

# 压力对体外培养髌突软骨细胞增殖、凋亡的影响

廖明庭, 张志光, 苏 凯, 匡世军, 张 娟

(中山大学光华口腔医学院·附属口腔医院口腔颌面外科, 广东 广州 510055)

**摘要:**【目的】观察压力对体外培养SD大鼠髌突软骨细胞增殖、凋亡以及合成蛋白多糖的影响,探讨压力与软骨退变之间的相互关系。【方法】在一个大气压基础上,分别对3组体外培养髌突细胞进行加压-10 kPa、10 kPa、20 kPa (5% CO<sub>2</sub>),以未加压组作为对照,用四唑盐法(MTT法)和流式细胞技术分别检测各组标本在加压3 h和加压24 h后细胞增殖、凋亡的情况;应用硫酸-吡嗪法检测各组标本在加压3 h和加压24 h后蛋白多糖的含量。【结果】加压3 h后,各加压组与对照组相比,细胞的增殖、凋亡以及蛋白多糖含量无明显变化;加压24 h后,压力值为20 kPa时可以明显抑制增殖,并诱导髌突软骨细胞发生凋亡增加,蛋白多糖含量明显减少。【结论】长时间的异常压力负荷可使髌突软骨细胞增殖减缓、凋亡增加,蛋白多糖含量减少,诱发或加重关节软骨退变。

**关键词:** 关节软骨; 髌状突; 压力; 细胞外基质

中图分类号: R246.83

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2005)03-0282-03

## Influence of Static Compression on Proliferation Activity, Apoptosis, and Matrix Proteoglycans Synthesis in Condylar Cartilage Chondrocytes *In Vitro*

LIAO Ming-ting, ZHANG Zhi-guang, SU Kai, KUANG Shi-jun, ZHANG Juan

(Department of Surgery, School of Guanghua Stomatology, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510055, China)

**Abstract:** 【Objective】 To investigate the effect of static compression on the proliferation activity, apoptosis rate, and matrix proteoglycans synthesis in cultured mandibular condylar cartilage (MCC) cells, and the relation between abnormal compression and degradation of cartilage. 【Methods】 MCC cells of second generation were placed into sealed containers, which were perfused with 5% CO<sub>2</sub> to offer 10 kPa, 20 kPa, -10 kPa static compressions respectively. No mechanical loading were applied to the control group. When the mechanical loading lasted 3 hours and 24 hours, the proliferation activity and the apoptosis rate were determined by MTT method and flow cytometry respectively, the content of matrix proteoglycans were determined by sulfuric acid-carbazole colorimetry methods. 【Results】 When the peak stress came to 20 kPa and last more than 24 hours, it can significantly decrease proliferation activity and the synthesis of matrix proteoglycans, increase the apoptosis rate significantly. 【Conclusion】 Abnormal compression could induce the apoptosis of chondrocytes and reduction in the content of proteoglycans, which may trigger or deteriorate the degradation of cartilage.

**Key words:** articular joint; mandibular condylar; compression; extracellular matrix

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2005, 26(3): 282-284]

颞下颌关节骨关节病是口腔颌面外科的常见病、多发病,其病因、发病机理尚不十分清楚,所以也无满意的治疗办法<sup>[1]</sup>。对关节软骨退变的研究主要集中在相关的炎症因子、细胞因子对关节软骨退变的影响,但这些因子究竟是始动因素或是疾

病发生后机体的自身反应目前尚无定论<sup>[2]</sup>。与其他体细胞相比,软骨细胞是处于关节内特殊的压力环境之中,其功能和结构必然受压力的影响或调控<sup>[3]</sup>。本实验尝试从细胞学层面探讨压力与关节软骨退变之间的关系。

收稿日期: 2004-08-09

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(C03031906)

作者简介: 廖明庭(1974-),男,江西赣州人,博士生,主治医师,研究方向主要是骨与关节疾病。E-mail: liaomingting01@163.com

# 1 材料与方 法

## 1.1 动物与试剂

2周龄SD大鼠20只(中山大学北校区动物中心提供),雌雄不限。主要试剂包括:高糖DMEM培养基、胎牛血清、PI染液(Gibco公司),胰蛋白酶、II型胶原酶(Sigma公司),羟脯氨酸检测试剂盒(南京建成生物制品研究所),四唑盐(MTT)、葡萄糖醛酸标准品(上海生工)。

## 1.2 软骨细胞的分离与培养

脱颈椎处死大鼠后,在无菌条件下,耳前切口显露髌突,仔细将附着于髌突的肌肉和滑膜等软组织分离,用刀片从髌突关节面上削下软骨,用PBS洗去软骨片表面的血液及滑膜组织,在玻璃平皿中用弯剪将其修剪成 $1\text{ mm}^3$ 以下的小块。2.5 g/L胰蛋白酶,37℃消化0.5 h;接着以1 g/L II型胶原酶,37℃消化1~2 h,加入含100 mL/L血清的培养基终止消化,1 000 r/min,5 min,PBS冲洗两遍,收集细胞,于 $25\text{ cm}^2$ 培养瓶中培养,培养液为高糖DMEM培养基,内含体积分数10%胎牛血清,在含有体积分数5%CO<sub>2</sub>,保持一定湿度的条件下培养,倒置显微镜下观察细胞生长情况,3~4 d换液1次。当镜下观察到软骨细胞铺满瓶底80%~90%时,2.5 g/L的胰蛋白酶消化得到细胞悬液。

## 1.3 软骨细胞分组加压培养

取第2代软骨细胞,按 $1\times 10^5/\text{mL}$ 接种于8块12孔板内,每块板上接种8个孔,每孔1 mL,另取8块96孔板上,每块板上接种8孔,每孔接种细胞悬液100  $\mu\text{L}$ 。接种细胞悬液接种后3~6 d,当细胞处于对数增长期时,将上述培养板分别放入8个含有体积分数5% CO<sub>2</sub>混合空气的密闭容器内。随机分为4组:A组:不加压,做为对照组;B组:在一个大气压基础上通以含体积分数5% CO<sub>2</sub>混合

气体加压10 kPa;C组:加压方法同B组,加压20 kPa;D组:负压组,抽吸负压值大小为-10 kPa,各加压组加压过程中均以压力表监测压力值。

## 1.4 四唑盐法检测压力对细胞增殖的影响

加压3 h、24 h后分别取出4块96孔板,吸去原培养液,每孔加0.1 mL D-Hanks液和10  $\mu\text{L}$  MTT(5 mg/mL溶于培养液中),培养4 h。每孔加入100 g/L SDS,在振荡器上振荡混匀10 min,待还原产物(formazan结晶)充分溶解后,置酶标分析仪上测定吸光值 $A_{570}$ 。

## 1.5 软骨细胞凋亡的检测

加压3 h、24 h后分别取出4块12孔板,更换培养液后(原来的培养液保存备用),用2.5 g/L胰蛋白酶消化制成单细胞悬液后,1 500 r/min离心5 min( $r=10\text{ cm}$ ),去上清,PBS冲洗2次,加入TritonX-100,作用20 min。PBS洗涤2次,加入PI染液,避光作用20 min。PBS洗涤1次,200目筛网过滤2次,上机检测。FACsort流式细胞仪(美国BECTON DICKINSON)采集数据,LYSYS II分析软件分析,通过计数凋亡区(亚二倍体区)细胞数量得出凋亡率。

## 1.6 硫酸-吡啶法检测软骨细胞蛋白多糖合成量

称取葡萄糖醛酸标准品10 mg,定容于25 mL定容瓶中制成标准溶液,然后分别量取0,0.1,0.2,0.4,0.6,0.8 mL标准溶液置于带塞试管中,各管加水至1 mL,在冰水浴中向各管加入6 mL浓硫酸,摇匀,85℃水浴20 min,取出冷却至室温后各管加入0.2 mL吡啶液,室温静置2 h,测定530 nm波长下的吸光度 $A_{530}$ ,以浓度对吸光度做标准曲线。取待测样本上清0.4 mL,加水补足至1 mL,再测 $A_{530}$ ,根据标准曲线可得出样本葡萄糖醛酸浓度。

## 1.7 统计学方法

用统计学软件SPSS10.0将各加压组所测得实验数据进行单因素方差分析,取 $\alpha=0.05$ 。

表1 压力对体外培养踝突软骨的影响

Table 1 Influence of static compression on condylar cartilage chondrocytes *in vitro* ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Group	Proteoglycans (mg/L)		MTT (A)		Apoptosis rate (%)	
	3 h	24 h	3 h	24 h	3 h	24 h
10 kPa	80.9 $\pm$ 1.3	85.1 $\pm$ 1.6	39.4 $\pm$ 3.4	52.7 $\pm$ 2.8	3.2 $\pm$ 0.5	3.3 $\pm$ 0.8
-10 kPa	81.4 $\pm$ 1.5	85.5 $\pm$ 1.9	41.2 $\pm$ 3.1	53.8 $\pm$ 3.6	3.0 $\pm$ 0.9	3.1 $\pm$ 0.6
20 kPa	78.3 $\pm$ 1.2	82.3 $\pm$ 1.1 <sup>1)</sup>	38.8 $\pm$ 2.4	46.2 $\pm$ 2.0 <sup>2)</sup>	3.2 $\pm$ 0.7	5.3 $\pm$ 1.3 <sup>3)</sup>
Control	79.2 $\pm$ 1.7	84.9 $\pm$ 1.9	40.6 $\pm$ 2.3	51.3 $\pm$ 3.7	3.1 $\pm$ 0.8	3.2 $\pm$ 0.5
		$F=6.208$		$F=9.107$		$F=13.658$
		$P=0.002$		$P=0.000$		$P=0.000$

SNK-*q* test, vs control, 10 kPa, and -10 kPa group: 1)  $P=0.023, 0.014, 0.003$ , respectively; 2)  $P=0.019, 0.002, 0.000$ , respectively; 3) all  $P=0.000$

## 2 结 果

加压 3 h, 各加压组 MTT 实验吸光度、凋亡率、蛋白多糖含量与对照组相比无显著性差异, 加压 24 h 后, 对照组相比, 20 kPa 组 MTT 实验吸光度、蛋白多糖含量明显降低, 而发生凋亡的细胞比例明显升高, 差异具有统计学意义(表 1)。

## 3 讨 论

### 3.1 压(应)力负荷与关节软骨的关系

关节软骨是由软骨细胞及其合成、分泌的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)所构成, 与其他细胞相比, 关节软骨细胞始终处于一定的压(应)力环境中, 正常生理范围内的应力负荷对维持软骨正常的生理功能具有重要的作用, 而异常的应力负荷则可能诱发或加速软骨的退变<sup>[4,5]</sup>。基质的主要成分是蛋白多糖与胶原蛋白, 它是关节软骨不同区域之间相互联系的媒介, 同时也是敏感的应力传递者<sup>[6]</sup>。在关节软骨承载时, 胶原和蛋白多糖构成的细胞外基质发生“蠕变”效应, 保护软骨细胞避免因受过高应力作用而损伤, 除了对软骨细胞起着一定的保护作用之外, ECM 对软骨细胞的生长、代谢亦具有重要的调节作用。当把关节软骨细胞培养的平皿用 ECM 人工基质包埋处理后, 即使不加以维持软骨细胞表型作用的细胞因子(如 FGF), 细胞也能增殖 12 代而并保持软骨表型不变<sup>[7]</sup>。在软骨的钙化调节中, 蛋白多糖亦发挥重要作用。当蛋白多糖含量丰富时, 能抑制软骨组织的矿物质沉积和钙化。把分解蛋白多糖的酶加入软骨细胞培养液中, 则促进培养细胞的钙化<sup>[8]</sup>。这可能是骨关节病软骨退变的同时往往伴有骨赘形成的原因之一。

### 3.2 异常压(应)力负荷与骨关节病的关系

既往对骨关节病的研究, 大多数着重于细胞外基质酶性降解和/或合成新的基质受到抑制而导致软骨的破坏, 很少注重软骨细胞生存或死亡在骨关节病关节软骨退变中所起的作用。1995 年国际骨关节病专题会议提出了骨关节病的最新定义: 认为骨性关节炎是力学和生物学因素共同作用下导致软骨细胞、细胞外基质以及软骨下骨三者降解和合成正常偶联失衡的结果。近年来, 在对骨关节病关节软骨组织学研究发现有关节软骨细胞减少, 而软骨细胞凋亡在其中起到关键作用<sup>[9,10]</sup>。但目前对于关节软骨细胞凋亡发生的确切诱因尚不清楚, 关节软骨细胞凋亡与软骨基质降解究竟何

为始动因素尚存在争论<sup>[11]</sup>。本实验研究证实: 当关节软骨细胞所受到的异常压力负荷达到一定阈值并持续一段时间后, 可抑制软骨细胞增殖、诱导软骨细胞凋亡, 软骨细胞合成分泌细胞外基质(如蛋白多糖)明显减少, 导致软骨基质合成与降解代谢的动态平衡被打破, 软骨生物力学特性改变, 进而可能诱发或加重关节软骨进行性、不可逆的退变。至于异常压(应)力是通过什么机制抑制软骨细胞增殖、诱导软骨细胞凋亡, 目前尚不清楚, 本课题组将进一步深入研究。

### 参考文献:

- [1] Troulis MJ, Williams WB, Kaban LB. Endoscopic mandibular condylectomy and reconstruction: early clinical results[J]. J Oral Maxillofac Surg, 2004, 62(4): 460-5.
- [2] Verzijl N, Bank RA, Tekoppele JM, *et al.* Ageing and osteoarthritis: a different perspective [J]. Curr Opin Rheumatol, 2003, 15(5): 616-22.
- [3] Guilak F, Fermor B, Keefe FJ, *et al.* The role of biomechanics and inflammation in cartilage injury and repair[J]. Clin Orthop, 2004, 423(1): 17-26.
- [4] 张志光, 田 慧, 何一青, 等. 山羊颞下颌关节腔内压测定及其意义[J]. 口腔颌面外科杂志. 2000, 10(1): 34-7.
- [5] 许 跃, 张志光, 陈缙光, 等. 颞下颌关节盘不可复性前移位关节内压测量与分析[J]. 中山医科大学学报, 2001, 22(6): 454-7.
- [6] Greco F, Specchia N, Falciglia F, *et al.* Ultrastructure analysis of the adaption of articular cartilage to mechanical stimulation[J]. Ital J Orthop Traumatol, 1992, 18(3): 311-21.
- [7] Goessler UR, Hormann K, Riedel F. Tissue engineering with chondrocytes and function of the extracellular matrix[J]. Int J Med, 2004, 13(4): 505-13.
- [8] Chen CC, Boskey AL. Mechanisms of proteoglycan inhibition of hydroxyapatite growth[J]. Calcif Tissue Int, 1985, 37(4): 395-400.
- [9] Nakagawa T, Yasuda T, Hoshikawa H, *et al.* LOX-1 expressed in cultured rat chondrocytes mediates oxidized LDL-induced cell death possible- possible role of phosphorylation of Akt [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 299(1): 91-7.
- [10] Goggs R, Carter SD, Schulze-Tanzil G, *et al.* Apoptosis and the loss of chondrocyte survival signals contribute to articular cartilage degradation in osteoarthritis[J]. Vet J, 2003, 166(2): 140-58.
- [11] Kuhn K, D'lima DD, Hashimoto S, *et al.* Cell death in cartilage[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2004, 12(1): 1-16.

(编辑 刘清海)