DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.12.007
第22卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 12
2000年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2000 

文章编号:1000-5404(2000)12-1139-03

论著

# BMP-2和TGFβ1对培养兔关节软骨细胞代谢的影响

杨物鹏,许建中 (第三军医大学附属西南医院骨科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨骨形态发生蛋白-2(BMP-2)和转化生长因子β1(TGFβ1)对体外培养兔关节软骨细胞代谢的影响,从而了解其在关节软骨损伤修复中的作用。方法 利用荧光光度计,721-型分光光度计,$^{35}S$-$Na_2SO_4$同位素掺入法等测定兔原代及反分化关节软骨细胞羟脯氨酸和蛋白多糖(PG)的变化。结果 BMP-2既能促进反分化关节软骨细胞DNA合成又能增加原代、反分化关节软骨细胞羟脯氨酸的含量和$^{35}S$-$Na_2SO_4$掺入,而TGFβ1显著增加原代软骨细胞羟脯氨酸的合成和$^{35}S$-$Na_2SO_4$掺入。结论 TGFβ1不能阻止关节软骨细胞反分化,而BMP-2能促进软骨细胞的增殖和维持其表型,还可使已丢失软骨表型的反分化软骨细胞有向恢复软骨表型方向分化的可能。

关键词:骨形态发生蛋白-2;细胞分化;细胞反分化;同位素掺入;转化生长因子β1
中图法分类号:R322.71;R329.25 文献标识码:A

# Effects of bone morphogenetic protecin-2 and transforming growth factor β1 on the metabolism of rabbit articular chondrocytes *in vitro*

YANG Wu-peng, XU Jian-zhong (Department of Orthopaedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract:** **Objective** To study the effects of transforming growth factor β1 (TGFβ1) and bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) on the metabolism of articular chondrocytes (AC) for their roles in the injury and repair of articular cartilage. **Methods** Hydroxyproline content and the changes of proteoglycan were detected with flurorimeter, spectrophotometer and $^{35}S$-$Na_2SO_4$ incorporation in primary and dedifferentiated chondrocytes. **Results** BMP-2 promoted the DNA synthesis of dedifferentiated AC and increased the hydroxyproline content and the $^{35}S$-$Na_2SO_4$ incorporation in primary and dedifferentiated AC. TGFβ1 promoted the hydroxyproline content and $^{35}S$-$Na_2SO_4$ incorporation in primary and dedifferentiated chondrocytes. **Conclusion** TGFβ1 can not prevent the dedifferentiation of AC. However, BMP-2 can not only enhance the proliferation and maintain the phenotype of AC, but also convert those dedifferentiated cells to their normal phenotype.

**Key words:** bone morphogenetic protein-2; cell differentiation; cell dedifferentiation; isotope incorporation; transforming growth factor β1

关节软骨主要由相对少的软骨细胞和较大量的软骨基质组成,软骨基质主要为Ⅱ型胶原、蛋白多糖和少量非胶原蛋白构成。软骨基质决定软骨的生物力学特性,而软骨细胞又调控着基质的代谢,软骨胶原的正常表型和含量是关节软骨力学特性的基础,蛋白多糖(Proteoglycan,PG)是关节软骨细胞和软骨基质构建的协调者。关节软骨内存在着由软骨细胞介导的内部调

作者简介:杨物鹏(1967—),男,内蒙古东胜市人,硕士,主治医师,主要从事关节外科及相关组织工程学方面的研究,现在内蒙古伊盟医院骨科,伊盟 017000。电话:(0477)8344948

收稿日期:2000-03-21,修回日期:2000-07-10

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

控系统,在细胞因子和生长因子的调控下精确调节金属蛋白酶和酶抑制剂的含量,诱导细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)各成分的转化[1]。目前国内外主要集中在原代关节软骨细胞体外培养扩增维持其正常表型,而大量扩增时则需要传代培养,且传代培养时软骨细胞形态改变伴随表型渐渐丧失及代谢的变化。TGFβ具有促进细胞增殖,调节细胞分化的同时又有促进其胞外基质的合成作用。BMP-2是TGFβ的超基因家族成员之一,而对软骨细胞的作用与TGFβ不同,BMP也可促进软骨细胞合成PG。本实验就BMP-2、$TGF\beta_1$对软骨细胞体外培养维持其正常表型作初步研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂及仪器设备

BMP-2(军科院),$TGF\beta_1$(Sigma公司),Hoechst 33258(Sigma公司,美国),$^{35}S$-$Na_2SO_4$(Sigma公司,美国),羟脯氨酸(重庆化学试剂公司),DMEM、F12、FCS(Hyclon公司,美国),培养箱、倒置显微镜、培养瓶(板)、721-型分光光度计、荧光色谱仪、超声细胞破碎仪、液闪计数仪。

### 1.2 实验动物细胞分离培养

大耳白兔(第三军医大学实验动物中心提供)2.1~2.3 kg,细胞分离采用酶消化分离法,无菌取兔8个关节面的软骨组织经GBSS缓冲液冲洗剪碎,经0.05%透明质酸酶3 min、0.2%胰蛋白酶25 min,0.2% II型胶原酶45 min消化,收集消化液过滤漂洗离心得到细胞团块,加入培养液缓慢机械吹打制成单细胞悬液(0.4%台盼蓝拒染测细胞存活率),分别以$35\times10^3/cm^2$细胞接种于25 $cm^2$培养瓶和6孔、24孔培养板,在37 ℃ 5% $CO_2$饱和湿度培养箱内培养。待到85%融合形成单层时即参照文献[2]传代获得反分化软骨细胞而培养。

### 1.3 实验分组

1.3.1 PG合成量的测定 实验分为4组,C组(对照组)、B组(BMP-2 3、10、30 ng/ml)、T组($TGF\beta_1$ 3、10、30 ng/ml)、B+T组(BMP-2 3、10、30 ng/ml加$TGF\beta_1$ 10 ng/ml)。每组均为3 well。

1.3.2 羟脯氨酸含量测定 实验分为4组,C组(对照组),B组(BMP-2 10ng/ml),T组($TGF\beta_1$ 10 ng/ml),B+T组(BMP-2 10 ng/ml+$TGF\beta_1$ 10 ng/ml),每组样本为3 well。

### 1.4 实验方法

$^{35}S$-$Na_2SO_4$掺入量为$74\times10^3$ Bq/ml培养液,掺入时间为24 h,按常规方法采用液闪计数进行结果测量。然后收集细胞培养液经盐酸水解采用721-型分光光度计测羟脯氨酸含量(以标准羟脯氨酸含量作直线回归得到回归方程)。

### 1.5 统计学分析

所有数据以$\bar{x}\pm s$表示,进行$t$检验。

## 2 结果

### 2.1 BMP-2、$TGF\beta_1$对原代软骨细胞、反分化软骨细胞形态的影响

原代软骨细胞为多角形,反分化软骨细胞为长梭形,在短期培养时$TGF\beta_1$和BMP-2对原代软骨细胞、反分化软骨细胞形态影响无明显变化。

### 2.2 BMP-2、$TGF\beta_1$对原代软骨细胞、反分化软骨细胞基质羟脯氨酸含量的影响

在原代、反分化软骨细胞培养液中分别加入BMP-2 10 ng/ml、$TGF\beta_1$ 10 ng/ml、BMP-2 10 ng/ml+$TGF\beta_1$ 10 ng/ml,收集其培养液测其中羟脯氨酸的含量(间接反应胶原的合成量),原代软骨细胞比相对应的反分化软骨细胞培养液中羟脯氨酸合成量高($P<0.01$),见图1。而$TGF\beta_1$、BMP-2分别在10 ng/ml时均有促进原代软骨细胞合成羟脯氨酸的作用,且此浓度二者无协同作用,对反分化软骨细胞合成羟脯氨酸也有促进作用,但二者有协同作用($P<0.05$)。而$TGF\beta_1$对软骨细胞在短期培养中促进羟脯氨酸的合成作用随其传代培养而减弱。

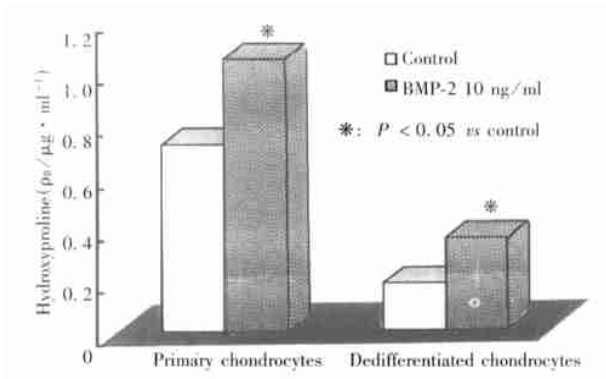



图1 培养液中羟脯氨酸含量

**Fig 1 Hydroxyoroline content in culture medium**

### 2.3 BMP-2、$TGF\beta_1$对原代软骨细胞、反分化软骨细胞基质PG的作用

分别依不同浓度的BMP-2、$TGF\beta_1$干预培养的原代、反分化软骨,观察其$^{35}S$-$Na_2SO_4$的掺入量,BMP-2 30 ng/ml时能促进原代软骨细胞$^{35}S$-$Na_2SO_4$掺入($P<0.05$),而$TGF\beta_1$在10 ng/ml时也促进$^{35}S$-$Na_2SO_4$的掺入($P<0.05$),且在3~10 ng/ml时有量效关系,大于10 ng/ml时随剂量(浓度)增加而掺入却降低。BMP-2和$TGF\beta_1$对原代软骨细胞$^{35}S$-$Na_2SO_4$掺入无协同作用,但BMP-2、$TGF\beta_1$对反分化软骨细胞$^{35}S$-$Na_2SO_4$掺入与对原代软骨细胞不同,$TGF\beta_1$对反分化软骨细胞$^{35}S$-$Na_2SO_4$掺入无显著作用($P>0.05$),而BMP-2在10 ng/ml时明显促进了反分化软骨细胞$^{35}S$-$Na_2SO_4$的掺入($P<0.05$),见图2,同时与$TGF\beta_1$ 10 ng/ml对反分化软骨细胞$^{35}S$-$Na_2SO_4$掺入有协同促进作用,且在一定

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

剂量范围内随剂量的变化而有量效关系($P<0.05$)。

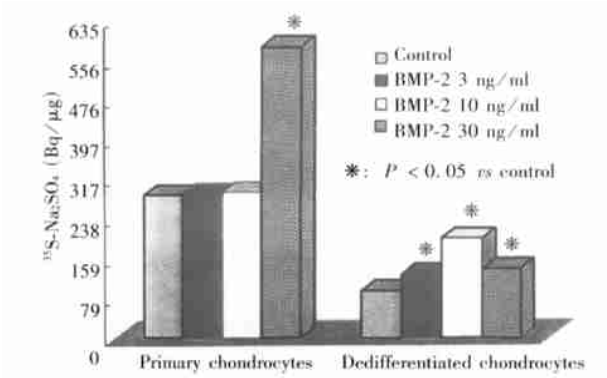



图 2　软骨细胞中$^{35}S$-$Na_2SO_4$ 掺入量

**Fig 2　Incorporation of $^{35}S$-$Na_2SO_4$ in chondrocytes**

## 3　讨论

TGFβ 是一类具有多功能的多肽, 作为一种大分子复合体贮存于骨、软骨基质和血小板等组织中, TGFβ 基因家族包括多种形式的 TGFβ。TGFβ 是多功能生长因子的原型, 对特定靶细胞作用的性质取决于许多参数, 而 BMP-2 是 TGFβ 的超基因家族成员之一, 但其对细胞的作用与 TGFβ 不尽相同。

本实验结果发现 TGFβ1 对软骨细胞的胶原和 PG 合成促进作用的最佳浓度为 10 ng/ml。TGFβ1 对反分化软骨细胞的基质合成作用可能与细胞外基质成分变化有关, 反分化软骨细胞外基质主要为Ⅰ、Ⅲ型胶原和小分子蛋白多糖, 实验证明Ⅱ型胶原能特异的调节 TGFβ 刺激软骨细胞合成Ⅱ型前胶原和蛋白多糖的 mRNA 合成, 同时认为Ⅱ型胶原在 TGFβ 存在条件下对软骨细胞特异性基因表达在一定范围内有剂量依赖性(量效关系)[3], 本实验的结果与此相符。而 BMP-2 在 10 ng/ml 时能促进原代软骨细胞合成羟脯氨酸, 在 30 ng/ml 时促进原代软骨细胞 $^{35}S$-$Na_2SO_4$ 掺入, 而在 10 ng/ml 时促进反分化软骨细胞的 $^{35}S$-$Na_2SO_4$ 掺入, 且对的 $^{35}S$-$Na_2SO_4$ 掺入与 TGFβ1 有协同促进作用, 这可能与细胞分化状态有关[4]。BMP-2 促进软骨细胞由不成熟向成熟方向分化。TGFβ1、BMP-2 对软骨细胞代谢的影响也可能与细胞的形态 ECM 等有关。软骨细胞的形态变化通过 ECM 对细胞骨架的改变来完成, 从而说明 TGFβ1、BMP-2 对原代、反分化软骨细胞基质合成的不同调控作用。其次, 这些结果也可能与 TGFβ1、BMP-2 作用于不同受体而引起生物学效应差异有关, 大多数细胞可以同时表达几种不同类型的 TGFβ、BMP-2 受体, 但每一个细胞的受体数和受体亲和力随其细胞形态骨架等构形的变化而改变。

已有实验证明 TGFβ 能促进体外培养软骨细胞合成Ⅱ型胶原和其它 ECM[4]。Blumenfeld 等[5] 研究表明 TGFβ 不仅能促进体外培养软骨细胞增殖且也增加了 PG 合成, TGFβ 在增加细胞合成蛋白多糖的同时, 还改变了 PG 的糖基模式, 使硫酸软骨素链加长, 磷酸化程度更高, 这些作用使 PG 的更加致密和富有弹性符合软骨的生理特性。本实验结果表明 TGFβ1 对传代软骨细胞的基质合成有促进作用但不能阻止其随传代而合成 ECM 能力减弱。而 BMP-2 对传代软骨细胞的基质合成有显著的促进作用, 可使已丢失软骨表型的反分化软骨细胞有向恢复软骨细胞表型方向分化的可能。

研究表明体外关节软骨培养时 TGFβ1 能增加软骨细胞合成 PG、抑制其降解并维持其软骨基质中 PG 浓度的相对稳定。在细胞和组织培养时, BMP 启动并能促进维持软骨细胞的表型。TGFβ1 能促进 BMP-2 基因转染细胞的增殖能力却抑制该细胞的 ALP 的活性和 OC(Osteocalcin)含量[6]。TGFβ1、BMP-2 对软骨细胞的作用性质与细胞分化状态和剂量等因素有关。

参考文献:

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

[2] Galera P, Redini F, Vivien D, *et al*. Effects of transforming growth factor-β1 on matrix synthesis by monolayer cultures of rabbit articular chondrocytes during the dedifferentiation process[J]. Exp Cell Res, 1992, 200(2): 379—392.

[3] Qi W N, Scully S P. Extracellular collagen modulates the regulation of chondrocytes by the TGF-β[J]. J Orthop Res, 1997, 15(4): 483—490.

[4] Redini F, Galera P, Mauviel A, *et al*. Transforming growth factor-beta stimulates collagen and glycosaminoglycan biosynthesis in cultured rabbit articular chondrocytes[J]. FEBS, 1998, 234(2): 172—175.

[5] Blumenfeld I, Laufer D, Liven E, *et al*. Effects of transforming growth factor-β1 and interleukin-1 alpha on matrix in osteoarthritic cartilage of the temporo-mandibular joint in aged mice[J]. Mech Ageing Dev, 1997, 95(1-2): 101—111.

[6] 司晓辉, 杨连甲, 金　岩. 转化生长因子β对骨形成蛋白-2 基因转染细胞生物学行为的影响[J]. 华西口腔医学杂志, 1999, 17(4): 321—324.

(编辑　薛国文)

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