

Ⅱ 型胶原诱导的关节炎大鼠滑膜成纤维细胞的培养、纯化和鉴定

仇海文, 李 卉, 刘振州, 孙胜楠, 马雪梅, 刘 梅

(南京师范大学生命科学学院, 江苏省分子医学生物技术重点实验室, 江苏 南京 210023)

[摘要] 类风湿关节炎(Rheumatoid arthritis, RA)病人滑膜成纤维细胞(Fibroblast-like synoviocytes, FLS)是研究 RA 发病机制和进行 RA 药物筛选的最理想的细胞来源。但是对于众多非医疗机构的高校和科研院所而言, 由于 RA 病人滑膜组织不易获取而难以进行细胞水平的操作。因此, 建立胶原诱导的关节炎大鼠(Collagen-induced arthritis, CIA)模型, 成功分离膝关节滑膜组织并进行滑膜成纤维细胞的原代培养和纯化, 将有效解决 RA FLS 的来源问题, 为后续实验奠定基础。本实验通过皮内和皮下两次注射鸡Ⅱ型胶原诱导 Wistar 大鼠罹患关节炎, 通过关节炎指数评分和膝关节 HE 染色明确 CIA 模型的建立; 分离膝关节滑膜组织, 采用Ⅱ型胶原酶和无 EDTA 胰酶消化法分离细胞并进行传代培养, 传至第三代时, 细胞免疫荧光检测细胞中 VCAM-1 蛋白含量以鉴定细胞纯度。结果显示, 滑膜组织经过消化和培养后得到大量大鼠滑膜成纤维细胞; 在显微镜下观察所得细胞呈梭形树突状, 具有成纤维样细胞特征; VCAM-1 蛋白阳性细胞达 98% 以上, 确证所分离细胞为滑膜成纤维样细胞, 且纯度极高。本研究建立了较简便快捷地获得大量滑膜成纤维细胞的方法, 为 RA 的发病机制研究和药物防治提供了丰富的实验材料。

[关键词] 滑膜成纤维细胞, 胶原诱导的关节炎大鼠模型, 原代培养, 类风湿关节炎

[中图分类号] Q2-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2017)03-0128-05

Isolation, Culture and Identification of Fibroblast-Like Synoviocytes from Collagen-Induced Arthritis (CIA) Rats

Qiu Haiwen, Li Hui, Liu Zhenzhou, Sun Shengnan, Ma Xuemei, Liu Mei

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Jiangsu Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, Nanjing 210023, China)

Abstract: Fibroblast-like synoviocytes (FLS), which derived from rheumatoid arthritis (RA) patients, are the best cell source for the investigation of pathogenesis and treatment of RA. But it is difficult for some universities and institutions, to obtain human synovial tissue. So, it appears to be of essence to establish collagen-induced arthritis (CIA) rat model and there after obtain synovium for primary culture. The approach will be helpful to provide RA FLS efficiently, and lay the foundation for the follow-up experiment. Female Wistar rats were immunized intradermally with 1.5 mg native chicken collagen type II with an equal volume of Freund's complete adjuvant. Seven days later, the rats were then given a subcutaneous booster injection of half the amount of CII emulsified in Freund's incomplete adjuvant. When CIA model was established, the knee synovial tissue was separated and digested with type II collagenase and trypsin without EDTA. When the cells were cultured to the third generation, VCAM-1 protein in the cells was determined by immunostaining to identify cell purity. We obtained a large number of spindle-shaped cells. More than 98% of these cells were VCAM-1 positive, suggesting that these cells were rat synovial fibroblast-like cells in high purity. The establishment of a simple and rapid method for obtaining a large number of synovial fibroblasts will provides sufficient experimental materials for the pathogenesis and treatment of RA.

Key words: synovial fibroblasts, collagen-induced arthritis rat model, primary culture, rheumatoid arthritis

类风湿关节炎(Rheumatoid arthritis, RA)是一种以关节慢性炎症、滑膜组织增生和软骨、骨的侵蚀性破坏为主要表现的全身性疾病^[1], 其两年致残率为 50%, 三年致残率为 70%, 而且 RA 会使患者的平均寿

收稿日期: 2016-11-15.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31171135)、江苏高校优势学科建设工程资助项目。

通讯联系人: 刘梅, 副教授, 研究方向: 类风湿关节炎发病机制和药物防治. E-mail: meiliunj@163.com

命缩减3~10年^[2]。目前全球有0.5%~1%的成年人患有RA^[1]。在我国,RA的发病率也高达0.32%~0.36%。RA的高发病率和致残率,严重影响患者的身心健康,给家庭和社会带来严重的负担。

目前,RA的病因和发病机制尚未明确,但很多研究表明,滑膜成纤维细胞(fibroblast-like synoviocytes, FLS)在炎症因子不断刺激下过度增殖,对其周边的关节软骨和软骨下骨造成侵袭,是RA发病过程中的最主要的效应细胞,因此滑膜成纤维细胞也成为RA发病机制研究和进行药物筛选的重要实验对象^[3]。目前,FLS最理想的来源为RA病人的滑膜组织,其供体大多数来自进行关节置换手术的RA晚期患者。由于大部分RA病人以药物治疗为主,非不得已情况下才行外科手术治疗,因此RA患者滑膜组织不易获取,尤其对众多非医疗机构的高校和科研院所而言,其材料来源更是困难。胶原诱导性关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)大鼠模型是临床症状和关节病理学改变与人类RA最为相似,也是目前公认的研究RA的理想动物模型。因此,本实验拟建立CIA大鼠模型,并分离和培养RA大鼠滑膜成纤维细胞,为后续RA机制研究和药物筛选提供RA FLS细胞来源。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF级雌性Wistar大鼠,体重为160 g~180 g,购于北京维通利华动物研究中心;所有大鼠均饲养于北京师范大学实验动物中心的SPF级鼠笼系统,光照时间为12 h,8:00~20:00,温度20℃~25℃,湿度40%~70%,动物照度:15 lx~20 lx,换气次数:10~20次/h,风速0.1 m/s~0.2 m/s,大鼠自由饮水和取食。

1.1.2 实验试剂

鸡Ⅱ型胶原,完全弗氏佐剂(CFA)和Ⅱ型胶原酶购于Sigma公司;高糖DMEM培养基、0.25%胰酶和胎牛血清均购于Gibco生物公司;VCAM-1抗体购于Abcam公司;FITC偶联羊抗兔二抗购买于CST公司;苏木素购于Solarbio公司;伊红购于生兴公司。

1.2 CIA大鼠模型制备

Wistar大鼠随机分为两组,分别为对照组和模型组,每组5只。CIA模型组:大鼠用10%水合氯醛(3.0 mL/kg体重)麻醉后,取Ⅱ型胶原(3 mg/mL)和等体积的完全弗氏佐剂充分混匀,冰上乳化。将乳化好的胶原分五点皮内注射至大鼠背部和尾根部,每只注射1 mL。7 d后按照相同的方法配制Ⅱ型胶原和不完全弗氏佐剂乳剂,五点皮下注射于大鼠背部和尾根部,每只注射0.5 mL。正常对照组分别于皮内和皮下注射生理盐水。

1.3 CIA大鼠模型鉴定

1.3.1 CIA模型评分

根据关节炎评分标准每天对大鼠后爪进行评分^[4],病理学评分标准为:0分,足爪无肿胀和红斑;1分,有红斑或轻度肿胀;2分,关节部位中度肿胀;3分,严重肿胀;4分,严重肿胀且不能负重。

1.3.2 大鼠膝关节H&E染色

将正常大鼠和CIA大鼠膝关节分离并用4%多聚甲醛固定,经过12% EDTA脱钙后进行石蜡包埋和切片。将切好的石蜡切片放置二甲苯中脱蜡,二甲苯Ⅰ:5 min、二甲苯Ⅱ:5 min。通过梯度酒精进行复水,100%酒精:2 min;95%酒精:2 min;80%酒精:2 min;双蒸水:4 min。用苏木素染色5 min,1%氨水溶液返蓝5 s,双蒸水冲洗3次,伊红染色5 min,无水乙醇脱水3次,中性树胶封片。显微镜下观察。

1.4 滑膜成纤维细胞分离和培养

造模第3周,大鼠评分达到最大值,将CIA大鼠脱颈处死,仰面固定。沿膝关节正中纵行切开皮肤直至暴露以膝关节为中心区域,打开韧带层,然后在体视镜下从关节腔中分离滑膜组织。将滑膜组织浸泡在含有双抗的D-Hank'液中清洗4次。使用显微镜将组织反复剪至1 mm³小块,加入配制好的含有0.4%Ⅱ型胶原酶培养基消化2 h。将未贴壁的细胞转移至4 mL含0.25%无EDTA的胰蛋白酶中再次消化30 min,加入8 mL完全培养基消化,1 500 rpm离心10 min,弃上清,重新悬浮细胞,使用200目细胞筛过滤,加入完全培养基继续培养。

1.5 滑膜成纤维细胞纯度鉴定

取第3代滑膜成纤维细胞接种至24孔板上。每孔1×10⁵个细胞,待细胞长满,吸弃培养基,使用PBS

洗 2 遍,使用甲醇在-20 ℃固定 20 min. PBS 洗 3 次,0.1% Triton-X 透化细胞 30 min,PBS 洗 3 次,山羊血清封闭 1 h,VCAM-1 抗体 4 ℃孵育过夜. PBS 洗 3 次,荧光二抗室温孵育 1 h,PBS 洗 2 次. DAPI 染色 10 min,PBS 洗 5 次. 荧光显微镜下观察拍照.

2 结果

2.1 CIA 大鼠模型的建立

2.1.1 大鼠足爪形态学观察

CIA 模型组大鼠发病率为 80%. 从外观来看,正常大鼠足爪部细长(图 1(a)),发病大鼠在造模 12 d 左右出现足爪部红肿,25 d 左右足爪评分达到最高值,足爪明显肿胀、畸形、无法负重(图 1(b)、1(c)).

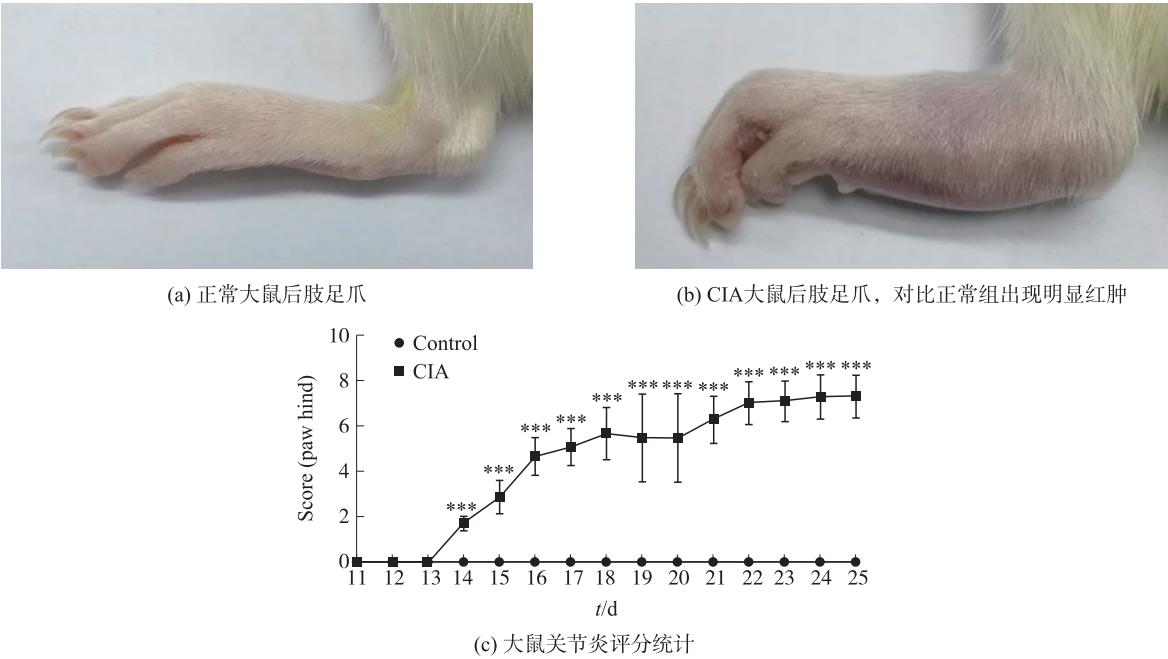


图 1 大鼠足爪形态学观察和关节炎指数评分

Fig. 1 Morphological observation and arthritic scores of CIA rats

2.1.2 大鼠膝关节 H&E 染色

将大鼠后肢膝关节固定脱钙后进行石蜡切片并行 H&E 染色,如图 2(a)所示,正常大鼠膝关节没有炎性细胞产生,骨和关节软骨完整,关节腔明显,滑膜组织未增生;CIA 组大鼠膝关节滑膜增生明显,关节周围有大量炎性细胞浸润,骨和关节软骨均遭到明显破坏(图 2(b)).

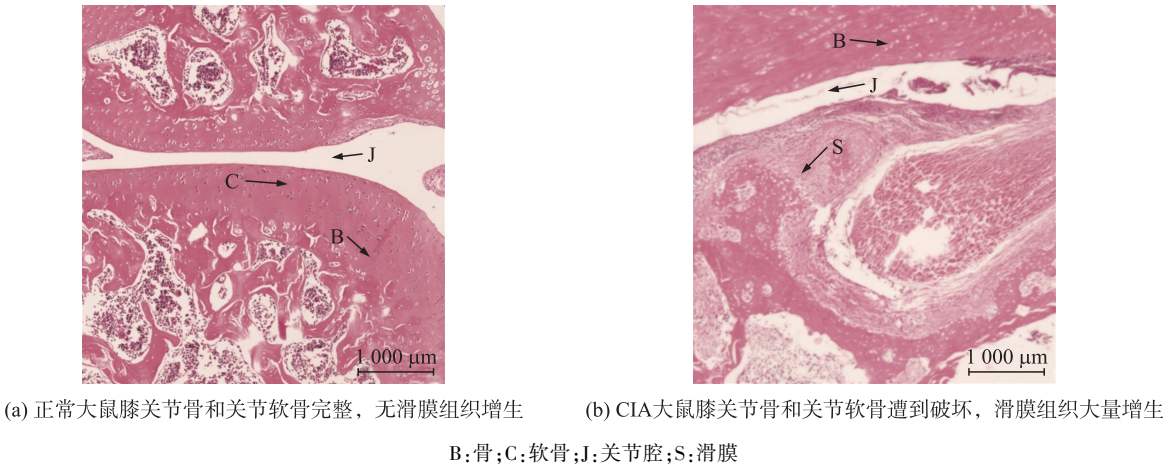


图 2 大鼠膝关节 H&E 染色(4×)

Fig. 2 Rats knee joint was observed by H&E staining(4×)

2.2 大鼠滑膜组织分离及滑膜成纤维细胞培养

2.2.1 大鼠膝关节滑膜组织分离

在建立 CIA 大鼠模型后,分离 CIA 大鼠红肿后肢,小心打开膝关节,暴露内层的滑膜组织. 结果发现, CIA 组关节腔炎性细胞浸润,滑膜液较多,滑膜组织大量增生,出现明显的黄褐色滑膜组织,肉眼可见,分离较易(图 3(b));与此相对,正常组大鼠膝关节打开后,关节腔内无明显肉眼可见的滑膜组织(图 3(a)).



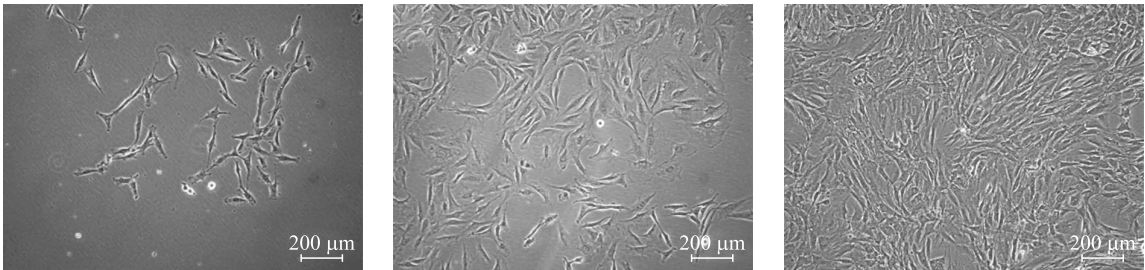
(a) 正常大鼠关节腔无明显滑膜组织,滑膜液较少 (b) CIA大鼠关节腔出现明显的黄褐色滑膜组织,滑膜液较多

图 3 CIA 大鼠关节腔内具明显肉眼可见的增生滑膜组织

Fig. 3 Synovial tissues in knee joint cavity of rats

2.2.2 滑膜成纤维细胞原代培养和形态观察

用手术刀剥取 CIA 膝关节滑膜组织,剪碎并通过Ⅱ型胶原酶和胰酶消化(见材料与方法)后,收集细胞悬液并进行培养. 结果发现,滑膜成纤维细胞贴壁前为圆形,24 h 后全部贴壁并伸出生长突,在显微镜下可以观察到细胞呈梭形树突状生长,细胞质突起细长或较短,具有成纤维样细胞特性(图 4(a)). 经过 72 h 培养后,可见细胞呈簇聚(图 4(b)). 经过 120 h 的培养后,显微镜下可以观察到细胞连接成一整片(图 4(c)). 经过传代培养后,滑膜成纤维细胞呈对数生长,分裂增殖快,可见细胞集落呈极向分布.



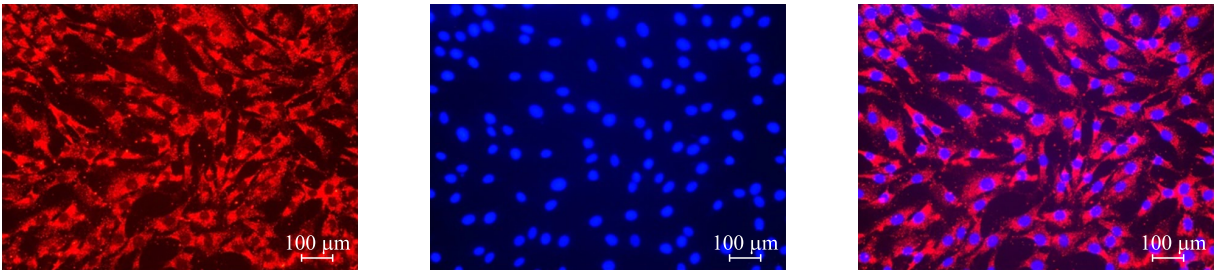
(a) 原代成纤维细胞培养24 h (b) 原代成纤维细胞培养72 h (c) 原代成纤维细胞培养120 h

图 4 原代滑膜成纤维细胞(100×)

Fig. 4 Primary cultured fibroblast-like synoviocytes(100×)

2.3 滑膜成纤维细胞纯度鉴定

VCAM-1 蛋白是滑膜成纤维细胞标志性蛋白,其主要在细胞质中表达. 取第 3 代细胞进行 VCAM-1 免疫荧光检测,结果如图 5(a) 所示,98%以上的成纤维细胞中呈 VCAM-1 阳性,而且均分布于细胞质中,表明所培养细胞为 CIA 大鼠的滑膜成纤维细胞,且纯度极高,可满足后续实验需要.



(a) VCAM-1蛋白在滑膜成纤维细胞质中表达 (b) 滑膜成纤维细胞细胞核 (c) Merge图,所有细胞都表达VCAM-1

图 5 滑膜成纤维细胞鉴定(200×)

Fig. 5 Identification of Fibroblast-like synoviocytes(200×)

3 讨论

类风湿关节炎是一种严重危害人类健康的,全身性、多关节、慢性的自身免疫性疾病^[1].有研究表明滑膜成纤维细胞是RA的关键效应细胞之一,滑膜成纤维细胞的过量增殖和侵袭在RA的发病过程中起重要作用^[3,5-6].因此,滑膜成纤维细胞成为了研究RA发病机制以及治疗的重要靶细胞.目前,RA病人滑膜成纤维细胞难以获得,选取简单易得的替代细胞变得尤为重要.

在本实验中,采取Ⅱ型胶原诱导大鼠关节炎模型^[7],通过关节炎指数评分判断发病严重程度,评分达到最高值处死大鼠^[8],从其膝关节中分离滑膜组织.通过双酶消化法获取大鼠成纤维滑膜细胞,所培养出的滑膜细胞形态典型,增殖能力强,一只大鼠成纤维滑膜细胞培养至第7代,可获得100盘左右10 cm培养皿的细胞.将该细胞冻存后,复苏后其在增殖能力方面未发生明显改变.因此,当细胞大量增殖后可通过超低温保存,为以后实验提供细胞来源.

目前,RA滑膜成纤维细胞主要分离方法包括组织块贴壁法、单胶原酶消化法和单胰酶消化法^[9].本研究选取双酶消化法,并摸索出了最佳的酶浓度和消化时间,成功培养出大鼠成纤维滑膜细胞.这种方法与传统的组织块贴壁法相比,具有很多优点:(1)获取的原代细胞多,CIA模型大鼠膝关节滑膜组织大量增生,将滑膜分离消化可获得大量原代细胞;(2)操作简单,污染机会少,分离的滑膜组织经过缓冲液反复洗涤和两次消化过程,细菌污染几率大大降低.和一般的单酶消化法相比,经双酶消化后,细胞分离更加充分,经过充分消化的原代滑膜成纤维细胞贴壁快,增殖快.

据文献报道,滑膜成纤维细胞中VCAM-1蛋白大量表达,该蛋白可介导滑膜成纤维细胞之间以及其与骨质之间的黏附,是滑膜成纤维细胞的重要蛋白^[10].在许多研究中,VCAM-1蛋白常被认为滑膜成纤维细胞的标志蛋白,该蛋白只在细胞质中表达用以鉴定FLS细胞纯度^[11].本研究中VCAM-1免疫荧光染色结果表明,我们所提取的大鼠滑膜成纤维细胞纯度很高,可用来作为人滑膜成纤维细胞的替代,以进行后续RA发病机制和药物筛选研究.

[参考文献]

- [1] FIRESTEIN G S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis[J]. Nature,2003,423(6 937):356-361.
- [2] BRENOL C V, MONTICIELO O A, XAVIER R M, et al. Rheumatoid arthritis and atherosclerosis[J]. Revista da associacao medica brasileira,2007,53(5):465-470.
- [3] BARTOK B, FIRESTEIN G S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis[J]. Immunological reviews,2010,233(1):233-255.
- [4] DU F, LU L J, FU Q, et al. T-614, a novel immunomodulator, attenuates joint inflammation and articular damage in collagen-induced arthritis[J]. Arthritis Res Ther,2008,10(6):R136.
- [5] HUBER L C, DISTLER O, TARNER I, et al. Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis[J]. Rheumatology,2006,45(6):669-675.
- [6] NOSS E H, BRENNER M B. The role and therapeutic implications of fibroblast-like synoviocytes in inflammation and cartilage erosion in rheumatoid arthritis[J]. Immunological reviews,2008,223:252-270.
- [7] GONZALEZ C, ABELLO P, CEPEDA R, et al. Inflammation, synovial angiogenesis and chondroid apoptosis in the evolution of type II collagen-induced arthritis[J]. European cytokine network,2007,18(3):127-135.
- [8] AMDEKAR S, SINGH V, KUMAR A, et al. Lactobacillus casei and Lactobacillus acidophilus regulate inflammatory pathway and improve antioxidant status in collagen-induced arthritic rats[J]. Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the international society for interferon and cytokine research,2013,33(1):1-8.
- [9] 马莎. 三种培养原代滑膜成纤维细胞方法的比较[J]. 昆明医科大学学报,2016,37(6):52-56.
- [10] LITTLER A J, BUCKLEY C D, WORDSWORTH P, et al. A distinct profile of six soluble adhesion molecules(ICAM-1, ICAM-3, VCAM-1, E-selectin, L-selectin and P-selectin) in rheumatoid arthritis[J]. British journal of rheumatology,1997,36(2):164-169.
- [11] LI R, CAI L, TANG W J, et al. Apoptotic effect of geniposide on fibroblast-like synoviocytes in rats with adjuvant-induced arthritis via inhibiting ERK signal pathway *in vitro*[J]. Inflammation,2016,39(1):30-38.

[责任编辑:黄 敏]