四川大学学报（医学版）
J Sichuan Univ（Med Sci Edi） 2016；47(2)：164－168

# 大鼠颅骨成骨细胞的胶原水凝胶三维立体培养*

谢艳芳[1]，石文贵[1]，周　建[1]，高玉海[1]，王鸣刚[2]，陈克明[1△]

1.兰州军区兰州总医院 骨科研究所（兰州 730050）；2.兰州理工大学 生命科学与工程学院（兰州 730050）

**【摘要】 目的** 建立大鼠乳鼠颅骨成骨细胞(ROBs)的胶原水凝胶三维立体培养模型。**方法** 取新生 SD 大鼠颅骨，通过酶消化法获得成骨细胞。将传代培养的第一代(标记为 $P_1$ 代) ROBs 与不同浓度Ⅰ型鼠尾胶原(胶原浓度为 1、2、3 mg/mL)、DMEM 培养液、NaOH 等混合，调节混合液 pH 并将其置于 37 ℃使胶原凝固成形，建立细胞的三维立体培养。ROBs 立体培养 3 d 后，普通显微镜观察细胞形态及密度，培养 6 d 后二乙酸荧光素/碘化丙啶(FDA/PI)染色法鉴定细胞存活率；培养 3 d、6 d、9 d 后 CCK-8 检测法测定细胞活性，筛选出三维立体培养最佳胶原浓度及最佳培养体系。扫描电镜和 HE 染色观察最佳培养体系中 ROBs 细胞形态以及细胞与胶原复合物的黏附和分布情况。**结果** 胶原浓度为2 mg/mL培养体系，胶原成形最好、硬度最高。ROBs 三维立体培养 3 d 后，胶原浓度为 1 mg/mL、2 mg/mL 培养体系中细胞饱满、多呈长梭形。胶原浓度为 3 mg/mL 的培养体系细胞多呈圆形并固缩。胶原浓度为 2 mg/mL 培养体系中，细胞存活率最高($P<0.05$)，细胞活性强于 1 mg/mL 组和 3 mg/mL 组($P<0.05$)。2 mg/mL 培养体系组扫描电镜结果显示细胞与胶原复合物黏附较好且细胞形态正常，HE 染色结果显示细胞在胶原中分布均匀且细胞形态正常。**结论** 胶原浓度为 2 mg/mL 时，能够成功建立 ROBs 胶原水凝胶三维立体培养模型，该模型中胶原成形较好，硬度较高，细胞生存良好，分布均匀，能够维持正常形态及活性，适用于后期科学研究。

**【关键词】** 成骨细胞　三维立体培养　胶原水凝胶

**3D Collagen Hydrogel Culture of Rat Calvarial Osteoblasts**

*XIE Yan-fang*[1], *SHI Wen-gui*[1], *ZHOU Jian*[1], *GAO Yu-hai*[1], *WANG Ming-gang*[2], *CHEN Ke-ming*[1△]. 1. *Insitute of Orthopedics*, *Lanzhou General Hospital*, *Lanzhou Command of CPLA*, Lanzhou 730050, China; 2. *School of Life Science and Engineering*, *Lanzhou University of Technology*, Lanzhou 730050, China

△ Corresponding author, E-mail: chenkm@lut.cn

**【Abstract】 Objective** To establish a collagen hydrogel three-dimensional culture model with rat calvarial osteoblasts (ROBs). **Methods** ROBs were obtained through enzyme digestion of segregated neonatal SD rat skull. The collagen hydrogel three-dimensional culture model was established by mixing ROBs with different concentrations of type Ⅰ rat tail collagen (collagen concentration of 1, 2, 3 mg/mL), DMEM medium and NaOH under adjusted PH and a temperature of 37 ℃. Cell viability and activity were detected by FDA/PI staining and CCK-8 3 d after cell culture. The optimal culture method of 3D collagen hydrogel was identified. Cell distribution was observed using scanning electron microscopy and HE staining. **Results** ROBs collagen was formed firmly at 2 mg/mL, which had significantly higher levels of cell viability and activity than those at 1 mg/mL and 3 mg/mL. Scanning electron microscopy and HE staining showed that cells under the 2 mg/mL collagen culture system adhered with collagen tightly and distributed homogeneously. **Conclusion** A collagen hydrogel 3D culture model was established successfully by mixing ROBs with collagen at 2 mg/mL.

**【Key words】** Osteoblast　Three-dimensional culture　Collagen hydrogel

骨质疏松症是一种骨量减少、骨密度降低、骨微结构退化、骨脆性增加的全身性骨骼疾病，是全球四大非传染性致死疾病之一[1,2]。目前，骨质疏松症预防与治疗的研究多以成骨细胞为基础，与平面培养的成骨细胞相比，三维立体培养成骨细胞生存环境更接近动物体，成骨性因子的表达差异更加显著，细胞间相互作用更加复杂[3,4]。因此，以三维立体培养的成骨细胞作为研究材料，更有利于骨质疏松预防与治疗新途径的开发及新型骨材料的开拓。

胶原水凝胶是一种含水量丰富的软质材料，与体内软组织及器官基质材料高度相似，并具有生物相容性好、细胞接种方便、机械性能优良等特点，是构建细胞三维立体培养的首选材料[5,6]。因此，本

* 国家自然科学基金(No. 81270963，No. 81471090)资助

△ 通讯作者，E-mail：chenkm@lut.cn

研究旨在建立大鼠颅骨成骨细胞的胶原水凝胶三维立体培养模型，为电磁场及其它治疗骨质疏松症药物的开发提供帮助。

## 1　材料与方法

### 1.1　实验动物

SPF 级新生 SD 大鼠 10 只，购自甘肃中医学院 SPF 级动物实验中心，许可证号 SCXK（甘）2004-0006-152。

### 1.2　实验试剂与仪器

DMEM 培养基（Gibco，美国）；胎牛血清（FBS，HyClone，美国）；Ⅰ型鼠尾胶原（BD 公司，美国）；Ⅰ型胶原酶、胰蛋白酶（Sigma 公司，美国）；伊红、苏木素、碘化丙啶（PI）、双乙酸荧光素（FDA，Salarbio 公司，北京）；CCK-8 细胞增殖检测试剂盒（日本 Dojindo Laboratories）。正置荧光显微镜、倒置相差显微镜（OLYMPUS，Japan）；$CO_2$ 细胞培养箱（Thermo Revco，USA）；台式高速冷冻离心机（Heraeus，German）；紫外分光光度计、酶标仪均为 Bio-Rad 公司产品。JSM-5600LV 低真空扫描电子显微镜 X 射线能量色散谱仪（Thermo Revco，USA）。

### 1.3　方法

**1.3.1**　*成骨细胞的分离培养*　将 10 只出生 48 h 内的 SD 大鼠处死后，置于 75%酒精中浸泡 15 min，在无菌条件下取其颅骨并去除骨膜及结缔组织，PBS（pH＝7.8）清洗 3 次；将骨片剪为大小约1 $mm^3$ 的碎片，转移至培养瓶中，加入 0.25%胰酶消化 2 次（37 ℃，每次 10 min），弃上清液，0.1% Ⅱ型胶原酶消化 10 min，弃上清；再用 0.1% Ⅱ型胶原酶消化 4 次（37 ℃，每次 20 min），收集合并上清液，加入 5 mL 含 10%FBS 的培养基中止酶消化，150 目滤网过滤 3 次，1 000 r/min 离心 10 min；弃上清，加入培养基（DMEM 培养基，内含 10% FBS、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μg/mL），吹打均匀并计数。原代细胞悬液以 $3\times10^5$ PI /mL 接种于大皿中培养，每皿 10 mL，37 ℃、5%$CO_2$和饱和湿度的条件下培养，每 3 d 换液 1 次，培养至细胞铺满 80%皿底后，胰蛋白酶消化传代（标记为 $P_1$ 代）。

**1.3.2**　*三维细胞的培养*　将 $P_1$ 代成骨细胞胰蛋白酶消化，离心收集细胞，调整细胞密度为 $1\times10^6$/mL 并放置于冰浴中待用。以配置体积为 1 mL 胶原浓度为 1 mg/mL 三维培养体系为例，将 200 μL 胶原蛋白（浓度为 5 mg/ mL）加入 12 μL 0.1 mol/L NaOH 溶液中（如果反过来把 12 μL 0.1 mol/L NaOH 加到胶原溶液中，则会产生局部的胶原凝结块），并立即混匀。再加入 23 μL 10×PBS 混匀（混匀后 pH 为 7 左右，如果 PBS 或培养液中未加酚红，初次使用时需要用 pH 试纸测试）。同样方法配置胶原浓度为 2 mg/mL、3 mg/mL 的三维培养体系。加入 760 μL 细胞悬浮液并立即混匀，快速将胶原细胞混合液加入 48 孔培养板中，37 ℃、5% $CO_2$ 培养箱中培养 30 min，待胶原凝固后，补加含 10% FBS 的 DMEM，37 ℃、5% $CO_2$ 培养箱中培养。

**1.3.3**　*细胞形态观察*　待细胞三维立体培养 3 d、6 d、9 d 后，置于倒置相差显微镜下观察细胞的生长状态以及形态并拍照。

**1.3.4**　*水凝胶的形成结构*　待细胞三维立体培养 3 d 后，弃去培养基，用 PBS 冲洗 3 遍后，4%（体积分数）多聚甲醛固定 30 min，用小镊子小心取出胶原凝胶块，拍照比较不同浓度胶原培养体系胶原凝胶块的形态、硬度。

**1.3.5**　*细胞存活率检测*　待细胞三维立体培养 6 d 后，弃去培养基，PBS 冲洗 3 次后，加入浓度为 10 mg/mL的Ⅰ型胶原酶，37 ℃孵育 30 min，待胶原材料完全被消化后，1 000 r/ min 离心 10 min，PBS 清洗 3 次，加入浓度为 2 μmol/L 的乙二酸荧光素（FDA）和 4 μmol/L PI 的混合液，室温下避光孵育 35 min，立即置于激光共聚焦显微镜下观察，随机选取 3 个视野，分别计数活细胞及死细胞数目，细胞存活率（%）＝活细胞数/总细胞数×100%，观察不同胶原浓度培养体系成骨细胞的生长状况。

**1.3.6**　*扫描电镜观察细胞生长及分布*　待细胞三维立体培养 6 d 后，用 PBS 冲洗 3 次，加入 2.5%戊二醛固定30 min，再加入 1%锇酸 2 次固定 30 min，随后用不同浓度的酒精梯度脱水，最后加入乙酸异戊酯 4 h 以上。真空喷溅铂金离子，扫描电镜观察细胞生长及分布情况。

**1.3.7**　*HE 染色*　待细胞三维立体培养 6 d 后，取出胶原材料并用 PBS 冲洗 3 次，置于 4%（体积分数）多聚甲醛中固定 10 min，石蜡包埋切片，脱蜡，梯度酒精脱水，移入苏木素溶液中浸染 15 min。使用蒸馏水洗去苏木素及浮色后移入分化液（1%盐酸酒精）中10 min，使切片褪色至淡蓝红色即可。流水冲洗 30 min 后进行伊红染色 3 min，使组织呈天蓝色。分别经酒精脱水、二甲苯透明后，用中性树胶封片，晾干后即可行显微镜下观察及拍照。

**1.3.8**　*细胞活性检测*　分别将不同胶原浓度三维

立体培养的成骨细胞种于 96 孔板中,每孔 200 μL。分别培养 3 d、6 d、9 d 之后,采用常规 CCK-8 法检测细胞活性,即每 200 μL 培养基加入 8 μL CCK-8 试剂,37 ℃孵育 4 h 之后用酶标仪测定 450 nm 处吸光度(A)值。

**1.3.9** *统计学方法* 数据用 $\bar{x}\pm s$ 或率表示。组间比较采用 $\chi^2$ 检验或 $t$ 检验,$\alpha=0.05$。

## 2 结果

### 2.1 普通显微镜下细胞形态观察

细胞在不同浓度的凝胶中培养 3 d 后,普通显微镜下细胞的生长状态以及形态见图1。凝胶浓度为 1 mg/mL 与 2 mg/mL 的培养体系中,细胞多呈伸展开状态,呈三角形或长梭形,且在相同的培养条件,胶原浓度为 2 mg/mL 的培养体系中,细胞增长的速度比1 mg/mL培养体系更快,且细胞更饱满圆

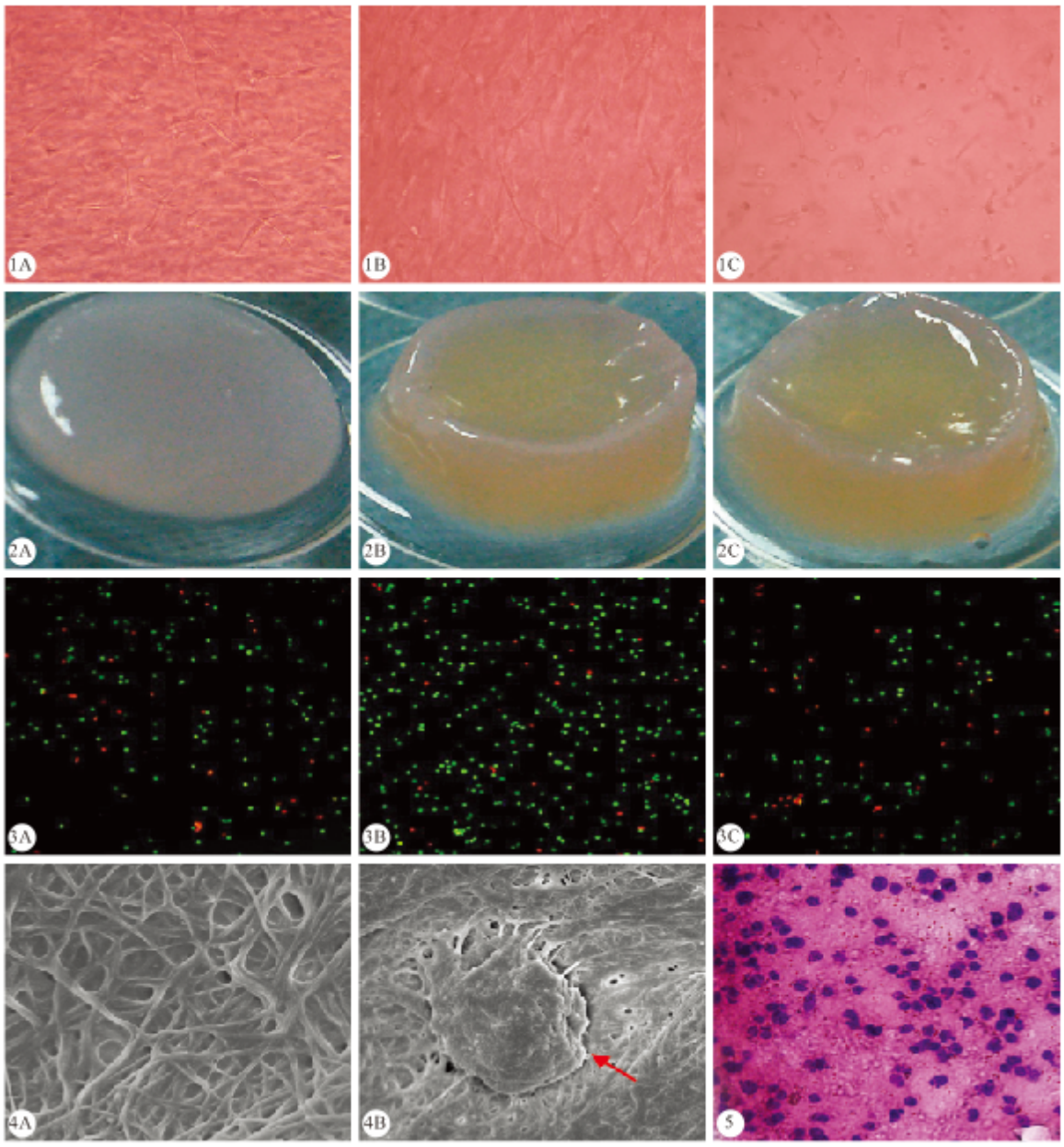


**图 1 三维立体培养成骨细胞形态。×100 图 2 不同浓度的胶原水凝胶材料形态 图 3 三维立体培养成骨细胞存活情况检测结果。×40 图 4 扫描电镜下观察胶原水凝胶与细胞复合物形态 图 5 2 mg/mL 胶原浓度培养 6 d 后的 HE 染色结果。×400**

**Fig 1 Morphology of 3D collagen hydrogel culture ROBs. ×100 Fig 2 Morphology of different concentrations of collagen hydrogel material Fig 3 Cells viability of different collagen culture system. ×40 Fig 4 SEM micrograph of 3D collagen hydrogel culture of ROBs Fig 5 HE staining of 2 mg/mL 3D collagen hydrogel culture of ROBs at 6 d. ×400**

1A,2A,3A: 1 mg/mL gel concentration; 1B, 2B, 3B: 2 mg/mL gel concentration; 1C, 2C, 3C: 3 mg/mL gel concentration; 4A: Collagen hydrogel material, ×10 000; 4B: ROBs (arrow), ×5 000

融。而胶原浓度为 3 mg/mL 培养体系中，细胞多呈圆形，且细胞有凋亡的趋势。

### 2.2　不同浓度的水凝胶形成结构对比观察结果

胶原水凝胶块观察（图 2）发现，胶原浓度为 1 mg/mL的水凝胶，结构比较松散，含水分较高，硬度较低，形态较差且已被部分降解。而胶原浓度为 2 mg/mL与 3 mg/mL 的水凝胶块硬度较高，形态保持完整，在整个培养过程中胶原降解较少。

### 2.3　细胞存活率检测结果

成骨细胞进行胶原三维立体培养 6 d 后，FDA/PI 死活细胞染色结果显示，胶原浓度为 1 mg/mL 的培养体系中，被染成绿色的活细胞较多，红色的死细胞较少，活细胞数占总细胞数的（75.12 ± 2.49）%。胶原浓度为 2 mg/mL 的培养体系中，只有个别呈红色的死细胞，呈绿色的活细胞数占总细胞数的（88.63±3.12）%。而胶原浓度为 3 mg/mL 的培养体系中，活细胞数量较少，占总细胞数的（58.29±2.12）%。见图 3。3 组间细胞存活率差异有无统计学意义（$P<0.05$）。

### 2.4　扫描电镜结果

对胶原浓度为 2 mg/mL 的胶原水凝胶进行电镜扫描，结果表明胶原纤维分布均匀（图 4A），该浓度下细胞生长状态良好（图 4B），细胞较为饱满，与胶原材料交联紧密。

### 2.5　HE 染色结果

胶原浓度为 2 mg/mL 的成骨细胞培养 6 d 后 HE 染色，结果表明细胞在胶原材料中分布均匀，密度适中（图 5）。

### 2.6　细胞活性检测结果

成骨细胞三维立体培养 3 d、6 d、9 d 后，CCK-8法检测结果（图6）显示，胶原浓度2 mg/mL的培养体系细胞活性高于其它组（$P<0.05$），细胞活性最高。

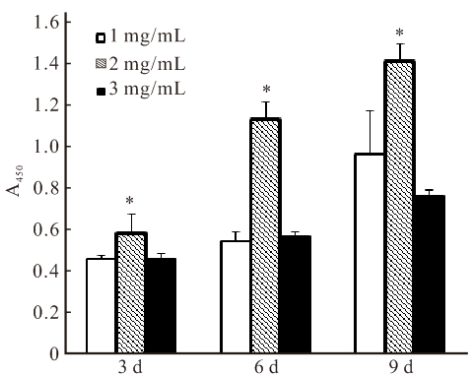


**图 6　三维立体培养成骨细胞活性检测结果**

**Fig 6　Result of cell activity**

* $P<0.05$, vs. 1 mg/mL and 3 mg/mL groups

## 3　讨论

随着我国人口逐渐老龄化，作为老年性疾病之一的骨质疏松症，其发病率也在不断地增加[7]。然而，目前对于骨质疏松症的预防和治疗，依旧没有非常理想的治疗手段，开发抗骨质疏松症的替代疗法一直是研究热点。目前，骨质疏松预防和治疗的研究多以成骨细胞为研究对象，其在骨质疏松新治疗手段的研究和开发中发挥着重要作用。成骨细胞多采用单层细胞培养，虽培养操作方便，细胞能快速增殖，但其生长环境与体内环境相差较大，细胞间自分泌-旁分泌的相互作用较弱，成骨性相关因子的表达也受到抑制[8,9]。成骨细胞的三维立体培养，能够较好地模拟成骨细胞体内的生存环境，使其成骨性分化更加容易，对外界促进骨形成的药物或物理刺激更加敏感，更有利于进行抗骨质疏松症手段的研究[10,11]。

将成骨细胞接种于支架材料进行骨替换的研究已有报道，但以胶原水凝胶为基地进行原代成骨细胞的培养来进行骨质疏松症的预防与治疗研究的报道较少，系统地建立原代成骨细胞胶原水凝胶的三维立体培养的方法以及对胶原水凝胶中成骨细胞的形态、活性及其与胶原材料的黏附度进行鉴定等还有待研究[10,12]。因此，本研究系统地筛选出了原代大鼠颅骨成骨细胞胶原水凝胶三维立体培养的方法，并对其细胞的形态、存活率、细胞活性及成骨细胞在胶原水凝胶中的分布及黏附度进行了研究。发现将传代培养的第一代大鼠乳鼠颅骨成骨细胞与浓度为 2 mg/mL 的 Ⅰ 型鼠尾胶原、DMEM 培养液、NaOH 等混合，通过调节混合液 pH 并将其置于 37 ℃使胶原凝固成形，能够很好地建立成骨细胞的三维立体培养的模型。此胶原材料成形好、硬度高，有利于后续研究的进行。该胶原浓度培养体系中成骨细胞多呈圆形并且饱满圆润，FDA/PI 染色以及 CCK-8 活性检测结果显示该体系中细胞存活率与活性最高。最后通过扫描电镜和 HE 染色显示细胞在胶原材料中分布均匀，与胶原材料黏附较好。

胶原在人体内含量较丰富，作为天然材料，其免疫排斥反应小，生物相容性高，同时水凝胶支架具有含水量高，氧气、营养物质及代谢废物容易运输、制作工艺简单以及易于交联等优点，是进行细胞三维立体培养的绝佳材料[3,12]。胶原水凝胶进行三维立

体培养的难点在于,当胶原浓度较低时,形成的网状结构较大,但是其成胶能力差,凝胶容易降解,无法进行较长时间的细胞培养。当胶原浓度过高时,形成的网状结构太致密,细胞无法较好地伸展,营养物及代谢物的输送同样受到限制,最终导致细胞趋于凋亡。本研究建立的成骨细胞三维立体培养体系,为开发低频电磁场或其它治疗和预防骨质疏松症药物的研究和开发提供了帮助[12,13]。

## 参 考 文 献


1 Kim K, Svedbom A, Luo X, *et al*. Comparative cost-effectiveness of bazedoxifene and raloxifene in the treatment of postmenopausal osteoporosis in Europe, using the FRAX algorithm. Osteoporos Int,2014;25(1):325-337.

2 Kanis J, McCloskey E, Johansson H, *et al*. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. Osteoporos Int,2013;24(1):23-57.

3 Bajaj P, Schweller RM, Khademhosseini A, *et al*. 3D biofabrication strategies for tissue engineering and regenerative medicine. Annu Rev Biomed Eng,2014;16:247-76. doi:10.1146/annurev-bioeng-071813-105155.

4 Flora T, Tanguy W, Fleur M, *et al*. Effects of zoledronic acid on osteoblasts in three-dimensional culture. J Dent Sci,2014;10(1):8-15.

5 王 敏,兰 亚,胡 皓等.以胶原水凝胶为支架构建干细胞三维培养系统.中国组织工程研究,2013;17(29):5323-5330.

6 Neufurth M, Wang X, Schröder HC, *et al*. Engineering a morphogenetically active hydrogel for bioprinting of bioartificial tissue derived from human osteoblast-like SaOS-2 cells. Biomaterials,2014;35(31):8810-8819.

7 韩亚军,帖小佳.中国中老年人骨质疏松症患病率的 Meta 分析.中国组织工程研究,2014;18(7):1129-1134.

8 石文贵,马小妮,谢艳芳等.淫羊藿苷促成骨细胞分化成熟主要不依赖其雌激素活性.中国中药杂志,2014;39(14):63-68.

9 Ming LG, Lv X, Ma XN, *et al*. The prenyl group contributes to activities of phytoestrogen 8-prenynaringenin in enhancing bone formation and inhibiting bone resorption *in vitro*. Endocrinology,2013;154(3):1202-1214.

10 Chatterjee K, Lin-Gibson S, Wallace WE, *et al*. The effect of 3D hydrogel scaffold modulus on osteoblast differentiation and mineralization revealed by combinatorial screening. Biomaterials,2010;31(19):5051-5062.

11 Ho W, Tawil B, Dunn JC, *et al*. The behavior of human mesenchymal stem cells in 3D fibrin clots: dependence on fibrinogen concentration and clot structure. Tissue Eng,2006;12(6):1587-1595.

12 赵可伟,唐菊英,肖 林等.三维培养成骨细胞系统在骨康方含药血清体外干预实验中的应用研究.中药材,2013;36(6):972-975.

13 Bernabei R, Martone AM, Ortolani E, *et al*. Screening, diagnosis and treatment of osteoporosis: a brief review. Clin Cases Miner Bone Metab,2014;11(3):201-207.


(2015-07-16 收稿,2015-11-17 修回)

编辑 沈 进


# 本 刊 征 稿 启 事

《四川大学学报(医学版)》(原《华西医科大学学报》)是中文核心期刊,曾荣获全国优秀科技期刊一等奖、首届国家期刊奖提名奖、第二、三届国家期刊奖百种重点期刊、四川省十佳科技期刊称号和第一、二、三、四、五届中国高校精品科技期刊奖,2014 中国国际影响力优秀学术期刊。本刊被美国《医学索引》(INDEX MEDICUS, IM/MEDLINE),《生物学文摘》(BIOLOGICAL ABSTRACTS,BA),《化学文摘》(CHEMICAL ABSTRACTS,CA),荷兰《医学文摘》(EXCERPTA MEDICA, EM),中国科技论文与引文数据库(CSTPCD),中国生物医学文献光盘数据库(CBMdisc),中文生物医学期刊文献数据库(CMCC),中国学术期刊网全文数据库(CNKI),中国学术期刊(光盘版),万方数据-数字化期刊群等数据库收录。

为了更好地开展国内外学术交流,促进医药卫生事业的发展,凡符合编辑部稿件要求(见每卷末期稿约),均可向本刊投稿。凡属于国家自然科学基金及其他部省级以上科研基金资助的来稿,编辑部将适当地给予优先。用英文撰写的稿件投稿时应附上中文稿。英文稿一经采用,刊出时间可提前。

本刊在线投稿网址:http://scdx.cnjournals.com

地址:四川省成都市人民南路三段 17 号四川大学学报(医学版)编辑部

邮政编码:610041

电话/传真:(028)85501320

E-mail: scuxbyxb@scu.edu.cn

四川大学学报(医学版)编辑部