

宽纹虎鲨软骨细胞体外培养的启动

于秋涛, 樊廷俊, 汪小锋, 丛日山, 汤志宏, 吕翠仙, 史振平

(中国海洋大学 生命科学与技术学部海洋生物系, 山东 青岛 266003)

摘要: 以活体宽纹虎鲨(*Heterodontus japonicus*)的鳃软骨和鳍软骨组织为材料, 利用透明质酸酶(hyaluronidase)、II型胶原酶(type II collagenase)和胰蛋白酶(trypsin)进行消化获得游离软骨细胞, 对所得游离细胞连同软骨组织分别用含20%小牛血清的MEM培养液进行体外培养。对软骨细胞体外培养条件的优化结果显示, 宽纹虎鲨鳍软骨细胞体外培养的最适pH为7.2~7.6、最佳温度为24℃, 成纤维细胞生长因子(bFGF, basic fibroblast growth factor)对软骨细胞作用不显著。培养于pH 7.2~7.6的MEM培养液(含20%小牛血清)中的宽纹虎鲨鳍软骨组织, 在24℃启动培养3d后便有软骨细胞开始陆续从组织中迁出, 新迁出细胞的形态多为圆形, 随着培养时间的延长, 部分细胞形态逐渐转变成上皮样。

关键词: 宽纹虎鲨(*Heterodontus japonicus*); 软骨细胞; 体外培养

中图分类号: Q813 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2005)03-0033-05

癌症, 作为当前危害人类生命与健康的严重疾病之一, 其患病死亡率在世界上仍高居第三位。尽管传统的治疗方法能达到一定效果, 但目前仍属不治之症。因此, 探讨肿瘤治疗的新途径已成为世界各国医疗领域的重大研究课题之一。经研究发现, 鲨鱼是极少患恶性肿瘤的海洋生物之一, 其发病率仅为百万分之一^[1]。由于鲨鱼具有其独特的缺少血管的软骨组织^[2, 3], 因此美国科学家将高剂量的强致癌剂——黄曲霉素B注射到鲨鱼体内, 也不能诱发鲨鱼长癌。

软骨(cartilage)是动物体内一种高度特化的致密结缔组织, 属无血管组织, 主要由软骨细胞和含有胶原纤维以及大量蛋白聚糖的细胞外基质构成。从20世纪70年代起, 人们在多种动物软骨中发现了抑制新血管形成与抑制肿瘤生长的活性因子的存在^[4-9]。这些活性因子包括血管生成抑制因子(angiogenesis inhibiting factor, AGIF), 抗肿瘤因子(anti-tumor factor)及抗入侵因子(anti-invasion factor)。其中以AGIF因子研究得最为详细, 也最为深入。

1983年, Lee和Langer^[10]首次从鲨鱼软骨中分离出具有抑制新生血管生长的活性物质。与牛软骨相比, 该物质的胰酶抑制活性仅为其1/15, 但其

血管生成抑制活性要高得多。在90年代初, 国外便开始利用鲨鱼软骨粉治疗中晚期癌症^[11-15]。但是, 由于目前过度捕捞以及环境污染等问题, 鲨鱼的数量大幅度减少, 再者由于软骨组织中含有许多大分子如蛋白聚糖和胶原蛋白等原因, 给从鲨鱼软骨中提取活性物质带来了很大困难。

软骨细胞是软骨素和AGIF等的分泌细胞。1992年Moses^[4]等从牛肩胛软骨的条件培养基中分离出了AGIF因子, 首次证实了培养软骨细胞可产生含量丰富的高活性AGIF因子。从此, 人们才相信, 通过对软骨细胞的大规模培养技术, 可以获得大量廉价的血管生成因子制品, 为肿瘤患者得到有效而廉价的治疗创造条件。

1986年以来, Weiss A等开始对软骨细胞进行

收稿日期: 2004-10-08; 修回日期: 2005-01-08

基金项目: 教育部留学回国人员基金项目(980418)

作者简介: 于秋涛(1979-), 女, 山东青岛人, 硕士研究生; 通讯作者: 樊廷俊(1964-), 男, 山东单县人, 教授/博士生导师, 博士, 主要从事海洋经济动物细胞工程与细胞分化研究, 电话: 0532-2031637, E-mail: tjfan@ouc.edu.cn

体外培养^[16-22]。先后成功培养了鸡、鼠兔子等的软骨细胞,并且利用SV40病毒T抗原对培养人软骨细胞进行转化诱导,成功地建立了人软骨细胞系^[17]。2003年,樊廷俊等报道了孔鲷的软骨细胞的原代培养^[23]。但到目前为止,在国际上还未见有关鲨鱼软骨细胞体外培养和建系的研究报道。本研究旨在创立鲨鱼软骨细胞的体外培养技术,为鲨鱼软骨细胞的建系以及鲨鱼软骨生物活性物质的进一步开发利用奠定前期的研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

宽纹虎鲨 (*Heterodontus japonicus*), 质量约 0.5 kg, 购自青岛台东海鲜市场; 培养用软骨组织取自活体宽纹虎鲨的鳍和鳃软骨。

MEM 培养基, Gibco 公司产品; 小牛血清, Hyclone 公司产品; 透明质酸酶(hyaluronidase)、II 型胶原酶(Type II collagenase)、胰蛋白酶(Trypsin)和成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)均为 Sigma 公司产品。实验中所用化学试剂均为分析纯。

1.2 组织取材

宽纹虎鲨用铁锤敲击头部致死, 用 70% 酒精擦洗其体表后, 剪下宽纹虎鲨的鳃和鳍, 置于 PBS 缓冲液中。于无菌室中剥离出鳃软骨与鳍软骨, 经 70% 酒精浸泡(1 min)后, 于超净工作台中再用 70% 酒精浸泡 1 min, 经无血清 MEM 冲洗 3 遍后, 放入含 5% 小牛血清的 MEM 培养液中, 用手术刀、眼科剪等将表面残余的肌肉组织去除。置软骨放入青霉素小瓶中, 加入 2 mL 含 5% 血清的 MEM 培养液, 用眼科剪将软骨剪成大小 1 mm³ 的组织碎块。将组织块转移至离心管中, 500 r/min 离心 5 min, 分别收集上清和沉淀。将沉淀悬浮于无血清 MEM 培养液中, 充分震荡后 1200 r/min 离心 10 min, 收集沉淀以备消化。

1.3 组织块的消化处理

于沉淀的组织碎块中, 加入 0.5% 透明质酸酶和 0.2% II 型胶原酶各 2 mL, 24℃ 无菌消化 1 h, 每隔 15~20 min 振摇一次。消化后, 500 r/min 离心 5 min 分别收集上清(含游离软骨细胞)和沉淀, 所得沉淀加入 0.25% 胰蛋白酶和无血清 MEM 培养液各 2 mL, 于 24℃ 消化 20 min。胰蛋白酶消化后, 500 r/min 离心 5 min 收集沉淀, 再加入 0.5% 透明质酸酶和 0.2% II 型胶原酶各 2 mL, 培养箱中

24℃ 消化 1 h, 每隔 15~20 min 振摇一次。消化结束后, 经 500 r/min 离心 5 min 分别收集沉淀和上清, 进行体外培养。

1.4 体外培养

所得沉淀悬浮于含 10% 血清的 MEM 培养液中, 以终止反应, 按每瓶 1~2 mL 的液量接种于 25 cm² 培养瓶中, 使其均匀平铺于瓶底, 倒置干贴 4~6 h。干贴结束后, 再补加含 20% 血清的 MEM 培养液至 5 mL/瓶。

所收集上清液经 1200 r/min 离心 10 min 后, 收集游离细胞并用含 10% 血清的 MEM 培养液悬浮, 接种于 25 cm² 培养瓶中, 正贴过夜。次日补加含 20% 血清的 MEM 培养液至 5 mL/瓶。

组织块及软骨细胞培养于含 20% 小牛血清的 MEM 培养基中(含 100 IU/mL 青霉素和 100 ig/mL 链霉素), 观察细胞的形态、贴壁性、生长与分裂情况。每隔 4~5d, 待培养基开始变黄时进行半换液处理。需要进行二次消化时, 可在原代培养启动 4~7d 后进行二次消化。

1.5 培养液最适 pH 值的确定

用 1 mol/L HCl 或 1 mol/L NaOH 分别将 MEM 培养液的 pH 值调至 6.8, 7.2 和 7.6, 将获得的组织块和游离细胞分别培养在含有 20% 血清的不同 pH 值的 MEM 培养液中, 24℃ 恒温培养, 观察并比较细胞的形态、贴壁性、生长与分裂情况。

1.6 最适培养温度的确定

将组织块和游离细胞分别接种于 pH 7.2 含 20% 小牛血清的 MEM 培养液中, 分别置于 20, 24, 28℃ 恒温培养, 观察并比较细胞的形态、贴壁性、生长与分裂情况。

2 实验结果

2.1 软骨细胞原代培养的启动

通过对宽纹虎鲨鳍、鳃软骨的消化组织分别进行培养发现, 鳍软骨组织经消化后软骨细胞容易迁出(图 1), 且迁出后生长态势良好(图 2); 而鳃软骨虽易于剪碎, 但细胞的迁出则不如鳍软骨。

2.2 培养软骨细胞的形态特征

在 24℃、培养于 pH 7.2、含 20% 小牛血清的 MEM 培养液中的宽纹虎鲨软骨组织, 在启动培养 3d 后, 宽纹虎鲨软骨细胞逐渐开始迁出, 并开始生长和分裂(图 1)。观察结果显示, 软骨细胞

为贴壁细胞，细胞从组织块迁出时多为椭圆形或圆形。在随后的培养过程中，也有部分细胞其形态会逐渐发生转变，有些变成了上皮样细胞形态（图3，

A）。迁出的细胞具有很强的增殖能力，常常可观察到处于不同分裂相的细胞（图3，B）。



图1 宽纹虎鲨鳍软骨组织的细胞迁出态势 (100×)

Fig.1 The migration of cartilage cells from fin tissues (100×)



图2 体外培养的宽纹虎鲨鳍软骨细胞生长状态 (100×)

Fig.2 The growth of cartilage cells from fin tissues (100×)

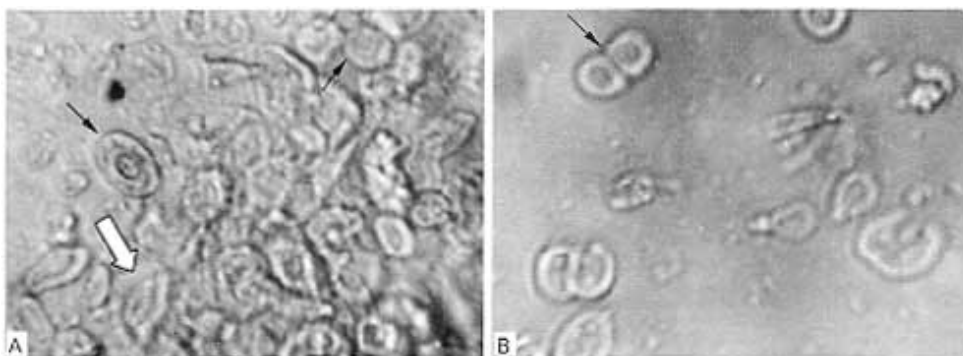


图3 体外培养的宽纹虎鲨软骨细胞(400×)

Fig.3 The shark cartilage cells *in vitro* culture(400×)

- A. 体外培养的软骨细胞形态（黑箭头示圆形或椭圆形细胞，白箭头示上皮样细胞）；B. 分裂时椭圆形或圆形的软骨细胞
 A. The morphology of cartilage cells *in vitro* culture (the black arrow shows oval or round cell, the white arrow shows epithelioid cell);
 B. Oval or round cartilage cells when dividing

2.3 培养液的最适 pH 值与培养的最适温度

在 pH 值 7.2 时，软骨细胞的迁出及生长态势最好（图 4），细胞容易迁出且能够维持生长和增殖大约 15d；pH 为 7.6 时次之；而在 pH 6.8 时，只有小部分细胞迁出。在不同温度下对宽纹虎鲨软骨细胞进行培养发现，培养温度为 24℃ 时，软骨细胞的迁出及生长态势最好，细胞容易迁出且能够维持生长和增殖大约 15d（图 4）。

3 讨论

建立鲨鱼软骨细胞的体外培养体系，是研究鲨鱼软骨组织和鲨鱼软骨细胞的一种理想的体外实验模型。目前，从鲨鱼软骨中提取抗肿瘤活性因子进

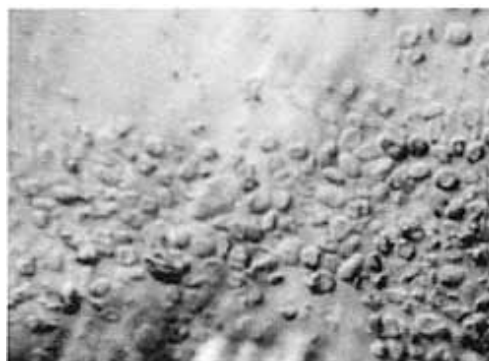


图4 pH 7.2、24℃时软骨细胞的生长状态 (100 ×)
 Fig.4 Growth of cartilage cells cultured at pH 7.2 and 24°C (100×)

而应用于肿瘤的临床治疗的研究, 已为许多学者所关注的热点^[12, 13, 24-26]。但是利用鲨鱼软骨细胞的大规模体外培养技术来获取抗肿瘤活性因子的尝试, 在国内外至今还未见报道。动物软骨细胞的体外培养研究也多集中于哺乳类和鸟类动物中。利用本实验室已建立的孔鳐(*Raja porosa*)吻软骨细胞的体外培养条件, 对鲨鱼软骨细胞的体外培养技术的创立和培养条件的优化进行了探索。

现有文献资料表明^[27-29], 哺乳类动物软骨细胞的培养多选用耳廓、关节等部位的软骨。作者所用材料为活体宽纹虎鲨的鳃和鳍软骨组织。宽纹虎鲨属于软骨鱼, 尽管软骨的数量很多, 但非常碎、小而且分散, 因此很难剥离。作者之所以采用鳃和鳍软骨为启动软骨细胞培养的组织, 是因为鳃和鳍软骨的易取性和易被消化性。而宽纹虎鲨的脊椎骨等其它软骨, 因过于致密, 故很难被消化。

由于宽纹虎鲨软骨中含有大量的细胞外基质, 其中以蛋白聚糖和胶原蛋白最为丰富, 故难于获得大量的游离软骨细胞。针对这一特点, 作者选用透明质酸酶(0.5%)和II型胶原蛋白酶(0.2%), 来特异性地降解细胞外基质中的多糖和胶原蛋白成分, 再配合以胰蛋白酶(0.25%), 降解那些非特异性蛋白质成分。透明质酸酶和II型胶原酶对底物具有高度特异性, 所以适当延长了其消化降解时间, 以期获得更多的游离软骨细胞来启动其原代培养。

作者对宽纹虎鲨软骨细胞体外培养条件进行了优化, 发现宽纹虎鲨软骨细胞的最适pH值为7.2~7.6; 最适温度为24℃。培养液的pH值和培养温度的高低直接影响了细胞内的酶活性, 尤其是那些在细胞生长和分裂过程中起关键作用的蛋白酶。据报道, 软骨细胞一般在弱碱性的培养液中易于生长。所得最适pH为7.2~7.6, 也在弱碱性的pH范围内。与宽纹虎鲨同为软骨鱼的孔鳐, 其最适pH亦为7.6^[30]。

通过在培养游离软骨细胞和软骨组织的培养液中添加bFGF, 发现bFGF对培养宽纹虎鲨软骨细胞的促进作用不显著。该结果与其他动物如孔鳐、对虾^[30, 31]等的实验结果不同, 可能与种间差异有关。目前, 我们正在进行宽纹虎鲨软骨细胞的培养条件进行优化, 希望在不久的将来能建立起宽纹虎鲨软骨细胞系, 为AGIF及其他抗肿瘤因子的规模化生产奠定基础。

参考文献:

- [1] Mathews J. Sharks still intrigue cancer researchers[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1992, **84** (13):1 000-1 002.
- [2] Mathews J. Media feeds frenzy over shark cartilage as cancer treatment[J]. *J Natl Cancer Inst*, 1993, **85** (15): 1 190-1 191.
- [3] Dupont E, Brazeau P, Juneau C. Extracts of shark cartilage having an anti-angiogenic activity and an effect on tumor regression[J]. *Pross of making thereof US*, 1997, 5:618,925.
- [4] Moses M A, Sudhalter J, Langer R. Isolation and characterization of an inhibitor of neovascularization from scapular chondrocytes[J]. *J cell Biol*, 1992, 119:475-482.
- [5] Maione T E, Sharpe R J. Development of angiogenesis inhibitors for clinical applications[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 1990, **11** (11):457-461.
- [6] Moses M A, Sudhalter J, Langer R. Identification of an inhibitor of neovascularization from cartilage[J]. *Science*, 1990, **248**(4 961):1 408-1 410.
- [7] Liu N, Lapcevic R K, Underhill C B, *et al*. Metastatin: a hyaluronan-binding complex from cartilage that inhibits tumor growth[J]. *Cancer Res*, 2001, **61**(3):1 022-1 028.
- [8] Kern B E, Balcom J H, Antoniu B A, *et al*. Troponin I peptide (Glu94-Leu123), a cartilage-derived angiogenesis inhibitor: in vitro and in vivo effects on human endothelial cells and on pancreatic cancer[J]. *J Gastrointest Surg*, 2003, **7**(8):961-969.
- [9] 刘嘉璐, 顾谦群, 方玉春. 软骨抗癌活性成分的研究进展[J]. *中国海洋药物*, 1999, 1:37-42.
- [10] Lee A, Langer R. Shark cartilage contains inhibitors of tumor angiogenesis[J]. *Science*, 1983, **221**:1 185-1 187.
- [11] 于志洁, 蔡平, 吕家本, 等. “鲨鱼精”胶囊在肿瘤治疗中的临床观察[J]. *中国海洋药物*, 1997, 1:12-14.
- [12] Dupont E, Savard P E, Jourdain C, *et al*. Antiangiogenic properties of a novel shark cartilage extract: potential role in the treatment of psoriasis[J]. *J Cutan Med Surg*, 1998, **2** (3):146-152.
- [13] Sheu J R, Fu C C, Tsai M L, *et al*. Effect of U-995, a potent shark cartilage-derived angiogenesis inhibitor, on anti-angiogenesis and anti-tumor activities[J]. *Anticancer Res*, 1998, **18** (6A):4 435-4 441.
- [14] Berbari P, Thibodeau A, Germain L, *et al*. Antiangiogenic effects of the oral administration of liquid cartilage extract in humans[J]. *J Surg Res*, 1999, **87** (1):108-113.
- [15] Gonzalez R P, Leyva A, Moraes M O. Shark cartilage as source of antiangiogenic compounds: from basic to clinical research[J]. *Biol Pharm Bull*, 2001, **24**(10):1 097-1 101.
- [16] Weiss A, von der Mark K, Silbermann M. A tissue culture system supporting cartilage cell differentiation, extracellular mineralization, and subsequent bone formation, using mouse condylar progenitor cells[J]. *Cell Differ*, 1986, **19**(2):103-113.
- [17] Verbruggen G, Malfait A M, Almqvist K F, *et al*. Development of immortalized human articular cartilage cell lines[J]. *Agents Actions Suppl*, 1993, **39**: 267-272.
- [18] van de Werken R, Gennari M, Tavella S, *et al*. Modula-

- tion of tensin and vimentin expression in chick embryo developing cartilage and cultured differentiation chondrocytes[J]. *Eur J Biochem*, 1993, **217** (2):781-790.
- [19] Shakibaei M, De Souza P. Differentiation of mesenchymal limb bud cells to chondrocytes in alginate beads[J]. *Cell Biol Int*, 1997, **21** (2):75-86.
- [20] van Osch G J, van der Veen S W, Verwoerd-Verhoef H L. In vitro redifferentiation of culture-expanded rabbit and human auricular chondrocytes for cartilage reconstruction[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2001, **107**(2):433-440.
- [21] Garimella R, Bi X, Camacho N, *et al.* Primary culture of rat growth plate chondrocytes: an in vitro model of growth plate histotype, matrix vesicle biogenesis and mineralization[J]. *Bone*, 2004, **34**(6):961-970.
- [22] Stern S, Lindenhayn K, Perka C. Human intervertebral disc cell culture for disc disorders[J]. *Clin Orthop*, 2004, **419**:238-244.
- [23] Fan T J, Jin L Y, Wang X F. Initiation of cartilage cell culture from skate (*Raja porasa* Gunther) [J]. *Mar Biotechnol*, 2003, **5**(1):64-69.
- [24] Oikawa T, Ashino-Fuse H, Shimamura M, *et al.* A novel angiogenic inhibitor derived from Japanese shark cartilage (I). Extraxtion and estimation of inhibitory activities toward tumor and embryonic angiogenesis[J]. *Cancer Lett*, 1990, **51** (3):181-186.
- [25] Liang J H, Wong K P. The characterization of anginogenesis inhibitor from shark cartilage[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2000, **476**:209-223.
- [26] 沈先荣, 吉冬梅, 胡幼卿, 等. 血管生成抑制因子 SCAIF80及其抗肿瘤效应[J]. *生物化学与生物物理学报*, 2001, **33** (1):99-104.
- [27] 张金宁, 王旭东, 杨驰. 猕猴耳廓软骨细胞的体外培养与鉴定[J]. *口腔医学纵横*, 2001, **17**(1):28-30.
- [28] Schindler F H, Ose M A, Solorsh M. The synthesis of cartilage collagen by rabbit and human chondrocytes in primary cell culture[J]. *In Vitro*, 1976, **12** (1):44-47.
- [29] Fuentes M A, Opperman L A, Bellinger L L, *et al.* Regulation of cell proliferation in rat mandibular condylar cartilage in explant culture by insulin-like growth factor-1 and fibroblast growth factor-2[J]. *Arch Oral Biol*, 2002, **47**(9):643-654.
- [30] Fan T J, Jin L Y, Wang X F. Effects of Basic Fibroblast Growth Factor and Insulin-like Growth Factor on Cultured Cartilage Cells from Skate *Raja porasa*[J]. *Oceanol et limnol sin*, 2003, **21**(4):305-311.
- [31] Fan T J, Wang X F. In vitro culture of embryonic cells from shrimp *Penaeus chinensis*[J]. *J Exp Marine Biol Ecol*, 2002, **267**:175-184.

In vitro culture of cartilage cells from shark, *Heterodontus japonicus*

YU Qiu-tao, FAN Ting-jun, WANG Xiao-feng, CONG Ri-shan, TANG Zhi-hong, LÜ Cui-xian, SHI Zhen-ping

(Department of Ecology, Division of Life Science and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: Oct., 8, 2004

Key words: shark; cartilage cell; *in vitro* culture

Abstract: This study was to initiate *in vitro* culture of shark cartilage cells. Fin and gill cartilage tissues digested by hyaluronidase (0.5%), Type II collagenase (0.2%) and trypsin (0.25%) were chosen for the initiation. Then the digested tissues and dissociated cells obtained were cultured in 20% newborn bovine serum (NBS) containing MEM medium. The results show that cultured cartilage cells began to migrate out of tissues 3 days after the culture initiated. And they became round or oval shape immediately after the migration, and some of them changed gradually into epithelioid shape later. It was found that the optimal pH value and temperature for cultured cartilage cells is 7.2, and 24 °C, respectively. Under the optimal conditions, the culturing cartilage cells were in a good growing status, and they grow and proliferate rapidly. The effect of basic fibroblast growth factor (bFGF) on culturing cartilage cells was also investigated in this study, and no obvious growth and proliferation stimulating effect was observed.

(本文编辑: 刘珊珊)