3] 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.
- [4] 谈益芬,唐艳丽,王胜香,等. 中药组方 NDRF 对佐剂性关节炎家兔滑膜 MMP-3、VEGF 分子及其 mRNA 的影响[J]. 中国免疫学杂志,2014,30(1):57-59.
- [5] 秦苏萍,孙德旭,李慧,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.
- [6] 蔡文虹,孙保东,张宝凤,等. 两种方法分离培养类风湿性关节炎成纤维样滑膜细胞的比较[J]. 中国当代医药, 2012, 19

(21):13-19.

- [7] Zong M, Lu T, Fan S, et al. Glucose-6-phosphate isomerase promotes the proliferation and inhibits the apoptosis in fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2015,17(1):100.
- [8] RosengrenS, BoyleDL, FiresteinGS. Acquisition, culture and phenotyping of synovial fibroblasts[J]. Methods Mol Med,2007; 135:365-375.
- [9] 袁琴,阚卫兵,宋朋飞,等. 大鼠膝关节炎滑膜细胞原代培养[J]. 现代生物医学进展,2012,12(2):253-290.
- [10] 蒋明,朱立平,林孝义. 风湿病学[M]. 北京;科学出版社, 1995:774-775.
- [11] 司徒镇强,吴军正,等. 细胞培养[M]. 西安;世界图书出版西安公司,2009:65-67.
- [12] 丁娟,王志军,董晓薇,等. RA 滑膜成纤维细胞的原代培养及鉴定[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(36):7008-7011.

[修回日期]2016-01-13