

兔关节软骨接受体外冲击波治疗后细胞增殖及II型胶原的表达*

王明波¹, 赵喆², 云文科¹

文章亮点: 探讨体外冲击波对兔关节软骨细胞增殖及其对II型胶原蛋白表达的影响, 提示适当能量强度及频次的体外冲击波刺激, 能够明显促进软骨细胞增殖及II型胶原表达。

关键词: 体外冲击波; 软骨细胞; 细胞增殖; II型胶原; 兔

摘要

背景: 关节软骨损伤后自身修复能力有限, 体外冲击波可能提供一种高质量的修复关节软骨损伤并达到很好远期疗效的方法。

目的: 探讨体外冲击波对兔关节软骨细胞增殖及II型胶原蛋白表达的影响。

方法: 酶消化法获得正常兔膝关节软骨细胞, 培养并传代, 实验A、B、C组分别用 0.5×10^5 、 1.5×10^5 、 2.5×10^5 Pa等3种强度能量体外冲击波干预, 空白对照组无任何干预措施。

结果与结论: 细胞生长曲线在第6天实验B组显著高于其他各组($P < 0.05$); ELISA法检测实验B组II型胶原A值与其他各组相比, 显著升高($P < 0.05$); RT-PCR法检测实验B组II型胶原表达明显增强, 与其他各组相比差异有显著性意义($P < 0.05$)。提示适当能量强度及频次的体外冲击波刺激, 能够明显促进软骨细胞的增殖及II型胶原表达。

Effect of extracorporeal shock wave on the proliferation of rabbit articular chondrocytes and type II collagen expression

Wang Ming-bo¹, Zhao Zhe², Yun Wen-ke¹

Abstract

BACKGROUND: Injured articular cartilage has a very limited self-repair ability. Extracorporeal shock wave may provide a method that has high-quality repair of articular cartilage defects and can achieve good late outcomes.

OBJECTIVE: To explore the effect of extracorporeal shock wave on the proliferation of rabbit articular chondrocytes and type II collagen expression.

METHODS: Normal rabbit knee joint chondrocytes were obtained by enzymatic digestion method. The cells were cultured, passaged, and then randomized into three experimental groups: A, B and C groups were given 0.5×10^5 , 1.5×10^5 and 2.5×10^5 Pa extracorporeal shock wave intervention, respectively. The blank control received no intervention.

RESULTS AND CONCLUSION: The cell growth curve in the group B at day 6 was higher than that in the other groups ($P < 0.05$). Enzyme-linked immunosorbent assay showed that compared with the other groups, the absorbance of type II collagen in the group B was significantly increased ($P < 0.05$). Reverse transcription PCR indicated that type II collagen expression was enhanced obviously in the group B, as compared with the other groups ($P < 0.05$). These results suggest that the extracorporeal shock wave stimulation of appropriate energy intensity and frequency can significantly promote chondrocyte proliferation and type II collagen expression.

Wang MB, Zhao Z, Yun WK. Effect of extracorporeal shock wave on the proliferation of rabbit articular chondrocytes and type II collagen expression. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(46): 8611-8614.

0 引言

关节软骨损伤后自身修复能力有限, 大的关节软骨缺损常由纤维软骨修复, 常因无力承担长时间的关节内各种机械应力而退变。但临床上尚

无一种方法能高质量的修复关节软骨损伤并达到很好的远期疗效。近年来, 发现体外冲击波在治疗骨关节炎中有显著疗效。实验利用体外培养的正常原代软骨细胞, 施加不同能量强度的体外冲击刺激, 观察体外冲击是否对关节软骨细胞的增殖有影响, 检测体外冲击对软骨细胞增殖情况

¹ 武警内蒙古总队医院外二科, 内蒙古自治区呼和浩特市 010020;
² 解放军总医院骨科研究所, 北京市 100039

王明波★, 男, 1981年生, 内蒙古自治区赤峰市人, 蒙古族, 2009年河北医科大学毕业, 硕士, 医师, 主要从事骨与关节损伤修复的研究。
wangmingbo_2003@yahoo.com.cn

中图分类号:R318
文献标识码:A
文章编号:2095-4344
(2012)46-08611-04

收稿日期:2012-01-09
修回日期:2012-04-07
(20120109016/WL·T)

¹Department of Second Surgery, Armed Police Corps Hospital of Inner Mongolia, Hohhot 010020, Inner Mongolia Autonomous Region, China; ²Institute of Orthopedics, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100039, China

Wang Ming-bo★, Mater, Physician, Department of Second Surgery, Armed Police Corps Hospital of Inner Mongolia, Hohhot 010020, Inner Mongolia Autonomous Region, China
wangmingbo_2003@yahoo.com.cn

Received: 2012-01-09
Accepted: 2012-04-07

及 II 型胶原表达的影响。

1 材料和方法

设计: 随机分组设计, 对比观察。

时间及地点: 实验于2009年1至8月在中国科学院高能物理研究所生物实验室完成。

材料: 选用健康3月龄新西兰兔20只, 体质量(0.6±0.3) kg, 雌雄不拘, 由解放军总医院动物中心提供。

主要试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
胰蛋白酶、CCK-8 试剂盒、透明质酸酶	Sigma, 美国
II 型胶原、H-DMEM 培养基	Gibco, 美国
胎牛血清	MDgenics InC, 美国
2×Taq Plus PCR Master Mix	天根生化
M-MLV Reverse Transcriptase	Promega, 美国
3S Total RNA DNA Mini Kit V2.0	上海申能博彩
Nucleic Acid Stain	赛百胜基因
Sunrise Remote 酶标仪	TECAN, 澳大利亚
气压弹道式冲击波治疗仪	EMS, 瑞士
兔 II 型胶原 ELISA 检测试剂盒	Bio Ripid, 美国

实验方法:

兔软骨细胞原代分离: 麻醉过量处死3月龄新西兰兔, 从膝上部沿纵轴向下将皮肤剪开, 充分暴露膝关节。用线锯在距离关节上下4.0–5.0 cm处将骨离断, 将取下的关节浸泡在体积分数为75%乙醇中5–10 min。在超净台中, 用灭菌后的剪刀将关节腔打开, 将覆盖在关节表面软组织去除, 用15#手术刀将软骨组织削下放入盛有PBS的平皿中(注意避免削至软骨下骨和周围软组织)。用剪刀将软骨片剪成在1 mm×1 mm×1 mm以下大小, PBS冲洗2遍。将软骨组织移入培养瓶中, 加入0.15% II 型胶原酶和0.05%透明质酸酶10 mL。将培养瓶放入37 °C孵箱中消化过夜。将消化后的软骨细胞200目金属筛网过滤, 得到的液体移入离心管中, 1 500 r/min离心5 min弃去上清, 加PBS将细胞吹起, 配平后再次离心, 反复离心2遍。弃去上清后向离心管中加10 mL含体积分数10%胎牛血清的DMEM培养液将细胞吹起, 制成细胞悬液。

原代软骨细胞单层培养: 将原代兔关节软骨细胞按 $5 \times 10^3 \text{ L}^{-1}$ 的浓度接种到25 cm²的培养瓶中, 37 °C, 体积分数为5%CO₂及饱和湿度培养。24 h后首次换液, 在超净台操作, 先倒掉已变色培养基, 用PBS冲洗将未贴壁软骨细胞弃掉, 加入含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养液。每日观察软骨细胞贴壁及生长情况, 适时照相。后隔日换液, 待软骨细胞相互融合生长至90%

瓶壁, 进行细胞传代。

软骨细胞传代: 弃去培养基, 用PBS冲洗贴壁侧单层软骨细胞两三次, 弃去PBS, 加入0.25%胰蛋白酶2 mL, 水平轻晃使之分布均匀。封口膜密封瓶口置于倒置显微镜镜下观察, 待细胞间连接消失, 细胞略呈球形, 立即弃去培养液, 加入新鲜等量含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养液10 mL, 用吸管吸取培养液吹打贴壁软骨细胞数分钟, 制成细胞悬液, 细胞计数, 分瓶接种于25 mL培养瓶, 置于37 °C, 体积分数为5%CO₂及饱和湿度培养箱继续培养。

干预分组: 将传3代的软骨细胞随机分为4组, 实验A组: 体外冲击能量 $0.5 \times 10^5 \text{ Pa}$, 200次; 实验B组: 体外冲击能量 $1.5 \times 10^5 \text{ Pa}$, 200次; 实验C组: 体外冲击能量 $2.5 \times 10^5 \text{ Pa}$, 200次; 空白对照组: 无任何干预措施(暴露空气时间与其他3组相同)。

软骨细胞增殖及 II 型胶原活性检测:

CCK-8法绘制生长曲线: 体外冲击干预后的细胞悬液, 根据试剂盒说明操作, 在酶联免疫检测仪上测定每孔的吸光度(A)值(波长450 nm), 绘制生长曲线。

ELISA法检测 II 型胶原表达: 取细胞培养后的上清液, 根据试剂盒说明操作, 在450 nm波长时读吸光度(A)值。

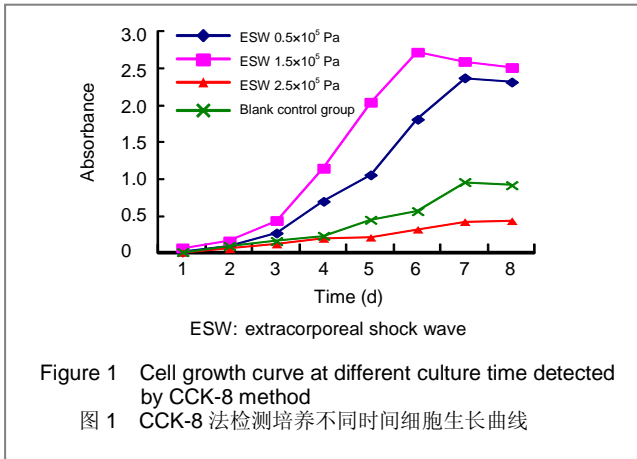
RT-PCR法检测 II 型胶原: ①RNA提取及反转录: Trizol试剂常规方法提取组织总RNA。各样本取1 μL RNA原液, 应用反转录试剂盒, 以Oligo(dT)18为引物进行反转录。②PCR扩增及琼脂糖凝胶电泳检测: 以反转录获取的cDNA为模板, β-actin为内参照, 进行双重PCR扩增, 引物如下: II 型胶原: 上游5'-GCA CCC ATG GAC ATT GGA GG-3', 下游5'-AGC CCC GCA CGG TCT TGC TT-3', 长度323 bp。反应条件: 96 °C, 5 min; 94 °C, 30 s; 57 °C, 40 s; 72 °C, 30 s; 72 °C, 7 min。产物进行1%琼脂糖凝胶电泳检测。

统计学分析: 由第一作者采用SPSS 13.0软件完成统计处理, Excel 2003建立数据库, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用t检验, 多组间比较采用方差分析, P < 0.05为差异有显著性意义。

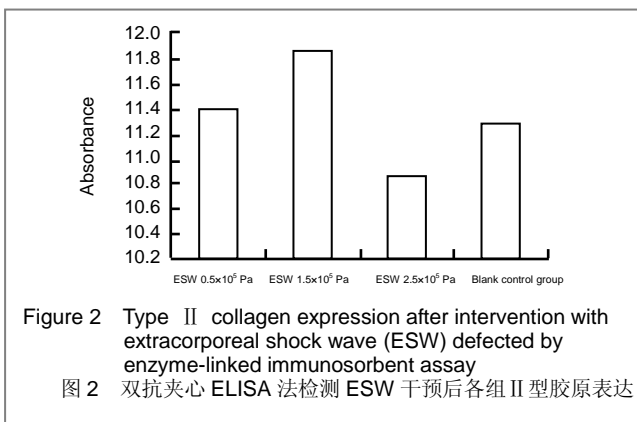
2 结果

2.1 细胞生长曲线 关节软骨细胞的生长曲线基本呈“S”形, 未见明显区别。其传代生长可分为以下几个阶段: 传代后第1, 2天为潜伏适应期; 传代后第3天为缓慢增长期; 传代后第4–6天此为指数生长期; 传代第7天以后, 为生长停滞期或平台期。

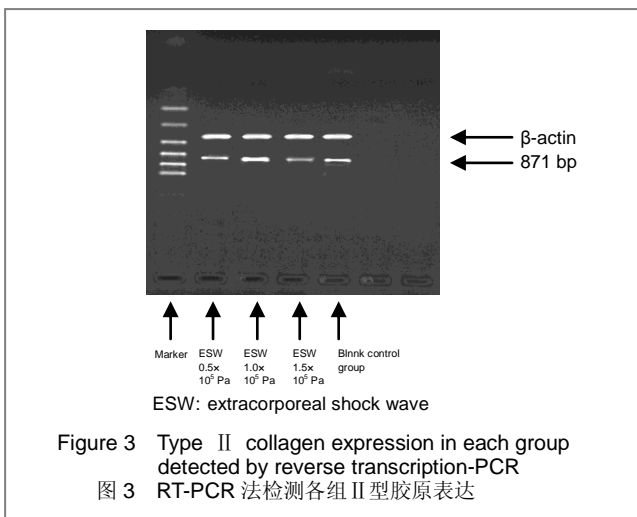
体外冲击能量实验B组第4, 5, 6天吸光度值分别为 1.152 ± 0.055 , 2.046 ± 0.081 , 2.724 ± 0.068 。实验B组在第4-6天与其他3组相比差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。而且细胞增殖高峰提前, 表明适当能量的体外冲击可以明显在时间和数量上促进软骨细胞的增殖, 见图1。



2.2 ELISA法检测II型胶原表达 不同能量体外冲击干预后, 细胞培养48 h, 实验B组的A值与实验C组、实验A组和空白对照组相比差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 见图2。



2.3 RT-PCR法检测II型胶原 见图3。



各组的mRNA扩增产物中都能看到预期长度的II型胶原特异性条带。实验B组表达明显增强, 与实验A组、实验C组和空白对照组相比差异有显著性意义 ($P < 0.05$); 实验C组与实验A、B组的特异性条带无明显差异 ($P > 0.05$)

3 讨论

3.1 体外冲击波的性质 体外冲击波属于一种特殊形式的机械波, 具有高压强, 短周期(仅10 μs)的特点, 频率为16-20 MHz, 可在三维空间传播, 传播速度随压力的增加而加快。其在临床上应用于碎石术已有30年历史, 但直到近期, 体外冲击才大量应用于矫形和创伤外科中的肱骨内外髌炎、跟痛症、肩关节钙化性肌腱炎、骨不连、慢性跖筋膜炎、假关节及股骨头缺血性坏死等的治疗并证实疗效显著^[1-8]。其作用机制可能有: 机械压力效应、压力的压电效应、空化效应和止痛效应。其中机械压力效应和空化效应起主要作用^[9-11]。

3.2 体外冲击对软骨细胞增殖的影响 软骨细胞的生长、发育、成熟、增殖、分化及调控机制同细胞所受力学刺激密切相关。当软骨细胞在体外培养和失去外界应力作用时, 其正常功能、状态发生改变。Wang等^[12]应用体外冲击治疗大鼠膝关节骨性关节炎发现, 经过适当能量及频次的体外冲击对大鼠膝关节软骨及软骨下骨起到很好的塑性作用。Waldman等^[13]将牛软骨细胞置于陶瓷上培养, 给予应力刺激每天8 min。4周后实验组较对照组细胞密度及细胞外基质增多, 同时发现剪切力刺激组蛋白多糖和II型胶原较压力刺激组明显增加。基于此类现象, 提出力学刺激作为软骨细胞自身代谢的一种调控方式。软骨细胞如何将这一机械信号转化成为细胞生长、分泌等代谢化学信号的具体过程, 目前还不清楚。其主要调控机制可能是细胞骨架的改变以及所导致一系列分子信号的级联反应, 最终实现对细胞生长、分裂、蛋白质合成与分泌等的调控^[14]。机械应力可使细胞外基质的间隙水流出, 继而使细胞骨架发生位移与形变。通过这种由外及内的机制, 将施加于宏观上的机械应力作用在细胞和分子水平上的结构再调整, 进而转化为细胞的生物化学反应。Ingber^[15]在归纳了最近一些实验的基础上, 提出外来应力首先作用于细胞骨架, 使其发生移位或变形, 而细胞骨架中的整合素与细胞表面的整合素受体结合, 从而使细胞膜附近的局部粘连复合体发生改变, 而局部粘连复合体与细胞骨架相连就会发生基于上述应力的细胞骨架几何形态改变以及信号转导分子的

激活。

3.3 体外冲击对软骨细胞表型的影响 胶原是软骨重要的细胞外基质成分, 占软骨干重的60%。关节软骨内的胶原蛋白分子高度有序地排列呈胶原纤维网架结构, 使具有高度吸水性的蛋白多糖镶嵌于内, 从而使软骨具有独特的弹性、低摩擦性和高抗压性。目前培养的正常成人关节软骨中含量最多的是 II 型胶原, 为3条 $\alpha 1$ (II)链构成的同质三聚体。它具有 II A 和 II B 两种存在形式, 正常成人关节软骨中含有 II B 型, II A 型在骨关节炎中伴随 X 型胶原由肥大软骨细胞产生。一直以来, II 型胶原都是公认的软骨细胞表型的特征性标志, 骨关节炎软骨退变、基质降解的同时有 II 型胶原减少, 它的表达量减少也是体外培养软骨细胞去分化最重要的特征之一^[16]。关节软骨缺损或损伤时由于软骨细胞周围环境发生改变, 刺激软骨细胞合成基质金属蛋白酶作用于胶原纤维, 使螺旋链松解, 胶原纤维变性、降解, 含量减少, 从而使软骨吸收, 最终导致关节软骨的进行性破坏。生长因子在细胞的增殖、分化和代谢过程中发挥重要的作用, 能促进软骨细胞增殖, 保持软骨细胞的分化表型。

不同能量体外冲击干预后, 培养48 h检测, 双抗夹心ELISA法检测, 实验B组的A值与实验A组、实验C组和空白对照组相比差异有显著性意义($P < 0.05$)。 1.5×10^5 Pa 能量干预后 II 型胶原表达增多明显。而 2.5×10^5 Pa 能量干预后 II 型胶原表达明显减少, 呈现抑制趋势, 说明高能量体外冲击对软骨细胞合成 II 型胶原有抑制作用。此结果与体外冲击干预后RT-PCR检测 II 型胶原mRNA表达结果一致。

体外冲击作为机械应力在一定能量强度和频次的情况下可显著促进软骨细胞增殖。从细胞水平证实软骨细胞是对体外冲击应力敏感细胞, 具有能量依赖性和积累效应, 为下步实验应用提供理论支持。今后还需对体外冲击如何促进软骨细胞增殖的机制、调控方式、细胞性状维持及如何控制细胞过度增殖等方面进行深入研究。

4 参考文献

[1] Haupt G. Use of extracorporeal shock waves in the treatment of pseudarthrosis, tendinopathy and other orthopedic diseases. J Urol. 1997;158(1):4-11.
[2] Ko JY, Chen HS, Chen LM. Treatment of lateral epicondylitis of the elbow with shock waves. Clin Orthop Relat Res. 2001;(387):60-67.
[3] Chen HS, Chen LM, Huang TW. Treatment of painful heel syndrome with shock waves. Clin Orthop Relat Res. 2001;(387):41-46.

[4] Hammer DS, Rupp S, Ensslin S, et al. Extracorporeal shock wave therapy in patients with tennis elbow and painful heel. Arch Orthop Trauma Surg. 2000;120(5-6):304-307.
[5] Rompe JD, Zoellner J, Nafe B. Shock wave therapy versus conventional surgery in the treatment of calcifying tendinitis of the shoulder. Clin Orthop Relat Res. 2001;(387):72-82.
[6] Wang CJ, Chen HS, Chen CE, et al. Treatment of nonunions of long bone fractures with shock waves. Clin Orthop Relat Res. 2001;(387):95-101.
[7] Maier M, Steinborn M, Schmitz C, et al. Extracorporeal shock wave application for chronic plantar fasciitis associated with heel spurs: prediction of outcome by magnetic resonance imaging. J Rheumatol. 2000;27(10):2455-2462.
[8] Ludwig J, Lauber S, Lauber HJ, et al. High-energy shock wave treatment of femoral head necrosis in adults. Clin Orthop Relat Res. 2001;(387):119-126.
[9] Jiang M, Xing GY, Bai XD. Zhonghua Waike Zazhi. 2005; 43(16):1099-1101.
江明, 邢更彦, 白晓东. 体外冲击波疗法在骨科领域的应用[J]. 中华外科杂志, 2005, 43(16):1099-1101.
[10] Pan PJ, Chou CL, Chiou HJ, et al. Extracorporeal shock wave therapy for chronic calcific tendinitis of the shoulders: a functional and sonographic study. Arch Phys Med Rehabil. 2003;84(7):988-993.
[11] Theodore GH, Buch M, Amendola A, et al. Extracorporeal shock wave therapy for the treatment of plantar fasciitis. Foot Ankle Int. 2004;25(5):290-297.
[12] Wang CJ, Weng LH, Ko JY, et al. Extracorporeal shockwave therapy shows chondroprotective effects in osteoarthritic rat knee. Arch Orthop Trauma Surg. 2011;131(8):1153-1158.
[13] Waldman SD, Spiteri CG, Grynblas MD, et al. Effect of biomechanical conditioning on cartilaginous tissue formation in vitro. J Bone Joint Surg Am. 2003;85-A Suppl 2:101-105.
[14] Huang S, Ingber DE. The structural and mechanical complexity of cell-growth control. Nat Cell Biol. 1999;1(5): E131-E138.
[15] Ingber DE. Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction. Annu Rev Physiol. 1997;59:575-599.
[16] Garnero P, Ayral X, Rousseau JC, et al. Uncoupling of type II collagen synthesis and degradation predicts progression of joint damage in patients with knee osteoarthritis. Arthritis Rheum. 2002;46(10):2613-2624.

来自本文课题的更多信息——

作者贡献: 第一作者进行实验设计, 实验实施为第一作者, 实验评估为第二作者, 资料收集为第三作者, 第一作者成文, 第一作者审校, 第一作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。