文章编号:1000-5404(2011)10-1003-05

论著

骨关节炎软骨下骨的成骨细胞生物学表型研究

张立智,张先龙,王 琦,陈云苏,沈 灏,邵俊杰,蒋 垚 (200233 上海,上海交通大学附属第六人民医院骨科)

【摘要】 **目的** 培养骨关节炎患者软骨下骨成骨细胞,探讨硬化区和非硬化区软骨下骨成骨细胞的生物学特性。**方法** 收集本科2009年10月至2010年3月拟行全膝关节置换入院的骨关节炎患者7例,男性5例,女性2例,平均年龄68(55~79)岁,留取术后遗弃的胫骨平台骨组织。应用Ⅰ型胶原酶消化联合贴壁培养方法,培养软骨下骨的成骨细胞,光镜下观察细胞形态,免疫组化检测Ⅰ型胶原,NBT/BCIP染色法检测碱性磷酸酶,茜素红染色检测矿化结节,油红O染色检测脂质成分。应用实时定量RT-PCR技术检测并比较硬化区和非硬化区软骨下骨成骨细胞相关基因[碱性磷酸酶(ALP),骨钙蛋白(OCN),转化生长因子β1(TGF-β1),胰岛素样生长因子1(IGF-1),Ⅰ型胶原(COL1)A1/(COL1)A2,基质金属蛋白酶13(MMP-13),骨桥蛋白(OPN),肿瘤坏死因子(TNF-α),白介素(IL)-6和IL-8]的表达。应用茜素红染色比较两种细胞矿化能力。**结果** 光镜下观察到细胞渐从骨片中爬出的生长过程,免疫组化证实细胞表达Ⅰ型胶原,NBT/BCIP染色显示细胞表达碱性磷酸酶,茜素红染色显示细胞能形成矿化结节,油红O染色显示细胞内无脂质成分,证实Ⅰ型胶原酶消化联合贴壁培养方法能较好的培养出成骨细胞。茜素红染色显示软骨下骨硬化区成骨细胞矿化能力低于非硬化区[(0.92±0.06),(1.32±0.15),$P<0.01$]。RT-PCR显示,硬化区软骨下骨成骨细胞比非硬化区软骨下骨成骨细胞高表达基因OPN[$(2.62\pm1.47)\times10^{-2}$,$(9.63\pm3.37)\times10^{-4}$,$P<0.05$]、OCN[$(6.04\pm6.27)\times10^{-6}$,$(4.84\pm2.18)\times10^{-6}$,$P<0.05$]、ALP[$(73.62\pm15.75)\times10^{-4}$,$(3.10\pm0.33)\times10^{-4}$,$P<0.01$]、IGF-1[$(14.84\pm1.23)\times10^{-4}$,$(6.33\pm2.80)\times10^{-4}$,$P<0.01$]、IL-6[$(8.24\pm1.05)\times10^{-4}$,$(2.64\pm0.37)\times10^{-4}$,$P<0.01$]、IL-8[$(14.68\pm6.97)\times10^{-6}$,$(2.60\pm0.89)\times10^{-6}$,$P<0.01$]、MMP-13[$(1.50\pm0.11)\times10^{-3}$,$(1.23\pm0.10)\times10^{-3}$,$P<0.05$]、TGF-β1[$(4.41\pm0.42)\times10^{-3}$,$(2.96\pm0.36)\times10^{-3}$,$P<0.01$]、COL1A1[$(55.44\pm21.61)\times10^{-2}$,$(9.17\pm3.30)\times10^{-2}$,$P<0.01$];而TNF-α[$(5.62\pm2.03)\times10^{-6}$,$(5.62\pm3.146)\times10^{-6}$]和COL1A2[0.64±0.07,0.46±0.12]表达水平没有明显差异($P>0.05$)。**结论** 硬化区软骨下骨成骨细胞的生物学表型变化是骨关节炎患者病变的重要特征之一。

【关键词】 骨关节炎;软骨下骨;成骨细胞;基因
【中图法分类号】 R684.3;R329.24;R394.2 【文献标志码】 A

Study on biological characteristics of subchondral bone osteoblasts in osteoarthritis patients

Zhang Lizhi, Zhang Xianlong, Wang Qi, Chen Yunsu, Shen Hao, Shao Junjie, Jiang Yao (Department of Orthopedic Surgery, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai JiaoTong University, Shanghai, 200233, China)

【**Abstract**】 **Objective** To culture subchondral bone osteoblasts and to study the biological characteristic differences between the osteoblasts in sclerotic area and non-sclerotic area in osteoarthritis (OA) patients. **Methods** We collected the bone tissue of tibial plateaus resected from 7 OA patients (5 men and 2 women), with an average age of 68 years (55 – 79), who received total knee replacement between October 2009 and March 2010 in our hospital. Subchondral bone osteoblasts were obtained from the sclerotic area and non-sclerotic area of the tibial plateaus through type-Ⅰ collagenase digestion and adherent culture. The appearances of the osteoblasts were observed under a light microscope. Immunohistochemistry, NBT/BCIP staining, alizarin red staining, and oil red O staining were performed on the osteoblasts to detect type-I collagen (COL1), alkaline phosphate (ALP), mineralized nodules, and fat, respectively. Real-time RT-PCR was performed to evaluate the mRNA expression levels of ALP, osteocalcin (OCN), transforming growth factor-β1 (TGF-β1), insulin-like growth factor-1 (IGF-1), COL1A1, COL1A2, matrix metalloproteinase-13 (MMP-13), osteopontin (OPN), tumor necrosis factor-α (TNF-α), IL-6, and IL-8 of the osteoblasts in the sclerotic area and non-scle-

【基金项目】 国家自然科学基金(30772182)
【通信作者】 蒋 垚,E-mail:jiangyao2005@163.com

rotic area. Alizarin red staining was performed to compare the mineralization degrees of the osteoblasts in the sclerotic area and non-sclerotic area. **Results** The growth of subchondral bone osteoblasts could be observed under the light microscope. COL1, ALP, and mineralized nodules were detected in the osteoblasts, while no fat granules were found. The alizarin red staining showed that the subchondral bone osteoblasts in the sclerotic area had a lower mineralization degree than those in the non-sclerotic area [(0.92 ± 0.06), (1.32 ± 0.15), $P < 0.01$]. Compared with those in the non-sclerotic area, the osteoblasts in the sclerotic area had significantly higher mRNA expression levels of OPN [$(2.62 \pm 1.47) \times 10^{-2}$, $(9.63 \pm 3.37) \times 10^{-4}$, ($P < 0.05$)], OCN [$(6.04 \pm 6.27) \times 10^{-6}$, $(4.84 \pm 2.18) \times 10^{-6}$, $P < 0.05$], ALP [$(73.62 \pm 15.75) \times 10^{-4}$, $(3.10 \pm 0.33) \times 10^{-4}$, $P < 0.01$], IGF-1 [$(14.84 \pm 1.23) \times 10^{-4}$, $(6.33 \pm 2.80) \times 10^{-4}$, $P < 0.01$], IL-6 [$(8.24 \pm 1.05) \times 10^{-4}$, $(2.64 \pm 0.37) \times 10^{-4}$, $P < 0.01$], IL-8 [$(14.68 \pm 6.97) \times 10^{-6}$, $(2.60 \pm 0.89) \times 10^{-6}$, $P < 0.01$], MMP-13 [$(1.50 \pm 0.11) \times 10^{-3}$, $(1.23 \pm 0.10) \times 10^{-3}$, $P < 0.05$], TGFβ1 [$(4.41 \pm 0.42) \times 10^{-3}$, $(2.96 \pm 0.36) \times 10^{-3}$, $P < 0.01$], and COL1A1 [$(55.44 \pm 21.61) \times 10^{-2}$, $(9.17 \pm 3.30) \times 10^{-2}$, $P < 0.01$], while no significant differences ($P > 0.05$) were found in terms of the mRNA expression levels of TNF-α [$(5.62 \pm 2.03) \times 10^{-6}$, $(5.62 \pm 3.146) \times 10^{-6}$] and COL1A2 [$0.64 \pm 0.07$, 0.46 ± 0.12]. **Conclusion** Type-I collagenase digestion in conjugation with adherent culture is an effective means of culturing subchondral bone osteoblasts. The biological characteristic changes of the subchondral bone osteoblasts in sclerotic area are important pathological characteristics of OA patients. A further research on these changes and their causes will provide a great help for the research and therapy of OA.

[Key words] osteoarthritis; subchondral bone; osteoblast; gene

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30772182). Corresponding author: Jiang Yao, E-mail: jiangyao2005@163.com

骨关节炎的发病率逐年增加,是引起慢性残疾的首要因素之一,导致了沉重的社会负担[1]。目前骨关节炎的治疗虽然可以改善症状但不能完全延缓疾病的进展。因此需要进一步研究骨性关节炎的病变特征和机制,寻求更有效的早期诊断及治疗方式。骨关节炎的病因仍不十分清楚。目前认为创伤、肥胖、超负载等导致的生物应力的增加,以及关节周围组织,如滑膜、肌腱、肌肉病变等许多因素都与骨关节炎的发病有关[2]。在这些复杂的生物应力和异常的生物学作用下,患者最终出现进行性关节软骨退变、软骨下骨硬化为特征的典型病理表现。值得注意的是,除了软骨的病变,软骨下骨的重塑是骨关节炎病理过程中一个非常重要的特点[3]。首先关节软骨结构的完整和功能的正常依赖于正常的软骨下骨的转换。骨关节炎病变时,软骨下骨的重塑不仅改变了软骨下骨的应力特性,使其不再是一个有效的减震器,而且能释放因子通过生物学交流影响软骨细胞的代谢[4-5]。另外还有研究者提出软骨下骨重塑可先于软骨的退变,导致骨关节炎的病变[6]。本实验探索培养骨关节炎患者软骨下骨成骨细胞的方法,分离培养骨关节炎患者硬化区和非硬化区的成骨细胞后,进一步分析它们的生物学表型。

1 材料与方法

1.1 试剂

DMEM和DMEM/F12培养液、胎牛血清(FBS)、胰酶购自Gibicol公司,总RNA抽提试剂Trizol、RT-PCR引物购自Invitrogen公司,Ⅰ型胶原酶、茜素红、碱性磷酸酶染色试剂盒、油红O、维生素C、1,25二羟基维生素D3等购自美国Sigma公司。逆转录试剂盒PrimeScript® RT reagent Kit和实时定量试剂盒SYBR® Premix Ex Taq™ Ⅱ购自TaKaRa公司。Ⅰ型胶原抗体购自博士德公司。苏木精购自Regal Biotechnology公司。丙酮、二甲苯、酒精、磷酸二乙酯(DEPC)、RNA酶抑制剂、琼脂糖等购自华美公司。

1.2 组织来源

收集本科2009年10月至2010年3月拟行全膝关节置换入院的骨关节炎患者7例,5例男性,2例女性,平均年龄68(55~79)岁。在征得患者同意后,留取术后遗弃的胫骨平台骨组织。显微镜辅助下认真检查骨小梁和关节软骨后,区分硬化区和非硬化区的软骨下骨:硬化区软骨下骨厚度大于2 mm,软骨下骨裸露或覆盖薄层纤维软骨;非硬化区软骨下骨骨板厚度最大1 mm,覆盖完整的关节软骨。

1.3 成骨细胞分离与培养

仔细解剖骨关节炎的软骨下骨,首先从胫骨平台去除软骨组织,从内侧胫骨平台的软骨下骨板分离骨小梁组织,用128 U/ml庆大霉素浸泡冲洗骨块3次,用眼科手术剪将骨块剪碎成小片,无血清培养基洗3遍,洗净骨髓,以含1 mg/ml Ⅰ型胶原酶的DMEM/F12培养基覆盖骨块,37 ℃消化20 min,吸弃上清及消化掉的细胞,再次加入上述Ⅰ型胶原酶培养基重复消化20、240 min共3次,无血清培养基冲洗3遍,消化后的骨片以含20%的胎牛血清的DMEM/F12培养基,置于37 ℃、5% CO_2和饱和湿度的培养箱中培养,每2天更换培养液,当细胞爬出骨片到培养皿,更换为含有10%的胎牛血清的培养液培养4~6

周,当细胞生长融合状态时,用 0.25% 胰蛋白酶-0.02% EDTA 消化,用 20 μm 的细胞筛过滤去除骨片后,以含 10^{-8} mol/L 1,25二羟基维生素 D3,50 μg/ml 维生素 C,20 μg/ml 的脯氨酸,10% 的胎牛血清的 DMEM 培养基培养,细胞传代培养,进行下一步鉴定和试验,矿化诱导试验时加入 5 mmol/L β-磷酸甘油,培养 1 周。

1.4 免疫组化

细胞爬片 PBS 冲洗 3 次,多聚甲醛固定,每片加 50 μl 过氧化酶阻断溶液,室温下孵育 10 min,PBS 冲洗 3 次,加入 50 μl 正常非免疫动物血清,室温下孵育 10 min。除去血清,加的第一抗体,4 ℃过夜,PBS 冲洗 3 次,加入链霉菌抗生素-过氧化物酶溶液,孵育 10 min,PBS 冲洗 3 次,加入 100 μl 新鲜配制的 DAB 和 AEC 溶液,显微镜下观察 3 ~ 10 min,自来水冲洗,苏木精复染,自来水冲洗返蓝。梯度酒精脱水干燥,二甲苯透明,中性树胶封固。

1.5 茜素红染色

6 孔板培养的单层细胞,细胞数量 $3 \times 10^4/cm^2$,PBS 洗 3 次,4% 多聚甲醛固定 15 min,双蒸水洗 3 次,添加 1 ml 40 mmol/L 茜素红/孔(pH 4.1),室温下 20 min 轻轻振动,抽吸未结合的染料,4 ml 双蒸水冲洗 3 次,振荡 5 min,倾斜去除过多的水 2 min,于显微镜下观察染色情况后,-20 ℃冻存。染色的量化采用文献[7]方法,800 μl 10% 的醋酸添加到每孔,室温下振荡孵育 30 min,细胞刮子刮离培养皿,以 10% 醋酸转移到 1.5 ml 的微量离心管,离心 30 s,500 μl 的矿物油覆盖泥浆,加热到 85 ℃ 10 min,冰浴 5 min,泥浆 2 000 × g 离心 15 min,500 μl 悬浮物转移到一个新的 1.5 ml 的离心管,200 μl,10% 的氨水中和酸,pH 4.1 ~ 4.5,取 150 μl,405 nm,96 孔板检测 3 次。

1.6 碱性磷酸酶染色

细胞爬片 PBS 冲洗 3 次,2.4% 多聚甲醛固定 5 ~ 10 min,PBST 冲洗 3 次,爬片置湿盒内,碱性磷酸酶染液 37 ℃孵育 30 min,PBS 冲洗 3 次,显微镜观察,照相。

1.7 油红 O 染色[8]

去除培养基,用 PBS 洗涤 1 遍,10% 中性甲醛固定,用 60% ~80% 异丙醇稍洗,0.3% 油红 O 染色 15 ~ 30 min,入异丙醇洗,用苏木精淡染细胞核 2 min,水洗至细胞核蓝化,显微镜观察,照相。

1.8 RT-PCR 检测细胞中相关基因的 mRNA 的表达

细胞加 Trizol 裂解,抽提总 RNA,随机引物法将 RNA 逆转录成 cDNA。将总 RNA 作适当稀释后,分光光度计测 $D(260)/D(280)$ 值(1.7 ~ 2.0 为合格),并定量。定量公式:RNA 浓度(μg/ml) = $D(260) \times 40 \times$ 稀释倍数。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,使用相同剂量的 RNA(2 μg)经 M-MLV 逆转录酶系统合成 cDNA 第 1 链,反应总体积 20 μl,随后各取逆转录产物 1 μl cDNA 用 20 μl 反应体系进行 PCR 扩增,引物信息见表 1。反应条件:95 ℃预变性 30 s;60 ℃变性 30 s,72 ℃退火 1 min,40 个循环;熔解曲线分析:95 ℃ 0 s→65 ℃ 30 s→95 ℃ 0 s。基线 3 ~ 12 个循环,同一基因,不同标本,基因表达量差异通过(靶基因 Ct 值和内参基因 Ct 值差异)△Ct 来计算,基因的相对表达量通过 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 来计算。

表 1 定量 RT-PCR 引物信息

引物名称	引物序列	扩增片段
TNF-α	上游 5′- CGAGTCTGGGCAGGTCTA-3′	196 bp
	下游 5′-GTGGTGGTCTTGTTGCTTAA-3′	
TGF-β1	上游 5′-CGAGCCTGAGGCCGACTA-3′	70 bp
	下游 5′-AGATTTCGTTGTGGGTTTCCA-3′	
MMP-13	上游 5′-ACCTCCAGTTTGCAGAGC-3′	146 bp
	下游 5′-CAAGTTTGCCAGTCACCT-3′	
IL-8	上游 5′- ATGGGTTTGCTAGAATGT-3′	218 bp
	下游 5′-GTGAGGTAAGATGGTGGC-3′	
IL-6	上游 5′-GGAGACTTGCCTGGTGAA-3′	195 bp
	下游 5′-GCATTTGTGGTTGGGTCA-3′	
OCN	上游 5′-CAAAGGTGCAGCCTTTGTGTC-3′	149 bp
	下游 5′-TCACAGTCCGGATTGAGCTCA-3′	
ALP	上游 5′-ACGTGGCTAAGAATGTCATC-3′	475 bp
	下游 5′-CTGGTAGGCGATGTCCTTA-3′	
OPN	上游 5′-TCACCTGTGCCATACCAGTTAA-3′	111 bp
	下游 5′-TGAGATGGGTCAGGGTTTAGC-3′	
IGF-1	上游 5′-GACCTTCCACAATCCTTAGA-3′	238 bp
	下游 5′-GTGTTTAGCAGCGGGTA-3′	
COL1A1	上游 5′- AGTTCGAGTATGGCGG-3′	231 bp
	下游 5′-CAGTGACGCTGTAGGT-3′	
COL1A2	上游 5′- GCCAACTATGCCTCTCAG-3′	277 bp
	下游 5′-CACCACCGATGTCCAA -3′	
GAPDH	上游 5′- TTGGTATCGTGGAAGGACTCA-3′	190 bp
	下游 5′- TGTCATCATATTTGGCAGGTTT-3′	

1.9 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件进行各组均数之间比较方差分析及两两比较 t 检验。

2 结果

2.1 软骨下骨成骨细胞的培养及鉴定

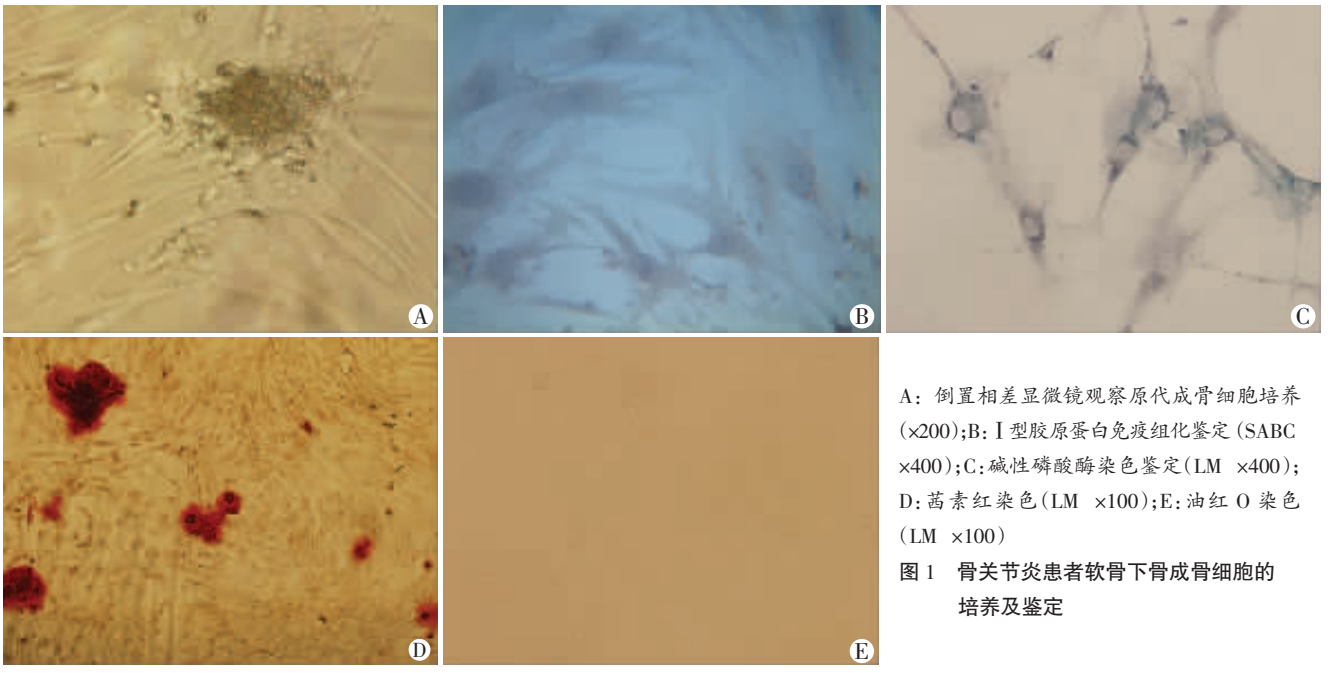
选取的骨关节炎患者软骨下骨标本,应用Ⅰ型胶原酶消化和贴壁培养方法,培养 3 周后,细胞贴附于培养瓶底,爬出骨片,细胞形态多样,呈梭形、三角形、立方形、多角形等(图 1A);6 周后,细胞可生长至融合状态。原代培养的细胞Ⅰ型胶原蛋白免疫组化染色阳性,细胞质内可见棕色颗粒状Ⅰ型胶原蛋白表达(图 1B);碱性磷酸酶染色阳性,细胞质内可见蓝色碱性磷酸酶颗粒(图 1C);茜素红染色阳性,细胞能形成鲜红色的钙化结节(图 1D);而油红 O 染色阴性,细胞质内无橘红色脂肪颗粒(图 1E)。原代培养出的细胞具有良好的成骨细胞的生物学特征,证实培养出的细胞是成骨细胞。

2.2 茜素红染色

硬化区和非硬化区软骨下骨成骨细胞均能形成矿化结节,经 β-磷酸甘油诱导 1 周,非硬化区成骨细胞矿化能力明显增强,且高于硬化区软骨下骨成骨细胞矿化程度;通过对茜素红染料进行定量,非硬化区软骨下成骨细胞吸光值(1.32 ± 0.15)明显强于硬化区(0.92 ± 0.06,$P < 0.01$)。

2.3 RT-PCR 检测硬化区和非硬化区成骨细胞 mRNA 水平基因表达差异

2.3.1 成骨细胞分化相关基因表达差异 骨钙蛋白(OCN)和骨桥蛋白(OPN)的表达量非硬化区低于硬化区,碱性磷酸酶(ALP)和胰岛素样生长因子 1 (IGF-1)的表达量非硬化区明显低于硬化区(表 2)。



A：倒置相差显微镜观察原代成骨细胞培养(×200)；B：Ⅰ型胶原蛋白免疫组化鉴定(SABC ×400)；C：碱性磷酸酶染色鉴定(LM ×400)；D：茜素红染色(LM ×100)；E：油红O染色(LM ×100)

图1　骨关节炎患者软骨下骨成骨细胞的培养及鉴定

2.3.2　TGF-β1和Ⅰ型胶原基因表达差异　转化生长因子β1(TGF-β1)和Ⅰ型胶原(COL1)A1的表达量非硬化区明显低于硬化区；COL1A2的表达量非硬化区同硬化区之间无差异；COL1A1/COL1A2非硬化区低于硬化区(表2)。

2.3.3　支持炎性因子基因表达差异　肿瘤坏死因子(TNF-α)的表达量非硬化区同硬化区之间没有差异；白介素-6(IL-6)、IL8的表达量非硬化区明显低于硬化区；基质金属蛋白酶13(MMP-13)的表达量非硬化区低于硬化区(表2)。

表2　定量RT-PCR检测软骨下骨成骨细胞的硬化区和非硬化区基因表达差异

基因	软骨下骨成骨细胞		*P*值
	非硬化区	硬化区	
ALP	$(3.10\pm0.33)\times10^{-4}$	$(73.62\pm15.75)\times10^{-4}$	<0.01
OCN	$(4.84\pm2.18)\times10^{-6}$	$(6.04\pm6.27)\times10^{-6}$	<0.05
OPN	$(9.63\pm3.37)\times10^{-4}$	$(2.62\pm1.47)\times10^{-2}$	<0.05
IGF-1	$(6.33\pm2.80)\times10^{-4}$	$(14.84\pm1.23)\times10^{-4}$	<0.01
TGF-β1	$(2.96\pm0.36)\times10^{-3}$	$(4.41\pm0.42)\times10^{-3}$	<0.01
COL1A1	$(9.17\pm3.30)\times10^{-2}$	$(55.44\pm21.61)\times10^{-2}$	<0.01
COL1A2	0.46±0.12	0.64±0.07	>0.05
COL1A1/COL1A2	0.19±0.02	0.88±0.41	<0.05
TNF-α	$(5.62\pm3.15)\times10^{-6}$	$(5.62\pm2.03)\times10^{-6}$	>0.05
IL-6	$(2.64\pm0.37)\times10^{-4}$	$(8.24\pm1.05)\times10^{-4}$	<0.01
MMP-13	$(1.23\pm0.10)\times10^{-3}$	$(1.50\pm0.11)\times10^{-3}$	<0.05
IL-8	$(2.60\pm0.89)\times10^{-6}$	$(14.68\pm6.97)\times10^{-6}$	<0.01

3　讨论

因为关节软骨的退变和丢失是骨关节炎的特征之一，长期以来骨关节炎研究更多的集中于关节软骨，然而保持完整的关节软骨结构和发挥关节软骨正常的生物学功能都离不开正常的软骨下骨的转换。软骨下骨和软骨解剖位置上紧密相邻，不仅共同和软骨维持关节形态，承受应力；而且软骨下骨可以通过生物学信息交流，对软骨，尤其是软骨深部组织的健康起着重要作用[4]。动物实验研究表明软骨下骨的骨重塑改变可先于软骨病变，进而导致骨关节炎的发生和发展[6]。不能否认软骨下骨硬化，骨重塑是骨关节炎病变过程中另一个重要特点[9]。进一步阐明骨关节炎患者软骨下骨成骨细胞的特性，不仅有利于骨关节炎机制的研究，而且还可能对骨关节炎的治疗提供有意义的指导[10]。本实验通过成骨细胞细胞学鉴定证实，应用Ⅰ型胶原酶消化联合贴壁培养方法，能较好的培养出成骨细胞，并进行相关生物学特性的研究。

研究证实，骨关节炎患者软骨下骨成骨细胞表型发生了改变，许多因子如ALP、OCN、TGF-β1、IGF-1和尿激酶纤维蛋白溶酶原激活因子表达均升高，IGF结合蛋白3，4，5表达降低，纤溶酶原激活物抑制因子1和IL-1表达水平没有明显变化[11-14]。骨关节炎患者软骨下骨在不同的病变部位的表型也发生着不同的变化[15]。我们的研究结果显示TNF-α和COL1A2基因表达两者间没有明显差异。同时，硬化区软骨下骨成骨细胞不仅高表达了成骨细胞相关基因ALP和OPN，促进着成骨细胞的分化与基质形成；而且高表达了支持炎性的细胞因子，如IL-6、IL-8和MMP-13，抑制细胞外基质的形成，促进骨吸收。另外，成骨细胞能表达促进细胞外骨基质形成的相关因子，如TGF-β1和IGF-1，它们在病变局部的聚集可能参与并促进了骨关节炎患者软骨下骨硬化[11]。这些复杂的生物学表型

的变化共同参与了软骨下骨的重塑能力。

本研究发现骨关节炎患者硬化区软骨下成骨细胞存在着不同于以前一些文献报道的正常成骨细胞生物学特性。本实验中硬化区的成骨细胞相对于非硬化区成骨细胞高表达成骨细胞相关基因表型;然而在硬化区和非硬化区成骨细胞数量相同情况下,硬化区成骨细胞矿化程度低于非硬化区成骨细胞。硬化区软骨下骨成骨细胞高表达 TGF-β1[16],这可能导致产生异常的Ⅰ型胶原和异常的 COL1A1/ COL1A2,同时异常的 COL1A1/COL1A2 下产生的类骨基质可能阻碍了骨关节炎成骨细胞的矿化[17]。相关研究也显示骨关节炎患者软骨下骨胶原三聚物的组成朝向 α1 链的同型三聚体转变,弹力降低,另外,赖氨酸羟基化作用提高导致了高交联,进一步扭曲了胶原结构[18]。尽管硬化区软骨下骨成骨细胞在基因水平高表达了 ALP、COL1 和 OPN 等成骨细胞分化相关基因,Ⅰ型胶原成分的异常可能导致了硬化区成骨细胞的相对低的矿化能力。

软骨下骨的骨重塑是在力学因素(包括反复微损伤)和多种生物学因素(包括基因易感因素)相互作用下的复杂调节过程[19-20]。正是这些复杂的调节因素,导致硬化区软骨下骨的成骨细胞和非硬化区的软骨下骨的成骨细胞呈现出不同的生物学表型。由于我们病例研究数量的限制,尚不能完全排除不同的生物学表型的变化可能存在着个体的差异。然而,硬化区和非硬化区软骨下骨成骨细胞的生物学表型不同,提示对软骨下骨研究和治疗的过程中可能需对硬化区和非硬化区不同对待。这一现象仍值得我们进一步深思,硬化区的软骨下骨重塑过程是骨关节炎患者病变的重要特征之一,其异常生物学特征的原因仍需进一步研究和细化。进一步研究骨关节炎患者软骨下骨成骨细胞生物学代谢的变化及其原因,更有效的调节骨关节炎患者软骨下骨的骨重塑,改善软骨下骨硬化,将为骨关节炎的研究和治疗开辟一条崭新而有意义的途径[3,21]。

参考文献:

[1] Henrotin Y, Pesesse L, Sanchez C. Subchondral bone in osteoarthritis physiopathology: state-of-the art and perspectives[J]. Biomed Mater Eng, 2009, 19(4/5): 311-316.

[2] Moe R H, Uhlig T, Kjeken I, *et al*. Multidisciplinary and multifaceted outpatient management of patients with osteoarthritis: protocol for a randomised, controlled trial[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2010, 11: 253.

[3] Karsdal M A, Leeming D J, Dam E B, *et al*. Should subchondral bone turnover be targeted when treating osteoarthritis?[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2008, 16(6): 638-646.

[4] Amin A K, Huntley J S, Simpson A H, *et al*. Chondrocyte survival in articular cartilage: the influence of subchondral bone in a bovine model [J]. J Bone Joint Surg Br, 2009, 91(5): 691-699.

[5] Bailey A J, Mansell J P, Sims T J, *et al*. Biochemical and mechanical properties of subchondral bone in osteoarthritis[J]. Biorheology, 2004, 41(3/4): 349-358.

[6] Blair-Levy J M, Watts C E, Fiorentino N M, *et al*. A type I collagen defect leads to rapidly progressive osteoarthritis in a mouse model[J]. Arthritis Rheum, 2008, 58(4): 1096-1106.

[7] Gregory C A, Gunn W G, Peister A, *et al*. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction[J]. Anal Biochem, 2004, 329(1): 77-84.

[8] 黄宏,朱方强,孙宏振,等. 脂肪来源干细胞体外成骨诱导和成脂诱导分化[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(13): 1219-1222.

[9] Day J S, Van-Der-Linden J C, Bank R A, *et al*. Adaptation of subchondral bone in osteoarthritis[J]. Biorheology, 2004, 41(3/4): 359-368.

[10] Petrtyl M, Danesova J, Lisal J, *et al*. The initial bearing capacities of subchondral bone replacements considerably contributing to chondrogenesis[J]. Acta Bioeng Biomech, 2010, 12(3): 59-65.

[11] Massicotte F, Fernandes J C, Martel-Pelletier J, *et al*. Modulation of insulin-like growth factor 1 levels in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts[J]. Bone, 2006, 38(3): 333-341.

[12] Sanchez-Sabate E, Alvarez L, Gil-Garay E, *et al*. Identification of differentially expressed genes in trabecular bone from the iliac crest of osteoarthritic patients[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2009, 17(8): 1106-1114.

[13] Lin Y Y, Tanaka N, Ohkuma S, *et al*. The mandibular cartilage metabolism is altered by damaged subchondral bone from traumatic impact loading[J]. Ann Biomed Eng, 2009, 37(7): 1358-1367.

[14] Kapoor M, Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, *et al*. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis[J]. Nat Rev Rheumatol, 2011, 7(1): 33-42.

[15] Sanchez C, Deberg M A, Bellahcene A, *et al*. Phenotypic characterization of osteoblasts from the sclerotic zones of osteoarthritic subchondral bone[J]. Arthritis Rheum, 2008, 58(2): 442-455.

[16] Sakao K, Takahashi K A, Arai Y, *et al*. Asporin and transforming growth factor-beta gene expression in osteoblasts from subchondral bone and osteophytes in osteoarthritis[J]. J Orthop Sci, 2009, 14(6): 738-747.

[17] Couchourel D, Aubry I, Delalandre A, *et al*. Altered mineralization of human osteoarthritic osteoblasts is attributable to abnormal type I collagen production[J]. Arthritis Rheum, 2009, 60(5): 1438-1450.

[18] Bailey A J, Sims T J, Knott L. Phenotypic expression of osteoblast collagen in osteoarthritic bone: production of type I homotrimer[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2002, 34(2): 176-182.

[19] Lin Y Y, Tanaka N, Ohkuma S, *et al*. Applying an excessive mechanical stress alters the effect of subchondral osteoblasts on chondrocytes in a co-culture system[J]. Eur J Oral Sci, 2010, 118(2): 151-158.

[20] 李忠,杨柳,戴刚,等. 关节镜下半月板部分切除制备骨关节炎动物模型[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(10): 919-921.

[21] Alcaraz M J, Megias J, Garcia-Arnandis I, *et al*. New molecular targets for the treatment of osteoarthritis[J]. Biochem Pharmacol, 2010, 80(1): 13-21.

(收稿 2010-12-01 修回 2011-02-10)
(编辑 栾 嘉)