

· 基础研究 ·

流体剪切力影响人关节软骨细胞合成Ⅱ型胶原的研究

王华 刘世清 陈廖斌 陈彪

【摘要】目的 检测体外培养的人关节软骨细胞在不同大小的间断剪切力作用下合成Ⅱ型胶原的能力。方法 选取培养的软骨组织,按摇床作用的转速分为:空白对照组和低、中等、高转速组(转速分别为 20、40、60 转/min);通过免疫组化法检测关节软骨细胞Ⅱ型胶原蛋白的表达,RT-PCR 法检测Ⅱ型胶原 mRNA 表达。结果 中等转速组和高转速组Ⅱ型胶原免疫组化平均光密度(OD)值分别为 (0.3061 ± 0.0530) 和 (0.3777 ± 0.0397) ,均高于低转速组平均 OD 值 (0.2184 ± 0.0135) 和空白对照组平均 OD 值 (0.1846 ± 0.0363) ,差异均有统计学意义($P < 0.05$);低、中等、高转速组Ⅱ型胶原 mRNA OD 比值分别为 (0.120 ± 0.003) 、 (0.150 ± 0.005) 、 (0.210 ± 0.006) ,均高于空白对照组 OD 比值 (0.080 ± 0.006) ,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 一定强度间断剪切力能够影响人软骨细胞的代谢、增殖活动,使其合成Ⅱ型胶原增多。

【关键词】剪切力; 软骨细胞; Ⅱ型胶原

Effects of fluid shearing force on type II collagen synthesis by human chondrocytes in vitro WANG Hua*, LIU Shi-qing, CHEN Liao-bin, CHEN Biao. * Department of Orthopaedic Surgery, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China

Corresponding author: LIU Shi-qing, Email: whzkwlh@126.com

【Abstract】Objective To detect type II collagen synthesis by cultured human chondrocytes under the influence of different intermittent fluid shearing forces. Methods Second passage human monolayer chondrocytes were divided into low-speed (20 rpm/min), mid-speed (40 rpm/min) and high-speed (60 rpm/min) groups according to the rotation speed of the rocking bed. The expression of type II collagen was analyzed using immunohistochemistry and RT-PCRs. Results The absorbance of the mid-speed and high-speed groups was significantly greater than that of the low-speed group and a control group. The average optical density of type II collagen by RT-PCR was significantly higher in all three sheared groups than in the control group. Conclusions Intermittent shearing can enhance cellular proliferation and the metabolism of human chondrocytes in vitro and promote the expression of type II collagen.

【Key words】Shearing force; Chondrocytes; Type II collagen

由于创伤的增多和老龄化社会的到来,骨关节炎患者众多。关节软骨细胞的力学特性是影响关节健康和功能的重要因素,目前认为软骨细胞是一类力学敏感细胞,生理性的力学刺激有利于软骨细胞的生长、分化和代谢;过强或较弱的力学刺激则会抑制软骨细胞的代谢。本研究通过对体外培养的人关节软骨细胞施加不同的流体剪切力,来探讨不同流体剪切力对软骨细胞合成Ⅱ型胶原的影响,为软骨损伤的修复提供实验依据。

材料和方法

一、人关节软骨细胞的培养及力学干预

1. 人关节软骨的取材及培养:从武汉大学中南医

院骨科选取股骨颈骨折患者行髋关节置换时废弃的股骨头(均告知患者并获同意),在无菌条件下从股骨头表面将关节软骨切削下来,并用眼科剪将软骨组织剪成 1 mm^3 大小的组织碎块。依次用 0.25% 的胰蛋白酶和 0.2% Ⅱ型胶原酶消化分离软骨细胞,离心后沉淀物用 200 目不锈钢筛网过滤并加入全培养液置于培养瓶中,放置 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 2~3 d,除去未贴壁的细胞;加入含 10% 新鲜胎牛血清的培养基 5 ml 继续培养,当软骨细胞增殖铺满单层的 80%~90% 后,进行软骨细胞的传代。取第 2 代软骨细胞继续实验。

2. 力学干预及分组:通过摇床的转速调节流体剪切力,按转速的大小将第 2 代软骨细胞分为:空白对照组、低转速组(20 转/min)、中等转速组(40 转/min)、高转速组(60 转/min)。空白对照组置于 5% CO_2 、 37°C 培养箱中静止培养;其余 3 组按设定转速每天置于摇床上作用 2 h,每天 2 次,隔天更换培养液,共 7 d。

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2011.07.006

作者单位:430060 武汉,武汉大学人民医院骨科[王华(现在武汉大学中南医院工作)、刘世清];武汉大学中南医院骨科(陈廖斌、陈彪)

通信作者:刘世清,Email:whzkwlh@126.com

二、软骨细胞爬片Ⅱ型胶原免疫组化检测

各组分别行细胞爬片 3 d 并给予相应处理 7 d 后终止培养,细胞载片用 4% 的多聚甲醛固定,并 0.5% Triton X-100 孵育后再用 3% H_2O_2 室温孵育以消除内源性过氧化物酶活性;用正常山羊血清工作液(试剂 A)室温孵育封闭;滴加 1:100 稀释的一抗 50 μ l,置 4 $^{\circ}$ C 冰箱中过夜后,PBS 液冲洗 3 次;依次滴加生物素化二抗工作液(试剂 B)和辣根酶标记链霉卵白素工作液(试剂 C);DAB 显色(A、B、C 试剂各 1 滴,加 1 ml 蒸馏水);苏木精复染,氨水返蓝,常规梯度酒精脱水之后,二甲苯透明,50% 明胶封片;阴性对照用 PBS 液代替一抗。显微镜下观察并进行图像分析,计算平均光密度(optical density, OD)值。

三、RT-PCR 法检测Ⅱ型胶原 mRNA 表达

1. 提取细胞总 mRNA:取 4 组软骨细胞给予相应处理 7 d 后弃去培养基,离心沉淀在 Trizol 中,用移液管反复吹打裂解核蛋白体,依次经氯仿及异丙醇处理沉淀;用 75% 乙醇 1 ml 沉淀 RNA,震荡混匀样品;4 $^{\circ}$ C 下 7500 $\times g$ 离心沉淀 5 min,吸尽上清液,静置 1 h 挥发乙醇;用 DEPC 水 30 μ l 溶解 RNA,并在 55 $^{\circ}$ C 条件下孵育 10 min;紫外光检测 260 nm 与 280 nm 处 OD 值,计算 RNA 浓度与纯度,OD(260)/OD(280)比值最好 > 1.65。

2. mRNA 逆转录为 cDNA:将离心管置于冰上,加入反应混合物,包括总 RNA 0.1 ~ 5 μ g,随机引物 1 μ l, DEPC 水 10 μ l, 5 $\times$ reaction buffer 4 μ l, RiboLockTM Ribonuclease inhibitor 1 μ l, 10 mmol/L dNTP mix 2 μ l, RevertAidTM M 逆转录酶 1 μ l,轻轻混匀,低速离心;在 PCR 仪上设定逆转录条件:70 $^{\circ}$ C 5 min, 37 $^{\circ}$ C 5 min, 42 $^{\circ}$ C 60 min, 72 $^{\circ}$ C 5 min,将逆转录样品管置入 PCR 仪。程序完成后,取出样品管, -20 $^{\circ}$ C 保存。

3. PCR 引物及扩增条件:Ⅱ型胶原 $\alpha 1$, 片段长度:123 bp;上游引物为 5' CCAGTTGGGAGTAATGCAAG-GA3', 下游引物为 5' ACACCAGGTTCCACCAGGTTC3';扩增条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 63 $^{\circ}$ C 复性 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

内参 β -actin, 片段长度:232 bp;上游引物为 5' AGCCATGTACGTTGCTAT3', 下游引物为 5' CTTAAT-GTCACGCACGATTT3';扩增条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 57 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

4. PCR 扩增产物的测定:扩增的 PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶中 100 mV 下电泳 15 min,采用 UVP 生物成像系统进行凝胶成像,用 Gelwork 图像分析软件将

各个目的条带进行扫描和灰度值分析,计算Ⅱ型胶原蛋白 $\alpha 1$ 与 β -actin 的 OD 值比值。

四、统计学分析

所得数据用($\bar{x} \pm s$)表示,利用 SPSS 14.0 版统计软件进行单因素方差分析。

结 果

一、倒置显微镜观察结果

原代软骨细胞经过 48 ~ 72 h 培养后完全贴壁,此时原代软骨细胞分别呈现球形、椭圆形或短梭形外观,少部分软骨细胞呈集落性生长(图 1)。传代后第 2 代软骨细胞大约需要 72 h 可以爬满整个培养瓶壁,此时可见软骨细胞呈较规整的短梭形,呈现集落性生长。

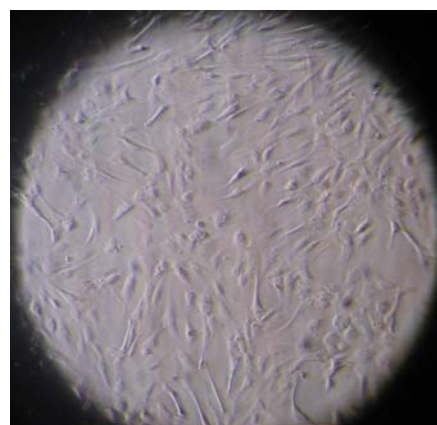


图 1 倒置显微镜下人软骨细胞呈现圆形、短梭形($\times 100$)

二、HE 染色结果

软骨细胞 HE 染色结果可见软骨细胞核呈淡蓝色,大而圆;胞浆染色均匀,呈浅红色(图 2)。

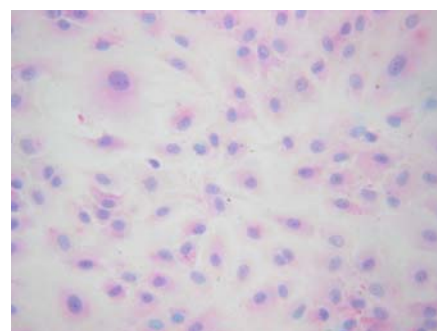


图 2 人关节软骨细胞显微镜下观察所见(HE 染色, $\times 200$)

三、Ⅱ型胶原免疫组化检测

中等转速组和高转速组Ⅱ型胶原免疫组化平均 OD 值分别为(0.3061 ± 0.0530)和(0.3777 ± 0.0397),均高于低转速组平均 OD 值(0.2184 ± 0.0135)和空白对照组平均 OD 值(0.1846 ± 0.0363),差异均有统计学意义($P < 0.05$),而低转速组和空白对照组Ⅱ型胶原免疫组化平均 OD 值差异无统计学意

义($P>0.05$)。见图 3~6。

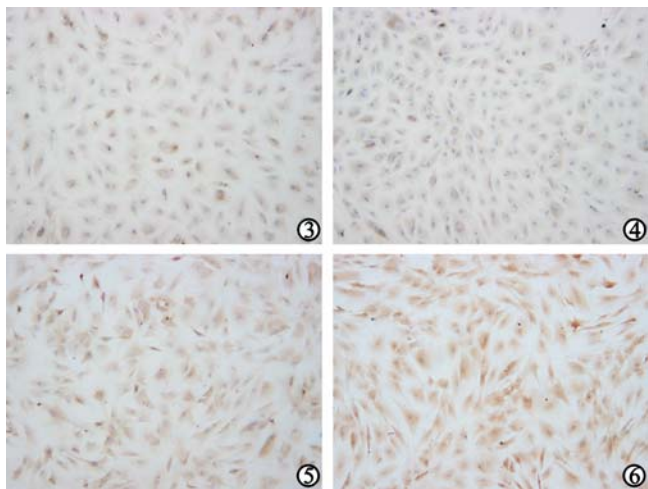
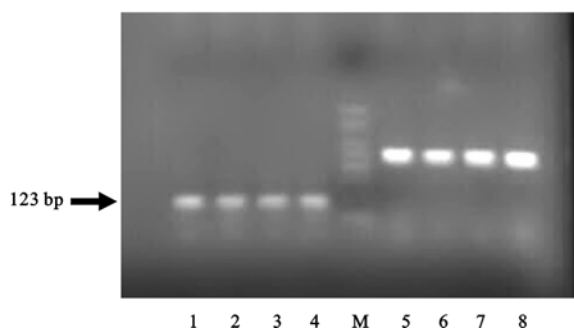


图 3 空白对照组 II 型胶原免疫组化染色($\times 100$); 图 4 低转速组 II 型胶原免疫组化染色($\times 100$); 图 5 中等转速组 II 型胶原免疫组化染色($\times 100$); 图 6 高转速组 II 型胶原免疫组化染色($\times 100$)

四、RT-PCR 检测 II 型胶原 mRNA 的表达

低、中等、高转速组 II 型胶原 mRNA OD 比值分别为(0.120 ± 0.003)、(0.150 ± 0.005)、(0.210 ± 0.006),均高于空白对照组 OD 比值(0.080 ± 0.006),且低、中等、高转速组 OD 比值依次递增,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 7。



注:M 为 Marker(各条带从上至下依次为 600 bp,500 bp,400 bp,300 bp,200 bp,100 bp),1 为高转速组,2 为中等转速组,3 为低转速组,4 为空白对照组,5~8 分别为高转速组、中等转速组、低转速组和空白对照组内参(232 bp)

图 7 II 型胶原 mRNA 表达

讨 论

关节软骨由软骨细胞和软骨基质组成,软骨细胞合成所有的细胞外基质,并调节基质的代谢。细胞外基质主要由胶原和蛋白聚糖组成,II 型胶原占胶原总量的 90%~95%,是软骨细胞所分泌的特有胶原类型,因此通过免疫组化法检测软骨细胞所分泌的 II 型胶原蛋白量可以提示软骨细胞的功能,当软骨细胞发

生去分化时将逐渐丧失合成 II 型胶原和硫酸软骨素蛋白多糖的能力。

引起软骨细胞发生分化及去分化的因素很多,其正常表型受到微环境、pH 值、细胞密度、力学、电磁场及激光照射等众多因素的影响^[1-2]。国内外学者研究表明,力学刺激对调控软骨细胞代谢和变化、生长因子等维持其胞外基质正常表型的因素起重要作用。软骨细胞是人体内力学敏感细胞之一,已被证实对压应力、张力、剪切力均敏感^[3-4],软骨细胞对力学信号的反应协同环境因子和遗传因素来共同调控细胞外基质的代谢并维持其正常表型。循环载荷是软骨细胞执行正常功能和维持细胞外基质正常表型的基本因素,有研究显示正常动压力刺激可促进 II 型胶原和蛋白多糖的合成^[5]。还有研究显示机械压力对培养软骨细胞的作用在有效范围内与压力值无关,而与压缩程度(静压力)和频率(循环压力)有关,持续的静压力抑制软骨细胞的合成代谢,一定频率的循环压力则促进软骨细胞的合成功能^[6]。周期性力学刺激促进基质合成,实验表明在软骨细胞培养 1 周后,给予循环压力刺激 15 次/min,结果 3 h 后,循环压力促进了 II 型胶原和聚合素 mRNA 的表达,从而说明胞外基质可能通过调节整合素来应力学刺激^[7]。

体外培养细胞应力加载试验能方便准确地调控力学影响因素,并能反映软骨细胞在应力作用下的即时变化,是近年来开展的研究应力作用下细胞生物学反应的有效手段。1975 年,Rodan 等^[8]利用软骨和骨细胞进行流体静压加载试验,将鸡胚的长骨置于有活动活塞的注射器中进行压力加载,开创了将机械应力作用于培养细胞研究的新时代。

软骨细胞体外培养主要对流体剪切应力、静水压和基质层变形等力学信号产生响应。目前的研究表明,流体剪切应力在其中占主导作用,其对软骨细胞的影响大于静水压或者基质层变形,这可能是由于软骨细胞所处的环境所决定的:软骨细胞位于软骨基质的细胞陷窝中,关节液需要通过压力渗透进入软骨细胞周围基质中来维持软骨细胞的代谢,这时可能产生关节液相对软骨细胞的剪切力。因此,我们采用摇床使培养皿中的培养液做一种涡流式运动来模拟软骨细胞加载的流体剪切力。Honda 等^[9]利用旋转摇床产生逆向流和低切应力,对体内复杂流体进行模拟,并通过公式 $\tau = \mu \Delta v / \Delta y$ 对复杂流场剪切力进行估算,其中 μ 为流体黏度, Δv 为激光-多普勒风速计测得的培养液速度与培养皿的运动速度之差, Δy 为流体中细胞距离培养皿内培养液表面的高度。因此,在流体黏度及流动方式不变的前提下,本研究通过调节摇床的转速即改变 Δv 来控制流体剪切力,结果显示不同转速组细胞

增殖均高于空白对照组,提示力学刺激可诱导软骨细胞的增殖。Yang 和 Luo^[10]的研究也发现,在一定时间、一定力值范围内,随着载荷的增大,受压的下颌髁突软骨细胞增殖活性有逐渐增高的趋势,以持续压力作用 6 h 的变化最明显。

本实验免疫组化结果显示,中等转速组和高转速组 II 型胶原免疫组化平均 OD 值均高于低转速组和空白对照组,低、中等、高转速组 II 型胶原 mRNA OD 比值均高于空白对照组,且呈依次递增趋势,说明 II 型胶原蛋白合成和 mRNA 的表达均随着剪切力作用的增强而增加。Smith 等^[11]研究提示,软骨细胞 II 型胶原 mRNA 的表达随着压力作用时间的延长呈现双向性改变,当用 10 MPa、频率为 1 Hz 的压力作用于牛关节软骨细胞时,发现在受力 4 h 和 8 h 时 II 型胶原 mRNA 水平较对照细胞增加 5 倍,其后随着受力时间的延长而降低;受力方式改为每天 4 h,4 d 后 II 型胶原 mRNA 水平较对照细胞增加 9 倍,而蛋白聚糖的合成则随着作用时间的延长逐渐增加。

适度的力学刺激会促进软骨细胞外基质的代谢,但时间过长或载荷强度过大则会引起抑制效应^[12-13],本研究中不同转速组均可诱导软骨细胞的增殖和促进软骨细胞的代谢,说明这三种应力条件都尚未达到对软骨细胞造成损害的程度。

总之,本实验研究了不同大小的流体剪切力对体外培养的人关节软骨细胞的影响,检测了软骨细胞分泌 II 型胶原蛋白的变化,探讨作用于关节软骨细胞合适的应力大小,为我们以后进行关节软骨损伤的修复提供了直接的依据。

参 考 文 献

- [1] 刘宇,吴华,刘朝旭,等. 电磁场对骨髓间充质干细胞聚集蛋白聚糖 I、II 型胶原和 Sox9 等基因表达的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2009, 31: 519-523.
- [2] 杨小红,刘承宜,刘少杰,等. 光生物调节作用对软骨细胞基质分泌及超微结构变化的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2007, 29: 368-373.
- [3] Urban JP. The chondrocyte: a cell under pressure. Br J Rheumatol, 33: 901-908.
- [4] Grodzinsky AJ, Levenston ME, Jin M, et al. Cartilage tissue remodeling in response to mechanical forces. Annu Rev Biomed Eng, 2: 691-713.
- [5] Durrant LA, Archer CW, Benjamin. Organization of the chondrocyte cytoskeleton and its response to changing mechanical conditions in organ culture. J Anat, 1999, 194: 53-60.
- [6] 张文涛,卢世壁. 力学刺激与软骨细胞培养. 国外医学生物医学工程分册, 1997, 20: 348-349.
- [7] Thomas M, Quinn Alan J. Mechanical compression alter proteoglycan deposition and matrix deformation around individual cells in cartilage explants. J Cell Sci, 1998, 111: 573-583.
- [8] Rodan GA, Bourret LA, Harvey A, et al. 3',5'-cyclic AMP and 3',5'-cyclic GMP mediators of the mechanical effects on bone remodeling. Science, 1975, 189: 467-446.
- [9] Honda HM, Hsiai T, Wortham CM, et al. A complex flow pattern of low shear stress and flow reversal promotes monocyte binding to endothelial cells. Atherosclerosis, 2001, 158: 385-390.
- [10] Yang HM, Luo SJ. Mechanical stress regulation and proliferation of rat mandibular condylar chondrocytes in vitro. Chin J Dent Res, 1999, 5: 54-56.
- [11] Smith RL, Lin J, Trindade MC, et al. Time-dependent effects of intermittent hydrostatic pressure on articular chondrocyte type II collagen and aggrecan mRNA expression. J Rehabil Res Dev, 2000, 37: 153-161.
- [12] Smith RL, Rusk SF, Ellison BE, et al. In vitro stimulation of articular chondrocyte mRNA and extracellular matrix synthesis by hydrostatic pressure. J Orthop Res, 1996, 14: 53-60.
- [13] Bachrach NM, Valhnu WB, Stazzone E, et al. Changes in proteoglycan synthesis of chondrocytes in articular cartilage are associated with the time dependent changes in their mechanical environment. J Biomech, 1995, 28: 1562-1569.

(修回日期: 2011-05-20)

(本文编辑: 吴 倩)

《中华物理医学与康复杂志》第七届编辑委员会通讯编委名单

(按姓氏笔画排序)

马 超	尹 勇	王俊华	王楚怀	王蓓蓓	白玉龙	刘雅丽	孙乐蓉	毕 胜
许 涛	许光旭	余 茜	张载福	李 丽	李铁山	李雪萍	杨卫新	汪 萍
汪 琴	汪军民	陆 敏	陈 刚	陈 翔	范晓华	姜志梅	胡昔权	胥方元
商晓英	舒 彬	谢 明	虞乐华					