DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.05.018
第24卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 5
540 2002年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)05-0540-04

生长因子(IGF-Ⅰ、TGF-β_1和BMP-2)对兔关节软骨细胞体外增殖的作用

许建中[1],解志杰[1],杨物鹏[2],兰 旭[3] ([1]第三军医大学附属西南医院骨科,重庆 400038;[2]内蒙古伊盟医院骨科,内蒙古 017000;[3]兰州军区总医院骨科,兰州 730000)

提 要:目的 观察IGF-Ⅰ、TGF-β_1和BMP-2对培养兔关节软骨细胞增殖的作用。方法 采用体外培养兔关节软骨细胞的方法,利用^{3}H-TdR掺入反映软骨细胞增殖。结果 IGF-Ⅰ和TGF-β_1均可促进软骨细胞^{3}H-TdR掺入增加,并有一定的协同作用。而BMP-2对软骨细胞^{3}H-TdR掺入无显著影响,但与TGF-β_1和IGF-Ⅰ合用时却有抑制^{3}H-TdR掺入的作用。结论 生长因子之间的不同组合可以协同或拮抗方式影响软骨细胞的增殖,提示生长因子在关节软骨退变和防治上可能有重要的意义。

关键词:胰岛素样生长因子-Ⅰ;转化生长因子-β_1;骨形态发生蛋白-2;软骨细胞;
中图法分类号:R322.72;R329.28;R392.11 文献标识码:A

Effects of IGF-Ⅰ, TGF-β_1 and BMP-2 on proliferation of rabbit articular chondrocytes *in vitro*

XU Jian-zhong, XIE Zhi-jie, YANG Wu-peng, LAN Xu (Department of orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To observe the effects of IGF-Ⅰ, TGF-β_1 and BMP-2 on the proliferation in cultured rabbit articular chondrocytes. **Methods** Chondrocytes were isolated from rabbit articular cartilage obtained from the animals aged 3 months and studied in primary culture with these growth factors. Proliferation was measured with ^{3}H-thymidine incorporation. **Results** IGF-Ⅰ (10 ng/ml) and TGF-β_1 (10 ng/ml) caused the increases of ^{3}H-TdR uptake, and the two peptides acted in synergism. However, BMP-2 (10 ng/ml) did not cause the uptake increases in ^{3}H-TdR incorporation, and inhibited ^{3}H-TdR uptake when IGF-Ⅰ or TGF-β_1 was added. **Conclusion** Different growth factors have various effects on chondrocyte proliferation. Combination of growth factors might play an important role in the treatment or occurrence of osteoarthritis.

Key words: insulin-like growth factor-Ⅰ; transforming growth factor beta1; bone morphogenetic protein-2; chondrocytes

骨关节炎(Osteoarthritis, OA)是一种严重危害人类健康的慢性进行性骨关节疾病,然而由于软骨组织自身修复能力相当小,加之目前临床上修复软骨缺损的主要方法(自体、异体软骨移植或人工软骨替代物植入等)都不同程度地存在着某些缺陷,所以使软骨组织缺损的完全再生修复成为医学难题之一。近年来,生长因子在关节软骨形成和退变过程中的作用日益受到重视,它们均有促进软骨细胞增殖、分化的能力。本研究采用体外培养兔关节软骨细胞的方法,观察了IGF-Ⅰ、TGF-β_1和BMP-2对兔关节软骨细胞增殖的作用,为防治骨关节炎恢复衰老软骨细胞的功能提供一定的理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

TGF-β_1、IGF-Ⅰ(均购自Sigma公司),BMP-2(军事医学科学院提供),^{3}H-TdR(中国原子能研究所),Ⅰ型胶原羊抗兔抗体(购自北京中山生物技术公司),Ⅱ型胶原羊抗兔抗体(购自美国Oncogene公司)。

作者简介:许建中(1962—),男,辽宁省大连市人,博士,主任医师,教授,主要从事脊柱外科及骨组织工程方面的研究,发表论文32篇。电话:(023)68754164

收稿日期:2002-02-04;修回日期:2002-04-19

1.2 关节软骨细胞分离培养

参照文献[1]进行无菌切取大耳白兔(3月龄,体重1.8~2.0 kg,第三军医大学实验动物中心提供)关节软骨组织经GBSS缓冲液充分冲洗,用解剖刀将软骨小块切成大小较一致1 mm^{3}大小的组织块,经0.05%透明质酸酶3 min、0.2%胰蛋白酶30 min、0.2%Ⅱ型胶原酶60 min依次消化,收集消化液漂洗离心得到细胞团块后,加入培养液制成单细胞悬液(0.4%台盼蓝染色检测所获细胞存活率)。最后把细胞悬液稀释成所需浓度进行原代培养。培养液为DMEM:F_{12}(1∶1)含10%FCS。待到85%融合形成单层时进行传代培养。

1.3 实验分组

对照组(5%FCS),IGF-Ⅰ组,TGF-β_1组,BMP-2组,IGF-Ⅰ+TGF-β_1组,IGF-Ⅰ+BMP-2组,TGF-β_1+BMP-2组。各实验组生长因子浓度均为10 ng/ml(参照以往文献报道)。

1.4 甲苯胺蓝染色

软骨细胞以3.5×10^4/cm^{2}的密度接种于放置有盖玻片的6孔培养板中,5 d后,吸出培养液,PBS漂洗2次,用75%乙醇室温固定30 min,晾干,用中性树胶将盖玻片粘于载玻片上(有细胞的一面朝上),待粘牢后,甲苯胺蓝染色观察。

1.5 Ⅰ、Ⅱ型胶原免疫组织化学染色

采用常规ABC法。阴性对照以PBS代替一抗。

1.6 软骨细胞DNA合成率测定(参照以往文献报道)

软骨细胞以1×10^4/孔接种于96孔培养板。每孔中培养液为200 μl。实验分组同前,每组设6个复孔。培养5 d,在结束

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

培养前 12 h 加入^{3}H-TdR(1 μCi/ 孔), 利用多头细胞自动收集器收集细胞于 49 型玻纤维滤纸上, 液闪计数器测定每分钟脉冲数(CPM 值)。

1.7　统计学方法

计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用本校数学教研室提供的统计程序包SPMR, 进行两样本均数间 t 检验。$P<0.05$ 为差异显著, $P<0.01$ 为差异非常显著。

2　结果

2.1　培养软骨细胞形态学观察

倒置显微镜下, 原代兔关节软骨细胞培养 48 h 后大部分细胞贴壁, 形态由圆盘状逐渐向外伸出突起而转变成多角形, 少数呈梭形。随着细胞数量增加体积增大, 细胞形态趋于一致。培养 7 d 后细胞逐渐融合成单层, 呈"铺路石"样外观, 见图 1。在传代培养过程中软骨细胞形态变化显著, 第 3 代出现大量的长梭形软骨细胞, 至第 5 代时几乎所有细胞都为长梭形呈纤维细胞样外观, 见图 2。



图 1　原代培养兔关节软骨细胞呈多角形, 少数为梭形 (倒置显微镜× 100)

Fig 1　Primary cultured rabbit articular chondrocytes with many in polygonal and few in fusiform (× 100)

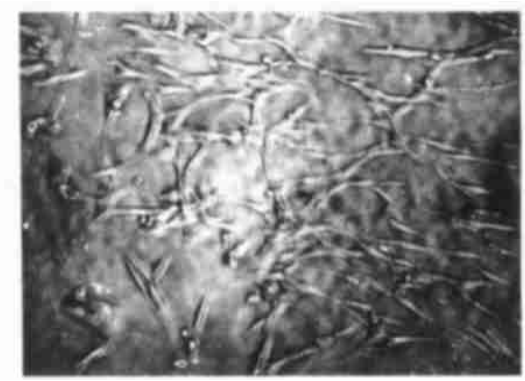


图 2　第 5 代兔关节软骨细胞呈纤维细胞样 (倒置显微镜× 100)

Fig 2　Fibroblastic rabbit articular chondrocytes at passage 5 (× 100)

2.2　甲苯胺蓝染色观察

培养的原代软骨细胞甲苯胺蓝染色, 核呈紫色, 酸性粘多糖呈深蓝色, 大多集中于细胞内, 见图 3。而第 3、5 代软骨细胞浆内的蓝色颗粒随传代而渐减少至消失, 见图 4。

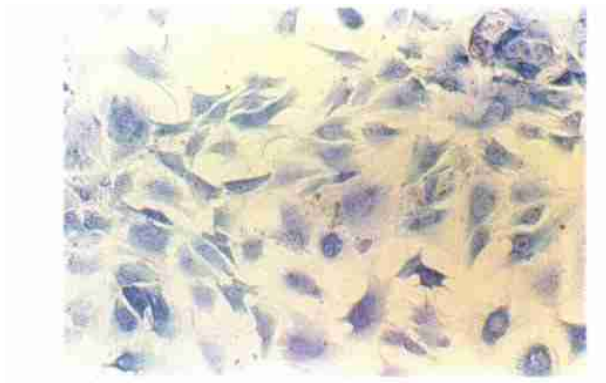


图 3　甲苯胺蓝染色培养的原代软骨细胞, 核呈紫色, 胞浆内有蓝色分泌颗粒 (× 400)

Fig 3　Toluidine blue stained chondrocytes in primary culture with purple nuclei and mazarine granules in the cytoplasm (× 400)

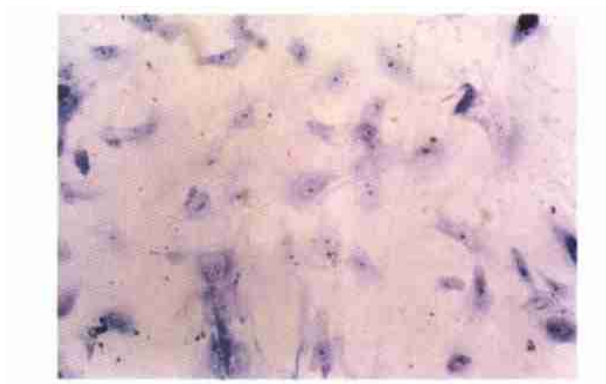


图 4　第 3 代关节软骨细胞胞浆内蓝色颗粒显著减少 (× 400)

Fig 4　Markedly reduced mazarine granules in the cytoplasm of the 3rd passage rabbit articular chondrocytes (× 400)

2.3　Ⅰ、Ⅱ型胶原免疫组织化学染色观察

培养的原代软骨细胞浆内均有不同程度的Ⅱ型胶原阳性表达, 较散在的单个细胞呈弱阳性, 较密集的软骨细胞群周围及胞浆内呈强阳性, 见图 5。而第 3、5 代软骨细胞浆内Ⅰ型胶原表达阳性, 见图 6、Ⅱ型胶原表达阴性。

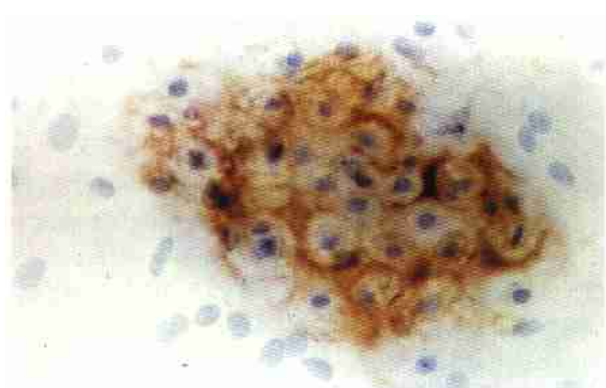


图 5　原代培养兔软骨细胞胞浆内Ⅱ型胶原有不同程度的阳性表达 (ABC× 400)

Fig 5　Collagen Ⅱ expression in primary cultured rabbit articular chondrocytes (ABC× 400)

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

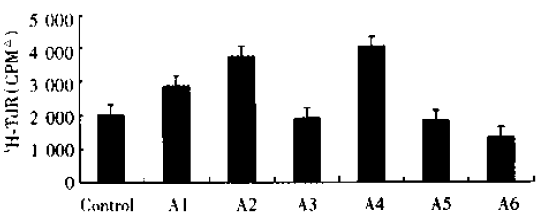


图 6 第 5 代关节软骨细胞胞浆内Ⅰ型胶原阳性表达 (ABC×400)

Fig 6 Collagen Ⅰ expression in P5 cultured rabbit articular chondrocytes (ABC×400)

2.4 IGF-Ⅰ、TGF-β_1 和 BMP-2 对原代培养软骨细胞增殖的影响

通过兔关节软骨细胞原代培养, 利用^{3}H-TdR 掺入来反映 DNA 的合成水平。从图 7 可以看出, IGF-Ⅰ、TGF-β_1 均可引起软骨细胞^{3}H-TdR 掺入增加, 并且 IGF-Ⅰ和 TGF-β_1 对^{3}H-TdR 掺入有一定的协同作用($P<0.05$)。而 BMP-2 对软骨细胞^{3}H-TdR 掺入无显著影响, 但与 TGF-β_1 和 IGF-Ⅰ合用时却有抑制^{3}H-TdR 掺入的作用($P<0.05$)。



△: 1 CPM = 12 Bq; A1~A6: IGF-Ⅰ, TGF-β_1, BMP-2, IGF-Ⅰ + TGF-β_1, IGF-1 + BMP-2 and TGF-β_1 + BMP-2 group respectively

图 7 IGF-Ⅰ、TGF-β_1 和 BMP-2 对培养兔关节软骨细胞增殖的作用

Fig 7 Effects of IGF-Ⅰ, TGF-β_1 and BMP-2 on the proliferation of cultured chondrocytes

3 讨论

近年来, 对关节软骨细胞在体外培养过程中所发生的生物学性状变化逐渐有所了解。据国外文献[2]报道, 软骨细胞在体外培养过程中有两种转归: 一是继续维持表型(Phenotype), 具有分泌Ⅱ型胶原蛋白和硫酸软骨素蛋白多糖(Chondroitin sulfate proteoglycan CSPG)的能力; 二是发生去分化(Dedifferentiation), 细胞不仅形态发生改变, 由多角形、椭圆形逐渐变为梭形, 而且所分泌的胶原蛋白不再是Ⅱ型而成为Ⅰ型, CSPG 的合成能力也随之丧失。

本实验结果表明, 在传代培养过程中软骨细胞形态变化显著, 第 3 代出现大量的长梭形软骨细胞, 至第 5 代时几乎所有细胞都为长梭形呈纤维细胞样外观。甲苯胺蓝染色显示第 3、5 代软骨细胞浆内的酸性粘多糖随传代而渐减少至消失。Ⅰ、Ⅱ型胶原免疫组织化学染色也证实培养的原代软骨细胞浆内均有不同程度的Ⅱ型胶原阳性表达, 而第 3、5 代软骨细胞浆内Ⅰ型胶原表达阳性、Ⅱ型胶原表达阴性, 说明软骨细胞在传代过程中表型逐渐丧失发生了去分化。由于去分化后的细胞生物学性状与原来细胞大相径庭, 因此本实验在使用体外培养的软骨细胞来作实验研究时, 均采用软骨细胞原代培养。

生长因子在关节软骨形成和退变过程中的作用日益受到重视, 主要集中在对 IGF-Ⅰ、TGF-β、bFGF、PDGF-AA 和 BMP 的研究上。它们均有促进软骨细胞增殖、分化的能力。TGF-β 对软骨细胞表现为双相作用, 可能依赖于细胞所处的细胞周期[3,4]。BMP-2 除有维持软骨细胞特异性表型外, 同时也促进了软骨细胞的分化作用[5]。IGF-Ⅰ是调节软骨细胞 PG 合成的最重要生长因子。IGF-Ⅰ可促进软骨基质合成, 增强有丝分裂, 抑制软骨基质的降解[6]。但以往研究多针对单一因子的作用, 对不同因子的复合作用研究较少。本实验结果表明 IGF-Ⅰ、TGF-β_1 均可引起软骨细胞^{3}H-TdR 掺入增加, 并且 IGF-Ⅰ和 TGF-β_1 对^{3}H-TdR 掺入有一定的协同作用。而 BMP-2 对软骨细胞^{3}H-TdR 掺入无显著影响, 但与 TGF-β_1 和 IGF-Ⅰ合用时却有抑制^{3}H-TdR 掺入的作用。这一结果说明生长因子之间的不同组合可以协同或拮抗方式影响软骨细胞的增殖和生长, 并受因子的浓度、细胞微环境及细胞的分化状态等诸多因素的影响, 机体内的软骨细胞正是在多种生长因子、多因素共同作用下调控其增殖, 从而维持关节软骨的正常功能。Yaeger 等[7]研究表明, IGF-Ⅰ和 TGF-β 协同可刺激反分化人关节软骨细胞产生聚合素和Ⅱ型胶原。说明 IGF-Ⅰ和 TGF-β 对衰老的软骨细胞增殖和分化有潜在的作用。对成年软骨细胞, TGF-β、bFGF、IGF-Ⅰ、PDGF-AA 均可引起剂量依赖的^{3}H-TdR 摄入增加, 但 TGF-β 是成年软骨细胞增殖最强有力的刺激剂。效力高于 bFGF、IGF-Ⅰ、PDGF-AA[8]。

尽管近年来对生长因子在关节软骨形成和退变过程中的作用日益受到重视, 并开展了广泛的研究, 但生长因子在促进软骨细胞增殖及维持其正常表型方面受到众多复杂因素的影响, 包括培养条件、培养方式、动物种属及年龄、软骨来源以及细胞分化状态等, 致使得出不一致甚至相反的结果。由于活体内软骨细胞处于多种因子的复合作用下, 阐明这些因子的作用及因子之间的相互影响对了解骨关节炎的发病机制和为治疗骨关节炎提供新的治疗手段有重要的指导作用。

参考文献:

[1] 魏西秦, 曹峻岭, 熊咏民. 兔软骨细胞培养方法研究[J]. 中国地方病学杂志, 1987, 6(2): 89—92.

[2] Gueme P A, Sublet A, Lotz M. Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes: distinct profiles in primary chondrocytes, subcultured chondrocytes, and fibroblasts[J]. J Cell Physiol, 1994, 158(3): 476—484.

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

[3] Trippel S B. Growth facter actions on articular cartilag[J]. J Rheumatol Suppl, 1995, 43(): 129—132.
[4] Nasatzky E, Azran E, Dean D D, *et al*. Parathyroid hormone and transforming growth factor-beta1 coregulate chondrocyte differentiation *in vitro*[J]. Endocrine, 2000, 13(3): 305—313.
[5] Shukunami C, Ohta Y, Sakuda M, *et al*. Sequential progression of the differentiation program by bone morphogenetic protein-2 in chondrogenic cell line ATDC5[J]. Exp Cell Res, 1998, 241(1): 1—11.
[6] Martel Pelletier J, Di Battista J A, Lajeunesse D, *et al*. IGF/IGFBP axis in cartilage and bone in osteoarthritis pathogenesis[J]. Inflamm Res, 1998, 47(3): 90—100.
[7] Yaeger P C, Masi T L, de Ortiz J L, *et al*. Synergistic action of transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor-I induces expression of type II collagen and aggrecan genes in adult human articular chondrocytes[J]. Exp Cell Res, 1997, 237(2): 318—325.
[8] Guerne P A, Blanco, F, Kaelin A, *et al*. Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes in aging and development[J]. Arthritis Rheum, 1995, 38(7): 960—968.

（编辑　王　红）

文章编号：1000-5404(2002)05-0543-01

个案与短篇

嗜铬细胞瘤误诊 1 例分析

One case report on misdiagnosed pheochromocytoma

张艳玲，邵淑琴　　（第三军医大学附属西南医院神经内科，重庆 400038）

患者，女性，35 岁，夜间突感心悸、胸闷、气促，2 h 后至当地县医院就诊。既往体健，查体：血压 0/0 kPa，面色苍白，大汗，检查心电图（结果不详），诊断为“病毒性心肌炎”。给予多巴胺升压及补液、心肌营养剂治疗。患者当天血压好转，但逐渐出现气促和腹胀，2 d 后转至我院。入院时查体：半卧位，体温 36.7 ℃，脉搏 120 次/min，呼吸 26 次/min，血压 12/8 kPa，颈静脉充盈，肝颈静脉回流征（－），双肺呼吸音粗糙，未闻及干湿罗音，心界不大，心音略低，律齐，各瓣膜听诊区未闻及杂音，无水冲脉、枪击音及毛细血管搏动征，腹部膨隆，全腹扣诊呈鼓音，移动性浊音（－），肝脾未扪及，双下肢无水肿。辅助检查：①心电图“窦性心动过速，全导联低电压及 ST 段轻度抬高”。②胸片及心脏超声排除心包积液。③心肌酶谱示 AST、LDH 略增高，CK、CK-MB 正常。④血生化提示低钾（2.9 mmol/L）及高血糖（12 mmol/L）。诊断：“病毒性心肌炎、糖尿病？”。给予甲基强的松龙、心肌营养及补液、支持治疗后，患者血压逐渐增高（在使用硝普钠治疗心衰情况下，血压达到 24～26.7/14.7 kPa 左右），出现气短、气促、双肺底湿罗音；腹胀、肠鸣音减少。通过 B 超发现肝肾区包块，直径约 10 cm，均质，包膜光滑。通过外科手术切除，病理检查证实为嗜铬细胞瘤。术后各种症状消失，血压恢复正常，痊愈出院。

讨论

嗜铬细胞瘤起源于肾上腺髓质、交感神经节或其他部位的嗜铬组织，瘤体持续或间断释放大量儿茶酚胺，引起高血压、代谢紊乱（基础代谢增高，糖、脂、电解质代谢紊乱）及多个器官功能障碍。根据临床症状，结合血尿儿茶酚胺、VMA、131I-MIBG、B 超、CT、MRI 检查，术前确诊率达 95.6%。70% 嗜铬细胞瘤主要表现为阵发性高血压、头痛、心悸、大汗等症状[1]。

由于瘤体病理生理改变及器官反应性差异，嗜铬细胞瘤患者可以出现一些不典型的临床表现：血压：可以表现为持续性高血压，或低血压休克，或高血压和低血压休克交替发生。其机制为：①儿茶酚胺阵发或持续大量释放，导致血压阵发或持续增高；②大量儿茶酚胺使血管强烈收缩致微血管通透性增加→血浆外渗→血压下降；③肿瘤骤然出血坏死，停止释放儿茶酚胺致低血压休克。④肿瘤主要分泌肾上腺素，兴奋肾上腺素能β受体，使周围血管扩张，致低血压。⑤肾上腺素能受体下降调节，导致体位性低血压。心脏：①大量儿茶酚胺引起快速性心动过速；②引起以心肌损害为特征的儿茶酚胺性心脏病[2,3]。非心衰性肺水肿：儿茶酚胺可以直接作用于肺部血管，使肺静脉收缩，毛细血管压增高，血管壁渗透性增强[3]，血浆成分渗出。消化系统：可以出现上消化道出血、腹痛、肠蠕动及肠张力减弱、肠坏死出血和穿孔、胆结石、假性或动力性肠梗阻、腹部肿块[2]；其机制为：①儿茶酚胺使肠蠕动及张力减弱致便秘、肠扩张、假性或动力性肠梗阻；②、胃肠壁内发生增殖性及闭塞性动脉内膜炎，导致肠坏死、出血、穿孔、腹痛；③增加胆结石发病率。其他可以见到的嗜铬细胞瘤临床表现有：体内血液细胞重分布，外周血白细胞增多；基础代谢增高、血糖增高（糖尿病）[2]、血脂消耗增加、低血钾、皮质醇增多症；脑血管意外；膀胱 Pheo 及 Pheo 危象[2]；下肢疼痛及间歇性跛行[3]；嗜铬细胞瘤同时可以伴随肾功能受损，伴发神经系统肿瘤及内分泌肿瘤，进行性视力下降，其机制尚不明确。

本例患者出现的症状有：低血压休克、高血压与低血压交替出现、肺水肿、麻痹性肠梗阻。诊治过程中，对嗜铬细胞瘤特殊症状的不熟悉，对血压波动和麻痹性肠梗阻的忽视，是造成误诊的主要原因。

关键词：嗜铬细胞瘤；误诊
中图法分类号：R736.604　　文献标识码：B

参考文献：

[1] 何　瑶，范华迪，何　健 等. 嗜铬细胞瘤 45 例临床分析[J]. 中国基层医学，1998，5(4)：196—197
[2] 童钟杭. 嗜铬细胞瘤的不典型临床表现[J]. 科技通报，1998，14(2)：124—127.
[3] 鲍镇美. 嗜铬细胞瘤进展及误诊原因分析[J]. 中华泌尿外科杂志，1992，13(3)：230—232.

（编辑　潘式文）

作者简介：张艳玲（1974－），女，河北省石家庄市人，硕士研究生，医师，主要从事脑血管病方面的研究。电话：(023)68752905
收稿日期：2001-04-16；修回日期：2001-09-14

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