

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.09.011

周期性静水压对人软骨细胞 IL-1 β 和 MMP-3 代谢的影响 *

肖 春^{1,2} 颜世举¹ 靳 雷¹ 王 鑫¹ 袁秀春¹ 范清宇¹ 马保安^{1 Δ}

(1 第四军医大学唐都医院骨科 陕西 西安 710038; 2 第二炮兵总医院 北京 100088)

摘要 目的:以正常成人软骨细胞及 OA 软骨细胞为研究对象,探讨在静水压作用下正常软骨细胞 IL-1 β 和 MMP-3 代谢的变化,以及与 OA 软骨细胞之间的差异。同时观察在力学信号刺激下软骨细胞的 IL-1 β 和 MMP-3 代谢有无相关性。**方法:**将体外培养的正常成人膝关节软骨第 3 代软骨细胞随机分为加压组和对照组。甲苯胺蓝及 II 型胶原免疫细胞化学染色进行细胞鉴定。将加压组细胞放入高压恒温静水压加压系统,冲入含有 95% 的空气和 5% 的 CO₂ 混合气体,以 10MPa 进行加压 2h,共加压 5d。分别于加压前、加压第 3 天、加压第 5 天后取加压组、对照组和 OA 组细胞培养液检测 IL-1 β 、MMP-3 含量。同时采用 MTT 法分析 3 组细胞的增殖情况。对三组细胞中 IL-1 β 与 MMP-3 的水平做双变量相关分析,采用方差分析对三组标本间的 IL-1 β 、MMP-3 含量进行比较。**结果:**各组细胞 IL-1 β 与 MMP-3 两者间存在正相关关系。OA 组细胞中 IL-1 β 与 MMP-3 含量高于加压组和对照组,加压组高于对照组。加压组、OA 组软骨细胞的生长曲线与对照组相比增殖高峰降低,平台时间缩短。**结论:**10MPa 间歇性静水压加压可抑制软骨细胞增殖,增加 IL-1 β 与 MMP-3 分泌。

关键词:周期性静水压;IL-1 β ;MMP-3

中图分类号:R68,Q813 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)09-1648-04

Effects of Periodic Hydrostatic Pressure on IL-1 β and MMP-3 Metabolism of Human Chondrocytes*

XIAO Chun^{1,2}, YAN Shi-ju¹, JIN Lei¹, WANG Xin¹, QIU Xiu-chun¹, FAN Qing-yu¹, MA Bao-an^{1 Δ}

(1 Department of Orthopedics, Tangdu hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China;

2 Department of cadre wards, The Second Artillery General Hospital, Beijing, 100088, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the changes of IL-1 β and MMP-3 metabolism in normal chondrocytes under hydrostatic pressure, and the difference between OA and loaded chondrocytes, with the normal adult and OA chondrocytes as the object. At the same time, to investigate the correlation between IL-1 and MMP-3 of chondrocytes in the mechanical stimuli. **Methods:** The third generation of the chondrocytes, which come from the knee articular cartilage of adult normal cultured in vitro, were randomly divided into loaded groups and control groups. Toluidine blue staining and type II collagen immunocytochemical staining were applied to identify the chondrocytes. The loaded group was put into the high hydrostatic pressure loading system filled with the mixed gas with 95% air and 5% CO₂, periodically pressurized to 10 MPa pressure, 2h per day for 5days. The cell culture fluid of the loaded group, control group and OA group was used to detect the content of IL-1 and MMP-3 respectively in before compression, 3days and 5 days after compression. MTT assay analyzed the information of chondrocytes cell multiplication in three groups. The bivariate correlation was used to analysis the IL-1 and MMP-3 level. ANOVA was used to compare the IL-1 and MMP-3 content in three groups. **Results:** There was a positive correlation between IL-1 β and MMP-3. The content of IL-1 β and MMP-3 in OA group was higher than that in the loaded and control group, while which in loaded group was higher than that in the control group. Compared with that in the control group, the proliferate peak decreased and the platform time shortened on the growth curve of the loaded and OA group. **Conclusion:** 10MPa intermittent hydrostatic pressure could inhibit the proliferation of chondrocytes, and increase the secretion of MMP-3 and IL-1 β .

Key words: Periodic Hydrostatic; IL-1 β ; MMP-3

Chinese Library Classification(CLC): R68, Q813 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)09-1648-04

前言

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是一种由多因素引发的多发

于老年人的慢性退行性骨关节疾病,多以缓慢进行性的关节软骨破坏为主要病理特征,并且随年龄增长发病率明显增加。OA 的发病机制尚不明确,国内外大量研究表明,关节内多种应压

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81072194)

作者简介:肖春(1985-),男,硕士研究生,主治医师,主要研究方向:骨关节炎发病机制,

E-mail:helloxiaochun@live.cn

Δ 通讯作者:马保安,男,教授,博导,主任医师,E-mail:maban@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2013-11-07 接受日期:2013-11-30)

力与软骨细胞增殖、凋亡和细胞外基质(ECM)分泌的调节密切相关^[1-4]。Trickey 等发现正常软骨细胞与骨性关节炎软骨细胞在生物力学特性上存在差异,软骨细胞受应力作用产生的形变可看成是一种信号来调节其新陈代谢^[5]。在正常软骨中,ECM 的代谢受多因素严格调节,维持合成和降解的动态平衡,而在 OA 中平衡被打破,多种炎性因子如 IL-1、IL-6、TNF- α 等及 NO 参与增加基质金属蛋白酶(MMP)的合成,降低基质金属蛋白酶抑制因子(TIMP)和 ECM 的合成。MMP-3 在 MMP 中具代表性,可起胶原酶作用降解蛋白多糖、基底膜成分、IV 型胶原、层粘连蛋白等,诱发 OA 形成。本研究以正常成人软骨细胞及 OA 软骨细胞为研究对象,探讨在静水压作用下正常软骨细胞 IL-1 β 、MMP-3 代谢的变化,以及与 OA 软骨细胞之间的差异。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验标本来源于第四军医大学唐都医院骨科 6 例截肢患者的手术废弃标本及 3 例 OA 行人工膝关节置换术患者,正常组患者平均年龄 55.67 ± 13.31 岁(32-70 岁),经病理学诊断关节无病变,OA 组患者平均年龄 68 ± 5.57 岁(62-73 岁),均经患者及家属知情同意。各组间年龄差异无统计学意义。

1.2 试剂与仪器

胎牛血清(FBS, PAA, Austria),DMEM/F12 混合培养基(1:1)(Gibco, USA),胰蛋白酶(Gibco, USA),II 型胶原酶(Sigma, USA),甲苯胺蓝(Sigma, USA),鼠抗-人 II 型胶原单克隆抗体(Abcam, UK),DAB 试剂盒(武汉博士德生物试剂公司),四甲基偶氮唑盐(MTT, Sigma, USA),二甲基亚砷(DMSO, Sigma, USA),IL-1 β ELISA 试剂盒(上海西唐生物科技有限公司),MMP-3 ELISA 试剂盒(上海西唐生物科技有限公司),酶标仪(Bio-Rad 680, USA),倒置相差显微镜及照相系统(Olympus, Japan),细胞培养箱(Thermo, USA),高压恒温静水压加压系统。

1.3 软骨细胞培养与鉴定

将软骨组织在无菌条件下剪成 1 mm^3 左右大小,移入 50 mL 离心管,PBS 冲洗。加入 0.25% 胰蛋白酶 10 mL, 37°C 消化 30 min,加入含血清培养液终止消化,1000 r/min 离心 5 min,弃上清。加入 0.2% II 型胶原酶 10 mL, 37°C 振荡消化 8 h,以 150 目、200 目滤网依次过滤、收集消化液,离心,弃上清,加入含 10% 血清 DMEM/F-12 培养液制成细胞悬液,接种于 25 mL 培养瓶内,置于 37°C 、5% CO_2 浓度培养箱内培养。隔天换液 1 次,待细胞 90% 融合后,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。

将第 3 代软骨细胞接种于预制有盖玻片的 6 孔板上培养,3 天后取出,4% 多聚甲醛常温固定 30 min,PBS 冲洗后,1% 甲苯胺蓝染色 30 min,双蒸水冲去多余染液,迅速置于倒置相差显微镜下观察并照相记录。将 4% 多聚甲醛固定后的 3 代软骨细胞加 0.1% Triton $\times$ -100 通透化 15 min,3% H_2O_2 避光处理 15 min,双蒸水冲洗。BSA 封闭 30 min,加鼠抗-人 II 型胶原抗体, 4°C 过夜。PBS 冲洗后加入兔抗-鼠二抗 1 h。滴加 DAB 显色 3 min,双蒸水冲洗,苏木素复染,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。倒置相差显微镜下观察并照相记录。

1.4 软骨细胞加压

本实验采用自行设计的高压恒温静水压加压系统,压力装

置压力最小值 0.05 Mpa,最高值 12.0 Mpa。6 例正常组患者软骨细胞随机分为加压组和对照组,每组各 3 例,取第 3 代软骨细胞,将加压组、OA 组、对照组三组细胞调整细胞浓度为 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 接种至培养皿内,每 1 例患者软骨细胞均接种 3 个培养皿。接种后第 3 天待细胞进入对数生长期换液,换液时各培养皿内均加入 5 mL 培养基,将加压组细胞放入高压恒温静水压加压系统,冲入含有 95% 的空气和 5% 的 CO_2 混合气体,以 10 MPa 进行加压 2 h,共加压 5 d。OA 组和对照组不做处理,加压期间 3 组细胞均不换液。

1.5 IL-1 β 、MMP-3 的检测

3 组 9 例患者细胞接种的 27 个培养皿于分别于加压前、加压第 3 天、加压第 5 天后各取细胞培养液 100 μL ,封盖、编号,IL-1 β 、MMP-3 的检测均采用酶联免疫吸附法(ELISA),方法步骤严格按照试剂盒说明书操作,所得到的浓度以 pg/mL 来表示。每例患者细胞所接种的 3 个培养皿测量结果取平均值。

1.6 用 MTT 法分析三组软骨细胞的增殖情况

将三组细胞按照 $10^4/\text{孔}$ 的密度分别接种于 96 孔板中,加压组单独接种 10 个板,OA 组和对照组细胞各 10 孔,每孔加 200 μL 培养液,接种 10 个板,设 1 排空白调零孔,定期换液,加压组加压方法同上,同培养皿一起进行,接种后第 2 天开始测量,每天测量 1 个板。每孔中加入 5 mg/mL 的 MTT20 μL ,37 $^\circ\text{C}$ 培养 4 h,加入 DMSO150 μL ,室温下将 96 孔板置于微孔板振荡器上震荡 10 min。酶标仪检测 490 nm 波长的各孔 OD 值并记录,共测 10 d。绘制生长曲线。

1.7 统计学处理

实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{X} \pm S$)表示,采用 SPSS 18.0 软件对文中数据进行处理与分析。三组细胞中 IL-1 β 与 MMP-3 的水平做双变量相关分析,采用方差分析对三组标本间的 IL-1 β 、MMP-3 含量进行比较。取 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞培养与鉴定

对软骨细胞进行 II 型胶原免疫组织化学染色可见正常及骨关节炎患者软骨细胞第 2 代软骨细胞呈现圆形或椭圆形,胞浆内出现棕黄色颗粒(图 1),显示 II 型胶原染色为阳性结果。甲苯胺蓝染色可见细胞内蓝紫色异染颗粒,并有少量出现在细胞周围(图 2),表明甲苯胺蓝染色为阳性结果。软骨细胞经传代后染色均变浅,骨关节炎软骨细胞第 5 代后可出现 II 型胶原染色为阴性,细胞甲苯胺蓝染色呈核负染。

三组细胞中 IL-1 β 与 MMP-3 水平作线性相关分析,相关系数为 $r=0.68(P<0.01)$,两者间存在正相关关系。OA 组细胞中 IL-1 β 含量高于加压组和对照组,差异有统计学意义。MMP-3 含量也高于加压组和对照组,差异有统计学意义。加压组 IL-1 β 与 MMP-3 水平平均高于对照组,差异有统计学意义(图 3、4)。

2.2 软骨细胞生长曲线

三组细胞生长曲线均呈“S”型,1-3 d 为平台期,3 d 后开始为指数增长期,8-10 d 增殖趋于平缓并逐渐下降(图 5)。加压组、OA 组软骨细胞的生长曲线与对照组相比增殖高峰降低,平台时间缩短,同时加压组又优于 OA 组结果与 IL-1 β 与 MMP-3 含量检测结果基本一致。

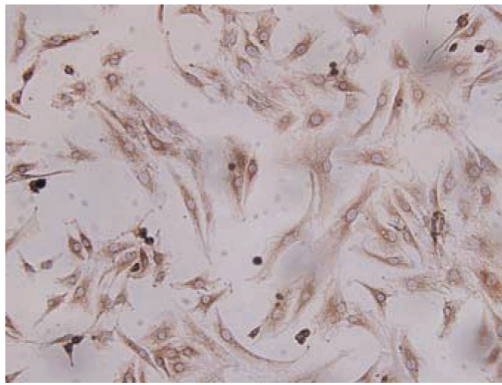
图1 II型胶原免疫细胞化学染色($\times 100$)

Fig.1 Type II collagen immunocytochemical staining

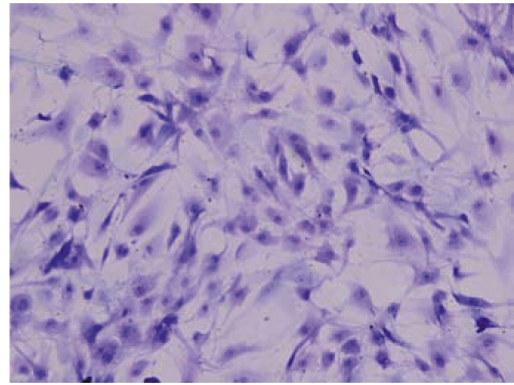
图2 软骨细胞甲苯胺蓝染色图($\times 100$)

Fig.2 Toluidine blue staining of chondrocytes

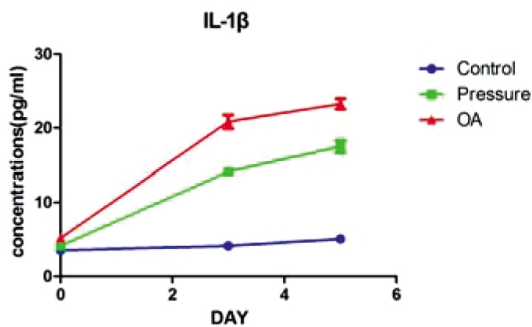
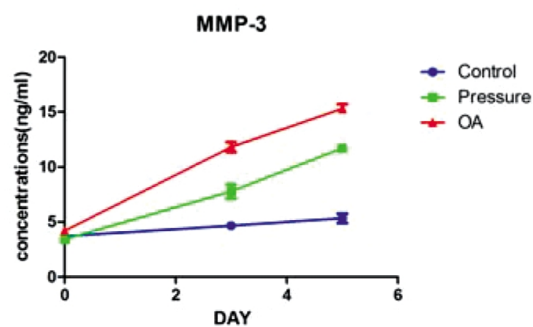
图3 三组细胞 IL-1 β 浓度Fig. 3 Concentrations of IL-1 β in three groups

图4 三组细胞 MMP-3 浓度

Fig.4 Concentrations of MMP-3 in three groups

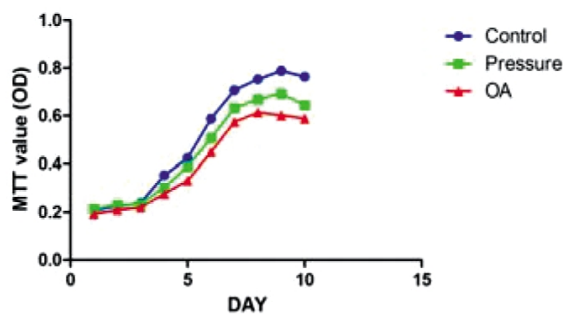


图5 软骨细胞生长曲线图

Fig.5 Growth curve of chondrocytes

3 讨论

随着对 OA 的不断深入研究,近年来对于其发病机制和病理变化的过程以取得了较大的进步。目前普遍认为细胞因子和软骨降解蛋白酶是参与骨关节炎发病进程的重要介质,MMPs 是一类结构相似的酶活性依赖锌离子的蛋白水解酶超家族,构成了细胞外基质降解最重要的蛋白水解系统,能够降解关节组织细胞外基质所有成分,在软骨降解的晚期发挥着重要作用^[6]。MMP-3 是与 OA 关系密切的 MMPs 成员之一,在 OA 病变的软骨、滑膜、软骨下骨上均表达增加,是 OA 关节滑膜炎和软骨基质降解中最重要的酶之一^[7]。MMP-3 可降解细胞外蛋白多糖、IV 型胶原等多种基质蛋白底物。另外,MMP-3 还参与间质胶原酶的激活,而间质胶原酶可降解 II 型胶原。也有研究发现 MMP-3 在成纤维细胞增生中起中介作用^[8]。目前国内针对 OA 患者关节液和血清中 MMP-3 水平已做了大量研究,提示

MMP-3 是 OA 发病中有重要意义的生物学标志物。本实验结果显示,在细胞培养中细胞外液的 MMP-3 水平也有显著差异,支持这一观点。同时加压组的 MMP-3 表达水平也出现上升趋势,表明了加压模型的建立对 MMP-3 表达的影响。

大量研究已证实 IL-1 β 在 OA 的发病过程中起到关键性作用,其通过 IL-1 β 转换酶分泌到细胞膜外发挥生物学效应。有研究报道^[9],OA 软骨细胞表面的 IL-1 β 受体数量是正常软骨细胞表面的 2 倍,使 OA 的软骨细胞对 IL-1 β 具有高度的敏感性。即使在未退化的软骨中,如软骨细胞在形态学上表现异常,则 IL-1 β 水平显著升高,且胶原明显减少,最终导致软骨的破坏^[10]。Houghlin 等病例对照研究结果显示,IL-1 β 配体簇可能为膝 OA 患者的易感基因,IL-1 β 簇的多态性可能参与了膝关节 OA 的发病机制,全基因组扫描结果示 IL-1 β 基因簇可能与 OA 相关联^[11]。目前对于 IL-1 β 的致病机制研究越来越深入,主要认为与其通过多种途径诱导软骨细胞凋亡、抑制增殖,促使软骨细胞功能异化,进而对软骨及滑膜产生影响。研究表明,软骨细胞 Sox9 基因能增强细胞表型的再表达,使 OA 软骨细胞的 II 型胶原基因 (COL2A1) 高表达,而 IL-1 β 能显著减少 Sox9mRNA 和蛋白含量^[12-14]。同时 IL-1 β 还可通过对炎性因子及 MMPs 等异常调控,进而影响细胞外基质正常生理调节产生影响。有学者研究发现,使用 IL-1 β 刺激的人关节软骨细胞,MMP-1,MMP-3 和 MMP-13 蛋白的产生和释放水平均升高^[15]。本实验对 OA 细胞的 IL-1 β 与 MMP-3 水平作线性相关分析,可证实二者呈正相关关系,表明在细胞体外培养中,其水平的表达与关节液及血清中的表达相关性一致。

Ko 等证实正常软骨细胞和 OA 软骨细胞对于力学刺激的影响体积的变化有所不同^[16]。Jones 等通过微管吸允技术实验

表明正常软骨细胞与 OA 软骨细胞在体积调控能力上存在差异^[17]。Erickson 等^[18]认为机械压力作用于软骨,使细胞间隙渗透压增加,引起细胞有效体积发生变化,从而导致细胞内钙离子浓度短暂升高,激活第二信号系统发挥作用。软骨细胞通过力学信号结合其基因表达来调控胶原、蛋白多糖、软骨新陈代谢所需酶的分泌。在异常力学刺激下软骨细胞可出现病理反应。本实验的重点是对正常软骨细胞构建压力模型,从而对比正常组及 OA 组,观察组间差异。结果显示,加压组 IL-1 β 与 MMP-3 水平均高于正常,差异有统计学意义,且对照国内外研究^[19-21]加压组 IL-1 β 水平已接近早期 OA 的标准,结合 MTT 生长曲线,可证明高压 10MPa,2h 间歇性静水压加压可抑制软骨细胞增殖,增加 IL-1 β 与 MMP-3 分泌。继续进行延长加压周期是否会使 IL-1 β 与 MMP-3 调控基因及相关 MiRNA 产生变化,还可进一步探索。

本研究证实了压力可增加 ECM 中 IL-1 β 与 MMP-3 的分泌,及为 IL-1 β 、MMP-3 在骨关节炎致病机制中的重要作用提供依据,有利于 OA 的预防、早期诊断和治疗。压力对 IL-1 β 与 MMP-3 基因及蛋白表达的影响是如何调控的,目前尚不清楚有待于进一步研究。相信随着对 IL-1 β 、MMPs 及其抑制物基因调控机制的深入研究,通过不同途径阻断 OA 关节组织的破坏将成为现实。

参考文献(References)

- [1] Plumb MS, Treon K, Aspden RM, et al. Competing regulation of matrix biosynthesis by mechanical and IGF-1 signalling in elderly human articular cartilage in vitro[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1760(5): 762-767
- [2] De Croos JN, Dhaliwal SS, Grynblas MD, et al. Cyclic compressive mechanical stimulation induces sequential catabolic and anabolic gene changes in chondrocytes resulting in increased extracellular matrix accumulation[J]. *Matrix Biol*, 2006, 25(6): 323-331
- [3] Hunter CJ, Imler SM, Malaviya P, et al. Mechanical compression alters gene expression and extracellular matrix synthesis by chondrocytes cultured in collagen I gels[J]. *Biomaterials*, 2002, 23(4): 1249-1259
- [4] 范卫民, 蔡俊. 周期性压力对组织工程软骨的影响及其作用机制[J]. *中华实验外科杂志*, 2006, 23(8): 977-979
Fan Wei-min, Cai Jun. The explore of the effects of the cyclic pressure on constructing of tissue engineering cartilage and its mechanisms[J]. *Chin J Exp Surg*, 2006, 23(8): 977-979
- [5] Trickey WR, Lee GM, Guilak F, et al. Viscoelastic properties of chondrocytes from normal and osteoarthritic human cartilage [J]. *J Orthop Res*, 2000, 18(6): 891-898
- [6] Little CB, Hughes CE, Curtis CL, et al. Matrix metalloproteinases are involved in C-terminal and interglobular domain processing of cartilage aggrecan in late stage cartilage degradation [J]. *Matrix Biology*, 2002, 21(3): 271-288
- [7] Hulejová H, Baresová V, Kléz Z, et al. Increased level of cytokines and matrix metalloproteinases in osteoarthritic subchondral bone [J]. *Cytokine*, 2007, 38(3): 151-156
- [8] Tolboom TC, Pieterman E, Vander WH, et al. Invasive properties of fibroblast-like synoviocytes: correlation with growth characteristics and expression of MMP-1, MMP-3, and MMP-10 [J]. *Ann Rheum Dis*, 2002, 61(11): 975-980
- [9] 林木南, 刘献祥. 骨性关节炎中细胞因子的协同效应 [J]. *福建中医学院学报*, 2006, 16(2): 69-70
Lin Mu-nan, Liu Xian-xiang. Synergistic effect of cytokines in osteoarthritis [J]. *Journal of Fujian Traditional Chinese Medicine College*, 2006, 16(2): 69-70
- [10] Murray DH, Bush PG, Brenkel IJ, et al. Abnormal human chondrocyte morphology is related to increased levels of cell-associated IL-1 β and disruption to pericellular collagen type VI[J]. *J Orthop Res*, 2010, 28(11): 1507-1514
- [11] Loughlin J, Mustafa Z, Smith A, et al. Linkage analysis of chromosome 2q in osteoarthritis[J]. *Rheumatology(Oxford)*, 2000, 39(4): 377-381
- [12] Tew SR, Li Y, Pothacharoen P, et al. Retroviral transduction with SOX9 enhances re-expression of the chondrocyte phenotype in passaged osteoarthritic human articular chondrocytes[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2005, 13(1): 80-89
- [13] Murakami S, Lefebvre V, de Crombrughe B. Potent inhibition of the master chondrogenic factor Sox9 gene by interleukin-1 and tumor necrosis factor- α [J]. *Biol Chem*, 2000, 275(5): 3687-3692
- [14] Kolettas E, Muir HI, Barrett JC, et al. Chondrocyte phenotype and cell survival are regulated by culture conditions and by specific cytokines through the expression of Sox-9 transcription factor[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2001, 40(10): 1146-1156
- [15] Fan Z, Bau B, Yang H, et al. Freshly isolated osteoarthritic chondrocytes are catabolically more active than normal chondrocytes, but less responsive to catabolic stimulation with interleukin-1 β [J]. *Arthritis Rheum*, 2005, 52(1): 136-143
- [16] Ko KS, McCulloch CA. Partners in protection: interdependence of cytoskeleton and plasma membrane in adaptations to applied forces [J]. *J Membr Biol*, 2000, 174(2): 85-95
- [17] Jones WR, Ting-Beall HP, Lee GM, et al. Alterations in the young's modulus and volumetric properties of chondrocytes isolated from normal and osteoarthritic human cartilage [J]. *J Biomech*, 1999, 32(2): 119-127
- [18] Erickson GR, Alexopoulos LG, Guilak F. Hyper-osmotic stress induces volume change and calcium transients in chondrocytes by transmembrane, phospholipid, and G-protein pathways[J]. *J Biomech*, 2001, 34(12): 1527-1535
- [19] 张金山, 程园园. 膝关节炎患者血清 MMP-3, TIMP-1 水平变化及相关性研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(9): 1066-1069
Zhang Jin-shan, Cheng Yuan-yuan. The correlation between serum MMP-3 and TIMP-1 on osteoarthritis[J]. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*, 2012, 47(9): 1066-1069
- [20] 唐万兵, 唐从耀, 陈平等. 膝关节炎患者血清和关节液中 IL-1 水平的变化研究[J]. *实用医技杂志*, 2008, 15(21): 2785-2786
Tang Wan-bing, Tang Cong-yao, Chen Ping, et al. The change between serum and joint fluid on IL-1 osteoarthritis [J]. *JPMT*, 2008, 15(21): 2785-2786
- [21] Kaneko S, Satoh T, Chiba J, et al. Interleukin-6 and interleukin-8 levels in serum and synovial fluid of patients with osteoarthritis[J]. *Cytokines Cell Mol Ther*, 2000, 6(2): 71