文章编号:1000-5404(2006)17-1761-04

论著

核心蛋白聚糖对兔肌腱细胞增殖及细胞周期的影响

熊 雁,张正治,傅晓岚 (第三军医大学高原军事医学系中心实验室,重庆 400038)

提 要:目的 观察核心蛋白聚糖(decorin,DCN)对兔肌腱细胞体外增殖和细胞周期的影响,以探讨decorin在肌腱愈合中对肌腱细胞的作用。**方法** 原代培养兔肌腱细胞,分别加入不同浓度(0.25、1.25、2.5、5 μg/ml)的decorin;培养12、24、48 h用二甲基噻唑二苯基四唑溴盐(MTT)法测定细胞增殖速度;镜下观察低浓度DCN作用24 h后对兔肌腱细胞增殖的影响;低浓度DCN培养24 h后用流式细胞仪检测细胞周期。**结果** 0.25、1.25、2.5 μg/ml浓度decorin作用12 h后对兔肌腱细胞增殖有着减少的趋势,但是24 h后却明显地促进其增殖($P<0.05$),但是48 h后差异不显著。而5 μg/ml浓度组作品12 h对兔肌腱细胞增殖有着增加的趋势,24 h后促进增殖作用显著($P<0.05$),48 h后却抑制兔肌腱细胞的增殖。0.25 μg/ml低浓度decorin作用兔肌腱细胞24 h后镜下观察和流式细胞分析,细胞增殖明显增强,S期增加,PI明显大于对照组($P<0.05$)。**结论** 低、中浓度decorin对兔肌腱细胞的增殖起着先延迟后促进的作用,提示在肌腱愈合中如果在肌腱和腱鞘之间运用DCN,可能起到早期隔离TGF-β对腱鞘成纤维细胞的作用,而后期增强TGF-β对腱内膜细胞的作用,从而促进内源性愈合,减少外源性愈合,达到减少粘连的效果。

关键词:核心蛋白聚糖;肌腱细胞;细胞周期
中图法分类号:R322.73;R329.28;R341.3 **文献标识码**:A

Effect of decorin on proliferation and cell cycle of rabbit tendon cells *in vitro*

XIONG Yan, ZHANG Zheng-zhi, FU Xiao-lan (Central Laboratory, College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate effect of decorin on proliferation and cell cycle of rabbit tendon cells *in vitro* so as to explore the role of decorin in tendon wound healing. **Methods** Tendon cells derived from the tissue of rabbits flexor tendon were harvested and cultured *in vitro* with decorin of 0.25, 1.25, 2.5, 5 μg/ml. After culture of 12, 24 or 48 h, the cell proliferation rate was measured by MTT colorimetric determination. After 24-hour culture with 0.25 μg/ml decorin, the morphology of tendon cells was obtained and the cell cycle distribution was detected by flow cytometer. **Results** The proliferation of tendon cells was inhibited after 12-hour culture and significantly increased after 24-hour culture with 0.25, 1.25, 2.5 μg/ml decorin. However, 5 μg/ml decorin could increase the proliferation after 12-hour culture, increase after 24-hour culture, with no significant difference between 24 h and 48 h. decorin at 0.25 μg/ml could significantly increase the cells at S phase and PI after 24-hour culture ($P<0.05$). **Conclusion** decorin at 0.25, 1.25, 2.5 μg/ml can first inhibit the proliferations of tendon cells and then increase the proliferations, implying that decorin can delay the effect of TGF-β in the early phase and increase the effect of TGF-β in the late phase, thus, inhibit extrinsic healing, increase intrinsic healing and decrease adhesion formation.

Key words: decorin; tendon cells; cell cycle

核心蛋白聚糖(decorin,DCN)是富含亮氨酸的小分子的蛋白聚糖家族(small leucine-rich proteoglycans,SLRPs)中的一员,主要分布在骨,软骨,肌腱,巩膜,皮肤,大动脉和角膜等结缔组织,属于细胞外基质(ECM)。由于电镜下显示其在胶原网络中能够修饰胶原纤维,故又称为饰胶蛋白聚糖。1990年Yamaguchi等[1]发现DCN能够负性调节转化生长因子(TGF-β),而TGF-β的过度表达将引起瘢痕形成和纤维化,从而使DCN在抗纤维化,防止瘢痕形成,促进愈合方面的研究成为热点。

另一方面,Samiric等[2]通过氨基酸序列分析发现:在新鲜的肌腱中大约80%的蛋白聚糖的核心蛋白是DCN。本实验通过加入外源性的DCN,研究其对兔肌腱细胞的增殖和细胞周期的影响,探讨其对肌腱细胞的作用,为抑制外源性纤维化愈合,促进内源性肌腱

作者简介:熊 雁(1980-),男,江西省高安市人,硕士研究生,主要从事手外科方面的研究。电话:(023)68752354,E-mail:xiongchengyan@yahoo.com.cn
通讯作者:张正治,电话:(023)68752346,E-mail:zhizzcq@yahoo.com.cn
收稿日期:2005-09-28;修回日期:2005-11-22

细胞的分裂增殖，防止粘连形成，达到肌腱的无瘢痕愈合提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

肌腱取自健康清洁体质量1.51～1.95 kg的日本大耳白兔（第三军医大学实验动物中心提供）后肢的屈趾肌腱；decorin购于Sigma公司；胰蛋白酶，I型胶原酶系Sigma公司分装，DMEM/F-12培养液，胎牛血清购于Hyclone公司。Ⅰ、Ⅲ型胶原一抗、二抗SABC（链酶亲合素－生物素－抗生物素复合物）和DAB显色试剂盒均购自武汉博士德公司。MTT和DMSO均为Amresco公司产品。流式细胞仪（FACsata，Dectondickinson公司，USA），HTS7000型酶标免疫测定仪（PE公司，USA）。

1.2 兔肌腱细胞的原代培养

无菌条件下取兔后肢屈趾肌腱1～2 cm，用Hanks液洗净表面血液，手术显微镜下剥离腱外膜组织后，用Hanks液洗涤3次。将整段肌腱用含0.25%胰蛋白酶及0.1%胶原酶的混合液在37 ℃水溶液中消化30 min，血清中止消化后再用Hanks液冲洗3次。用眼科剪将肌腱剪成1～3 mm^3碎块。一部分采用组织块法培养：放入50 ml培养瓶中，向瓶内加入少量培养液（约1 ml），培养液由DMEM/F12培养基加10%胎牛血清、青霉素6 mg/L、链霉素0.1 g/L组成，用无菌探针将组织块均匀分置，小心置入37 ℃、5% CO_2培养箱中培养，24 h后组织块与瓶壁粘着后取出再加入DMEM/F12完全培养液。在原代细胞爬出贴壁生长前每周换液1次，当其贴壁生长后每3天换液1次。另一部分采用消化法培养：继续用含0.25%胰蛋白酶及0.1%胶原酶的混合液在37 ℃水溶液中消化1 h 30 min，然后加入含10%胎牛血清的F12培养基终止消化，过滤去除组织块，滤液于1 000 r/min，离心10 min，去掉上清，加入培养基，吹打制悬，细胞计数，按5×10^5个/ml接种于25 ml的培养瓶，置入37 ℃、5% CO_2培养箱中培养。待原代培养的细胞生长融合成片，用0.25%胰蛋白酶消化，传代培养，实验用3～5代细胞。

1.3 兔肌腱细胞的鉴定

免疫组化SABC法，对细胞进行Ⅰ、Ⅲ型胶原染色，鉴定兔肌腱细胞。取第3代细胞接种于多聚赖氨酸处理的盖玻片上爬片培养，48 h后细胞长满盖玻片，0.01 mol/L的PBS洗3次，4%的多聚甲醛固定30 min，0.01 mol/L的PBS洗5 min×3次，3%的过氧化氢孵育20 min，蒸馏水冲洗，PBS浸泡5 min，0.5%的Triton处理10 min，0.01 mol/L的PBS洗5 min×3次，滴加5% BSA封闭液，室温20 min后吸去多余的液体，滴加1∶100稀释的一抗，分别做Ⅰ、Ⅲ型胶原一抗组，阳性对照组和阴性对照组。37℃湿盒内孵育60 min，0.01 mol/L的PBS洗2 min×3次，滴加生物素化的羊抗兔IgG，37 ℃ 20 min，0.01 mol/L的PBS洗2 min×3次，滴加SABC，37 ℃ 20 min，0.01 mol/L的PBS洗5 min×3次，DAB室温显色，镜下控制反应时间。蒸馏水洗涤，晾干，苏木精轻度复染，脱水，透明，中性树脂封片。

1.4 不同浓度DCN对兔肌腱细胞增殖影响的MTT检测

称取50 mg MTT溶于10 ml PBS（0.01 mol/L，pH 7.4），微孔滤器除菌、分装、4 ℃保存。取对数期生长兔肌腱细胞，制备细胞悬液，按1×10^3个细胞/孔的密度接种到96孔板，每孔200 μl，置37 ℃、5% CO_2孵箱培养使细胞贴壁。24 h后换液，加入用培养液稀释成不同浓度的DCN，使实验组分为0.25、1.25、2.5、5 μg/ml 4个不同浓度组。对照组只加入等量的培养液。每组设立6个重复孔。将培养板置于37 ℃、5% CO_2及饱和湿度条件下培养。12、24、48 h时，对应的培养板每孔加入MTT溶液（5 mg/ml）20 μl，37 ℃，继续孵育4 h。终止培养，小心吸弃孔内培养上清液。然后每孔加入150 μl DMSO，振荡10 min，使结晶物充分溶解。选择490 nm波长，HTS7000型酶标免疫测定仪侧定各孔光吸收值[D(490)值]，记录结果。

1.5 低浓度DCN对兔肌腱细胞增殖影响的镜下观察

取对数期生长的兔肌腱细胞，0.25%胰蛋白酶消化制悬后，按5×10^5个/瓶的浓度分别种植于25 cm^2培养瓶中，24 h贴壁后在实验组培养基中加入DCN，使其终浓度为0.25 μg/ml。5% CO_2，37 ℃条件下培养24 h后，在倒置显微镜下观察细胞的形态特征和生长增殖情况。

1.6 低浓度DCN对兔肌腱细胞周期影响的流式分析

取对数期生长的兔肌腱细胞，0.25%胰蛋白酶消化制悬后，按5×10^5个/瓶的浓度分别种植于25 cm^2培养瓶中，实验组和对照组各5瓶。24 h贴壁后，在实验组培养基中加入DCN，使其终浓度为0.25 μg/ml。5% CO_2，37 ℃条件下培养24 h后，用胰蛋白酶消化制成细胞悬液，1 000 r/min，离心10 min，弃上清液。用PBS（pH 7.4）洗涤细胞2次，离心，留沉淀物0.5 ml，用振荡器使细胞分散。用吸液器将细胞注入70%冷乙醇中，4℃固定过夜。测试前取用70%乙醇固定的细胞悬液，1 000 r/min，离心10 min，弃去固定液，用PBS洗1～2次。加RNA酶100 μl（50 μg/ml），37℃恒温水浴消化30 min，立即放入冰浴中终止RNA酶的作用。加1 ml PI染液（50 μg/ml）4 ℃避光，30 min后流式细胞仪检测，CellQuest 3.1软件分析。

1.7 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 10.0统计软件进行t检验。

2 结果

2.1 兔肌腱细胞的培养鉴定

组织块置入培养瓶后，倒置显微镜下观察，第（13.2±2.6）天见组织块周边有腱细胞呈放射状爬出，与组织块边缘垂直，并向远处贴壁生长（图1）。消化法培养的细胞，48 h开始贴壁，后逐渐延展为梭形和多角形。7 d左右达到对数生长期，形态上属于成纤维细胞类型。

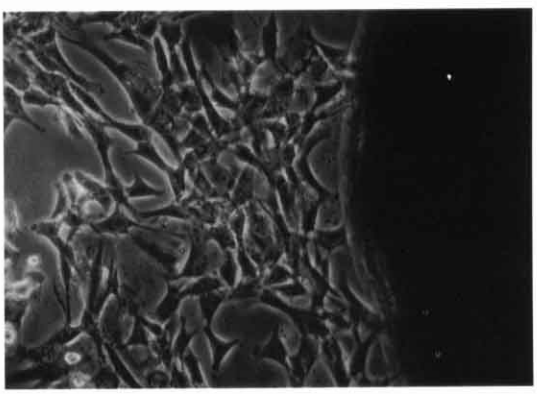
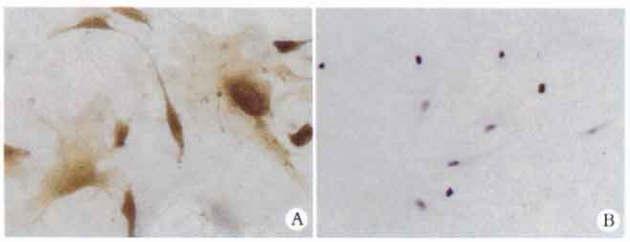


图1 倒置显微镜下的兔肌腱细胞 （×100）

兔肌腱细胞经消化后，20～30 min 收缩变圆。吹打制悬接种另瓶后 8 h 陆续贴壁，延展为梭形，后细胞继续延展开成为不规则多角形。6～7 d 长满瓶底，细胞具有接触抑制特性。

免疫组化染色鉴定，Ⅰ型胶原染色阳性，Ⅲ型胶原染色阴性（图 2），证明所培养的细胞为兔肌腱细胞。



A：Ⅰ型胶原染色阳性；B：Ⅲ型胶原染色阴性

图 2　肌腱细胞免疫细胞化学染色　（SABC×100）

2.2　不同浓度 DCN 对兔肌腱细胞增殖影响

与对照组比较，12 h 时相点，0.25、1.25、2.5 μg/ml 浓度组兔肌腱细胞增殖有着减少的趋势，而 5 μg/ml 浓度组细胞增殖有着增加的趋势，但 DCN 作用均无明显差异（$P>0.05$）；然而 24 h 时相点，DCN 非常显著地促进各浓度组兔肌腱细胞增殖（$P=0.00$）；48 h 时相点，0.25、1.25、2.5 μg/ml 浓度组细胞增殖变得不规则，各孔差异很大，与对照组差异不显著（$P>0.05$），5 μg/ml 浓度组细胞增殖显著抑制（$P<0.05$），见表 1。

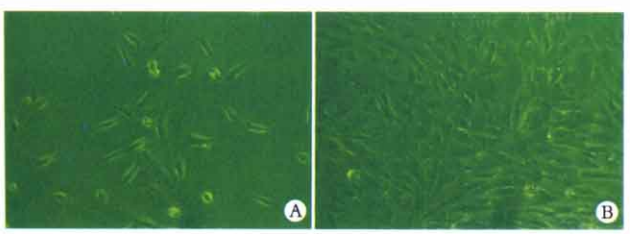
表 1　不同浓度 DCN 对兔肌腱细胞增殖影响[D(490)值，$\bar{x}\pm s$]

组别	12 h	24 h	48 h
对照组	0.097 5±0.016 5	0.142±0.023	0.185±0.022 4
DCN 组			
0.25 μg/ml	0.095 7±0.014 1	1.031±0.112[a]	0.642±1.156
1.25 μg/ml	0.088 8±0.010 9	1.101±0.278[a]	0.455±0.379
2.5 μg/ml	0.085 7±0.012 8	1.120±0.391[a]	0.218±0.204
5 μg/ml	0.119±0.043 1	1.385±0.247[a]	0.149±0.023[a]

a：$P<0.05$，与对照组同时相点比较

2.3　低浓度 DCN 对兔肌腱细胞增殖影响的镜下观察

24 h 后倒置显微镜下观察，见对照组细胞呈梭形或多角形，两极突起，细胞质透亮，细胞核居细胞中央，可见 1～2 个核仁，细胞散在，增殖不明显（图 3A）；0.25 μg/ml 浓度实验组细胞呈长梭形，增殖明显，生长致密，融合成片，细胞有接触性抑制，平行排列（图 3B）。



A：对照组；B：DCN 实验组

图 3　24 h 后细胞增殖情况　（倒置显微镜×100）

2.4　低浓度 DCN 对兔肌腱细胞周期影响

DCN 作用 24 h 后与对照组相比，0.25 μg/ml 浓度实验组细胞处于 G_0/G_1 期的百分比减少，S 期增加，G_2/M 期增加，细胞各期的差异显著（$P<0.05$），增殖指数 PI 明显增加（$P<0.05$）。提示作用 24 h 后低浓度 DCN 可以促进肌腱细胞的增殖，见表 2。

表 2　低浓度 Dceorin 对兔肌腱细胞周期的影响（$n=5$）

组别	细胞周期			PI
	G_0/G_1	S	G_2/M	
对照组	80.2±2.1	17.6±1.7	2.2±1.3	19.8±2.1
实验组	63.8±13.6[a]	28.9±10.8[a]	7.3±4.4[a]	36.2±13.6[a]

a：$P<0.05$，与对照组相比；PI=S+G_2

3　讨论

3.1　兔肌腱细胞的培养

1971 年 Dehm 等[3]用消化法首次进行鸡胚肌腱细胞的原代培养。将鸡胚肌腱细胞剪成碎块后用 0.25% 的胰酶和 0.1% 胶原酶混合消化。但是此方法培养的是腱细胞和腱外膜、腱内膜细胞的混合物。后来改良 Henderson 分步酶消化法是以上述浓度酶先混合消化整个屈趾肌腱 20 min 去除滑膜细胞、腱外膜细胞，而深层腱组织剪成碎块后消化。但用这种方法得到的细胞仍不够纯，因为腱实质内还有腱内膜细胞[4]。进一步研究，Banes 认为离心淘洗法可分离这两种细胞，他在消化分离鸡肌腱细胞后用 1 000 r/min 离心，下层沉淀为腱细胞，而上层悬浮者为内膜细胞。研究表明，肌腱细胞在体外传代过程中，其表型常会发生改变，传代次数越多变异越大，因此在进行肌腱细胞体外研究时应采用原代培养。我们的实验采用了组织块和消化法两种方法，发现消化法消化时间难以把握，收集到的肌腱细胞很少，而且细胞贴壁性不好。而组织块法原代细胞爬出的时间很长。但是最后细胞爬出后，很快就达到对数生长期，细胞贴壁性好，折光性强。

肌腱细胞的鉴定，Henderson 在鸡胚肌腱细胞与腱外膜成纤维细胞体外培养中，用免疫组化和同位素标记的方法对其合成的胶原类型进行鉴定后认为：肌腱细胞仅合成Ⅰ型胶原，而成纤维细胞合成Ⅰ型和Ⅲ型胶原[4]。我们实验采用 SABC 法免疫组化染色，培养的兔肌腱细胞Ⅰ型胶原阳性，Ⅲ型胶原阴性，证明培养细胞的为兔肌腱细胞。

3.2　不同浓度 DCN 对兔肌腱细胞的影响

近年来，随着对肌腱愈合中细胞因子的研究深入，人们对肌腱愈合的认识进入分子水平和基因水平。Tsubone 等[5]用免疫组化技术对成年狗的肌腱损伤修复模型研究发现，TGF 最接近修复位点，其受体基因的表达峰值在术后 14 d，PDGF 和 VEGF 在肌腱修复的整个节段都有表达，而 EGF，IGF 和 bFGF 没有在肌腱

细胞内表达只是在围绕修复位点的炎细胞中表达。肌腱术后愈合,功能降低的主要原因是肌腱的纤维性粘连愈合。而当前认为这种纤维性粘连愈合的关键因素是TGF-β。Chang 等[6]通过直接注射TGF-β_1抗体到肌腱损伤部位,发现能提高兔屈肌腱损伤愈合后的活动范围。因此,调节 TGF-β,在特定的愈合时段降低TGF-β 的作用可能达到抑制肌腱粘连的完美效果。

DCN 作为体内自身正常的 TGF-β 负性调节因子,其机制可能是通过与 TGF-β 的受体竞争性结合 TGF-β。但是 DCN 的作用是部分的,不完全的,外源性 TGF 可以终止其作用。Markmann 等[7]通过转染 DCN 的 DNA 和反义 DNA 到 MG-63 骨肉瘤细胞中发现,DCN 的表达和 TGF-β 介导的胶原凝胶的回收及双链蛋白聚糖的反应成反比。这说明,DCN 在细胞外基质中对 TGF-β 起隔离而不是灭活的作用。这提示在肌腱愈合中如果在肌腱和腱鞘之间运用 DCN,可能起到隔离 TGF-β 对腱鞘成纤维细胞的作用,而增强 TGF-β 对腱内膜细胞的作用,从而促进内源性愈合,减少外源性愈合,达到减少粘连的效果。DCN 还可以和纤连蛋白(fibronectin, FN),凝血栓蛋白(thrombospondin, TSP)结合抑制细胞黏附到细胞基质,减少细胞的迁移,导致其以 TGF 剂量依赖关系抑制粘连形成。

本实验结果显示:低、中浓度 DCN 对兔肌腱细胞增殖有先抑制后促进的表现。这种先延迟肌腱细胞增殖的效应,提示 DCN 只是延迟 TGF-β 作用,而不灭活其作用,从而有可能达到抑制外源性粘连愈合。随着时间的推移,低、中浓度的 DCN 对肌腱细胞又起到了明显的增殖作用,细胞 S 期明显增加,PI 明显高于对照组,提示 DCN 可以明显促进内源性愈合。这种先延迟后促进肌腱细胞增殖的作用,为调节 TGF-β,抑制肌腱粘连,促进内源性愈合提供了依据。但是高浓度 DCN 却有着相反的作用,这提示对于 TGF-β 的调节,DCN 的浓度存在一个剂量阈的问题。

3.3 DCN 与胚胎的无瘢痕愈合

70 年代初期,人们发现孕中期的胎儿创面愈合后没有瘢痕的形成,由此引发了对无瘢痕愈合机制的研究。Flanagan 等[8]通过对羊胚胎肌腱损伤模型研究发现胚胎肌腱损伤后是无瘢痕愈合,而胚胎环境中 TGF-β_1及其 mRNA 含量明显低于成年组织,这提示胚胎的无瘢痕愈合机制可能就是这种低浓度的 TGF-β_1环境造成的。由于 DCN 作为 TGF-β 的负性调节因子,因此有人认为它的上调可以抑制 TGF-β,从而达到抗瘢痕形成的作用。

但是 Beanes 等[9]却报道:怀孕早期的胎儿成纤维细胞和皮肤的 DCN 表达水平低于晚期胎儿和成体的成纤维细胞和皮肤,在无瘢痕愈合创口中 DCN 表达明显低于瘢痕愈合创口,DCN 表达升高与皮肤的发育和瘢痕形成有关,DCN 表达降低可能与无瘢痕愈合有关,它的下调可能导致了胚胎创伤的无瘢痕愈合。

对于上述两种矛盾的看法,本实验结果推测,DCN 作为 TGF-β 的负性调节因子早期确实可以起到抑制 TGF-β 引起的细胞增殖作用,但是 DCN 并不灭活 TGF-β,所以后期反而促进细胞增殖。DCN 与 TGF-β 受体竞争,减慢 TGF-β 的作用,以便在最佳的时间下,调节细胞的增殖。而这一现象,早期看上去像是一个抑制作用,后期却是一个促进作用。

在肌腱愈合中,DCN 作为饰胶蛋白,还能够调节胶原原纤维的正常纤维化。因此利用 DCN 对 TGF-β 的这种竞争作用以及调节胶原纤维成熟的作用,很可能可以达到胚胎肌腱无瘢痕愈合的效果,而且后期可以促进肌腱胶原的合成,提高肌腱的抗拉力。Nakamura 等[10]在兔韧带损伤模型中运用 DCN 反义基因治疗方法提高了早期瘢痕中胶原原纤维形成,以及抗拉力增加和瘢痕爬行距离延长,显示出 DCN 在提高皮肤,肌腱等软组织愈合中存在潜在的应用价值,但是 DCN 的浓度,作用时间,方式以及临床效果等需要进一步的研究。

参考文献:

[1] YAMAGUCHI Y, MANN D M, RUOSLAHTI E. Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin[J]. Nature, 1990, 346(6281): 281-284.

[2] SAMIRIC T, ILIC M Z, HANDLEY C J. Characterisation of proteoglycans and their catabolic products in tendon and explant cultures of tendon[J]. Matrix Biol, 2004, 23(2): 127-140.

[3] DEHM P, PROKOP D J. Synthesis and extrusion of collagen by freshly isolated cells from chick embryo tendon[J]. Biochim Biophys Acta, 1971, 240(3): 358-369.

[4] RIEDERER-HENDERSON M A, GAUGER A, OLSON A, *et al*. Attachment and extracellular matrix differences between tendon and synovial fibroblastic cells[J]. *In Vitro*, 1983, 19(2): 127-133.

[5] TSUBONE T, MORAN S L, AMADIO P C, *et al*. Expression of growth factors in canine flexor tendon after laceration *in vivo*[J]. Ann Plast Surg, 2004, 53(4): 393-397.

[6] CHANG J, THUNDER R, MOST D, *et al*. Studies in flexor tendon wound healing: neutralizing antibody to TGF-beta1 increases postoperative range of motion[J]. Plast Reconstr Surg, 2000, 105(1): 148-155.

[7] MARKMANN A, HAUSSER H, SCHONHERR E, *et al*. Influence of decorin expression on transforming growth factor-beta-mediated collagen gel retraction and biglycan induction[J]. Matrix Biol, 2000, 19(7): 631-636.

[8] FLANAGAN C L, SOSLOWSKY L J, LOVVORN H N, *et al*. A preliminary comparative study on the healing characteristics of fetal and adult sheep tendon[J]. Trans Orthop Res, 1999, 24: 1080.

[9] BEANES S R, DANG C, SOO C, *et al*. Down-regulation of decorin, a transforming growth factor-beta modulator, is associated with scarless fetal wound healing [J]. J Pediatr Surg, 2001, 36(11): 1666-1671.

[10] NAKAMURA N, HART D A, BOORMAN R S, *et al*. decorin antisense gene therapy improves functional healing of early rabbit ligament scar with enhanced collagen fibrillogenesis *in vivo*[J]. J Orthop Res, 2000, 18(4): 517-523.

(编辑 周 芳)