

静张应力与 TGF- β_1 对大鼠髁突软骨细胞增殖效应调节初步研究

宋锦麟 罗颂椒 樊瑜波 赵志河 郭欣

【摘要】 目的 探讨转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)在静张应力环境下对髁突软骨细胞增殖效应的影响。方法 (1)将传代培养至第4代大鼠下颌髁突软骨细胞在12孔培养板上培养,采用流式细胞仪测定加入不同浓度 TGF- β_1 (0.1、1、10 ng/ml) 0、6、12、18、24 h后,对髁突软骨细胞增殖活性(PI值)的影响。(2)将第4代大鼠下颌髁突软骨细胞在细胞膜式张应力施加装置上培养,检测不同浓度 TGF- β_1 及5 kPa静张应力联合应用0、6、12 h后,对髁突软骨细胞增殖活性(PI值)的影响。结果 不同浓度 TGF- β_1 (0.1、1、10 ng/ml)在模拟生理环境下以剂量依赖型的方式整体促进了髁突软骨细胞增殖效应,对髁突软骨细胞的增殖活性调节作用主要在12~18 h段,增殖峰值在18 h左右;在5 kPa静张应力联合 TGF- β_1 刺激下培养较 TGF- β_1 的单独效应具有更强的促髁突软骨细胞增殖作用。结论 静张应力联合 TGF- β_1 可以调节髁突软骨细胞的增殖活性。

【关键词】 静张应力; 转化生长因子- β_1 ; 髁突软骨细胞; 增殖活性; 功能矫治

Effects of Static Tension-stress and TGF- β_1 on Proliferation of Mandibular Condylar Chondrocytes

SONG Jinlin*, LUO Songjiao, FAN Yubo, et al. (Biomechanics Institute, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

【Abstract】 Objective The purpose of this study was to investigate effects of static tension-stress and TGF- β_1 on proliferation of mandibular condylar chondrocytes in vitro. **Methods** The fourth-passage chondrocytes were harvested from the mandibular condyles of 2-week-old SD rats for this study, and a cellular static tension-stress device was used to apply stress on cells. The effects of continuous static tension-stress and/or transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) on the proliferation of mandibular condylar chondrocytes were examined using flow cytometry. The experiment was divided into two parts. The first part consisted of 100 specimens which were divided into 20 groups with different TGF- β_1 dosage (0 ng/ml, 0.1 ng/ml, 1 ng/ml and 10 ng/ml) for 0, 6, 12, 18 and 24 hours respectively. The second part consisted of 30 specimens which were divided into six groups under continuous static tension-stress (5 kPa) and different TGF- β_1 dosage (0.1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml) for 0, 6 and 12 hours. Multivariable analyses were conducted to test for associations between proliferation of mandibular condylar chondrocytes and TGF- β_1 and/or different stresses. **Results** The results showed that TGF- β_1 had a mitogenic effect on rat mandibular condyle at the concentrations of 0.1, 1 and 10 ng/ml, and the mitogenic effects of TGF- β_1 on condylar chondrocytes were demonstrated in 12 to 18 hours after application of stresses, and the peak of mitogenic effects appeared at 18 hour ($P < 0.05$). The most active mitogenesis happened in the group with continuous static tension-stress (5 kPa) combined with TGF- β_1 . **Conclusion** These results prove mechanical stimulates and TGF- β_1 in vitro could influence and regulate the growth of condylar chondrocytes.

【Key words】 static tension-stress; transforming growth factor- β_1 ; mandibular condylar chondrocytes; proliferation; functional orthopedics

在功能矫形治疗中,功能矫治前伸下颌后颞颌关节的生物力学环境发生改变,继发的生物学效应使下颌髁突软骨周围的生长因子和激素含量增高^{1~4},刺激髁突软骨细胞增生活跃,促进髁突及下颌骨的生

长。髁突软骨生长改建不仅仅受到生物力学效应,力学环境变化继发的生物学效应也是重要的影响因素之一。转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)是目前作用最为复杂和多样的生长因子,但 TGF- β_1 对软骨细胞的作用在相同或不同的实验模型中得出的结论不完全一致^{5~8},尤其是尚未见模拟功能矫治状态下联合静张应力、TGF- β_1 对髁突软骨细胞增殖活性时相影响的报道。本实验联合细胞生物力

本课题为国家自然科学基金资助项目(编号 39870231,39900166)

作者单位:610065 四川大学生物力学研究所(宋锦麟,樊瑜波,郭欣),四川大学华西口腔医院正畸科(罗颂椒,赵志河)

学实验手段,模拟研究大鼠下颌髁突软骨细胞在 TGF- β_1 及静张应力联合作用下的增殖效应变化,有助于进一步阐明 TGF- β_1 对软骨细胞的生物力学作用机制,为功能矫形治疗提供依据。

1 材料和方法

1.1 主要实验设备及材料

NUAIRE Class II 超净工作台, SANYO MCO-17AI CO $_2$ 培养箱, OLYMPUS IX 50 相差显微镜, Heraeus Varifuge 3.0RS⁹。

II 型胶原蛋白酶, 胰蛋白酶, DMEM 培养基, 新生小牛血清, 聚苯乙烯一次性培养瓶、皿、板, 2 周龄纯种 SD 大鼠, 医用硅胶膜, 医用耐酸不锈钢及常规细胞培养实验器械等⁹; TGF- β_1 (Peprotech ECLTD 100-21R, 英国)。

1.2 实验方法

将 SD 大鼠下颌髁突软骨细胞的原代、传代培养, 每天常规在倒置相差显微镜下观察 SD 大鼠下颌髁突软骨在培养皿及硅胶膜上的培养性状⁹。

1.3 实验分组

实验分为两部分: (1) 检测不同浓度的 TGF- β_1 对髁突软骨细胞增殖活性的影响; (2) 不同浓度的 TGF- β_1 和 5 kPa 静张应力联合作用对髁突软骨细胞增殖活性的影响。实验均采用 15% 小牛血清浓度 DMEM 培养基进行培养。

1.3.1 TGF- β_1 对髁突软骨细胞增殖活性的影响 在 12 孔培养板上培养的髁突软骨细胞中加入浓度分别为 0.1、1、10 ng/ml 的 TGF- β_1 , 并在加入 TGF- β_1 0、6、12、18 和 24 h 后进行流式细胞仪检测。空白对照组不加 TGF- β_1 进行培养。

1.3.2 TGF- β_1 和 5 kPa 静张应力联合作用对髁突软骨细胞增殖活性的影响 对照组为硅胶膜上培养 0、6、12 h 后的髁突软骨细胞; 在 5 kPa 静张应力实验开始时每组分别加入浓度为 0.1、1、10 ng/ml 的 TGF- β_1 , 实验开始后定时用倒置相差显微镜观察细胞形态, 12 h 后进行流式细胞仪检测。

1.4 流式细胞仪检测

在培养膜加入适量 0.25% 胰酶-0.02 EDTA, 室温下消化 15 s 左右, 4 PBS 漂洗、离心, 4000 r/min 4 min 各 1 次, 收集髁突软骨细胞; 1 ml 75% 酒精固定保存于 EP 管, 用流式细胞仪检测髁突软骨细胞增殖活性。细胞增殖活性以增殖指数 (proliferative index, PI) 表示, 其计算公式为:

$$PI(\%) = \frac{S + G_2/M}{G_0/G_1 + S + G_2/M} \times 100\%$$

1.5 统计分析

实验数据利用 SAS v6.12 作重复测量的组间方差分析。

2 结果

2.1 倒置相差显微镜观察

在 5 kPa 静张应力及 TGF- β_1 联合作用下硅胶膜上大鼠髁突软骨细胞具有典型多角样细胞形态特征, 并可见正在大量分裂增殖的软骨细胞, 在单位培养面积上大鼠髁突软骨细胞数目较单纯力学刺激培养增多。

2.2 在不同浓度 TGF- β_1 作用下髁突软骨细胞的增殖活性

培养孔中不同 TGF- β_1 浓度下髁突软骨细胞各培养时段 PI 指数变化见表 1, 从表 1 可见, 随着培养时间的增加, 各组大鼠髁突软骨细胞具有增殖活性, 与 0 h 相比均有显著差异 ($P < 0.05$); 在不同浓度 TGF- β_1 作用下, 0~18 h 内, 大鼠髁突软骨细胞 PI 指数随着培养时间的延长呈剂量依赖型增加, 但在 18~24 h 段内出现下降的趋势。12~18 h 时段下, 不同浓度 TGF- β_1 组与不加 TGF- β_1 组比较均有显著性差异 ($P < 0.05$)。

表 1 培养孔中不同 TGF- β_1 浓度下髁突软骨细胞各培养时段 PI 指数变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Comparison of the average PI index of condylar chondrocytes cultured with the different TGF- β_1 dose ($\bar{x} \pm s$)

TGF- β_1 浓度 (ng/ml)	PI 指数				
	0 h	6 h	12 h	18 h	24 h
0	29.86 \pm 2.63	33.30 \pm 0.99	35.54 \pm 0.841 [#]	41.28 \pm 0.92 [#]	38.02 \pm 0.97 [#]
0.1	29.86 \pm 2.63	36.52 \pm 0.57 [#]	38.38 \pm 0.72 ^{*#}	42.46 \pm 1.52 ^{##}	36.24 \pm 1.19 [#]
1	29.86 \pm 2.63	40.34 \pm 0.84 [#]	42.44 \pm 0.85 ^{*#}	46.78 \pm 1.14 ^{##}	38.02 \pm 0.63 [#]
10	29.86 \pm 2.63	42.44 \pm 1.68 [#]	47.40 \pm 0.76 ^{*#}	48.82 \pm 0.97 ^{##}	42.08 \pm 1.39 [#]

注: * 示相同时段与不加 TGF- β_1 相比 $P < 0.05$; # 示相同 TGF- β_1 浓度条件下不同培养时间组与 0 h 组相比 $P < 0.05$

2.3 TGF- β_1 及静张应力联合作用 12 h 后髁突软骨细胞的增殖活性

髁突软骨细胞在 TGF- β_1 及 5 kPa 静张应力联合作用 12 h 后 PI 指数变化见表 2, 从表 2 可见, 在硅胶

膜上培养的大鼠髁突软骨细胞 PI 指数随着 TGF- β_1 浓度上升而增加 ($P < 0.05$), 即 TGF- β_1 可以促进大鼠髁突软骨细胞的增殖活性; 联合 5 kPa 静张应力后, 大鼠髁突软骨细胞 PI 指数在 12 h 培养段也随着 TGF- β_1

浓度上升而增加 ($P < 0.05$), 且较单独应用 TGF- β_1 促增殖效应更明显, 0.1 ng/ml 和 1 ng/ml 组有显著差异 ($P < 0.05$)。

表2 髌突软骨细胞在 TGF- β_1 及 5 kPa 静张应力联合作用 12 h 后 PI 指数变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Comparison of the average PI index of condylar chondrocytes cultured with the different TGF- β_1 dose and continuous static tension-stress (5 kPa) ($\bar{x} \pm s$)

静张应力 (kPa)	PI 指数			
	0 ng/ml	0.1 ng/ml	1 ng/ml	10 ng/ml
0	16.85 \pm 0.63	20.9 \pm 1.0 *	23.26 \pm 1.08 *	26.52 \pm 0.98 *
5	21.40 \pm 1.16 #	26.32 \pm 2.3 #	28.32 \pm 1.37 #	28.34 \pm 2.27 *

注: * 不同 TGF- β_1 浓度组与不加 TGF- β_1 组比较 $P < 0.05$; # 5 kPa 静张应力组与不加静张应力组比较 $P < 0.05$

3 讨 论

3.1 TGF- β_1 与髌突软骨细胞增殖的调控效应

TGF- β 在软骨的分布是有规律的, 但与软骨细胞的分化程度、功能状态及发育阶段相关, 同时 TGF- β_1 是一种具有双向调节作用的生长因子, 体外研究结果差异较大⁵⁻⁸。有研究已经证实 TGF- β_1 可以促进软骨合成胰岛素样生长因子-I (insulin-like growth factor-I, IGF-I), 通过 IGF-I 介导骨的合成代谢; 而 IGF-I 可能以剂量依赖方式增加胶原和胞外基质 (蛋白多糖等) 的合成, 减少胶原降解, 加快胶原的转化率; 同时维持蛋白多糖的稳态代谢⁶。

动物实验研究⁵ 证实 TGF- β 与软骨代谢存在一定的调节关系, 但 TGF- β 在软骨细胞增殖效应调节的具体作用机制至今未明。本研究模拟功能矫治的生理环境下观察 TGF- β_1 水平的上升对髌突软骨细胞的增殖效应调节的影响。将具有旺盛增殖活性的第 4 代髌突软骨细胞在含 15% 小牛血清 DMEM 培养基进行对比实验, 一方面模拟体内生理激素、生长因子环境; 另一方面避免低血清对髌突软骨细胞的不良影响。

本实验统计结果提示在 0~18 h 内随培养时间的延长, 各组髌突软骨细胞的增殖活性上升, 这表明不同浓度的 TGF- β_1 在本研究设定的条件下对髌突软骨细胞具有促细胞增殖的作用, 可能是通过激活血清中其它生长因子如 IGF-1 等来发挥其巨大的调节效应。此外, 不同浓度 TGF- β_1 对髌突软骨细胞的增殖活性调节作用主要在 12~18 h 段, 增殖峰值在 18 h 左右, 可能是 TGF- β_1 对髌突软骨细胞的调节、分化作

用需要一定的时间来发挥其生物学效应, 在 18 h 左右发挥最大的生物学效应, 随后由于外源性 TGF- β_1 及血清中其它生长因子的消耗及大多数髌突软骨细胞的细胞进入新的细胞周期, PI 指数逐渐下降。

相同时段的不同浓度 TGF- β_1 实验组与对照组比较有统计学差异 ($P < 0.05$), 提示在 0~18 h 内 TGF- β_1 以剂量依赖型促进髌突软骨细胞增殖活性, 而较高的 TGF- β_1 浓度延长了促髌突软骨细胞增殖效应; 综合考虑各组的比较结果, 在实验设定的浓度范围内, TGF- β_1 以剂量依赖型的方式整体促进了髌突软骨细胞增殖效应, 同时提高了增殖峰值, 对髌突软骨细胞的增殖效应具有正向调节作用。

3.2 5 kPa 静张应力联合 TGF- β_1 培养对髌突软骨细胞的增殖调控效应

在 0~12 h 内空白对照组髌突软骨细胞增殖活性随培养时间延长而上升具有统计学意义, 显示该组中髌突软骨细胞本身具有增殖的潜力, 与青春生长高峰期中髌突软骨类似; 而 TGF- β_1 或 5 kPa 静张应力均能增加髌突软骨细胞增殖活性。

比较单独 TGF- β_1 刺激培养组与张应力联合 TGF- β_1 刺激培养组发现张应力联合 TGF- β_1 较 TGF- β_1 的单独效应具有更强的促髌突软骨细胞增殖作用, 可能是静张应力增加 TGF- β_1 合成、分泌以及促进其生物学效应, 李小兵也证实功能矫形时力学环境改变可以促进下颌髌突软骨的合成代谢, 其作用方式是通过增加 TGF- β_1 合成、分泌以及提高其功能来实现的。5 kPa 静张应力联合不同浓度 TGF- β_1 实验组中, 1、10 ng/ml 组比 0.1 ng/ml 组具有更高的增殖活性, 1、10 ng/ml 两组无统计学差异可能是髌突软骨细胞上 TGF- β_1 受体有限, 当受体结合到一定程度后, 其生物学效应会受到限制^{5,8,10}。

不同浓度 TGF- β_1 以剂量依赖型的方式整体促进了髌突软骨细胞增殖效应, 对髌突软骨细胞的增殖活性调节作用主要在 12~18 h 段, 增殖峰值在 18 h 左右; 同时 5 kPa 静张应力联合 TGF- β_1 刺激培养下较 TGF- β_1 的单独效应具有更强的促髌突软骨细胞增殖作用, 即功能矫治的力学效应利于 TGF- β_1 发挥促进髌突软骨增殖作用。鉴于功能矫形治疗能够促进局部的 TGF- β_1 浓度上升, 而 TGF- β_1 分泌及作用也具有时间阶段性, 同时考虑患者的合作性, 所以在临床上采用间断、持续戴用功能矫治器是可行的。

(下转第 73 页)

胞系中均有扩增。人MDR1基因位于7号染色体的7q21.1,其编码的Pgp具有ATP依赖性药物泵出的功能,目前认为这是其介导细胞耐药的基础。MRP也是一种膜结合蛋白。其基因定位于染色体16p13.1,功能与Pgp相似,均属于ATP结合的转运载体超家族(ATP-binding cassette, ABC)家族成员,能引起多种肿瘤细胞对联合化疗敏感性减低。人的MDR1基因启动子包含一个CAAT盒的同感序列和两个GC盒样序列,可被紫外线、雌激素、化疗药物、促细胞分化剂、癌基因(如c-Ha-Ras-1和p53)、蛋白激酶A、蛋白激酶C等激活;MDR1基因在许多正常组织也有表达,是细胞的一种自我保护机制,而且与某些细胞的分泌功能有关。

化疗药物引起肿瘤细胞MDR1表达升高通常被认为是化疗药物对肿瘤细胞进行选择的结果。但由于MDR药物和非MDR药物均可诱导多种敏感细胞系成为耐药细胞并引起MDR1基因过表达及Pgp表达升高,提示细胞毒药物或许是通过某种共同的机制将敏感细胞转化成耐药细胞的。

目前多药耐药检测方法很多,由于各种检测方法的技术路线不同,敏感性不同,得到的结果并不完全相同。Abbaszadegan等⁴检查了20例临床耐药的标本,用传统免疫组化方法不能发现Pgp表达的样品,用RT-PCR法发现大部分表达一定的MDR1 mRNA,表明RT-PCR法与临床化疗效果之间的相关性更好。本实验为检测肿瘤细胞短暂接触化疗药物后的反应,选择了敏感性很高的RT-PCR方法检测肿瘤细胞内

耐药基因的表达。采用在大多数细胞膜上恒定高表达的 γ -MG为内对照,去除了实验过程中尤其是PCR反应体系中诸多因素的干扰,使实验更加简便、快速、可信。实验结果显示短期接触化疗药物可以诱导敏感的Tca8113细胞株耐药基因的表达,但其表达产生较慢,表达量随细胞接触化疗的时间延长而逐渐升高。原发耐药的细胞株K562/ADM在接触化疗药物后其MDR1及MRP表达随时间的延长也略有升高,其表达量明显高于Tca8113细胞株;与荧光分光光度计检测到细胞内阿霉素浓度的变化相一致。证实了化疗与肿瘤细胞继发性耐药之间的关系。

参考文献

- 1 Izquierdo MA, Scheffer CL, Flens MJ, et al. Broad distribution of the multidrug resistance-related vault lung resistance protein in normal human tissues and tumors. *Am J Pathol*, 1996, 148(3): 877-887
- 2 Chaudhary PM, Roninson IB. Induction of multidrug resistance in human cells by transient exposure to different chemotherapeutic drugs. *J Natl Cancer Inst*, 1993, 85(8): 632-639
- 3 Hu XF, Slater A, Wall DM, et al. Rapid up-regulation of mdr1 expression by anthracyclines in a classical multidrug-resistant cell line. *Br J Cancer*, 1995, 71(5): 931-936
- 4 Abbaszadegan MR, Futscher BW, Klimecki WT, et al. Analysis of multidrug resistance-associated protein (MRP) messenger RNA in normal and malignant hematopoietic cells. *Cancer Res*, 1994, 54(17): 4676-4679

(2001-12-01 收稿)

(本文编辑 刘怡)

(上接第63页)

参考文献

- 1 Graber TM, Rakosi T, Petrovic AG. Dentofacial Orthopedics with Functional Appliances. St Louis: The CV Mosby Co, 1996:27-37
- 2 Petrovic AG. Mechanisms and regulation of mandibular condylar growth. *Acta Morphol Neerl Scandl*, 1972, 10(1):25-35
- 3 周征,罗颂椒.大鼠下颌髁突软骨中IGF-1及其基因的差异性表达. *华西口腔医学杂志*, 1998, 16(2):164-166
- 4 杨红梅,罗颂椒. Mechanical stress regulation and proliferation of rat mandibular condylar chondrocytes in vitro. *Chin J Dent Res*, 1999, 5(2):54-56
- 5 李小兵,罗颂椒.功能矫形前伸大鼠下颌髁突软骨TGF- β_1 表达变化的研究. *华西口腔医学杂志*, 1998, 16(4):352-355
- 6 Hirki Y, Inoue H, Hirai R, et al. Effect of transforming growth factor beta on cell proliferation and glycosaminoglycan synthesis by

rabbit growth plate chondrocytes in culture. *Biochem Biophys Acta*, 1988, 969(1):91-92

- 7 焦岩涛,王大章,韩文利. bFGF、IGF-I及TGF- β_1 对人髁突软骨细胞增殖的影响. *中华口腔医学杂志*, 2000, 35(5):346-349
- 8 Thomas AL, Maria JK. Differential regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II release from cultured neonatal mouse calvaria by parathyroid hormone, transforming growth factor- β , and 1,25 dihydroxy vitamin D3. *Endocrinology*, 1991, 128(11):1511-1518
- 9 宋锦麟,罗颂椒,樊瑜波,等.静张应力对大鼠髁突软骨细胞增殖效应调节研究. *华西口腔医学杂志*, 2003, 21(1):57-60
- 10 Trippel SB, Coutts RD, Einhorn TA, et al. Growth factors as therapeutic agents. *J Bone Joint Surg Am*, 1996, 78(1):272-286

(2002-06-25 收稿)

(本文编辑 刘怡)