

# 生长因子对人髌突软骨细胞DNA及胶原合成的影响

焦岩涛 王大章 韩文利 李唐新

**摘要** 目的: 研究胰岛素样生长因子(IGF- I)、碱性成纤维样生长因子(bFGF)及转化生长因子-β(TGF-β)对人髌突软骨细胞增殖及代谢的调节作用。方法: 采用体外细胞培养技术及同位素掺入法。结果: 在0.4% 新生小牛血清(NCS)条件下, bFGF 对人髌突软骨细胞DNA 合成有显著的促进作用, 浓度在1 ng/ml 以上具显著性( $P < 0.05$ )。IGF- I 在10~ 100 ng/ml 呈剂量效应地促进<sup>3</sup>H-TdR 的掺入, 而TGF-β 无显著作用。bFGF 在0.1~ 100 ng/ml 可显著促进人髌突软骨细胞<sup>3</sup>H-Proline 掺入, 最大效应剂量为10 ng/ml (增加60%)。IGF- I 在10~ 100 ng/ml 能够明显促进细胞胶原合成, 最大值在100 ng/ml (增加98%)。TGF-β 在1~ 10 ng/ml 明显抑制<sup>3</sup>H-Proline 掺入, 最大抑制浓度为1 ng/ml, 抑制率约为24%。结论: 生长因子可有效促进软骨细胞增殖及基质合成, 为关节软骨损伤性疾患的治疗提供一种有效的途径。

**关键词** 生长因子 髌状突 软骨细胞 增殖 胶原合成

关节软骨特殊的解剖特点决定了关节软骨自身修复能力较差。尽管修复重建外科有了长足的发展, 但多是对病变软骨组织进行置换而非对病变软骨的生理性修复治疗。以往研究<sup>1,2</sup> 证实生长因子参与了关节软骨的生理及病理过程, 但研究多是局限对单一生长因子作用的研究, 且研究对象多为低等动物的软骨细胞。本研究首次探讨多种生长因子对人髌突软骨细胞增殖及代谢的影响研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和试剂

II型胶原酶(Sigma Chemical Co, USA), 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、转化生长因子-β(TGF-β)、胰岛素样生长因子(IGF- I)及DMEM 培养基(GBCOBR, USA), 小牛血清(华西医科大学分子生物学实验室), <sup>3</sup>H-胸腺嘧啶脱氧核苷(<sup>3</sup>H-TdR, 中国科学院上海原子能研究所), <sup>3</sup>H-脯氨酸(<sup>3</sup>H-Proline, 中国原子能研究所), 其它试剂均为国产分析纯。

### 1.2 人髌突软骨细胞分离培养

参照参考文献<sup>3</sup> 方法。髌突软骨取自因健康原因需终止妊娠的4~ 6月龄水囊引产的人胚胎。经机械分离及0.25% 胰蛋白酶、0.2% 胶原酶联合消化, 获得高成活率的、均一的关节软骨细胞, 接种于DMEM 培养基中, 内含10% 小牛血清、青霉素100 U/ml、链霉素100 μg/ml, 于二氧化

碳孵箱内, 37℃, 5% CO<sub>2</sub>饱和湿度下培养。

### 1.3 bFGF、TGF-β及 IGF- I 对人髌突软骨细胞DNA 及胶原蛋白合成的影响

取处于对数生长期的第2代人髌突软骨细胞, 经0.25% 胰蛋白酶消化制成单细胞悬液, 用DMEM 培养基调整细胞浓度为 $1 \times 10^5$ /ml, 定量接种于96孔板。待24 h 细胞贴壁后, 更换不含血清DMEM 培养基培养24 h, 使细胞相对同步化。更换含不同生长因子及浓度的DMEM 培养基(内含0.4% NCS), 3种生长因子选用4个浓度级0.1、1、10、100 ng/ml, 同时各样品孔加入<sup>3</sup>H-TdR 或<sup>3</sup>H-Proline, 终浓度为185 kBq/ml( $5 \mu Ci/ml$ )。继续培养至预定时间, 弃去原培养液, 用0.1 mol/L PBS 洗涤细胞2次, 每孔加入0.25% 胰蛋白酶50 μl 消化细胞5 min。镜下证实细胞分离后, 充分吹打使细胞悬浮, 多头细胞收集器将细胞抽滤点样于“49”型玻璃纤维滤纸上。并用生理盐水、10% 三氯醋酸、无水乙醇各2 ml 依次洗涤滤膜, 滤膜在80℃ 烘干30 min, 取下滤膜, 置入闪烁瓶, 并加入5 ml 二甲苯闪烁液(0.4% PPO, 0.04% POPOP), 用国产FJ2007P 液体闪烁谱仪测定各样品的放射强度, 以每分钟脉冲值(cpm)表示。

### 1.4 统计学分析

检测结果经 *t* 检验确定组间差异的统计学意义。

本课题为国家自然科学基金资助项目(编号 39500164)

作者单位: 610041 华西医科大学口腔医学院口腔颌面外科学教研室

## 2 结 果

### 2.1 生长因子对人髌突软骨细胞DNA 合成的影响

bFGF 对人髌突软骨细胞DNA 合成有显著的促进作用, 浓度在1 ng/ml 以上与空白对照组比具有显著性( $P < 0.05$ )。IGF- I 在10~ 100 ng/ml 范围内也呈剂量效应地促进 $^3\text{H-TdR}$  的掺入, 而TGF- $\beta$ 作用不显著( $P > 0.05$ ) (图1)。

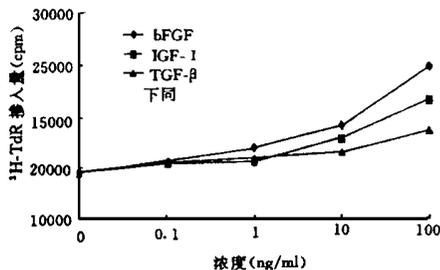


图1 生长因子对人髌突软骨细胞DNA 合成的影响

### 2.2 生长因子对人髌突软骨细胞胶原合成的影响

bFGF 在0.1~ 100 ng/ml 浓度范围内, 显著促进髌突软骨细胞 $^3\text{H-Proline}$  掺入, 最大效应剂量为10 ng/ml, 与对照组比较增加近60%, IGF- I 在1 ng/ml 时作用不显著 ( $P > 0.05$ ), 但在10~ 100 ng/ml 浓度范围能够明显促进细胞胶原合成, 最大值在100 ng/ml,  $^3\text{H-Proline}$  掺入增加了98%, TGF- $\beta$ 对 $^3\text{H-Proline}$  掺入无促进作用, 在1~ 10 ng/ml 范围内明显抑制 $^3\text{H-Proline}$  掺入, 最大抑制浓度为1 ng/ml, 抑制率约为24% (图2)。

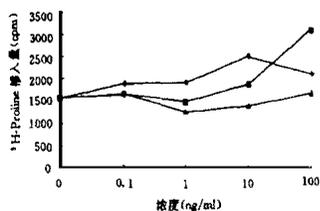


图2 生长因子对人髌突软骨细胞胶原合成的影响

## 3 讨 论

关节软骨细胞的分化, 增殖及基质合成能力直接影响了关节软骨的功能状态及损伤后的修复。关节软骨、软骨下骨中存在着多种生长因子, 并且软骨细胞本身具有合成多种生长因子及表达相应受体的功能。它们与细胞因子、激素形成一个精密的网络调节系统, 通过自分泌、内分泌及旁分泌的形式, 在时间及空间上相互协同或拮抗, 控制了组织器官的发生、改建、内环境的稳定及创伤后的修复等生理及病理过程。研

究不同生长因子对人体关节软骨细胞分化增殖的影响, 对探讨生长因子的作用机理及寻找有效的生长因子及组合治疗软骨损伤具有重要的理论及实践意义。

胰岛素样生长因子家族有两个成员即 IGF- I、IGF- II, 它们与胰岛素在氨基酸组成上有50% 的同源性。大多数组织细胞包括软骨细胞均能合成 IGF- I。以往研究<sup>4,5</sup> 显示 IGF- I 是软骨分化、代谢的重要调节因子, IGF 对人及动物的大关节生长板软骨细胞具有促进增殖及基质合成的作用。但对人下颌髌突软骨细胞的增殖分化研究, 目前尚未见报道。本研究证实, IGF- I 能在低浓度血清条件下促进人髌突软骨细胞的增殖。且在10~ 100 ng/ml 浓度下呈剂量依赖性的促进软骨细胞增殖, 最大效应下, 较对照组增加了24%, 超过50 ng/ml 其作用降低, 这可能与细胞表面受体结合状态有关。同时, 10~ 100 ng/ml 时 IGF- I 显著促进其胶原蛋白的合成, 在最大效应下,  $^3\text{H-Proline}$  的掺入增加了98%。这种促进基质合成的作用, 在3种因子中 IGF- I 最为突出。

碱性成纤维细胞生长因子对起源于中胚层及神经外胚层的细胞均具有强的有丝分裂活性, 除促进细胞增殖外, bFGF 还具有调节细胞分化及代谢的功能。以往研究证实, 关节软骨细胞具有 bFGF 的高、低亲和力受体, 软骨细胞自身能够合成 bFGF。1994年发现, bFGF 受体突变是遗传性侏儒症中最常见类型——软骨发育不良的直接原因。体外研究<sup>6</sup> 显示, bFGF 可促进生长板软骨细胞增殖, 并稳定其软骨表型。动物实验<sup>2</sup> 表明, bFGF 可促进关节软骨损伤的修复。本研究发现, 在0.4% NCS 条件下, bFGF 能够显著促进人髌突软骨细胞增殖, 在3种生长因子中其作用最为突出。在低浓度血清条件下, bFGF 还能够促进软骨细胞胶原蛋白的合成, 鉴于其对髌突软骨细胞增殖及代谢的特殊作用, bFGF 在软骨损伤修复中可能发挥着重要作用。

转化生长因子 $\beta$ 是一类具有多种生物学功能的蛋白多肽, 广泛存在于正常组织细胞及转化细胞中, 以骨组织及血小板中含量最丰富。最初发现骨基质提取物, 可诱导大鼠肌细胞向软骨细胞的转化; 遂命名为软骨诱导因子A (C IF-A)。研究表明<sup>7,8</sup> TGF- $\beta$ 是一种具有双向调节作用的生长因子, 体外研究差异较大。有研究表明, TGF- $\beta$ 可促进兔关节软骨细胞增殖、胶原及蛋白多糖的合成, 并抑制基质金属蛋白酶合成。但也有相反的研究结果。在骨关节病变骨赘中,

发现其mRNA 表达增强,说明 TGF-β参与了软骨的修复、改建过程。本研究结果表明,在低浓度血清条件下 TGF-β 无促增殖作用,而在0.4%NCS 条件下, TGF-β 能够显著抑制软骨细胞胶原蛋白的合成,抑制率达24%。其确切调节机理有待于进一步研究。

本研究探讨了体外3种生长因子对人髁突软骨细胞增殖及代谢的调节,但体外研究有其相对性,实验结果往往受到细胞来源、分化程度、培养条件及培养基中血清浓度等因素所影响。有关体内环境下生长因子作用的确切机理有待于更深入的研究。

#### 4 参考文献

- 1 Trippel SB, Coutts RD, Einhorn TA, et al Growth factors as therapeutic agents J Bone Joint Surg, 1996, 78A (8): 1272~ 1286
- 2 Cuevas P, Burgos J, Baird A. Basic fibroblast growth factor (FGF) promotes cartilage repair in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988, 156(2): 611~ 618
- 3 焦岩涛,王大章,田卫东,等. 人髁颞颌关节软骨细胞培养及生物学特性研究. *华西口腔医学杂志*, 1997, 15(3): 187 ~ 189
- 4 Trippel SB, Wroblewski J, Makower AM, et al Regulation of growth plate chondrocytes by insulin-like growth factor I and basic fibroblast growth factor. *J Bone Joint Surg*, 1993, 75A (2): 177~ 189
- 5 Froger-Gaillard B, Hossenbopp P, Adolph M, et al Production of insulin-like growth factors and their binding proteins by rabbit articular chondrocytes: relationships with cell multiplication. *Endocrinology*, 1989, 124 (5): 2365 ~ 2372
- 6 Kato Y, Iwamoto M, Koike T, et al Fibroblast growth factor stimulates colony formation of differentiated chondrocytes in soft agar. *J Cell Physiol*, 1987, 133(3): 491 ~ 498
- 7 Skantze KA, Brinckerhot CE, Collier JP. Use of agarose culture to measure the effect of transforming growth factor β and epidermal growth factor on rabbit articular chondrocytes. *Cancer Res*, 1984, 45(9): 4416~ 4421
- 8 Vivien D, Galera P, Loyau G, et al Differential response of cultured rabbit articular chondrocytes (RAC) to transforming growth factor-β (TGF-β) — evidence for a role of serum factors. *Eur J Cell Biol*, 1991, 54(2): 217~ 223

(1999-03-16收稿, 1999-07-07修回)

## Effects of Growth Factors on DNA and Collagen Synthesis of Human Mandibular Condylar Cartilage Cells

Jiao Yantao, Wang Dazhang, Han Wenli, et al

*College of Stomatology, West China University of Medical Sciences*

### Abstract

**Objective:** To investigate the effects of transforming growth factor-β (TGF-β), insulin-like growth factor- I (IGF- I) and basic fibroblast growth factor (bFGF) on DNA and collagen synthesis of mandibular condylar cartilage (MCC) of human fetus. **Methods:** Cell culture, <sup>3</sup>H-TdR and <sup>3</sup>H-Proline incorporation methods were used. MCC cells were harvested from 4 to 5 months old human fetus. Cells were seeded at 2 × 10<sup>4</sup>/well on 96-well Plate. After synchronization, medium was replaced by DMEM containing 0.4% NCS with various growth factors and concentrations. **Results:** bFGF stimulated the DNA synthesis significantly, and IGF- I had less effect, while the effect of TGF-β was insignificant. For collagen synthesis, bFGF caused a dose-dependent increase (60%). A greater effect (98%) was achieved when IGF- I was added. In contrast, TGF-β could inhibit collagen synthesis (24%). **Conclusion:** Growth factors play an important part in the proliferation and matrix synthesis of MCC cells, which might be of potential application in treating cartilage destructive lesions.

**Key words:** growth factor condylar cartilage cell proliferation collagen synthesis