

胰岛素样生长因子 I 与透明质酸对人胚关节软骨细胞表型的影响

黄建荣, 刘尚礼, 宋卫东, 李卫平, 郑召民, 沈慧勇, 黄东生

(中山大学附属第二医院骨科部, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】研究胰岛素样生长因子 I (IGF-I) 和透明质酸(HA)联合培养对人关节软骨细胞生物学行为的影响, 判断其稳定软骨细胞表型的效果。【方法】分离培养人关节软骨细胞, 从第 4 代开始, 用 hIGF-I 和 HA 联合培养, 通过电镜观察、甲苯胺蓝染色、II 型胶原和 aggrecan 免疫组化及 RT-PCR 判断联合培养第 8 代软骨细胞表型的变化。自然传代的第 6 代细胞为对照组。【结果】IGF-I 和 HA 联合培养的第 8 代细胞胞浆内含有丰富的粗面内质网和分泌小泡; RT-PCR 显示 II 型胶原 mRNA 表达阳性而 I 型胶原 mRNA 表达阴性; 甲苯胺蓝染色显示细胞浆内有大量的紫色异染颗粒; II 型胶原和 aggrecan 免疫组化见 80%~92% 的细胞染色呈阳性或强阳性, 平均灰度分别为 85.92 和 116.23, 均显著低于对照组, 说明处理组染色较对照组增强。【结论】IGF-I 和 HA 联合培养的第 8 代细胞仍能保持透明软骨细胞的表型, 为体外获得高数量级别的有正常功能的人关节软骨细胞提供一种新方法。

关键词: 软骨细胞; 胰岛素样生长因子 I; 透明质酸

中图分类号: R684 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)06-0419-04

The Influence of Insulin-like Growth Factor I and Hyaluronic Acid on the Phenotype of Human Embryonal Articular Chondrocytes HUANG Jian-rong, LIU Shang-li, SONG Wei-dong, LI Wei-ping, ZHENG Zhao-min, SHEN Hui-yong, HUANG Dong-sheng. (Department of Orthopedics, Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract 【Objective】To investigate the biological role of insulin-like growth factor I (IGF-I) and hyaluronic acid(HA) on human articular chondrocytes and explore their effects on stabilizing the phenotype of human hyaline chondrocytes. 【Methods】Human articular chondrocytes were isolated and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM). From passage 4 IGF-I and HA were added into the cultured media. The electronic microscopic observation, toluidine blue staining, human collagen II and aggrecan immunohistochemistry, reverse transcript polymerase chain reaction (RT-PCR) was conducted to investigate the phenotype of passage 8 chondrocytes treated by IGF-I and HA. 【Results】There were massive rough surfaced endoplasmic reticulus and secretory vesicles in cytoplasm by electronic microscopic observation, collagen II mRNA expressed by RT-PCR, metachromia granule by toluidine blue staining, 80%~92% positive cell by human collagen II and aggrecan immunohistochemistry in the passage 8 chondrocytes. Its gray scale displayed distinctively weaker than the control group. It illustrated that the chondrocytes in treatment group were stained stronger. 【Conclusion】chondrocytes can keep its hyaline chondrocyte phenotype more stable when IGF-I and HA are added to the culture media. It is a new method to get massive hyaline chondrocytes which have normal biological function *in vitro*.

Key words: chondrocytes; insulin-like growth factor I; hyaluronic acid

关节软骨缺损后自身的修复能力有限, 采用软骨细胞移植治疗关节软骨缺损是目前研究的热点^[1]。自体软骨细胞与缺损区细胞同源性好, 植入体内成软骨能力强, 是首选的种子细胞, 但自体关节软骨细胞来源有限, 体外多次传代培养容易发生“去分化”(dedifferentiation), 即向成纤维细胞转化, 表达 I 型和 III 型胶原, 丧失分泌软骨基质的能力, 植入体内后不能形成透明软骨, 所以难以从少量组织经体外培养扩增来获得大量有正常功能的软骨

细胞, 限制了其临床应用^[2]。研究显示, 在软骨损伤修复过程中, 胰岛素样生长因子 I (insulin-like growth factor I, IGF-I) 起重要的调节作用。透明质酸(hyaluronic acid, HA)是软骨基质的主要成分之一, 关节腔内注射透明质酸能保护软骨细胞免受进一步损伤。本实验采用 IGF-I 与 HA 联合培养人关节软骨细胞, 探讨二者对人关节软骨细胞的生物学影响, 为临床软骨细胞移植提供依据。

收稿日期: 2002-08-30

基金项目: 广东省重点攻关基金资助项目(2KM04903S)

作者简介: 黄建荣(1966-), 男, 湖南汨罗人, 在读博士, 主治医师; 刘尚礼(1943-), 男, 广东惠州人, 博士, 教授, 博士生导师。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

透射电镜(JME-100CXII, 日本), PCR 仪(PCR System-2700, 新加坡), 倒置显微镜(Nikon TE300, 日本), 图象分析系统(KONTRON, 德国), DMEM 培养液(Hyclone 公司, 美国), 胎牛血清(Gibco 公司, 美国), HA(Sigma 公司, 美国), IGF-I(Sigma 公司, 美国), II型胶原酶(Sigma 公司, 美国), TRIzol 和 THERMOSCRIPT RT-PCR 试剂盒(Gibco 公司, 美国), 鼠抗人 II型胶原一抗、鼠抗人 aggrecan 一抗、羊抗鼠 IgG(Lab vision 公司, 美国)。

1.2 人关节软骨细胞的分离与培养

人关节软骨取自因健康原因需终止妊娠的 4~6 月龄水囊引产的胚胎, 用解剖刀将之切成约 1 mm³ 大小的碎块, 以磷酸盐缓冲液(PBS, 含青霉素 0.2×10⁶ U/L, 链霉素 200 mg/L)冲洗两遍, 去除残余血迹, 然后分别采用 2.5 g/L 的胰蛋白酶、2.0 g/L 的 II型胶原酶分阶段消化, 获得高成活率、成分均一的关节软骨细胞, 接种于 DMEM 培养基中, 内含体积分数 10% 的胎牛血清、青霉素 0.1×10⁶ U/L、链霉素 100 mg/L, 于 37 ℃, 体积分数 5% 的 CO₂, 饱和湿度的孵箱培养, 待细胞贴壁后隔天换液。当软骨细胞铺满瓶底后, 用 PBS 冲洗, 2.5 g/L 的胰蛋白酶消化, 离心收集细胞用以传代。细胞传至第 4 代后, 在培养液中分别加入 IGF-I 和 HA, 终质量浓度分别为 50 μg/L, 100 mg/L。收集第 8 代细胞用于生物学特性的检测(处理组)。自然传代的第 6 代细胞为对照组。

1.3 电镜检查

分别收集处理组和对照组软骨细胞各 2×10⁶ 个于 Eppendorf 管中, 离心去上清, 30 g/L 的戊二醛固定, PBS 冲洗, 脱水, 环氧树脂包埋后, 切片送电镜检查。

1.4 细胞甲苯胺蓝染色

将处理组与对照组细胞以 0.2×10⁶ 个/mL 接种于预置有盖玻片的六孔板中, 待细胞 80% 融合后, 取出玻片, 用预冷的丙酮固定细胞 15 min, 细胞爬片置于 10 g/L 的甲苯胺蓝染液中染色过夜, 体积分数 95% 酒精分色后, 烘干封片。

1.5 Aggrecan 与 II型胶原免疫组化

每组 40 块细胞爬片用预冷的丙酮固定 15 min 后, PBS 冲洗, 用体积分数 0.3% 的过氧化氢甲

溶液室温处理 15 min, 以阻断内源性过氧化酶。再用小牛血清室温下阻断 5 min, 分别滴加鼠抗人 II型胶原一抗和鼠抗人 aggrecan 一抗, 4 ℃湿盒中孵育过夜, 然后分别用生物素标记的羊抗鼠 IgG 和链霉素过氧化物酶室温下孵育 10 min, DAB 显色, 苏木素复染细胞核后, 常规脱水、封片。以原代人关节软骨细胞为阳性对照, 以 PBS 代替一抗为阴性对照。

1.6 I、II型胶原 RT-PCR

用 TRIZOL 试剂分别提取两组细胞的总 RNA, RT-PCR 试剂盒检测两组细胞中 I、II型前胶原 mRNA 表达情况, 纤维软骨细胞和原代透明软骨细胞分别作为 I 型前胶原和 II型前胶原表达的阳性对照, 以 β-actin 表达量作为内参照。I 型前胶原 mRNA 上游引物为: 5'-CCA CCA ATC ACC TGC GTA CAG AAC-3'; 下游引物为: 5'-GGC ACG GAA ATT CCT CCG GTT GAT-3', 片段长度为 426 个碱基。II型前胶原上游引物为 5'-CCA GGT CAA GAT GGT C-3'; 下游引物为 5'-CTT CAG CAC CTG TCT CAC CA-3', 片断长度为 377 个碱基。

1.7 计算机图象分析和统计方法

II型胶原和 aggrecan 免疫组化切片经显微成像后, 用 Nikon FDX-35 摄像系统将图象直接输入计算机, IBAS 2.5 图象处理软件分析后得到各组细胞染色的灰度值, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 10.0 版统计软件进行数据处理, 先对各组总体方差进行齐性检验, 然后用单因素方差分析确定 3 组均数间是否有差异, 当总的比较差异有统计意义后再进行均数间的两两比较(*q* 检验), 比较不同组别的灰度差异。

2 结 果

2.1 倒置显微镜观察

IGF-I 和 HA 联合培养第 8 代软骨细胞仍然保持原代软骨细胞的形态特点: 细胞呈短梭形或多角形, 细胞突起短, 体积小, 细胞贴壁快, 12 h 内全部贴壁, 分裂增殖明显。自然传代第 6 代软骨细胞向成纤维细胞形态转化, 细胞体积增大, 突起多而长, 突起之间互相融合交织成纤维网状, 细胞增殖变慢。

2.2 电镜观察

电镜下可见处理组软骨细胞呈圆形或椭圆形,

内有大量粗面内质网及分泌小泡,细胞表面出现大量的丝状突起,多而密,其周围可见有较多的分泌颗粒。对照组第6代细胞呈长梭形或不规则形态,粗面内质网及分泌小泡明显减少,细胞表面未见明显的丝状突起,细胞周围分泌颗粒减少(图1,2)。

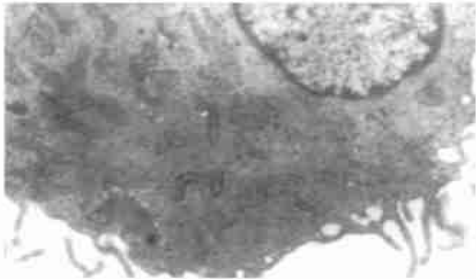


图1 用 IGF-I 和 HA 联合培养的第8代软骨细胞

Fig 1 The passage 8 chondrocytes under electron telescope which were cultured by hIGF-I and HA ($\times 13\ 000$)



图2 电镜下常规培养的第6代人软骨细胞

Fig 2 The passage 6 chondrocytes by ordinary culture under electron telescope ($\times 13\ 000$)

2.3 软骨细胞表型鉴定

甲苯胺蓝染色、II型胶原及 aggrecan 免疫组化:甲苯胺蓝染色见处理组软骨细胞内有大量紫色异染颗粒,细胞周围也有少量异染颗粒出现,而对照组细胞异染颗粒明显减少(图3)。II型胶原免疫组化示处理组92%的细胞呈阳性或强阳性。细胞核周围可见大量黄褐色或棕黄色颗粒(图4)。Aggrecan 免疫组化也可见处理组阳性细胞较对照组明显增多。二者的灰度对比见表1。

2.4 RT-PCR

IGF-I 和 HA 联合培养组软骨细胞至第8代未出现明显I型前胶原 mRNA 扩增带,而对照组第6代细胞则出现了I型前胶原 mRNA 的表达,说明自然扩增第6代细胞发生了细胞表型的改变。处理组第8代细胞仍有II型前胶原 mRNA 的特异扩增带;对照组第6代细胞未见明显II型前胶原

mRNA 的表达,说明处理组软骨细胞仍然具有分泌软骨基质的能力(图5,6)。

表1 软骨细胞爬片II型胶原和 aggrecan 免疫组化的灰度值
Table 1 The grey scale of different chondrocytes stained by SABC

Groups ¹⁾	n	Immunohisto-chemistry of collagen II ²⁾	Immunohisto-chemistry of aggrecan ³⁾
Control I	20	77.85 \pm 10.38	107.29 \pm 11.64
Control II	20	105.12 \pm 12.2 ⁴⁾	135.68 \pm 10.65 ²⁾
Treatment	20	85.92 \pm 9.71 ^{5),6)}	116.23 \pm 16.69 ^{5),6)}

1) Group control I: 2th generation chondrocytes by ordinary culture; control II: 6th generation chondrocytes by ordinary culture; treatment: 8th generation chondrocytes by IGF-I and HA; 2) comparing the means of 3 groups on immunohisto-chemistry of collagen type II, $F=33.4$, $P<0.01$; 3) comparing the means of 3 groups on immunohisto-chemistry of aggrecan, $F=19.5$, $P<0.01$; 4) compared with control I, $q_1=11.14$, $q_2=9.09$, $P<0.01$; 5) compared with control I, $q_1=2.81$, $q_2=2.73$, $P>0.05$; 6) compared with control II, $q_1=8.07$, $q_2=5.08$, $P<0.01$. q_1 : immunohisto-chemistry of collagen II; q_2 : immunohisto-chemistry of aggrecan

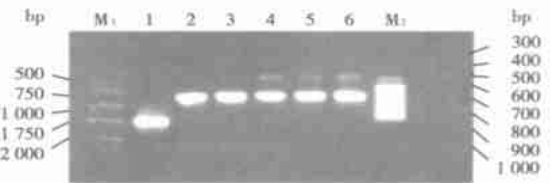


图5 II型胶原 RT-PCR 产物电泳

Fig 5 PCR amplification of collagen type II in 15 g/L agarose gel electrophoresis

M₁: DNA molecular size marker; Lane 1: positive control with MS2 viral RNA(1 011 bp); Lane 2~3: the passage 6 chondrocyte by ordinary culture; Lane 4~5: chondrocytes cultured by IGF-I and HA; Lane 6: the primary chondrocyte; M₂: DNA molecular size marker. Upper bands(377 bp): collagen type II; Lower bands(595 bp): β -actin

3 讨论

软骨细胞有丝分裂活动极低,所以软骨缺损后,自身没有修复的能力。治疗软骨缺损的传统方法包括软骨下骨钻孔术(subchondral drilling),打磨术(abrasion)及微骨折法(microfracture)等。其目的是促进具有成软骨潜能的骨髓基质干细胞参与修复,但修复组织是由成纤维细胞、软骨细胞和无序排列的细胞外基质共同组成的纤维软骨³⁾。骨膜或软骨膜含有成软骨潜能的基质干细胞,采用骨膜或软骨膜移植能够在移植处产生透明样软骨,但



图 6 I 型胶原 RT-PCR 产物电泳

Fig 6 PCR amplification of collagen type I in 15 g/L agarose gel electrophoresis

M₁: DNA molecular size marker; Lane 1: positive control with MS2 viral RNA(1 011 bp); Lane 2~3: positive control with fibroblast; Lane 4~5: the passage 6 chondrocyte by ordinary culture; Lane 6~7: chondrocytes cultured by IGF-I and HA; M₂: DNA molecular size marker. Upper bands(426 bp): collagen type I; Lower bands(595 bp): β -actin

随访发现治疗后两年移植物已经骨化,或者缺损区出现软骨内成骨。活检证实骨膜移植后新生物有 I、X 型胶原沉积和软骨内骨形成^[4]。软骨细胞移植和软骨组织工程是治疗软骨缺损最理想的途径。二者共同的难题是难以通过体外扩增获得表型稳定的、大量的软骨细胞^[3]。因此怎样保持体外培养软骨细胞表型的稳定是目前研究的热点。

透明软骨细胞和成纤维细胞在结构和功能上都存在明显的区别:透明软骨细胞分泌功能旺盛,主要分泌 II 型胶原、aggrecan 等特异性细胞外基质;成纤维细胞分泌功能不旺盛,以分泌 I 型胶原为主。关节软骨细胞体外单层培养过程中,容易发生表型改变,向成纤维细胞分化^[6]。本文结果显示:体外培养的软骨细胞自然传代到第 6 代后,已出现细胞结构的改变,粗面内质网和分泌小泡明显减少;甲苯胺蓝染色、II 型胶原及 aggrecan 免疫组化结果均显示细胞分泌特异性细胞外基质如 II 型胶原和 aggrecan 的能力降低;RT-PCR 结果显示,细胞以分泌 I 型胶原为主。说明细胞表型已发生改变。应用 IGF-I 和 HA 联合培养后,从不同角度都证实至第 8 代细胞,透明软骨的表型仍得到较好的维持。

体外培养软骨细胞容易发生细胞表型的改变,可能由于在体外培养过程中,失去了体内正常的生理环境,细胞相互之间缺乏必要的信号传导。研究显示,生长因子在软骨细胞信号传导通路中起重要作用,从而参与软骨细胞生长发育的调控。IGF-I 是第一个被确认对关节软骨细胞具有自分泌调节作用的生长因子^[7]。IGF 在关节软骨中的作用有:刺激细胞分裂增殖,在生长发育期间,刺激关节表

面的有控增大;促进蛋白聚糖合成,阻止基质金属蛋白酶(MMPs)的表达以减慢蛋白聚糖的降解;刺激 II 型胶原蛋白的合成,表明 IGF-I 是维持软骨细胞表型重要的因素。但 IGF-I 半衰期短,容易降解,因此其作用受到限制^[8]。透明质酸是由 β -葡萄糖醛酸和 2-乙酰氨基-2 去氧- β -D 葡萄糖以糖苷键形成的直链高分子聚合体。HA 本身带负电荷,有较强的亲水性和高粘附性,与软骨细胞之间有较强的亲和力^[9]。HA 是软骨细胞外基质的主要成分,具有软骨诱导功能。HA 能为关节软骨细胞提供营养,参与蛋白多糖聚合物的合成,通过糖蛋白滞留在软骨细胞表面而起关节结构重建作用。HA 还能促进表层关节的增生,维持未钙化软骨的厚度,对刚发生退行性变的关节软骨在一定程度上具有促进其修复的作用^[10]。HA 和软骨细胞之间的作用方式:其一是通过细胞表面的受体产生作用(CD44 是公认的 HA 受体),其二是 HA 与细胞表面的疏水蛋白以共价键结合而发挥作用。IGF-I 和 HA 联合培养软骨细胞有以下优点:①能提供给软骨细胞与体内相似的生存环境;②有利于细胞与细胞之间、细胞与基质之间的信号传导;③HA 可能充当 IGF-I 的载体,使 IGF-I 缓慢释放,减慢 IGF-I 的降解,有利于 IGF-I 发挥作用。除了在保持软骨细胞表型方面二者存在较好的协同作用以外,在促软骨细胞增殖方面,IGF-I 和透明质酸也存在较明显的协同作用(另文发表),二者协同作用的机制还有待于进一步的研究。

IGF-I 和 HA 联合体外培养人关节软骨细胞,有助于保持透明软骨细胞表型的稳定,促进细胞的增殖,为体外获得高密度而且具有正常功能的自体软骨细胞提供了一种新方法,并为自体软骨细胞移植或软骨组织工程的研究提供实验依据。

(本文图 3, 4 见插页 2. Fig 3, 4 shown in back coloured page 2)

参考文献:

- [1] 刘尚礼,李卫平,宋卫东,等.应用软骨细胞移植治疗关节软骨缺损[J].广州医药,2000,2(1):1
- [2] Bonaventure J, Kadhon N, Cohen-Solal L, et al. Reexpression of cartilage-specific gene by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads[J]. Exp Cell Res. 1994, 212(1): 97.
- [3] Grande D A, Breitbart A S, Mason J, et al. Cartilage tissue engineering: current limitations and solutions[J]. Clin Orthop. 1999, 367 Suppl: 176.

(下转第 426 页 to page 426)

$\mu\text{mol/L}$)仅抑制肝癌细胞的增殖,而未进入实质凋亡,高浓度才诱导肝癌细胞凋亡^[5]。根据抗癌药物的敏感标准,药物的敏感性仅与凋亡发生率有关,肿瘤细胞的凋亡阈值与化疗效果有着某种内在联系^[6],本实验中肝癌细胞对 As_2O_3 的敏感剂量(凋亡阈值)是 $5.0 \mu\text{mol/L}$,按公式:药物质量浓度($\mu\text{g/mL}$) = [(药物 $\text{mg} \times$ 体表面积)/体质量] \times (100/60),临床用药的敏感剂量应是 20mg/m^2 ,显然剂量偏大。细胞分化剂是从健康人尿中分离提纯的一组天然活性成分的非细胞毒抗肿瘤生物制剂,其药靶是癌细胞的异常甲基转移复合酶,作为甲基转移酶抑制剂能有效改善 DNA 甲基化低水平的状态^[7]。Shen 等^[8]在研究人肝癌时 DNA 甲基化水平与临床病理指标的关系指出, *N-ras* 在肝癌的表达阳性率高达 61%,而其甲基化降低,癌基因的甲基化水平乃至整个 DNA 甲基化水平的低下在肝癌中发挥了重要作用,甲基化水平越低,其肿瘤渗透及转移的能力越强。经美国 CMB 基金(95-583)、国家自然科学基金(93670701)和国家“九五”攻关基金(96-906-01-15)资助项目的研究提示 CDA-II 有明显抑制裸鼠人肝癌切除后的切缘复发和肝内外转移,对原癌基因 *c-myc*、*N-ras*、*c-jun*、*c-fos* 及 *mmp-9* 基因的表达有明显的下调作用^[9,10]。提示 CDA-II 的作用机理可能是下调 *N-ras* 等原癌基因的表达,改善 DNA 甲基化水平。徐建业等^[2]发现低浓度 CDA-II 能够明显逆转 KBV200(耐药株)癌细胞的耐药性,与 VCR(长春新碱)合用可增加 VCR 诱导 KBV200 细胞凋亡。本实验结果可以观测到 CDA-II 对肝癌细胞的直接凋亡效应并不明显,但能增强 As_2O_3 诱发的细胞凋亡,细胞周期分析发现低浓度的 CDA-II 使肝癌细胞滞留于 G_2 或 S 期的数目增多。此时只需增加小剂量的诱导凋亡剂三氧化二砷便能极大地促进细胞凋亡的发生,

说明 CDA-II 可能降低了肝癌细胞的凋亡阈值,增加肝癌细胞对 As_2O_3 敏感性。本实验 As_2O_3 合用 CDA-II 后凋亡阈值较单用时的 $5.0 \mu\text{mol/L}$ 降低至 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 。临床用药 As_2O_3 只需 4mg/m^2 ,结果有助于临床选择低剂量的 As_2O_3 并协同用 CDA-II,以减少 As_2O_3 对肝脏的毒副作用,提高疗效。

(本文图 1 见插页 2. Fig. 1 shown in back coloured page 2)

(本课题实验数据的统计学处理得到中山大学公共卫生学院统计学教研室凌莉副教授的热心指导,谨此致谢)

参考文献:

- [1] Pu Y S, Hour T C, Chen J, *et al.* Arsenic trioxide as a novel anticancer agent against human transitional carcinoma: characterizing its apoptotic pathway[J]. *Anticancer Drugs*, 2002, 13(3): 293.
- [2] 徐建业,周琦,卢萍,等. 细胞分化剂对肿瘤细胞凋亡的诱导与耐药性的逆转[J]. *中华内科杂志*, 2000, 39(1): 37.
- [3] 高也陶,时善全,吴孟超,等. 尿多酸肽注射液治疗晚期肝癌 15 例[J]. *中国肿瘤*, 2002, 11(2): 110.
- [4] Cai X, Shen Y L, Zhu Q, *et al.* Arsenic trioxide-induced apoptosis and differentiation are associated respectively with mitochondrial transmembrane potential collapse and retinoic acid signaling pathways in acute promyelocytic leukemia[J]. *Leukemia*, 2000, 14(2): 262.
- [5] Oketani M, Kohara K, Tuvdendorj D, *et al.* Inhibition by arsenic trioxide of human hepatoma cell growth[J]. *Cancer Lett*, 2002, 183(2): 147.
- [6] Fish D E. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold[J]. *Cell*, 1994, 78(4): 539.
- [7] 廖明微. “聪明的抗癌药 CDA-II”[M]. 台北:世茂出版社, 1999. 149~161.
- [8] Shen L, Fan J, Qiu D, *et al.* Correlation between DNA methylation and pathological change in human hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatogastroenterology*, 1998, 45(11): 1753.
- [9] 孙婧婧,周信达,刘银坤,等. 细胞分化诱导剂防治裸鼠肝癌转移复发的疗效[J]. *中华肝胆外科杂志*, 1999, 5(1): 14.
- [10] 刘银坤,李岩,马晓明,等. 喜滴克对肝癌相关基因及 AFP 表达的调节[J]. *中国肿瘤*, 2002, 11(3): 169.

(编辑 张敏瑞)

(上接第 422 页 from page 422)

- [4] O' Driscoll S W. Articular cartilage regeneration using periosteum[J]. *Clin Orthop*, 1999, 367 Suppl: 186.
- [5] Kandel R A, Boyle J, Gibson G, *et al.* *In vitro* formation of mineralized cartilaginous tissue by articular chondrocytes[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1997, 33(3): 174.
- [6] 郑卫平,张志光,郑有华,等. 兔关节软骨细胞在几丁糖中培养的生物学特性[J]. *中山医科大学学报*, 2000, 21(4): 277.
- [7] Koedam J A, Hoogenbrugge C M. Differential regulation of IGF-binding proteins in rabbit costal chondrocytes by IGF-I and dexamethasone[J]. *J Endocrinol*, 2000, 165(3): 557.
- [8] Mi Z, Ghivizzani S C, Lechman E R, *et al.* Adenovirus-mediated gene transfer of insulin-like growth factor I stimulates proteoglycan synthesis in rabbit joints[J]. *Arthritis Rheum*, 2000, 43(11): 2563.
- [9] Turley E A, Bowman P, Kytryk M A. Effect of hyaluronate and hyaluronate binding proteins on cell motile contact and behaviour[J]. *J Cell Sci*, 1985, 78(10): 133.
- [10] Hu M, Sabelman E E, Tsai C, *et al.* Improvement of Schwann cell attachment and proliferation on modified hyaluronate acid strands by polylysine[J]. *Tissue Engineering*, 2000, 6(6): 585.

(编辑 张敏瑞)

胰岛素样生长因子 I 与透明质酸对人胚关节软骨细胞表型的影响 (正文见第 419 页)

The Influence of Insulin-like Growth Factor I and Hyaluronic Acid on Human Embryonal Articular Chondrocytes Phenotype (Text in page 419)

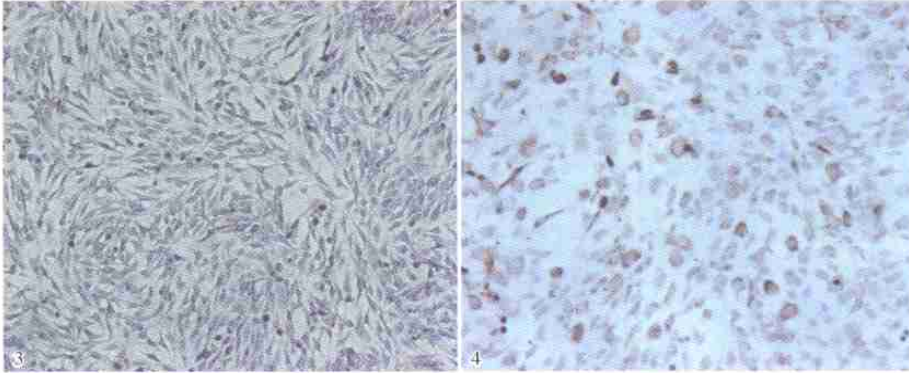


图 3 IGF- I 和 HA 联合培养的第 8 代软骨细胞的甲苯胺蓝染色

图 4 IGF- I 和 HA 联合培养第 8 代软骨细胞的 II 型胶原免疫组化

Fig. 3 The passage 8 chondrocytes cultured by hIGF- I and HA stained with toluidine blue ($\times 200$)

Fig. 4 The passage 8 chondrocyte express collagen II protein (immunohisto-chemistry SABC method ($\times 200$)

细胞分化剂增强三氧化二砷诱导肝癌细胞的凋亡效应 (正文见第 423 页)

Cell Differential Agent- II Potentiate Arsenic Trioxide-induced Apoptosis in Hepatoma cells (Text in page 423)

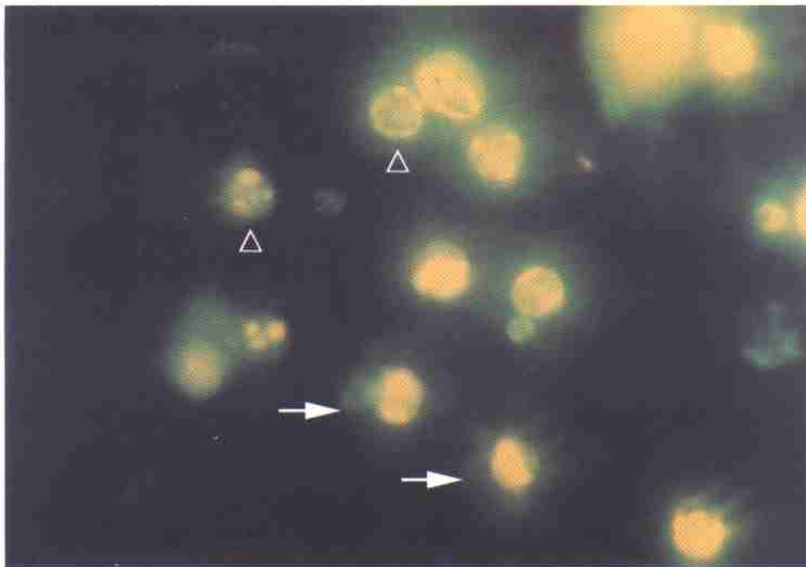


图 1 1.0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 + 1.0 g/L CDA- II 处理 72 h 后肝癌 HepG2 细胞的凋亡照片

Fig. 1 Immunofluorescenc staining of Hoechst 33 258 72 h after 1.0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 + 1.0 g/L CDA- II administrated in BEL-7402 cells ($\times 400$)

\rightarrow : dispersive fluorescences in normal cells nuclei

\triangle : compact particulate fluorescences in apoptosis cell nuclei