

## · 基础研究 ·

## I型与II型胶原酶在原代成骨细胞培养中消化效果的对比研究

汤小康,应航,李敏,包洁,童培建

(浙江中医药大学,浙江 杭州 310053)

**摘要** 目的:比较 I 型与 II 型胶原酶在原代成骨细胞培养中的消化效果。方法:取 6 只新生 24 h 内的 SD 大鼠,处死后取出颅盖骨并制成碎骨片。将碎骨片等分成 2 份,标记为 I 组和 II 组,分别用 0.1 % I 型胶原酶和 0.1 % II 型胶原酶在 37 ℃ 消化 2 次,每次 1 h。将 2 次消化所得到的细胞悬液混匀后进行细胞培养,并对 2 组细胞分别进行细胞计数,观察细胞形态、细胞增殖情况及碱性磷酸酶染色情况,并测定碱性磷酸酶含量。结果:①细胞计数。I 组细胞 3 次细胞计数结果分别为  $6.20 \times 10^5$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $6.00 \times 10^5$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $5.90 \times 10^5$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ ; II 组细胞 3 次细胞计数结果分别为  $3.20 \times 10^5$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $3.40 \times 10^5$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $2.90 \times 10^5$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ 。I 组细胞总量为 II 组细胞总量的 2 倍左右。②细胞形态。2 组细胞多呈梭形,表面有 2~3 个突触与周围细胞相联系,2 组细胞形态无明显差异。③细胞增殖。I 组光密度( $0.492 \pm 0.001$ )与 II 组光密度( $0.491 \pm 0.002$ )比较,差异无统计学意义( $t = 0.379, P = 0.713$ )。④碱性磷酸酶染色。2 组细胞用苏木素染色后,胞浆内均可见明显的咖啡色和红棕色颗粒。⑤碱性磷酸酶含量。I 组碱性磷酸酶含量[( $2.929 \pm 0.024$ ) 金氏单位]与 II 组[( $2.933 \pm 0.024$ ) 金氏单位]比较,差异无统计学意义( $t = 0.389, P = 0.706$ )。结论:I 型胶原酶和 II 型胶原酶均适用于成骨细胞的原代消化,但在消化 1 h  $\times$  2 次条件下用 I 型胶原酶容易获得更多的成骨细胞。

**关键词** 成骨细胞 细胞培养技术 胶原酶类 动物实验

**Comparison study of type-I collagenase and type-II collagenase on digestion efficiency for primary osteoblast culture** TANG Xiao-kang\*, YING Hang, LI Min, BAO Jie, TONG Pei-jian. \* Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, Zhejiang, China

**ABSTRACT** **Objective:** To compare type-I collagenase with type-II collagenase on digestion efficiency for primary osteoblast culture. **Methods:** Six neonatal (<24 hours old) SD rats were executed and their craniums were fetched out and made of bone fragments. The bone fragments were equally divided into 2 parts and marked as group I and group II, then they were respectively digested by 0.1% type-I collagenase and 0.1% type-II collagenase at 37 ℃ two times, one hour at a time. The cell suspensions got from the two-time digestions were mixed and the cells were cultured. Subsequently, the cells in the 2 groups were respectively counted. The cell shape, cell proliferation and alkaline phosphatase (ALP) staining results were observed, then ALP contents were assayed. **Results:** Results from cell counting for group I were  $6.20 \times 10^5$  cells  $\cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $6.00 \times 10^5$  cells  $\cdot \text{mL}^{-1}$  and  $5.90 \times 10^5$  cells  $\cdot \text{mL}^{-1}$  respectively; while results from cell counting for group II were  $3.20 \times 10^5$  cells  $\cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $3.40 \times 10^5$  cells  $\cdot \text{mL}^{-1}$  and  $2.90 \times 10^5$  cells  $\cdot \text{mL}^{-1}$  respectively. Group I had about twice as many cells as compared with group II. Most cells in the 2 groups were in the shapes of fusiform, and cells were connected by 2-3 synapses. There was no significant difference in cell shape between the 2 groups. There was no statistical difference in optical density between group I and group II [( $0.492 \pm 0.001$ ) vs ( $0.491 \pm 0.002$ );  $t = 0.379, P = 0.713$ ]. ALP staining results showed that coffee-colored granules and marron granules could be easily found in the cytoplasm in the 2 groups after hematoxylin staining. There was no statistical difference in ALP contents between group I and group II [( $2.929 \pm 0.024$ ) vs ( $2.933 \pm 0.024$ ) King unit;  $t = 0.389, P = 0.706$ ]. **Conclusion:** Although both type-I collagenase and type-II collagenase are suitable for digestions of primary osteoblasts, the former can get more osteoblasts after two-time digestions for one hour at a time.

**Key words** Osteoblasts; Cell culture techniques; Collagenases; Animal experimentation

成骨细胞源于骨髓基质间充质干细胞,具有成骨

功能,是骨组织中机械应力的主要效应细胞<sup>[1]</sup>。用酶消化法培养成骨细胞,操作简便,获得的成骨细胞较多,研究中常用于培养成骨细胞的消化酶主要是胰蛋白酶和胶原酶<sup>[2]</sup>。I 型和 II 型胶原酶都能用于培养原代成骨细胞,为比较二者消化培养成骨细胞的能

基金项目:浙江省自然科学基金(Y2110928),浙江省中医药科学研究基金计划(2010ZA020)

通讯作者:应航 E-mail: yh@zjtcn.net

力,我们进行了相应的实验研究,现总结报告如下。

## 1 材料与仪器

**1.1 实验动物** 24 h 新生 SD 大鼠 6 只,体质量 4 ~ 8 g,清洁级,由浙江中医药大学动物实验中心提供,实验动物合格证号:XL202081。

**1.2 主要试剂** RPMI1640 含双抗培养基(美国 Gibco 公司);胎牛血清(杭州四季青生物公司);0.25% 胰蛋白酶、PBS 缓冲液(吉诺生物医药技术有限公司);I 型胶原酶、II 型胶原酶(达文生物有限公司);MTT 试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司);碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)试剂盒、ALP 活性测定试剂盒(南京建成生物公司)。

**1.3 主要器材** 二氧化碳恒温培养箱(德国 Thermo 电子公司);双人单面超净工作台(苏州净化设备有限公司);倒置显微镜及显微拍摄系统(德国 Leica 公司);BioTek800 酶标仪(美国 BioTek 公司);24 孔培养板、96 孔培养板(美国 Corning 公司)。

## 2 方法

**2.1 取材** 采用颈椎脱臼的方法将 6 只新生 SD 乳鼠处死,在 75% 酒精中浸泡 10 min。揭去乳鼠头顶皮肤,切下头盖骨置于 PBS 液内清洗 2 次,再将清洗至发白的头盖骨剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm 的小片移入 0.25% 胰蛋白酶溶液内,在 37 °C 条件下预消化 15 min 后吸弃消化液。将碎骨片置于消毒过滤纸上吸除表面水分,迅速置于天平上,平均分成 2 份。

**2.2 标本分组及细胞消化分离** 将分好的 2 份骨碎片移入 2 个试管中,分别标记为 I 组和 II 组。分别向 2 个试管中加入 0.1 % I 型胶原酶和 0.1 % II 型胶原酶各 5 mL,在 37 °C 振荡消化分离细胞 60 min。将收集的消化液以 1 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 min 后(离心半径 13.5 cm),吸去上清液,将沉淀的细胞团块用 2.5 mL 培养液制成细胞悬液。将剩余的碎骨片按照上面的方法重复处理 1 次,然后将 2 次操作所得到的细胞悬液混匀。

**2.3 细胞培养** 将 2 组细胞悬液稀释至 2 × 10<sup>5</sup> 个 · mL<sup>-1</sup>,均分别接种于 24 孔和 96 孔培养板中,置于细胞培养箱培养(37 °C, 5% CO<sub>2</sub>),24 h 换液 1 次。

### 2.4 指标观察

**2.4.1 细胞计数** 分别从 2 个试管中吸取适量细胞悬液,置于清洁计数板上计数,分别计数 3 次。细胞数(个 · mL<sup>-1</sup>) = 4 个大格细胞数 ÷ 4 × 10 000。

**2.4.2 细胞形态** 培养 36 h 待细胞贴壁后,将 2 组盛有成骨细胞的 24 孔培养板置于倒置荧光显微镜下进行观察、拍照。

**2.4.3 细胞增殖** 从盛有 2 组成骨细胞的 96 孔培养板中各选 6 个培养孔,分别加入 10 μL MTT 溶液,37 °C 继续孵育 4 h 后吸弃培养液,再加入 100 μL MTT 溶解剂,于 570 nm 波长处测定 2 组的光密度(optical density, OD)。

**2.4.4 ALP 染色** 用 ALP 试剂盒采用重氮盐法进行 ALP 染色。分别从 2 组细胞悬液中抽吸 24 孔培养板中 1 孔或多孔培养液,用 PBS 清洗 2 次,待干燥后加入固定液固定 3 min。固定样本后,滴加底物运用液,将培养板放入湿盒(含双蒸水纱布的容器)避光 37 °C 孵育 15 min,再用双蒸水洗。趁湿用苏木素复染 3 min 左右,水洗后在显微镜下观察。

**2.4.5 ALP 含量测定** 从盛有 2 组细胞的 96 孔培养板中各选 18 个培养孔,并分别分为测定孔、标准孔和空白孔 3 个小组,每小组 6 孔。测定孔加入各组的细胞上清液,每孔 30 μL;标准孔加入浓度为 0.02 mg · mL<sup>-1</sup> 酚标准应用液,每孔 30 μL;空白孔加入双蒸水,每孔 30 μL。然后继续向每个培养孔加入 PBS 液 50 μL、基质液 50 μL,充分混匀后,将培养板在 37 °C 水浴 15 min。再加入显色剂 150 μL,轻轻摇均后用酶标仪在 520 nm 波长下测定 2 组 OD 值,并据此计算 2 组细胞中 ALP 含量。计算公式如下:ALP(金氏单位) = (标准孔 OD 值 - 空白孔 OD 值) ÷ (测定孔 OD 值 - 空白孔 OD 值) × 酚标准品浓度(0.02 mg · mL<sup>-1</sup>) × 100 mL × 样品测定前稀释倍数。

**2.5 统计学方法** 采用 SPSS 18.0 统计软件对所得数据进行统计分析,2 组细胞 OD 值及 ALP 含量的组间比较采用 *t* 检验,检验水准 α = 0.05。

## 3 结果

**3.1 细胞计数** 3 次细胞计数结果显示, I 组细胞总量为 II 组细胞总量的 2 倍左右(表 1)。

表 1 2 组成骨细胞计数结果比较 个 · mL<sup>-1</sup>

组别	第 1 次	第 2 次	第 3 次
I 组	6.20 × 10 <sup>5</sup>	6.00 × 10 <sup>5</sup>	5.90 × 10 <sup>5</sup>
II 组	3.20 × 10 <sup>5</sup>	3.40 × 10 <sup>5</sup>	2.90 × 10 <sup>5</sup>

**3.2 细胞形态** 2 组细胞多呈梭形,表面有 2 ~ 3 个突触与周围细胞相联系,2 组细胞形态无明显差异(图 1)。

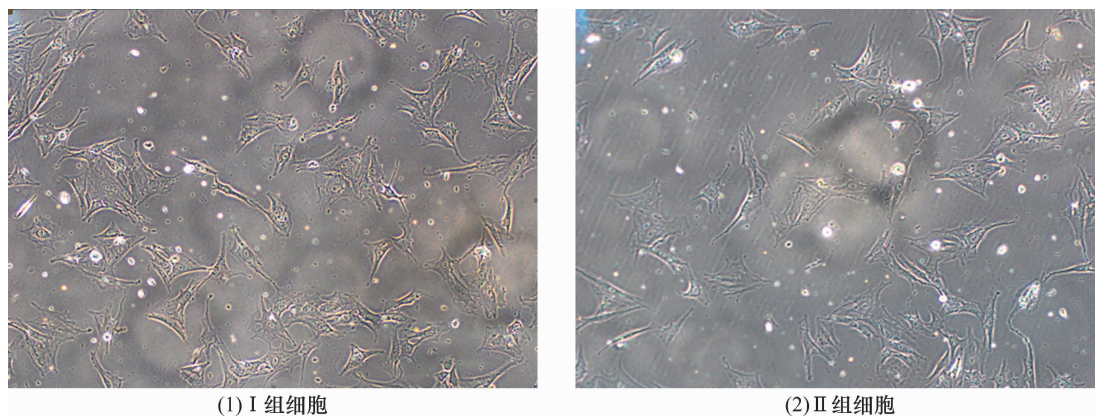


图 1 2 组成骨细胞培养 36 h 时的细胞形态 (×200)

**3.3 细胞增殖** I 组 OD 值( $0.492 \pm 0.001$ )与 II 组 OD 值( $0.491 \pm 0.002$ )比较,差异无统计学意义( $t = 0.379, P = 0.713$ )。

**3.4 ALP 染色** 2 组细胞用苏木素染色后,胞浆内均可见明显的咖啡色和红棕色颗粒(图 2)。

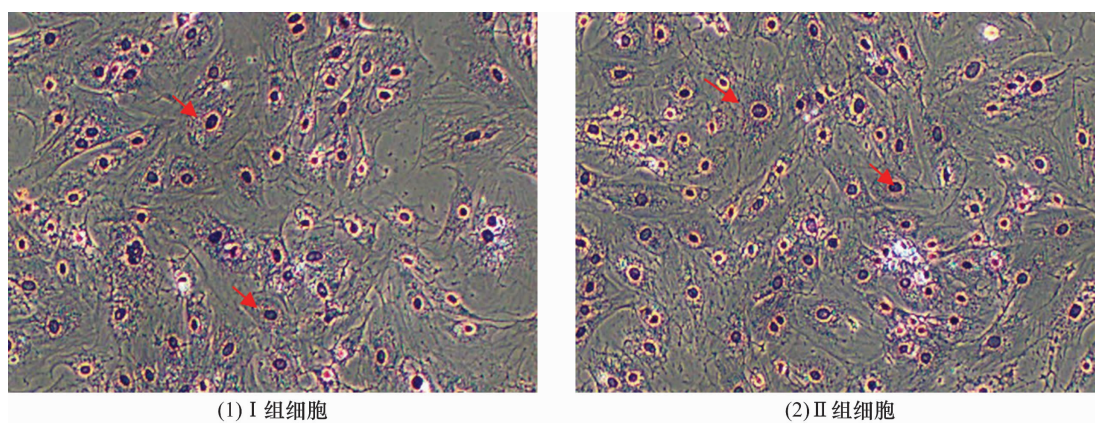


图 2 2 组成骨细胞 ALP 染色结果 (×200)

**3.5 ALP 含量** I 组 ALP 含量[( $2.929 \pm 0.024$ )金氏单位]与 II 组[( $2.933 \pm 0.024$ )金氏单位]比较,差异无统计学意义( $t = 0.389, P = 0.706$ )。

## 4 讨论

胶原酶能在生理酸碱度和温度条件下特异性地水解天然胶原蛋白的三维螺旋结构,但不损伤其他蛋白质和组织,因而被广泛用于各种细胞的分离培养。I 型和 II 型胶原酶都能用于培养原代成骨细胞<sup>[3-4]</sup>。II 型胶原酶在软骨细胞培养中具有一定优势<sup>[5-6]</sup>,然而关于这两种胶原酶在成骨细胞培养方面的优劣比较,国内外学者却意见不一<sup>[7-8]</sup>。

在成骨细胞培养过程中,取材的实验动物、取材部位以及动物年龄等均会影响实验结果<sup>[9]</sup>,为此本实验统一选取新生 SD 乳鼠的颅盖骨为实验材料,力求减少选材因素对实验结果的干扰。

利用计数板对细胞进行计数是实验室常用的方法,具有直观、便捷的特点,但容易出现误差,故应多

次进行。本实验对 2 组细胞悬液进行了 3 次严格计数,发现 I 组细胞数目明显高于 II 组,约为后者的 2 倍左右,这提示在成骨细胞培养中, I 型胶原酶的消化作用强于 II 型胶原酶,其原因可能与骨组织成骨细胞外多是富含 I 型胶原的基质有关。

用 MTT 法测定细胞增殖活性,可准确反映细胞的存活、增殖、生长以及毒性,是细胞实验中常用的方法。本实验在准确计数、等量接种和相同培养条件下,对 2 组细胞进行了细胞增殖活性检测,结果 2 组的 OD 值无明显差异,说明用这 2 种胶原酶得到的成骨细胞增殖活性相近。

ALP 主要分布于细胞膜的钙结合转运蛋白,可促进细胞成熟及钙化。ALP 定量检测可以反映成骨细胞的分化水平,其活性越高,说明前成骨细胞向成熟的成骨细胞分化得越明显。ALP 活性的高表达是成骨细胞分化成熟的早期标志,ALP 活性增强时,骨形成增强,并可促进骨基质矿化,因此 ALP 的活性是反

映成骨细胞分化程度和功能状态的良好指标<sup>[10]</sup>。本实验中用Ⅰ型胶原酶和Ⅱ型胶原酶消化获得的细胞,ALP 染色均为阳性,说明二者都是成骨细胞;而且 2 组细胞 ALP 定量检测结果无明显差异,说明Ⅰ型胶原酶和Ⅱ型胶原酶消化获得的成骨细胞 ALP 活性相当。

本研究结果表明,Ⅰ型胶原酶和Ⅱ型胶原酶均适用于成骨细胞的原代消化,但在消化 1 h × 2 次条件下用Ⅰ型胶原酶容易获得更多的成骨细胞。本实验为制定高效的成骨细胞体外培养方案提供了实验依据。

## 5 参考文献

- [1] Lozupone E, Favia A, Grimaldi A. Effect of intermittent mechanical force on bone tissue in vitro: preliminary results [J]. J Bone Miner Res, 1992, 7 (Suppl 2): S407 - S409.
- [2] Sun DC, Li DH, Ji HC, et al. In vitro culture and characterization of alveolar bone osteoblasts isolated from type 2 diabetics [J]. Braz J Med Biol Res, 2012, 45 (6): 502 - 509.
- [3] 明磊国, 葛宝丰, 陈克明, 等. 蛇床子素对体外培养成骨细胞增殖与分化成熟的影响 [J]. 中国骨伤, 2010, 23 (9): 688 - 691.
- [4] 于波, 崔宪春, 谢进. 复元活血汤含药血清对大鼠成骨细胞功能的影响 [J]. 中医正骨, 2011, 23 (1): 17 - 21.
- [5] 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.
- [6] 刘明东, 盛天金, 王万宗. 胰蛋白酶及Ⅱ型胶原酶消化获取关节软骨细胞 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14 (46): 8551 - 8554.
- [7] Orriss IR, Taylor SE, Arnett TR. Rat osteoblast cultures [J]. Methods Mol Biol, 2012, 816 (1): 31 - 41.
- [8] Hasegawa Y, Shimada K, Suzuki N, et al. The in vitro osteogenic characteristics of primary osteoblastic cells from a rabbit calvarium [J]. J Oral Sci, 2008, 50 (4): 427 - 434.
- [9] 程婉, 许兵, 应航, 等. 抗骨质疏松中药对成骨细胞作用的研究进展 [J]. 中医正骨, 2012, 24 (2): 65 - 68.
- [10] 许兵, 方剑利, 刘慧, 等. 补肾活血方对去势大鼠骨质疏松的影响 [J]. 中华骨质疏松骨矿盐疾病杂志, 2011, 4 (3): 177 - 182.

(2012-06-23 收稿 2012-07-30 修回)

## · 通 知 ·

### 全国水针刀三氧消融术尸体解剖研修班及中华筋骨三针法学习班通知

水针刀三氧消融术及筋骨针法是由中国骨伤微创水针刀学术委员会会长、张仲景国医学院教授、广东省中医院主任医师吴汉卿教授在水针刀疗法的基础上,结合三氧治疗仪所研发的新技术,研制发明的多用系列筋骨针具已获国家专利,并创立了十大筋骨针法(已编入骨伤教材),出版了《中华筋骨三针疗法》。该项技术的培训班已举办 180 余期,来自国内包括台湾、香港等地区及国外(马来西亚、新加坡、韩国)的万余名医生学习、掌握了该技术。为满足广大医师要求,现继续举办以下研修、学习班:

**水针刀三氧融盘术及尸体解剖研修班:**由吴汉卿教授主要传授:水针刀新针法治疗骨伤颈肩腰腿痛病、水针刀三氧融盘术。应用水针刀法结合新鲜尸体详细讲解三针法安全入路法、配合独特松解液及椎间孔扩张术、侧隐窝分离术。新颖的三针法理论、独特的十大针法、结合尸体刀法入路、水针刀挂图,有专科医院手术病人治疗,同时讲解影像诊断,保证每位学员能够独立操作。临床上可治疗腰椎间盘突出症,对颈肩腰腿痛患者具有较好的疗效。

**中华筋骨三针法学习班:**中华筋骨三针法是吴汉卿教授在水针刀针法九针疗法基础上,根据人体生物力学,提出了人体软组织立体三角平衡学说,创立了平衡三针法。该班传授筋骨三针法原理、三针定位法、十大针法技巧。该法主要治疗:颈椎病、颈 1 横突综合症、颈 7 棘突综合症、肩关节周围炎、肌筋膜炎、腰椎间盘突出症、股骨头坏死症、膝关节骨关节炎、神经痛、类风湿性关节炎、脊柱相关病等。

**脊柱九病区药磁线植入技术:**传授独特的脊背九大诊疗区,临床应用水针刀分离、磁线留置并配合整脊手法,快速治疗脊柱相关病,如颈源性心脏病、颈性咽炎、面瘫、三叉神经痛、癫痫、慢性支气管炎、哮喘、胃炎、胃溃疡、结肠炎、生殖疾病等。

**其他:**参加学习班者将授予国家级中医药 I 类继续教育学分(项目编号:390206006)

**开学时间:**每月 1 日开课,需提前 2 日报到

**报到地址:**河南省南阳市仲景路与天山路口(水针刀专科医院)

**邮政编码:**473000 **联系电话:**0377 - 63282507, 13721820657 **联系人:**黄建

**网址:**www. shuizhendao. com **邮箱:**shuizhendao@ 163. com