

大鼠软骨细胞与兔软骨细胞的培养与比较

张振 罗辉宇 曾炼

【摘要】 目的 体外分离培养大鼠及兔膝关节软骨细胞,观察并比较两种软骨细胞的培养特点。**方法** 采用机械-酶消化法处理SD大鼠幼鼠和新西兰兔的软骨组织,传代培养,倒置显微镜观察细胞形态,细胞计数法测定生长曲线,实时定量PCR测定不同代数的软骨细胞Ⅱ型胶原与含血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶5(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5, ADAMTS5)表达水平,甲苯胺蓝染色及Ⅱ型胶原酶免疫荧光染色对细胞进行鉴定。**结果** 原代培养大鼠软骨细胞12 h,内贴壁成多角形或不规则型,排列成“铺路石”状,培养3~5 d后进入快速增殖期,1周后进行细胞传代培养。兔软骨细胞相对贴壁缓慢,生长滞后。两类软骨细胞随着培养代数的增加,Ⅱ型胶原蛋白的mRNA表达量逐渐减少,ADAMTS5的表达逐代升高,表明随着培养代数的增加,软骨细胞活力逐渐下降。相同代数的大鼠软骨细胞活性较兔软骨细胞更高。甲苯胺蓝染色可见大鼠软骨细胞内成蓝色异染的糖胺多糖成分。不同波段的荧光激发下,Ⅱ型胶原酶免疫荧光染色可见大鼠原代培养的软骨细胞胞浆和胞膜呈清晰的绿色荧光,兔软骨细胞呈红色荧光,细胞核为明亮的蓝色荧光。**结论** 本实验通过比较大鼠及新西兰兔软骨细胞的培养与特点,证实随培养代数增加,软骨细胞活性逐渐降低,且相同代数大鼠软骨细胞较兔软骨细胞具备更高活性。

【关键词】 关节软骨;软骨细胞;细胞分离培养

Culture and comparison of rat and rabbit chondrocytes. ZHANG Zhen, LUO Hui-yu, ZENG Lian. Department of Anesthesiology, Xiangyang First People's Hospital, Hubei Medical University, Xiangyang 441100, China

Corresponding author: LUO Hui-yu, E-mail: 603983267@qq.com

【Abstract】 Objective To isolate and culture rat and rabbit knee chondrocytes *in vitro*, observe and compare the culture characteristics of the chondrocytes in rats and rabbits. **Methods** Chondrocytes were obtained by the mechanical separation combined with type Ⅱ collagenase enzymatic digestion from the cartilage of young SD rats and New Zealand white rabbits, and subcultured. The cell morphology was observed by an inverted microscope, growth curve was measured by cell counting, the expression levels of collagen Ⅱ and a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5 (ADAMTS5) in different generations of chondrocytes were detected by real-time PCR, and the cells were identified by toluidine blue staining and type Ⅱ collagenase immunofluorescence staining. **Results** Primary cultured rat chondrocytes were presented with polygonal or irregular shape after 12 h, and arranged as “paving stones”. After culture for 3-5 d, chondrocytes entered a period of rapid proliferation and cell subculture was carried out after 1 week. The chondrocytes of rabbits were adhered and grew slower than the rat chondrocytes. By comparing the expression of Collagen Ⅱ and ADAMTS5 in two types of different generation chondrocytes, it was found that the expression of Collagen Ⅱ in both chondrocytes decreased from generation to generation and that of ADAMTS5 increased, indicating that the activity of chondrocytes gradually decreased with the increase of chondrocytes' generation. And the rat chondrocytes of the same generation had higher activity than rabbit chondrocytes. The toluidine blue staining revealed that there were some blue-stained glycosaminoglycan components in chondrocytes. Under the fluorescence excitation of different wave bands, collagenase type Ⅱ immunofluorescence staining showed clear green fluorescence in the cytoplasm and membrane of primary cultured rat chondrocytes, and red fluorescence of rabbit chondrocytes, the nucleus was bright blue fluorescence. **Conclusion** The study compared the culture and characteristics of chondrocytes in rats and New Zealand rabbits. It was confirmed that the chondrocyte activity gradually decreased with the increase of culture passages, and that rat chondrocytes of the same

generation had higher activity than rabbit chondrocytes.

【Key words】 Articular cartilage; Chondrocytes; Cell isolation culture

骨性关节炎(Osteoarthritis, OA)作为一种慢性的关节退行性病变,其主要的病理改变是关节软骨损伤^[1]。软骨细胞作为关节软骨的主要成分,参与了骨性关节炎发生、发展的全过程^[2]。因此体外关节软骨细胞的培养是模拟软骨损伤的基础。然而目前关节软骨细胞的分离培养存在着操作步骤繁琐,细胞生物学特性难以持续保持以及经费投入较大等一系列的问题^[3]。

Ⅱ型胶原是由具有三重螺旋结构的三个相同链构成的胶原纤维,通过分子间的相互交联而形成稳定的结构,这种网状结构可以抵抗细胞外基质中阴离子蛋白多糖聚合时所产生的肿胀压力,进一步保证关节软骨的完整性^[4]。有研究表明退化的关节软骨细胞Ⅱ型胶原的表达量显著降低,同时证明了软骨细胞活力随Ⅱ型胶原表达的降低而逐渐下降^[5]。在骨性关节炎的研究中发现,90%~95%Ⅱ型胶原组成的纤维网状结构的损伤可能是引起关节炎病变的扳机点^[6]。正常的软骨细胞细胞外基质是由Ⅱ型胶原和蛋白聚糖构成,为维持结构的稳定性,细胞外基质的成分通过含血小板结合蛋白基序的解聚蛋白样金属蛋白酶5(a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5, ADAMTS5)不断更新与重塑,但当细胞退化或损伤时,ADAMTS5的表达量会不断增加,导致合成与降解的失衡,故而ADAMTS5可以作为评价软骨细胞功能活性的关键性指标^[7-9]。

本课题组采用机械分离联合Ⅱ型胶原酶消化的方法处理SD大鼠幼鼠和新西兰兔膝关节软骨组织,测定不同代数的软骨细胞Ⅱ型胶原与ADAMTS5表达水平,观察并比较两种软骨细胞的培养特点。

材料与方法

一、实验主要试剂及仪器

DMEM培养基(Gibco,美国)、胰蛋白酶(Gibco,美国)、Ⅱ型胶原酶(北京索莱宝科技有限公司,中国)、胎牛血清(FBS, Hyclone, 南美)、台盼蓝(Sigma, 美国)、甲苯胺蓝(Sigma, 美国)、Ⅱ型胶原多克隆抗体(Abcam, 美国)、Alexa Fluor 山羊抗鼠二抗(碧云天有限公司, 中国)、Tizol试剂盒(Invitrogen, 德国)、逆转录试剂盒(Promega, 美国)、SYBR Green qPCR试剂盒(Promega, 美国);荧光倒置显微镜(OLYMPUS, 日本)、NanoPhotometer(Implen, 德国)、二氧化

碳培养箱(Thermo, 美国)、低温台式离心机(Eppendorf, 德国)、生物安全柜(力康生物医疗科技控股有限公司, 中国)。

二、实验动物

10只出生2周、体重为10~14 g的SD大鼠幼鼠,2只出生4周、体重为400~450 g的新西兰兔,两者均雌雄各半,实验动物均来源于湖北医药学院实验动物中心[动物生产许可证:SCXK(鄂)2016-0008;动物使用许可证:SYXK(鄂)2016-0031],动物实验方案经湖北医药学院附属襄阳市第一人民医院伦理委员会批准,实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待动物的指导意见》。

三、软骨细胞分离培养及观察

(一)SD大鼠幼鼠膝关节软骨细胞分离培养

选取2周龄的SD大鼠幼鼠10只,10%的水合氯醛腹腔注射麻醉后处死,消毒皮肤。无菌条件下剪开双侧膝关节,离断含有软骨组织的部位,置于盛有磷酸盐缓冲液(PBS)的培养皿中。用含青/链霉素双抗液的PBS冲洗2~3次,清除表面血污;用眼科剪及镊子逐层分离肌肉组织、骨性成分、软骨骨膜,仅保留透明软骨。分离所得软骨组织用PBS再次冲洗3~4次后,移入生物安全柜,将软骨组织剪碎至1 mm³的大小,装入培养瓶,加入浓度为0.2%的Ⅱ型胶原酶,置于37℃、CO₂体积分数为5%的恒温培养箱中消化1 h后,倒置显微镜观察,可见大量的软骨细胞和细胞外基质成分。机械吹打30 s后,将细胞与未完全消化的软骨组织分离,静置5 min后,吸取上清液于15 ml离心管中,低温离心(1 500 rpm, 10 min)。离心后所得的上清液重新加入培养瓶中。消化剩余的软骨组织分别于2 h、4 h后再次收集,用FBS体积分数为10%的DMEM培养基重悬离心后沉淀的软骨细胞,轻轻吹打,使细胞悬液均匀分布,然后经300目不锈钢滤网过滤收获单细胞悬液,接种至10 ml培养瓶中置于恒温培养箱中培养,每隔2 d换一次液,倒置显微镜观察并摄像。

(二)新西兰兔膝关节软骨细胞分离培养

选取4周龄新西兰兔2只,耳缘静脉注射空气处死,去皮消毒,无菌条件下分离两侧膝关节软骨,置于盛有PBS培养皿中清洗表面血迹,后移入生物安全柜剪碎软骨组织至1 mm³大小装入培养瓶中,加

入浓度为 0.2% 的 II 型胶原酶消化 2 h, 显微镜观察, 明显观察到大量软骨细胞分布于软骨组织周围, 机械吹打 30 s 后, 将细胞与未消化的组织分开, 静置 5 min 后, 吸取上清液于 15 ml 离心管中, 低温离心 (1 500 rpm, 10 min), 弃上清, 加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基重悬, 经 300 目不锈钢滤网制成单细胞悬液, 接种于 10 ml 培养瓶中于培养箱中培养, 倒置显微镜观察并摄像。

四、软骨细胞传代培养

5 d 后软骨细胞融合成片, 排列成“铺路石”状, 生长面积达培养瓶的 80%~90%。弃去旧的培养液, 用 PBS 液清洗 3 次, 加入浓度为 0.25% 的胰蛋白酶置于恒温箱消化 1~2 min 后, 镜下观察贴壁细胞变得透亮, 成圆形, 个别细胞甚至漂浮, 立即加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基终止消化, 吹打混匀, 离心 (1 000 rpm, 3 min), 弃上清, 加入新的培养基重悬混匀, 接种培养, 按照 1:2 比例传代, 置于恒温箱培养。

五、细胞计数法测定软骨细胞生长曲线

用浓度为 0.25% 的胰酶消化原代培养的大鼠及兔软骨细胞, 按照 $1 \times 10^8/L$ 的相同密度接种于 48 孔板, 分 9 组, 每组设置 3 个复孔, 2 d 换液一次。从细胞培养的第 2 天开始连续 9 d, 每天收集细胞, 利用血球计数板进行计数, 每个复孔计数 2 次, 取细胞数的平均值作为结果, 以培养时间为横轴, 细胞数 (对数) 为纵轴, 利用 GraphPad Prism (Prism5, San Diego, 美国) 绘制大鼠软骨细胞的生长曲线。

六、实时定量 PCR 测定软骨细胞中 Collagen II 及 ADAMTS5 mRNA 的表达

取 1-5 代培养的大鼠及兔软骨细胞, 按照 $1 \times 10^5/ml$ 的密度接种于 6 孔板中, 待培养 48 h 后, 每孔加入 1 ml Trizol 裂解细胞。根据试剂说明书, 提取总 RNA, 并使用 NanoPhotometer 对 RNA 进行定量。取 2 μg 总 RNA 通过逆转录试剂盒逆转录为 cDNA, 使用 SYBR Green 荧光染料进行 qPCR, 过程如下: 反应混合物包括 4 μl cDNA 模板, 10 μl GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega, 美国), 以及引物 0.4 μl 和 5.2 μl 无核酶水。程序设置包括 95 $^{\circ}C$ 预变性 2 min, 95 $^{\circ}C$ 变性 15 s, 60 $^{\circ}C$ 退火延伸 1 min, 设置 40 个循环, 以 GAPDH 作为内参 (表 1), 计算各组中 Collagen II 及 ADAMTS5 的 mRNA 相对表达。

七、甲苯胺蓝染色

取第 2 代软骨细胞按照 $1 \times 10^8/L$ 的密度接种于 12 孔板中, 细胞培养 2 d 后, 融合面积达 60%~70%。去除原培养液, 用冰的 PBS 冲洗 2~3 次, 加入体积

表 1 大鼠及新西兰兔 GAPDH、Collagen II、ADAMTS5 基因序列

基因名称	种属	引物序列
GAPDH	大鼠	上游 5'-ACGGCAAGTTCAACGGCACA-3'
		下游 5'-AGCGGAAGGGGCGGAGATG-3'
Collagen II	大鼠	上游 5'-AGAACAGCATTGCCTACCT-3'
		下游 5'-ATGGTCTTGCCCCACTTAC-3'
ADAMTS5	大鼠	上游 5'-GGGCAGAGTCCGAACGAGT-3'
		下游 5'-CAGCCGGTTGGCAATAGAG-3'
GAPDH	兔	上游 5'-AAGGTCCGAGTGAACGGAT-3'
		下游 5'-CTCGCTCTGGAAGATGGT-3'
Collagen II	兔	上游 5'-CCCAGAATACACCTACCA-3'
		下游 5'-ACAGTCTTGCCCCACTTAC-3'
ADAMTS5	兔	上游 5'-GCAAAAAGGAGTCAAAAACAT-3'
		下游 5'-AGGCTAAGTAGGCAGTGAA-3'

分数为 4% 的多聚甲醛 4 $^{\circ}C$ 固定 2 h, 去离子水冲洗 5 min, 加入质量分数为 1% 的甲苯胺蓝染色液 2 ml, 置于摇床常温浸染 1~2 h, 去原液, 无水乙醇脱色, 去离子水终止, 倒置显微镜观察、摄像。

八、II 型胶原的免疫荧光染色

取第 2 代的软骨细胞按照 $1 \times 10^8/L$ 的密度接种于 12 孔板中, 待细胞正常贴壁后, 弃去原液, 用 PBS 缓冲液漂洗 3 min; 加入体积分数为 4% 的多聚甲醛固定 15 min, PBS 漂洗 3 min; 再加入质量分数为 0.5% 的 TritonX-100 室温透膜 20 min, 随后再用 PBS 润洗 3 次, 每次静置 5 min, 弃去 PBS, 加入体积分数为 10% 的脱脂牛奶室温封闭 30 min, 吸去封闭液, 加入足量的一抗 4 $^{\circ}C$ 孵育过夜; 第 2 天回收一抗后用 PBS 润洗 3 次, 每次静置 5 min, 避光滴加稀释好的荧光二抗 (稀释比 1:100), 常温避光孵育 1 h, PBS 漂洗 3 min; 加入 DAPI 避光孵育 5 min 复染核, PBS 漂洗 5 次, 每次 4 min, 洗去多余的 DAPI 染液, 封固, 荧光显微镜观察并摄像。

九、统计学分析

应用 SPSS 19.0 统计软件 (IBM 公司, 美国) 进行统计学分析, 计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、细胞形态的比较

倒置显微镜观察原代分离培养出的大鼠软骨细胞贴壁前成圆形, 漂浮于培养基中, 细胞形态较小。培养 6~12 h 后细胞贴壁, 折光性高呈透亮状态, 胞

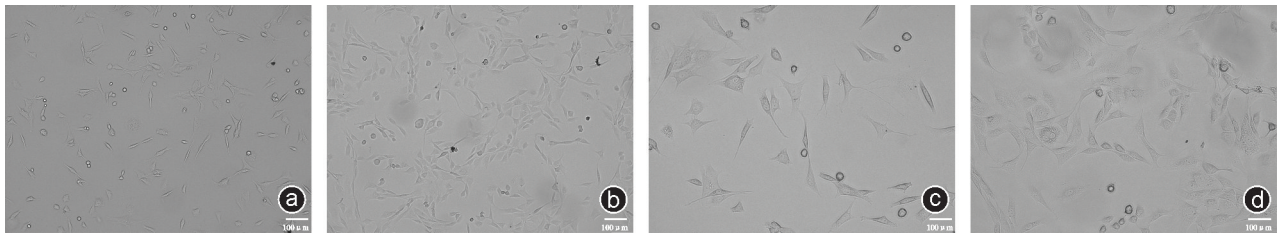


图1 大鼠软骨细胞培养不同时间在光学显微镜下的形态 a:培养1 d($\times 100$);b:培养3 d($\times 100$);c:培养1 d($\times 200$);d:培养3 d($\times 200$)

核为椭圆形,位于胞体中央,胞质丰富。24 h后大多数细胞完成贴壁,部分细胞逐渐伸展,形状发生改变,变为多角形或不规则形,散在均匀分布于培养基中(见图1 a),培养3 d后,细胞增殖明显,融合面积约占瓶底的60%,相邻细胞间出现结节状连接,周围伴有基质成分的沉积(见图1 b)。1周后,细胞铺满瓶底进行传代培养,传代后细胞贴壁时间明显缩短,增殖速度加快,约4 d左右的时间基本铺满。

与大鼠软骨细胞相比,原代培养的兔软骨细胞贴壁时间明显延长约12~24 h,其中大部分的细胞24 h后才开始贴壁,贴壁的细胞多为三角形或不规则形,形态较大,胞质成分较多,核仁明显。细胞增殖相对缓慢且具有成簇生长的特点,约2周左右才铺满瓶底(见图2 b)。

二、软骨细胞生长曲线

原代大鼠软骨细胞接种后前2 d生长缓慢,细胞分裂增殖较少,处于细胞生长周期的潜伏期,第3天起细胞分裂增殖加速,构成生长曲线的对数增长期,直到第5天后生长曲线逐渐趋于平稳达平台期;兔软骨细胞增殖明显滞后,生长曲线右移,其增殖高峰约第7天才出现(见图3)。

三、不同代数软骨细胞 Collagen II、ADAMTS5 mRNA水平的比较

Collagen II、ADAMTS5 表达水平可以代表软骨细胞活力的高低,通过比较不同代数的同种软骨细胞 Collagen II 的表达水平发现,随着培养代数的增

加, Collagen II 的 mRNA 表达水平逐渐降低, ADAMTS5 的 mRNA 表达水平逐步升高,表明软骨细胞的活力逐渐降低,逐步退化;进一步比较了相同代数的不同软骨细胞上述指标的表达差异,可以明显观察到大鼠软骨细胞较兔软骨细胞具有更好的活力,即 Collagen II 水平更高而 ADAMTS5 水平更低(见图4)。

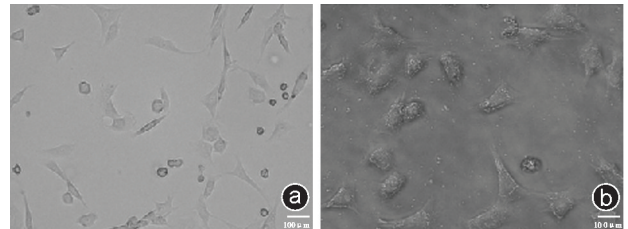


图2 大鼠软骨细胞与兔软骨细胞形态学比较 a:大鼠软骨细胞($\times 200$);b:兔软骨细胞($\times 200$)

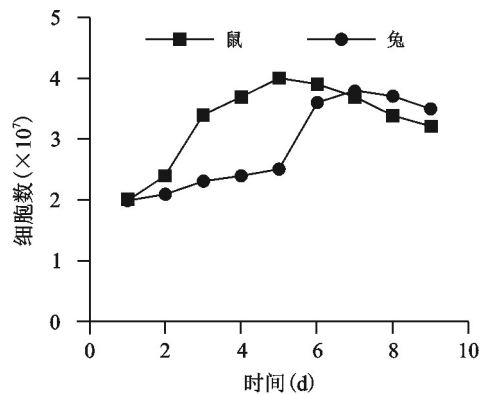


图3 大鼠软骨细胞与兔软骨细胞生长曲线的比较

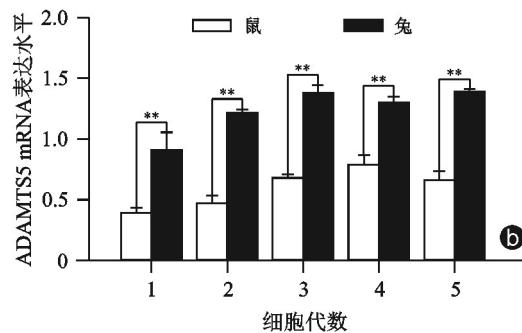
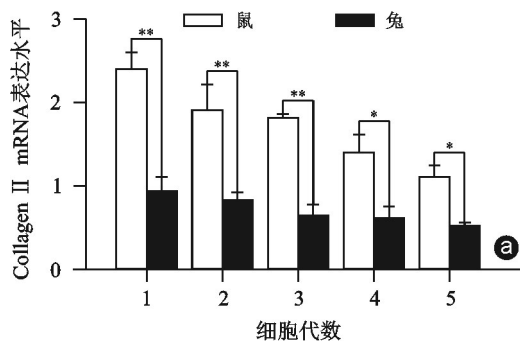


图4 不同代数大鼠及兔软骨细胞 Collagen II 及 ADAMTS5 mRNA 表达水平 a:大鼠及兔软骨细胞 Collagen II mRNA 表达;b:大鼠及兔软骨细胞 ADAMTS5 mRNA 表达

四、软骨细胞的鉴定

(一) 甲苯胺蓝染色

甲苯胺蓝染色可见大鼠软骨细胞胞质内存在蓝色异染颗粒,表明软骨细胞分泌了糖胺多糖(图5)。

(二) II型胶原免疫荧光染色

II型胶原免疫荧光染色在不同波段的荧光激发下,大鼠软骨细胞胞膜及胞质呈现出清晰的绿色荧光表现为强阳性,兔软骨细胞呈现出强烈的红色荧光,细胞核为明亮蓝色,证实原代分离培养的软骨胞具有分泌II型胶原的能力且分泌的胶原成分主要位于胞浆中^[10](见图6)。

讨 论

一、软骨细胞分离培养方法的改良

传统方法上选择成年或胎鼠进行实验,所收获的软骨细胞活性较差且数量较少。本研究选用出生2周的幼鼠,克服了鼠龄过小,软骨成分含量较少的缺点,又尽量地减少了其他骨质成分的干扰。传统方法往往采用胰蛋白酶与II型胶原酶消化法反复循环消化和离心获取软骨细胞,步骤相对复杂,细胞容易受损,活力差且容易发生污染^[11-12]。实验改良技术单用II型胶原酶进行消化,且突出机械分离的作

用,缩短酶消化的时间,逐层机械分离,尽可能去除其他成分,有助于提高细胞纯度。分离后软骨块剪碎,增加与酶的接触面积,缩短酶的消化时间,获取具有高度活性的软骨细胞。酶消化后,分时间段收集,提高细胞获取量。收集过程中采用机械吹打,每次至少吹打2~3 min有助于分离细胞与细胞外基质成分,滤网过滤后离心获取单细胞悬液。

二、大鼠软骨细胞和兔软骨细胞的分离培养

(一) 选材比较

大鼠软骨组织和兔相比价格低廉,取材容易。选用出生两周的幼鼠,软骨成分相对较多,利用机械分离和II型胶原酶消化后,可以极大地增加软骨细胞获取率;同时大鼠软骨组织细胞外基质成分含量相对较少,酶消化时间相应缩短,因此细胞的活性相对较高。

(二) 培养比较

大鼠软骨细胞培养周期短,培养条件相对简单,经一个星期左右的时间就可以长满瓶底;反复传代培养后,细胞依然保持高度活性,细胞形态和原代细胞差异不大,而兔软骨细胞在传代培养五代及以上后,细胞形态发生明显改变,细胞活性明显下降,逐渐走向衰老的进程甚至部分发生了分化,失去了软骨特征^[13-14]。进一步通过比较不同代数的软骨细胞标志性蛋白Collagen II及ADAMTS5 mRNA的表达水平,发现其表达特点与文献中介绍的一致^[6],也与形态结构的变化一致,即随着传代次数的增加,细胞中Collagen II mRNA表达量逐渐降低,ADAMTS5 mRNA表达量逐渐升高,软骨特性逐渐减弱。

三、软骨细胞的培养与鉴定

软骨细胞在体外的环境下,经过长期培养和反

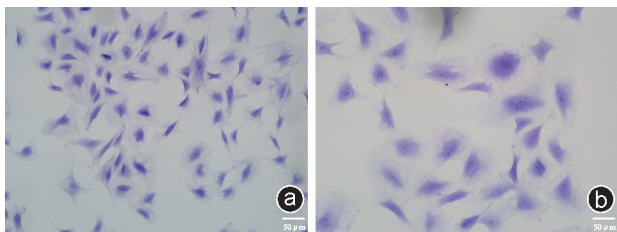


图5 大鼠软骨细胞形态学鉴定 a:×100;b:×200

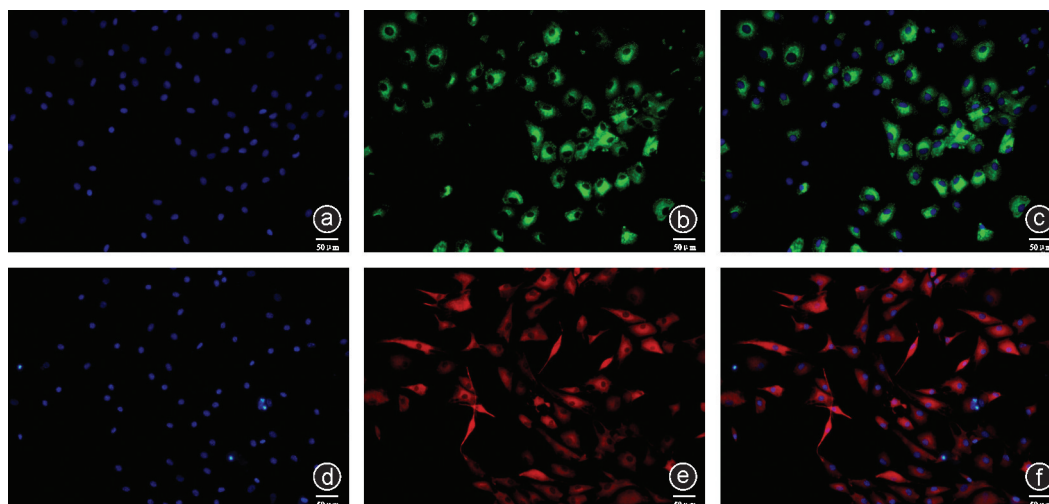


图6 软骨细胞的II型胶原免疫荧光染色鉴定 a~c:(DAPI, Collagen II, Merge),大鼠软骨细胞;d~f:(DAPI, Collagen II, Merge),兔软骨细胞

复传代容易出现分化不稳定的情况,逐渐转变为成纤维样细胞,失去表达Ⅱ型胶原的能力^[15]。在培养的过程中,需要注意细胞接种的密度。低密度培养时,细胞易与基质失去联系,细胞因子无法提供反馈调节,出现反分化呈成纤维样细胞形态,导致合成Ⅱ型胶原的能力下降;高密度培养时细胞生长良好,有助于分泌因子维持其基本表型以及细胞新陈代谢,阻止和减缓细胞的反分化^[16]。软骨细胞无特异性标志物,通过对其分泌的氨基多糖的甲苯胺蓝染色以及Ⅱ型胶原的免疫荧光染色,结合取材部位和培养观察可以鉴别^[17-18]。实验中观察到经甲苯胺蓝染色的软骨细胞胞质内形成蓝色的异染颗粒表明氨基多糖成分的存在;Ⅱ型胶原免疫荧光染色通过抗原-抗体反应检测Ⅱ型胶原表达情况,结果显示细胞胞浆中呈现出强荧光信号,表明分离得到是能够分泌Ⅱ型胶原的软骨细胞^[19]。

四、本研究的技术改良、不足及展望

本研究立足于比较大鼠及新西兰兔软骨细胞的培养以及生物学特性,重点关注两种动物相同取材部位的软骨细胞形态学特点、生长周期以及生物活性,发现随培养代数的增加,软骨细胞增殖能力逐渐下降,同时代表活性的Ⅱ型胶原的表达量也是逐渐降低,进一步说明了培养代数是制约软骨细胞活力的主要因素,同时发现大鼠软骨细胞相较于相同代数的兔软骨细胞活力较强,从而为软骨材料研发提供一定参考。但本研究也存在一定的缺陷,本研究仅仅停留在对于两类软骨细胞形态及分泌方面的研究,而对于两者的超微结构是否存在差异并未涉及,后续将通过电子显微镜进一步比较不同代数、不同来源的软骨细胞的结构差异,从而为揭示软骨老化提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] Ghosh P, Smith M. Osteoarthritis, genetic and molecular mechanisms[J]. Biogerontology, 2002, 3(1-2): 85-88.
- [2] Kim HA, Blanco FJ. Cell death and apoptosis in osteoarthritic cartilage[J]. Current Drug Targets, 2007, 8(2): 333-345.
- [3] 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.
- [4] 张志恒. 骨关节炎损伤机制及Ⅱ型胶原代谢产物浓度变化的研究[D]. 东北农业大学, 2019.
- [5] 宋奕,朱寅,丁道芳. 丹参酮ⅡA对软骨细胞Ⅱ型胶原及Wnt/ β -catenin信号通路的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2018, 26(9): 1-4.
- [6] 吴向阳,柳奇奇,汪宗保,等. 不同膝关节骨性关节炎模型大鼠软骨细胞Ⅱ型胶原表达的比较[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(9): 2114-2117.
- [7] 胡志俊,胡波,唐德志,等. 兔膝关节软骨细胞的分离培养及形态学特征[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(46): 8555-8558.
- [8] 王宁,董妙珠,施志冲,等. 体外培养豚鼠膝关节软骨细胞的生物学特性及其鉴定[J]. 职业卫生与应急救援, 2010, 28(6): 296-299.
- [9] Kenzaki K, Tsuchikawa K, Kuwahara T. An immunohistochemical study on the localization of type II collagen in the developing mouse mandibular condyle[J]. Okajimas Folia Anat Jpn, 2011, 88(2): 49-55.
- [10] Responde DJ, Natoli RM, Athanasiou KA. Collagens of articular cartilage: structure, function, and importance in tissue engineering[J]. Crit Rev Biomed Eng, 2007, 35(5): 363-411.
- [11] 徐磊,叶朝阳,周燕,等. 体外传代培养兔关节软骨细胞的去分化现象[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(20): 3626-3634.
- [12] 田峰,崔学生,张帅,等. 改良分步消化法培养原代软骨细胞[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(20): 3633-3635.
- [13] 闫虎,苏友新,林学义,等. Ⅱ型胶原酶消化法培养兔关节软骨细胞[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(50): 8647-8653.
- [14] 余方圆,卢世璧,崔雪梅,等. 兔关节软骨细胞聚集培养的生物性状观察[J]. 中华外科杂志, 2006, 44(12): 848-851.
- [15] Klein GR, Vaccaro AR, Albert TJ, et al. Efficacy of magnetic resonance imaging in the evaluation of posterior cervical spine fractures[J]. Spine (Phila Pa 1976), 1999, 24(8): 771-774.
- [16] 夏青,王卫东,魏振,等. 兔关节软骨细胞的体外培养及鉴定[J]. 中国医师杂志, 2007, 9(9): 1174-1177.
- [17] Hoshihara T, Lu H, Yamada T, et al. Effects of extracellular matrices derived from different cell sources on chondrocyte functions [J]. Biotechnol Prog, 2011, 27(3): 788-795.
- [18] Lin Z, Fitzgerald JB, Xu J, et al. Gene expression profiles of human chondrocytes during passaged monolayer cultivation [J]. J Orthop Res, 2008, 26(9): 1230-1237.
- [19] Park K, Min BH, Han DK, et al. Quantitative analysis of temporal and spatial variations of chondrocyte behavior in engineered cartilage during long-term culture [J]. Ann Biomed Eng, 2007, 35(3): 419-428.

(收稿日期:2019-12-28)

(本文编辑:龚哲妮)

本文引用格式

张振,罗辉宇,曾炼. 大鼠软骨细胞与兔软骨细胞的培养与比较[J]. 骨科, 2020, 11(4): 323-328. DOI: 10.3969/j.issn.1674-8573.2020.04.010.