DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.18.018
第26卷第18期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 18
1658 2004年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)18-1658-03

透明质酸对体外培养半月板纤维软骨细胞的影响

潘险峰[1],林月秋[2],张正治[1],汤 逊[2],徐永清[2],李主一[2] ([1]第三军医大学高原军事医学系中心实验室,重庆 400038;[2]成都军区昆明总医院骨科,昆明 650032)

提 要:目的 观察体外培养半月板纤维软骨细胞的生长特点及生物学特性,研究中分子量透明质酸(hyaluronic acid, HA)对体外培养半月板纤维软骨细胞的影响。方法 机械分离和胰酶、胶原酶联合消化,将兔半月板纤维软骨细胞进行体外分离培养,动态观察细胞形态变化和生长情况。设立对照,观察中分子量透明质酸HA(分子量2×10^6)对细胞生长增殖的影响,利用同位素标记技术,测定细胞对培养基中^{3}H-TdR、^{3}H-Pro和$Na^{35}SO_4$的摄取量,比较细胞DNA、胶原蛋白和蛋白多糖合成的速度。结果 体外培养的半月板细胞呈多角形、有突起、富含分泌颗粒。当培养基中加入HA后,细胞^{3}H-TdR、^{3}H-Pro和$Na^{35}SO_4$的摄取量不同程度高于对照组,统计学相差显著($P<0.05$)。结论 中分子量透明质酸能促进体外培养半月板纤维软骨细胞增殖和细胞外基质合成。

关键词:透明质酸;半月板;纤维软骨细胞;同位素掺入;体外培养
中图法分类号:R322.72;R329.24;R914.3 文献标识码:A

Effects of hyaluronic acid on meniscal fibrochondrocytes cultured *in vitro*

PAN Xian-feng[1], LIN Yue-qiu[2], ZHANG Zheng-zhi[1], TANG Xun[2], XU Yong-qing[2], LI Zhu-yi[2]([1]Central Laboratory, Third Military University, Chongqing 400038; [2]Department of Orthopaedics, Kunming General Hospital, Chengdu Military Area Command, Kunming 650032, China)

Abstract: **Objective** To observe the growth characteristics and biological properties of meniscal fibrochondrocytes cultured *in vitro* and to study the effects of moderate-molecular-weight hyaluronic acid (HA) on the cultured meniscal fibrochondrocytes. **Methods** The rabbit meniscal fibrochondrocytes were isolated mechanically and digested with trypsin and type Ⅱ collagenase for the culture *in vitro*. The morphological changes and growth characteristics of the cells were observed. A control group was employed. After the hyaluronic acid (molecular weight: 2×10^6) and vehicle were put into the cell culture medium, the cell growth was observed, and the ingestion of ^{3}H-TdR, ^{3}H-Pro, and $Na_2{}^{35}SO_4$ was measured using isotope-labeling technique. The incorporation rates of DNA, collagen, and proteoglycan were compared. **Results** The meniscal cells cultured *in vitro* were multi-angled, had with processes, and contained many secretory granules. After treatment with HA, the incorporation rates of ^{3}H-TdR, ^{3}H-Pro, and $Na_2{}^{35}SO_4$ were higher than those in the control group ($P<0.05$). **Conclusion** Moderate-molecular-weight HA can promote the cell proliferation and the synthesis of extracellular matrix of the meniscal fibrochondrocytes cultured *in vitro*.

Key words: hyaluronic acid; meniscus; fibrocartilage cell; isotope incorporation; culture *in vitro*

半月板损伤后愈合困难,尤其是少血供的游离缘部分,临床多采用切除整个半月板的方法,这往往带来很多后遗症。过去认为半月板纤维软骨细胞为分化终末细胞,损伤后难以自行修复,现在认为半月板纤维软骨细胞,在一定条件下也能分裂增殖。

透明质酸(hyaluronic acid, HA)是近年研究较多的氨基糖类,在促进创伤愈合(wound healing)方面,有其独特作用。已经发现胎儿创伤愈合的速度和质量明显高于成人,其原因之一是胎儿组织富含HA[1],HA能创造一个有利于伤口愈合的细胞微环境。

本实验通过观察中分子量HA对培养半月板纤维软骨细胞的影响,探讨外源性HA对半月板损伤后修复的作用机制。

作者简介:潘险峰(1968-),男,云南省昆明市人,博士,主治医师,主要从事骨与关节损伤方面的研究。电话:(023)68752345

收稿日期:2003-02-03;修回日期:2003-09-11

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1　材料和方法

1.1　材料

1.1.1　动物　　日本大耳白兔 1 只雄性, 体质量 1.5 kg(普通级, 昆明市中心血站, 滇实动证字 9720 号)。

1.1.2　试剂　　DMEM 培养液(Gibco 公司), D-Hanks 液(Gibco 公司), 胎牛血清(FBS, Sigma 公司), 胰蛋白酶, 胶原酶(Sigma 公司), Ⅱ型胶原单克隆抗体(美国 Neo Markers), S-P 试剂盒(晶美公司), 中分子量透明质酸(分子量 2×10^6, Sigma 公司), ^{3}H-TdR, ^{3}H-Pro, $Na_2{}^{35}SO_4$(中国原子能科学研究院同位素研究室)。闪烁液: 5 g 2,5-二苯基恶唑(PPO, Fluka 公司)、0.5 g 1,4-双(5-苯基-2-恶唑)苯 (POPOP, Sigma 公司)和 100 ml 甲苯[2]。

1.1.3　材料和设备　　24 孔细胞培养板(Gibco 公司), CO_2 培养箱(Hereaus), 超净工作台(国产), 倒置显微镜(Olympus), 液体闪烁计数仪(LKB Wallac, Rack beta, 芬兰产)。

1.2　实验方法

按文献[3]的方法, 将兔膝关节半月板纤维软骨细胞进行体外分离、培养、鉴定。原代培养的半月板纤维软骨细胞, 按 2×10^4/ml 的密度, 均匀分传于 3 块 24 孔培养板, 继续培养, 每 3 d 更换一次含 10%胎牛血清(FBS)的培养液。每块培养板随机分成 A、B、C、D 组, 每组 6 孔。

细胞于对数生长期(1 周左右), 作以下处理: ①A 组加入中分子量透明质酸(HA, 分子量 2×10^6) 2 μg/孔, 保持含血清的培养液; ②B 组更换无血清的 DMEM 液, 加入等量 HA; ③C 组更换无血清的 DMEM 液, 不加 HA; ④D 组不加处理因素, 保持含血清培养液继续培养。

继续培养 18 h 后, 分别加入经同位素标记的胸腺嘧啶核苷(^{3}H-TdR)、脯氨酸(^{3}H-Pro)和硫酸钠($Na_2{}^{35}SO_4$), 放射比活度均为 2.31×10^{10}Bq/mmol。第 1 块培养板 A、B、C、D 组培养孔各加入 3.7×10^7Bq 的 ^{3}H-TdR; 第 2 块培养板 A、B、C、D 组培养孔各加入 3.7×10^7Bq 的 ^{3}H-Pro; 第 3 块培养板 A、B、C、D 组培养孔各加入 3.7×10^7Bq 的 $Na_2{}^{35}SO_4$。

标记 6 h 后, 终止培养。取出培养板, 用冷 PBS 液轻轻将每个培养孔冲洗 2 次, 吸去 PBS 液, 分别加入 5%三氯乙酸和乙醇/乙醚(体积比 3∶1)各 1 ml, 用细吸管伸入孔底轻轻吹打沉淀物, 每孔内容物收集于纤维滤膜上。蒸馏水冲去滤膜上未掺入的同位素, 滤纸置于液闪瓶内, 每瓶加入 10 ml 闪烁液, 在液体闪烁计数仪上测量每分钟放射性脉冲量。

1.3　统计学方法

测量结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS 统计软件行方差分析及均数间多重比较。

2　结果

2.1　细胞生长情况

培养的半月板纤维软骨细胞保持单层生长, 铺满瓶底即停止增殖; 培养基中加入中分子量透明质酸, 细胞分裂速度加快, 表现为相同视野内细胞数多于不加 HA 的其它组, 但细胞形态无明显改变; 当更换不含血清的 DMEM 培养液后, 各组细胞增殖速度均明显减慢。

2.2　同位素标记结果

A 组(含血清培养液加 HA)所测得的放射性脉冲均不同程度高于 B 组(无血清培养液加 HA)、C 组(无血清培养液不加 HA)和 D 组(有血清培养液不加 HA), 其中 A 组最高, D 组次之, B 组和 C 组最低, 见表 1~3。

表 1　HA 对纤维软骨细胞^{3}H-TdR、^{3}H-Pro 和 $Na_2{}^{35}SO_4$ 掺入的影响 ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effects of HA on ^{3}H-TdR, ^{3}H-Pro and $Na_2{}^{35}SO_4$ incorporation of fibrochondrocytes ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Treatment	^{3}H-TdR	^{3}H-Pro	$Na_2{}^{35}SO_4$
A	HA+FBS+DMEM	3 381±592.9 *	1 362.3±395.2 *	5 876.3±2 170 **
B	HA+DMEM	1 158±375.1	472.5±232.6	1 355.8±456.7
C	DMEM	1 010.5±221.1	572.0±246.9	1 320.5±495.5
D	FBS+DMEM	2 060.5±801.6	849.8±242.5	3 807.6±1 416.8

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* D

3　讨论

传统观点认为, 细胞间质主要功能是为组织提供物理支持, 为细胞提供稳定、平衡的附着环境。但近年的研究揭示, 细胞间质不仅具有结构功能, 而且是调节细胞生长、增殖、分化和迁移的十分活跃成分[4]。细胞间质成分在细胞行为学、组织发生学以及组织调整等方面的作用, 正逐渐为人们所重视。在细胞间质的各种成分当中, 近年来研究较多, 也较为引人注目的是透明质酸(hyaluronic acid, HA)。

研究表明, HA 除了构成细胞外基质和细胞骨架, 为细胞提供赖以生存发展的微环境以外, 它还能参与细胞运动的调节[5], 促进细胞迁徙和游走; 与细胞表面受体 CD44 作用, 调节细胞外基质的积聚和形成[6,7]; 与活性氧作用, 抑制吞噬细胞的功能[8]。在细胞内, HA 影响细胞核的功能, 参与染色体的重排, 以及参与细胞分裂的其它过程[9]; 与其它间质成分作用, 通过储存和缓慢释放肽类细胞因子[10], 如 EGF、PDGF、bFGF 等, 充当"细胞因子调节储库", 使这些细胞因子更易于与靶细胞结合, 持续而精确地发挥生物学作用[11~13]。HA 在细胞粘附、细胞运动、细胞间信号传导以及储存释放细胞因子等方面的特殊功能, 决定了它对于体外培养细胞生物学行为, 如细胞增殖、基质合成和细胞分化的影响。已有研究表明, HA 能促进体外培养成纤维细胞增殖和胶原合成[14,15]。

细胞有丝分裂的进行是由 DNA 合成速度控制的, 细胞合成 DNA、胶原和糖胺多糖 GAG, 需要胸腺嘧啶核苷酸(TdR)、脯氨酸(Pro)和含硫基团(-S)的参与, 如果预先将同位素标记物 ^{3}H 和 ^{35}S 标记到胸腺嘧啶核

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

苷酸、脯氨酸和含硫基团中，那么，测定细胞中同位素的量，就可以知道上述物质被细胞摄取的量，同样，也就能知道有多少DNA、胶原蛋白和蛋白多糖被合成。所以，^{3}H-TdR，^{3}H-Pro和$Na_2{}^{35}SO_4$掺入量的多少，反映出细胞合成DNA、胶原和GAG的量。在我们的实验中，将半月板纤维软骨细胞培养于含血清的DMEM培养液中，细胞表现出一定的增殖能力。而当在培养基里加入一定量的中分子量透明质酸后，细胞增殖与合成能力明显提高，表现为细胞对合成DNA、胶原蛋白以及蛋白多糖原料的摄取量明显增加。

半月板纤维软骨细胞在含血清的培养基中，表现出一定的增殖能力，当换成不含血清的培养液时，细胞增殖速度明显减慢甚至停滞，说明在有血清的体外环境，体内表现惰性的半月板细胞能够被激活。当血清培养液中加入HA时，细胞在生长及合成胞外基质方面，明显优于对照组。但如果培养液中缺乏血清，HA的这种促进作用就表现不出来。究其原因，可能是因为透明质酸与血清中的物质，如细胞因子、胶原蛋白等相互作用，形成对细胞的“正性”作用。而当培养基中没有血清存在时，HA发挥其生物学作用的前提条件没有了，它既不能与细胞因子相互作用，也不能同纤维蛋白结合，构成分子网络，细胞的信号传导和运动就会受到一定的削弱。从这一结果，我们不难理解为什么临床上不同部位半月板损伤后，其预后结果不同。在富含HA的关节滑液腔内，受损的半月板内侧缘无血供区，由于缺乏血清的关系，其营养和修复能力非常有限；而半月板外侧缘损伤后能很快自行愈合，可能由于滑液HA与血清物质能够协同作用，从而促进半月板软骨修复。

参考文献：

[1] Longaker M T, Chiu E S, Adzick N S, *et al*. Studies in fetal wound healing. V. A prolonged presence of hyaluronic acid characterizes fetal wound fluid[J]. Ann Surg, 1991, 213(4): 292-296.

[2] 赵惠扬. 核医学[M]. 上海：上海科学技术出版社，1981.53-64.

[3] 潘险峰，林月秋，汤 逊，等. 兔半月板纤维软骨细胞的培养及生物学特性研究[J]. 中国矫形外科杂志，2000，7(10)：978-980.

[4] 付小兵，王德文. 创伤修复基础[M]. 北京：人民军医出版社，1997. 122-123.

[5] Turley E A. Hyaluronan and cell locomotion[J]. Cancer Metastasis Rev, 1992, 11(1): 21-30.

[6] Entwistle J, Hall C L, Turley E A. HA receptors: regulators of signaling to the cytoskeleton[J]. J Cell Biochem, 1996, 61(4): 569-577.

[7] Ishida O, Tanaka Y, Morimoto I, *et al*. Chondrocytes are regulated by cellular adhesion through CD44 and hyaluronic acid pathway[J]. J Bone Miner Res, 1997, 12(10): 1657-1663.

[8] Suzuki Y, Yamaguchi T. Effects of hyaluronic acid on macrophage phagocytosis and active oxygen release[J]. Agents Actions, 1993, 38(1-2): 32-37.

[9] Evanko S P, Wight T N. Intracellular localization of hyaluronan in proliferating cells[J]. J Histochem Cytochem, 1999, 47(10): 1331-1342.

[10] Roy F, De Blois C, Doillon C J. Extracellular matrix analogs as carriers for growth factors: *in vitro* fibroblast behavior[J]. J Biomed Mater Res, 1993, 27(3): 389-397.

[11] Radomsky M L, Thompson A Y, Spiro R C, *et al*. Potential role of fibroblast growth factor in enhancement of fracture healing[J]. Clin Orthop, 1998 (355 Suppl): S283-293.

[12] Relou I A, Damen C A, van der Schaft D W, *et al*. Effect of culture conditions on endothelial cell growth and responsiveness[J]. Tissue Cell, 1998, 30(5): 525-530.

[13] Maurer A M, Han Z C, Dhermy D, *et al*. Glycosaminoglycans enhance human leukemic cell growth *in vitro*[J]. Leuk Res, 1994, 18(11): 837-842.

[14] Yoneda M, Shimizu S, Nishi Y, *et al*. Hyaluronic acid-dependent change in the extracellular matrix of mouse dermal fibroblasts that is conduccive to cell proliferation[J]. J Cell Sci, 1988, 90(Pt2): 275-286.

[15] 李保玉，肖德刚，刘玉和，等. 透明质酸和肺巨噬细胞培养上清对成纤维细胞的影响[J]. 基础医学与临床，1997，17(5)：75-77.

（编辑 陈聪连）

参考文献类型及标识

根据GB 3469规定，以单字母方式标识以下各种参考文献类型：

参考文献类型	专著	论文集	报纸文章	期刊文章	学位论文	报告	标准	专利
文献类型标识	M	C	N	J	D	R	S	P

对于专著、论文集中的析出文献，其文献类型标识建议采用单字母“A”；对于其他未说明的文献类型，建议采用单字母“Z”。

对于数据库(database)、计算机程序(computer program)及电子公告(electronic bulletin board)等电子文献类型的参考文献，建议以下列双字母作为标识：

电子参考文献类型	数据库	计算机程序	电子公告
电子文献类型标识	DB	CP	EB

本刊编辑部

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net