

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2020.01.09

❖ 论著 ❖

周期性机械应力对大鼠软骨细胞增殖的影响

胡海¹, 刘旭卓², 贾维中¹, 徐西林³

(黑龙江中医药大学附属第二医院 1. 哈南分院骨科; 2. 骨二科; 3. 骨三科, 黑龙江 哈尔滨 150000)

【摘要】目的: 探讨周期性机械应力对大鼠软骨细胞增殖的影响。**方法:** 通过 II 型胶原酶消化分离大鼠原代软骨细胞, 并将软骨细胞分为对照组和实验组。MTT 法检测细胞活力, 实时荧光定量 PCR (Realtime PCR) 法检测蛋白聚糖 (Aggrecan) 及 II 型胶原酶 (Col II) mRNA 的表达, western blot 检测 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2)、增殖细胞抗原 (PCNA) 及细胞周期蛋白 D1 (CyclinD1) 蛋白表达水平与细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 磷酸化水平。**结果:** 与对照组比较, 实验组 1 h、2 h 的软骨细胞活力均明显提高 ($P < 0.05$), Aggrecan 及 Col II mRNA 表达量均明显提高 ($P < 0.05$), Bcl-2、PCNA 及 CyclinD1 蛋白表达量均明显上调 ($P < 0.05$), ERK1/2 磷酸化水平明显上调 ($P < 0.05$)。**结论:** 周期性机械应力能显著促进软骨细胞增殖。

【关键词】 周期性机械应力; 软骨细胞; 增殖

【中图分类号】 R68 **【文献标志码】** A

Effect of cyclic mechanical stress on the proliferation of chondrocyte in rats

HU Hai¹, LIU Xu-zhuo², JIA Wei-zhong¹, XU Xi-lin³

(1. Department of Orthopaedics, Hanan branch; 2. Second Department of Orthopaedics; 3. Third Department of Orthopaedics, the Second Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150000, Heilongjiang, China)

【Abstract】Objective: To explore the effect of cyclic mechanical stress on the proliferation of chondrocyte in rats. **Methods:** The primary chondrocytes of rats were isolated by digestion with type II collagenase. The chondrocytes were divided into control group and experimental group. The cell viability was detected by MTT assay. The expression of Aggrecan and Col II mRNA was detected by Real-time PCR. The expression of B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA), CyclinD1 and the phosphorylation level of extracellular regulated protein kinases (ERK) was detected by Western blot. **Results:** Compared with control group, the activity of chondrocytes in the experimental group increased significantly at 1 h and 2 h ($P < 0.05$), the expression of Aggrecan and Col II mRNA was increased ($P < 0.05$), the expression of Bcl-2, PCNA, CyclinD1 and p-ERK1/2 was up-regulated in experimental group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Cyclic mechanical stress can significantly promote chondrocyte proliferation.

【Key words】 Cyclic mechanical stress; Chondrocytes; Proliferation

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种常见的关节疾病, 发病机制尚不明确, 但软骨的降解在 OA 的发生发展过程中起着重要作用^[1-3]。软骨是一种附着在关节面上的无血管的结缔组织, 无时无刻承受着内外源性的力学刺激。研究^[4-6]显示, 生物力学是软骨生长、修复的重要环境, 对于软骨的发育、损伤具有重要的促进作用, 但力学刺激如何转化为软骨的生物学信号的机制尚不明确。本研究将对此展开探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 10 只 4 周龄 (约 100 g) SD 雄性大鼠购于上海斯莱克实验动物有限公司, 合格证号 SCXK (沪 2012-0002), 大鼠于 (25 ± 2) °C 环境下自由活动并饲养。

1.1.2 主要试剂及仪器 II 型胶原酶购自美国 Gibco 公司; CCK-8 试剂盒购于南京凯基生物技术有限公司; 兔抗 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2)、增殖细胞抗原 (PCNA)、细胞周期蛋白 D1 (CyclinD1)、细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 及 GAPDH 多克隆抗体购于美国 Abcam 公司。MK3 酶标仪购自美国 thermo 公司; IX51

基金项目: 黑龙江中医药大学科研基金 (201714)

作者简介: 胡海 (1980 -), 男, 硕士, 主治医师。E-mail: huhai009@163.com

通讯作者: 徐西林。E-mail: eastoph@sina.com

倒置显微镜购于日本 OLIMPUS 公司; ChemiDoc™ XRS 凝胶成像系统购自美国伯乐公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠软骨细胞的制备^[7-8] 将大鼠处死,并在无菌条件下将大鼠关节分离,剥离软骨面的结缔组织,取中间透明软骨,用 PBS 洗涤,眼科剪将组织剪碎到 1 mm³ 的大小。0.25% 胰蛋白酶 37 °C 预消化 30 min,将上清液弃去,加入 0.2% II 型胶原酶 37 °C 消化 4 h,200 目的滤网过滤,2 000 r/min 离心 10 min,收集细胞。加入含有 10% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养基重悬细胞,并在 25 mm² 培养瓶中在 37 °C 和 5% CO₂ 培养箱中培养,8 ~ 10 d,当软骨细胞密度达到 80% ~ 90% 时候,对细胞进行传代,取第 3 代软骨细胞进行试验。

1.2.2 周期性应力场的构建 往复式加压泵通过阻隔式压力传感器连接到旋转式生物反应器 (HFB40 型),进而构建一个“周期性机械应力灌注式培养系统”,本次实验所采用的频率范围在 0 ~ 1 Hz,压力范围在 0 ~ 200 kPa。

1.2.3 CCK-8 法检测细胞活力 将细胞接种于 96 孔板,待细胞贴壁后,将软骨细胞分为对照组及实验组,对照组在正常培养箱中培养细胞,实验组在周期性应力场中培养细胞,各培养 0、1、2 h,加入 CCK-8 试剂孵育 4 h 后,于酶标仪 560 nm 处测定细胞吸光值 (OD 值)。

1.2.4 Realtime-PCR 法检测细胞中 Aggrecan 及 Col II mRNA 表达 将细胞接种于 6 孔板,待细胞贴壁后,将软骨细胞分为对照组及实验组,对照组在正常培养箱中培养细胞,实验组在周期性应力场中培养细胞,各培养 8 h,根据 Trizol 试剂盒说明书提取细胞中总 RNA,并测定 RNA 浓度及纯度,当检测出的 RNA 纯度 (OD_{260nm}/OD_{280nm} = 1.8) 良好时候,根据反转录试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA,基于 SYBR Green I 荧光分析的 Realtime PCR 分析,预变性 95 °C,15 min;变性 95 °C,20 s;退火 60 °C,34 s;40 个循环。用 2- $\Delta\Delta$ Ct 法分析 Aggrecan 及 Col II mRNA 的表达量,以 GAPDH 为内参。

1.2.5 Western blot 检测蛋白表达量 将细胞接种于 6 孔板,待细胞贴壁后,将软骨细胞分为对照组及实验组,对照组在正常培养箱中培养细胞,实验组在周期性应力场中培养细胞,各培养 1 h,收集细胞并裂解,得到细胞总蛋白。BCA 试剂盒检测蛋白浓度,取 30 ng 蛋白样品上样,进行 12% 十二烷基苯磺酸钠凝胶电泳,转聚偏二氟乙烯膜 40 min。2% 的 BSA 室温下孵育 1 h,一抗溶液 4 °C 过夜孵育,第 2 天室温孵育二抗,最后根据化学发光免疫试剂盒说

明书在凝胶成像系统中曝光各蛋白条带,并分析条带灰度值。

1.3 统计学分析

利用 SPSS 17.0 软件对数据进行处理,计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,行 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 周期性机械应力对软骨细胞活力的影响

与对照组比较,实验组加压 1 h、2 h 的软骨细胞活力均明显提高 ($P < 0.05$)。见图 1。

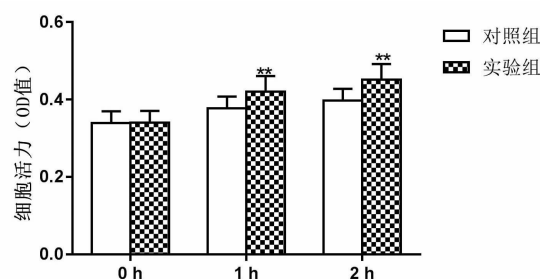


图 1 周期性机械应力对大鼠软骨细胞活力的影响

** $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.2 周期性机械应力对软骨细胞中 Aggrecan 及 Col II mRNA 表达量的影响

与对照组比较,实验组软骨细胞中 Aggrecan 及 Col II mRNA 表达量均明显提高 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 周期性机械应力对软骨细胞中 Aggrecan 及 Col II mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Aggrecan	Col II
对照组	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.11
实验组	1.82 ± 0.18*	1.73 ± 0.07*

2.3 周期性机械应力对软骨细胞中 Bcl-2、PCNA 及 Cyclin D1 蛋白表达量的影响

与对照组比较,实验组软骨细胞中 Bcl-2、PCNA 及 Cyclin D1 蛋白表达量均明显上调 ($P < 0.05$)。见图 2、表 2。

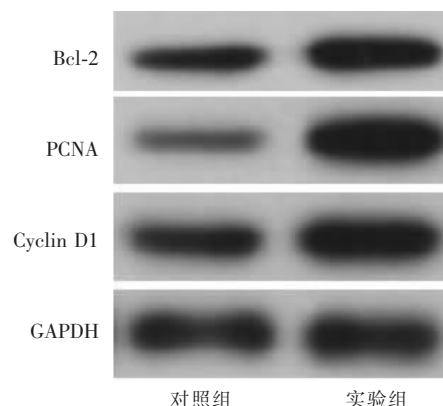


图 2 周期性机械应力对软骨细胞中 Bcl-2、PCNA 及 Cyclin D1 蛋白表达量的影响

表 2 周期性机械应力对软骨细胞中 Bcl-2、PCNA、CyclinD1 及 p-ERK1/2 蛋白表达量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Bcl-2/GAPDH	PCNA/GAPDH	CyclinD1/GAPDH	p-ERK1/2/ ERK1/2
对照组	0.32 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.35 ± 0.03	0.21 ± 0.02
实验组	0.85 ± 0.08 *	1.32 ± 0.13 *	1.03 ± 0.10 *	1.24 ± 0.12 *

* $P < 0.05$, 与对照组比较。

2.4 周期性机械应力对软骨细胞中 ERK1/2 磷酸化水平的影响

与对照组比较,实验组软骨细胞中 ERK1/2 磷酸化水平明显上调 ($P < 0.05$)。见图 3、表 2。

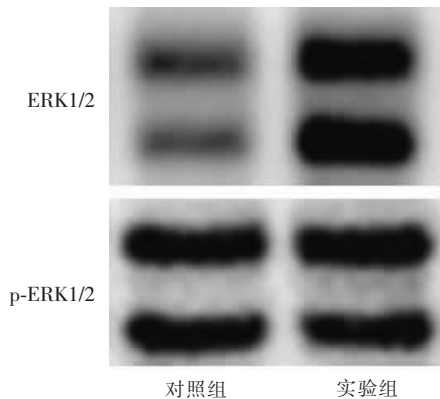


图 3 周期性机械应力对软骨细胞中 ERK1/2 磷酸化水平的影响

3 讨论

正常生理条件下,软骨细胞处于复杂的生理学环境中,内源性、外源性的机械刺激对于关节软骨的结构功能的维持具有重要的影响^[4-5]。研究^[9]表明,周期性的机械应力能够模拟机体的内环境,对于软骨组织工程具有促进作用。但周期性机械应力如何转化为生物学信号并在软骨细胞内传递尚不明确,本研究将对此展开探讨。

软骨细胞增殖和细胞外基质的合成是生理条件下关节软骨的基本特征。蛋白聚糖(Aggrecan)和Ⅱ型胶原蛋白(ColⅡ)是细胞外基质的基本成分,二者的表达水平能很好地体现出软骨细胞外基质的合成情况^[10-11]。Ⅱ型胶原蛋白是关节软骨的主要胶原,占软骨胶原总量近 95%。Ⅱ型胶原在关节软骨中交织成三维结构,被蛋白聚糖包围,起到固定蛋白聚糖的作用。另外Ⅱ型胶原也能够结合阳离子和水,保证软骨的强度。蛋白多糖通过长短不一的单体形式以非共价键连接在一起,并结合大量水分子,使软骨呈现一定形状并具有弹性。因此促进软骨细胞增殖并上调 Aggrecan 和 ColⅡ对于软骨的生成具有重

要意义。本研究首先通过周期性机械应力模拟体内环境,探讨周期性机械应力对软骨细胞增殖及 Aggrecan、ColⅡ mRNA 表达量的影响。MTT 实验结果表明,实验组加压 1 h、2 h 较对照组能显著的提高软骨细胞活力;Realtime PCR 结果表明,实验组较对照组 Aggrecan 和 ColⅡ mRNA 表达量显著上调,说明周期性应力能显著的促进软骨细胞增殖及细胞外基质合成。

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)是一类广泛存在于真核细胞中的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,通过 MAPKKK-MAPKK-MAPK 级联反应将细胞外信号分子传导至细胞核内,从而调控细胞核基因转录(Bax、Bcl-2 等),对细胞增殖,凋亡及分化等生物学行为产生重要影响^[12-14]。MAPK 信号通路中研究较为广泛的包括 ERK1/2, p38, JNKs 三个亚族,其中 ERK1/2 是 MAPK 级联反应的核心组成成分。在细胞因子、生长因子、细胞周围环境的变化均能显著的激活 ERK1/2 通路。目前研究也显示,ERK1/2 在多种细胞的机械传导过程中发挥着重要作用。Gao 等^[15]研究表明在周期性机械应力下,细胞外基质胶原 2A1(col2A1)和聚集蛋白聚糖的 mRNA 表达、椎间盘髓核细胞的迁移显著增加,与 SRC、Gti1 和 ERK1/2 磷酸化水平的提高密切相关。机械应力能够通过上调 p-ERK1/2 促进牙周干细胞的增殖,并抑制其向成骨细胞分化,使其保持牙本质细胞状态^[16]。Bcl-2 家族是最常见的细胞凋亡调控家族,其中 Bcl-2 是研究最为广泛的抗凋亡蛋白,能够与促凋亡蛋白 Bax 形成异二聚体,阻断凋亡信号传递给 Caspase 家族,促进细胞存活与生长。PCNA 是从系统性红斑狼疮患者血液中发现的一种与细胞增殖密切相关的蛋白质,是 DNA 聚合酶 δ 的辅助蛋白,其表达量的变化与细胞周期密切相关,并与 DNA 的合成一致,因此能够作为评价细胞增殖的一个有效指标。CyclinD1 是细胞周期 G1 期的关键蛋白,在外界因子的刺激下高度表达,并与细胞周期依赖蛋白 CDK4/6 结合,进而作用于底物,促使转录起始因子 E2F 进行转录,推动与 DNA 合成有关的基因进行转录,促使细胞周期从 G1 期向 S 期过渡。

本研究进一步探讨了周期性机械应力对软骨细胞中 Bcl-2、PCNA、CyclinD1 及 p-ERK1/2 表达量的影响,结果表明,周期性机械应力能显著的上调 Bcl-2、PCNA、CyclinD1 及 p-ERK1/2 表达,进而促进软骨细胞增殖与细胞外基质合成。

(下转第 56 页)