文章编号:1000-5404(2010)05-0431-04

论著

结缔组织生长因子在成年和幼年兔关节软骨全层缺损修复中表达的差异

付建军,初同伟,周 跃,刘玉刚 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院骨科)

[摘要] 目的 探讨结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,CTGF)在成年和幼年兔膝关节软骨全层缺损修复过程中的表达及意义。**方法** 成年和幼年新西兰白兔各25只,两年龄组兔分别分为5组($n=5$):对照组(未损伤组)、损伤24 h、1周、4周、8周组,制备兔膝关节股骨关节面全层软骨缺损自我修复模型。术后于各时间点处死动物,观察软骨缺损的修复情况,并应用RT-PCR和免疫组化技术分别检测CTGF mRNA及蛋白在成年和幼年兔修复过程中的表达。**结果** 幼年兔关节软骨全层缺损后可形成透明软骨样修复,成年兔仅为纤维组织修复。各组检测均见CTGF mRNA表达,幼年组表达水平显著高于成年组,差异有统计学意义($P<0.05$)。免疫组化显示各组软骨细胞均有CTGF蛋白表达,阳性表达主要集中在软骨的中间带及深层带。**结论** 幼年兔关节软骨全层缺损修复优于成年兔,同时伴有CTGF表达的显著增高,提示CTGF可能在促进关节软骨修复中发挥重要作用。

[关键词] 结缔组织生长因子;软骨,关节;创伤和损伤;软骨细胞;兔
[中图法分类号] R681.3; R392.1; R364.3 **[文献标志码]** A

Differential expression of connective tissue growth factor in articular cartilage in young and adult rabbits after full-thickness cartilage injury

Fu Jianjun, Chu Tongwei, Zhou Yue, Liu Yugang (Department of Orthopaedics, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

[Abstract] **Objective** To approach the expression and significance of connection tissue growth factor (CTGF) in articular cartilage after full-thickness osteochondral defect on the medial femoral condyle in young and adult rabbits model. **Methods** Totally 25 young (at an age from 10 to 12 weeks) and 25 adult New Zealand white rabbits (at an age from 34 to 39 weeks) were randomly divided into 5 groups ($n=5$), control group, 24-hour, 1-week, 4-week and 8-week after full-thickness cartilage injury groups. A rabbit model of spontaneous healing of full-thickness cartilage defect in the medial femoral condyle in both knees was reproduced. Macroscopic and histological morphous of repairs were observed in each age group during repair. mRNA and protein expression of CTGF were detected with RT-PCR and immunohistochemistry, respectively. **Results** The morphologically good repairs with hyaline-like cartilage appearance were observed in young rabbit, but formation of fibrous tissue in adult rabbit. The expression of CTGF mRNA was detected in all groups. Expression of CTGF mRNA was significantly higher in young rabbit than in adult rabbits ($P<0.05$). The immunohistochemical results showed that the expression of CTGF was positive in all groups, and located in the middle and deep zones. **Conclusion** Young rabbits show better specialization of the repair tissue than adult animals accompanied with high expression of CTGF mRNA. CTGF may play a role in the repair of articular cartilage injury.

[Key words] connective tissue growth factor; cartilage, articular; wounds and injuries; chondrocytes; rabbits

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30672120) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2006BB5355).
Corresponding author: Chu Tongwei, Tel: 86-23-68774080, E-mail: chtw@sina.com

关节软骨损伤在临床上较为常见,对于其修复的研究一直以来是一个巨大的挑战。关节软骨属于透明软骨,是一种特殊的结缔组织,软骨内无血管、淋巴管和神经,其营养主要由滑液和关节囊滑膜层的动脉分支供应,这些结构特点决定了损伤后自身愈合能力有限。关节软骨损伤后,诱导软骨细胞的增殖、分化及促进基质的产生,是修复的关键。生长因子是促进这些修复机制的重要因素。结缔组织生长因子(connective

[基金项目] 国家自然科学基金(30672120);重庆市自然科学基金(CSTC2006BB5355)
[通信作者] 初同伟,电话:(023)68774080,E-mail:chtw@sina.com

tissue growth factor,CTGF)是近年来发现的生长因子,有刺激间充质细胞向软骨细胞分化的潜能,可促进兔关节软骨细胞Ⅱ型胶原及聚集蛋白多糖核心蛋白的表达,同时有研究[1]证明在小鼠体内它能促进损伤关节软骨的再生。

有研究[2]报道,幼年新西兰白兔膝关节软骨全层损伤后可形成透明软骨修复,新生的软骨组织在组织结构等方面和正常关节软骨无明显差异,而成年新西兰白兔膝全层关节软骨损伤后只能形成瘢痕修复。这种修复结果的差异,必然蕴含了其修复机制的差异。本实验通过建立成年和幼年兔膝关节软骨全层缺损模型,观察不同年龄组软骨自行修复结果,了解CTGF在不同年龄组关节软骨修复中的差异表达及可能意义,探究兔关节软骨修复的内在机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、仪器和动物

软骨RNAOUT试剂盒(天泽基因公司);QUANT cDNA第一链合成试剂盒、2×*Taq* Plus PCR MasterMix(天根生物科技公司);CTGF及β-actin引物(上海生工)。多克隆抗CTGF抗体、免疫组化SABC试剂盒、DAB显色试剂盒(武汉博士德公司)。301型低温超速离心机(Beckman,USA),Chemi Imager 5500型凝胶成像仪(Alpha Innotech,USA),PTC-200型梯度PCR仪(Bio-Rad,USA),DU-800型核酸/蛋白检测仪(Beckman,USA)。健康新西兰白兔50只,幼年(10~12周龄)25只,体质量1.0~1.5 kg,成年(34~39周)25只,体质量2.5~3.0 kg,雌雄不限。由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 分组及造模

成年和幼年新西兰白兔分别按随机数字表法分为5组,每组5只:对照组(未损伤组)、损伤24 h组、损伤1周组、损伤4周组、损伤8周组。参照Wei等[2]实验方法制备关节软骨全层缺损模型。3%戊巴比妥钠耳静脉注射麻醉(30 mg/kg),常规脱毛,无菌条件下行双侧膝关节内侧纵行切口,长约1.5 cm,向外侧牵开髌骨及髌韧带,用直径为3 mm的钻头,在双侧膝关节股骨髁间关节软骨面造成直径3 mm、深3 mm的关节软骨全层缺损,清洗创面,逐层缝合伤口。

1.3 样本采集

用空气栓塞法处死各组动物后,取损伤部位修复组织及周围2 mm范围软骨组织及软骨下骨组织,置右侧膝关节标本于4%多聚甲醛固定后做石蜡切片,左侧膝关节标本立即液氮冻存。

1.4 指标检测

1.4.1 软骨修复组织形态学观察 标本采集前,用解剖显微镜观察关节软骨的大体形态。所取标本经4%多聚甲醛固定、20% EDTA微波下脱钙、石蜡包埋后切片,每个标本随机取3张切片行HE染色,光学显微镜下观察软骨缺损修复情况。

1.4.2 免疫组化SABC法检测CTGF蛋白的表达 切片经脱蜡和水化后,微波抗原修复。3% H_2O_2灭活10 min,蒸馏水洗3次;5% BSA封闭,室温孵育20 min,倾去血清;滴加一抗,浓度为1∶200,4 ℃过夜,PBS洗3次(2 min/次);滴加生物素标记的二抗,37 ℃孵育20 min,PBS洗3次(2 min/次);滴加SABC复合物,37 ℃孵育20 min,PBS洗4次(5 min/次);DAB显色,苏木精复染后脱水、透明、封片。以PBS代替一抗进行对照实验。CTGF阳性染色呈现棕黄色,位于软骨细胞质内。

1.4.3 RT-PCR检测CTGF mRNA在软骨及修复组织中的表达 用软骨RNAOUT试剂盒提取总RNA[3],并测定其浓度及纯度。兔CTGF引物系列:上游,5′-GGAAATGCTGCGAGGAGTG-3′,下游5′-GCATCATGGTTGGGTCTGG-3′;产物长度114 bp。PCR反应条件:94 ℃温育5 min,94℃变性30 s,60 ℃退火30 s,72 ℃延伸1 min,30个循环,72℃延伸10 min。内参采用β-actin,引物序列:上游,5′-CGTGCGGGACATCAAGGA-3′,下游,5′-AGGAAGGAGGGCTGGAACA-3′,产物长度177 bp。PCR反应条件为:94 ℃温育5 min,94 ℃变性30 s,66 ℃退火30 s,72 ℃延伸1 min,30个循环,72 ℃延伸10 min。反应结束后,取PCR产物在2%琼脂糖凝胶中电泳,加样量均为6 μl。电泳条带采用Chemi Imager 5500凝胶分析仪进行条带光密度分析,以平均光密度值表示其条带的相对数值。将目的基因平均光密度值/内参基因平均光密度值得到各例标本目的基因的相对表达量。

1.5 统计学分析

使用SPSS 13.0统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用析因设计的方差分析对数据进行分析处理。

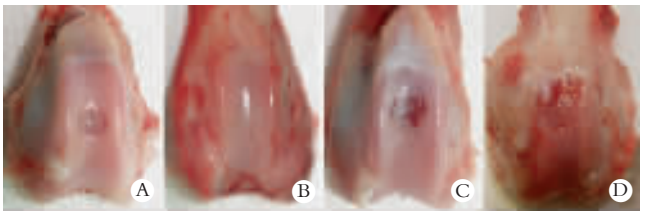
2 结果

2.1 软骨修复组织形态学变化

解剖显微镜观察,伤后1周时两年龄组缺损均未完全填充;4周时所有缺损较1周时有更多的修复组织,幼年组缺损填充优于成年组,再生组织表面凹凸,淡红色;8周时幼年组缺损均完全被填充,修复组织表面较成年组光滑,表面颜色由淡红逐渐转白,成年组仅少数标本填充完全,关节面偶见骨赘(图1)。光镜下观察,4周时所有再生组织都没有达到周围软骨的水平,但幼年组优于成年组。幼年组修复组织主要为纤维组织和未完全分化的间充质,并有大量的软骨样细胞,核大细胞质丰富,缺损邻近软骨区域常可见软骨细胞簇。成年组,修复组织以纤维组织为主。8周时幼年组修复组织充盈,成年组仅有少数标本的再生组织达到周围正常软骨的高度。幼年组大部分标本中发现透明样软骨,典型的栅栏样细胞结构也开始形成,仍可见较多的软骨细胞簇。在成年组,修复组织为纤维组织或者是未完全分化的间充质,没有标本有透明样软骨生成。幼年组修复组织完全与邻近正常软骨黏合,而成年组多可见明显裂隙(图2)。

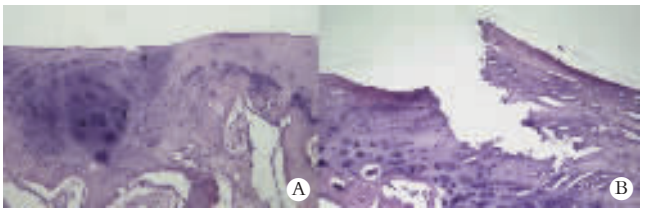
2.2 CTGF mRNA表达

RT-PCR结果显示,损伤后成年及幼年各组各时段均可见CTGF mRNA表达,表1显示了各组mRNA的相对表达量。损伤后幼年及成年组CTGF mRNA持续表达,于伤后1周出现表达高峰,4周时逐渐回落,修复过程中幼年兔CTGF mRNA的表达显著高于成年组,差异有统计学意义($P<0.05$,图3)。



A、B:幼年组损伤后 4、8 周;C、D:成年组损伤后 4、8 周

图 1　兔关节软骨损伤修复大体形态观察



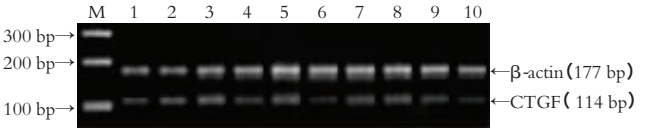
A:幼年组损伤后 8 周;B:成年组损伤后 8 周

图 2　兔关节软骨损伤修复的组织学观察　(HE ×100)

表 1　各组兔关节软骨 CTGF mRNA 的相对表达量($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	成年组	幼年组
对照组	0.119 ±0.009	0.350 ±0.014[a]
损伤 24 h 组	0.509 ±0.011	0.719 ±0.012[a]
损伤 1 周组	0.519 ±0.009	0.864 ±0.010[a]
损伤 4 周组	0.348 ±0.010	0.442 ±0.009[a]
损伤 8 周组	0.227 ±0.008	0.438 ±0.010[a]

a:$P<0.05$,与成年组比较

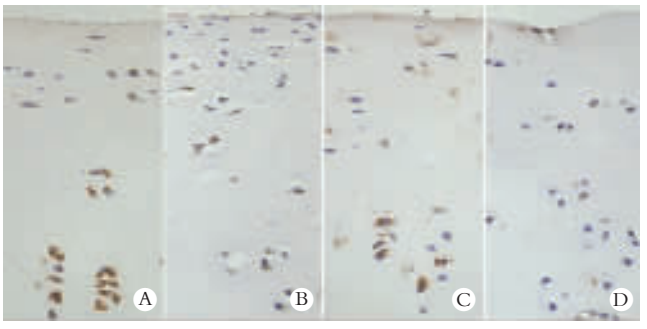


M:DNA 标准;1 ~5:分别为幼年组对照组、损伤 24 h 组、损伤 1 周组、损伤 4 周组、损伤 8 周组;6 ~10:分别为成年组对照组、损伤 24 h 组、损伤 1 周组、损伤 4 周组、损伤 8 周组

图 3　各组兔关节软骨 CTGF mRNA 的表达

2.3　CTGF 蛋白的表达

免疫组化染色结果显示,各组软骨细胞均有 CTGF 蛋白的表达,阳性表达主要集中于软骨的中间带及深层带(图 4)。



A:幼年组损伤后 1 周;B:成年组损伤后 1 周;C:幼年组损伤后 8 周;D:成年组损伤后 8 周

图 4　各组兔软骨细胞 CTGF 蛋白表达　(SABC ×400)

3　讨论

关节软骨损伤的修复与其组织结构和损伤的特征有关。关节软骨无血管、淋巴管和神经,软骨细胞深埋于软骨基质中,软骨损伤后,软骨细胞无法迁徙到损伤区域,软骨组织内缺乏血管分布又使得血液中的修复细胞无法到达损伤区,这些组织形态学特点决定了关节软骨的再生能力较差。损伤软骨的年龄、软骨损伤的类型等损伤特征是影响软骨修复的重要因素。未穿透软骨下骨的部分软骨损伤仅引起机体局限的损伤反应,关节软骨不能得到修复;而穿透软骨下骨的全层软骨损伤可以引起机体的修复反应,损伤区域可以得到修复。不论何种因素影响软骨的修复,促进修复的关键机制在于:提高修复组织的细胞构成,促使间充质细胞向软骨细胞的分化,以及产生和维护富含Ⅱ型胶原、蛋白多糖的基质。生长因子正是促进这些机制的重要因素。CTGF 是近年来新发现的生长因子,作为一种重要的效应分子,在关节软骨中发挥重要作用。Djouad 等[4]及 Kawaki 等[5]在研究中发现 CTGF 有刺激软骨细胞分化的潜能。Nishida 等[6]在实验中发现,CTGF 是软骨细胞发育和生存的重要因素。Ono 等[7]证实 CTGF 能显著提高分离的人骨髓间充质细胞的附着能力,在骨与软骨的再生中发挥重要作用。欧阳冰等[8]在兔关节软骨细胞的体外培养中发现,CTGF 可促进兔关节软骨细胞增殖,同时能刺激Ⅱ型胶原的表达并维持软骨细胞表型的稳定。Aoyama 等[9]的实验证明 CTGF 在促进关节软骨聚集蛋白聚糖合成时发挥作用。Nishida 等[1]在小鼠体内实验中发现,CTGF 能促进损伤关节软骨的再生。

本实验通过建立成年和幼年兔膝关节软骨全层缺损自我修复模型,观察比较成年和幼年兔软骨缺损修复及 CTGF 的表达情况。从大体形态及组织学形态观察到:成年与幼年兔软骨缺损填充情况随时间延长而改善,但幼年兔较成年兔有更加迅速的填充速度,幼年兔修复组织较成年兔修复组织有更明显的关节软骨组织特异性,即幼年兔修复组织的质量优于成年兔。CTGF mRNA 检测结果显示在成年组与幼年组关节软骨缺损修复过程中 CTGF 持续表达,幼年组各时间点 CTGF 的表达较成年组显著增高。关节软骨损伤后 CTGF 的持续表达、幼年组较成年组表达的显著增高、幼年组修复优于成年组及以往研究对 CTGF 在软骨中作用的认识,提示 CTGF 与关节软骨损伤修复密切相关,CTGF 表达量的高低可能影响着关节软骨修复的质量。将 CTGF 应用于关节软骨损伤的治疗,可能更好的促进关节软骨损伤的修复。

参考文献:

[1] Nishida T, Kubota S, Kojima S, *et al*. Regeneration of defects in articular cartilage in rat knee joints by CCN2 (connective tissue growth factor)[J]. J Bone Miner Res, 2004, 19(8): 1308 – 1319.

[2] Wei X, Gao J, Messner K. Maturation-dependent repair of untreated

osteochondral defects in the rabbit knee joint[J]. J Biomed Mater Res, 1997, 34(1): 63-72.
[3] 刘玉刚, 胡旭, 付建军, 等. 一种富含多糖的关节软骨组织总RNA提取方法初探[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(24): 2495-2497.
[4] Djouad F, Delorme B, Maurice M, *et al*. Microenvironmental changes during differentiation of mesenchymal stem cells towards chondrocytes [J]. Arthritis Res Ther, 2007, 9(2): R33.
[5] Kawaki H, Kubota S, Suzuki A, *et al*. Cooperative regulation of chondrocyte differentiation by CCN2 and CCN3 shown by a comprehensive analysis of the CCN family proteins in cartilage [J]. J Bone Miner Res, 2008, 23(11): 1751-1764.
[6] Nishida T, Kondo S, Maeda A, *et al*. CCN family 2/connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) regulates the expression of Vegf through Hif-1α expression in a chondrocytic cell line, HCS-2/8, under hypoxic condition[J]. Bone, 2009, 44(1): 24-31
[7] Ono M, Kubota S, Fujisawa T, *et al*. Promotion of attachment of human bone marrow stromal cells by CCN2[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 357(1): 20-25.
[8] 欧阳冰, 林绵辉, 左文建, 等. 结缔组织生长因子对体外培养的兔关节软骨细胞增殖和表型的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(20): 3816-3820.
[9] Aoyama E, Hattori T, Hoshijima M, *et al*. N-terminal domains of CCN family 2/connective tissue growth factor bind to aggrecan[J]. Biochem J, 2009, 420(3): 413-420.

(收稿:2009-07-17;修回:2009-08-29)
(编辑 栾 嘉)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2010)05-0434-01

肩胛骨平滑肌瘤1例

陈贤明[1],陈 波[1],张宇琳[2] (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所骨科[1];400030 重庆,重庆市肿瘤医院肿瘤研究所[2])

[关键词] 肩胛骨;平滑肌瘤;病例报告
[中图法分类号] R738 [文献标志码] B

骨平滑肌瘤极其少见,我科在2007年收治1例肩胛骨平滑肌瘤患者,现报告如下。

1 临床资料

患者,男性,21岁,因"反复左肩痛1年余"入院。病程中无发热、盗汗史,无明显夜间痛及身体消瘦,查体除肩胛区局部轻微肿大及压痛外,无其他阳性体征。入院后查血常规、血沉、C-反应蛋白、肝功能等未见明显异常;行全身骨显像:左侧肩胛骨异常增强影,骨质破坏灶(图1);左肩X线片:左侧肩胛骨盂下巨大囊状骨质破坏区,恶性肿瘤可能性大(图2);64排CT:左肩胛盂及附近骨质改变,提示结核(图3)。综合患者临床表现及相关资料,我们初步考虑左肩胛骨骨肿瘤,尤其是骨巨细胞瘤可能性大。

患者左肩胛骨病变诊断明确,有手术指征;术前检查未发现绝对手术禁忌证。手术流程:在全麻下行病灶刮除、植骨、内固定术。术中探查见:左肩胛盂内侧肩胛冈下可见一直径约6.0 cm类圆形骨质破坏区,病灶边界清楚,肩胛盂及周围软组织未受侵及;刮除物呈灰红色碎骨状,血供欠丰富。术中取自体髂骨1块进行肩胛骨重建及内固定。

2 结果

病理诊断:组织学检查显示形态单一的梭形细胞呈束状编织状排列,未见明显核分裂相(图4),免疫组化:SMA(+),S-100(-),Des(-),Actin(-),CD34(-),Myo-D1(+),Ki-67(<5%);左肩胛骨平滑肌瘤。复查左肩正位片显示:左肩胛骨骨质缺损区有一骨块支撑,内固定在位(图5)。术后随访2年无复发征象及疼痛症状出现,肩关节活动无碍。



图1 肩胛骨平滑肌瘤患者全身骨显像表现
图2 肩胛骨平滑肌瘤患者左肩正位X线片表现
图3 肩胛骨平滑肌瘤患者CT表现

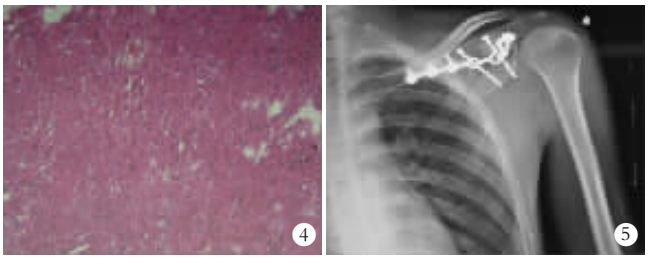


图4 肩胛骨平滑肌瘤病灶组织学观察 (HE ×200)
图5 肩胛骨平滑肌瘤患者术后复查左肩正位X线片表现

3 讨论

骨平滑肌瘤是指发生于骨的具有平滑肌分化的良性梭形细胞肿瘤。男女发病率基本相同。肿瘤好发部位以面部骨骼最常见,大多为下颌骨,其他部位以胫骨多见。临床症状以局部疼痛为主要表现。瘤体质韧呈灰白色,大部分病变最大直径

(下转438页)

[通信作者] 陈贤明,电话:(023)68757930,E-mail:chenxianming2006@163.com