

# IGF- I 对培养兔关节软骨细胞作用的实验研究

蓝旭<sup>1</sup> 刘雪梅<sup>1</sup> 葛宝丰<sup>1</sup> 许建中<sup>2</sup>

(1. 兰州军区总医院骨科研究所, 甘肃 兰州 730050; 2 第三军医大学西南医院, 重庆)

**【摘要】** 目的 了解胰岛素样生长因子 I (IGF- I) 对培养兔关节软骨细胞增殖及代谢的影响。方法 体外单层培养兔关节软骨细胞, 实验组以 10, 100, 200ng/ml IGF- I 作用细胞 2, 4, 6 天, 对照组不加 IGF- I 作用培养细胞。检测细胞 DNA 及基质中糖醛酸含量。用流式细胞仪分析在 100ng/ml IGF- I 作用下细胞周期亚时相。结果 IGF- I 在 10~ 100ng/ml 浓度范围内, 对培养软骨细胞增殖和代谢有促进作用, 以 100ng/ml 浓度作用效果最佳。细胞周期分析, 实验组 DNA 合成前期(G1 期) 较对照组缩短。结论 IGF- I 促进软骨细胞的增殖与代谢, 且通过缩短细胞 G1 期而缩短细胞周期。

**【关键词】** 胰岛素样生长因子 I 关节疾病 软骨

**Effects of IGF I on proliferation and metabolism of cultured rabbit articular chondrocytes** LAN Xu, LIU Xue-mei, GE Bao Feng, et al. General Hospital of Lanzhou Military Area (Gansu Lanzhou, 730050)

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of insulin like growth factor I (IGF- I) on proliferation and metabolism of cultured articular chondrocytes. **Methods** The monolayer chondrocytes obtained from rabbit were cultured. The experimental group was treated with IGF- I at doses ranging from 10, 100, 200ng/ml at 2, 4, and 6 days while the control group was cultured without IGF- I. The cell DNA content and matrixal glucuronic acid were measured. The cell cycle of chondrocytes treated with IGF- I at 100ng/ml was determined by flow cytometer. **Results** IGF- I stimulated proliferation and metabolism of chondrocytes at doses ranging from 10 to 100ng/ml. Maximal effect of stimulation occurred at 100ng/ml after treatment. The time of DNA synthesis(G1) was shorter in experimental group than in control group. **Conclusion** IGF- I stimulated proliferation and metabolism of chondrocytes and shortened the time needed for G1 phase.

**【Key Words】** Insulin like growth factor I Joint diseases Cartilage

本实验运用 IGF- I 作用于体外单层培养兔关节软骨细胞, 探讨其对软骨细胞的作用机制, 为组织工程修复软骨缺损提供理论依据。

## 1 材料和方法

**1.1 软骨细胞培养** 无菌切取 4 周龄新西兰白兔关节软骨, 放入盛有 DMEM 培养液的培养皿中, 剪成 0.5mm × 0.5mm × 0.5mm 的碎块, 移入 25ml 培养瓶中。用培养液洗软骨块两次, 加入 0.1% II 型胶原酶 2ml 消化 20 分钟, 吹打后弃去, 重复一次。加入 0.1% II 型胶原酶 5ml, 在孵箱内消化 6~ 8 小时, 观察大部分软骨块被消化后, 收集消化液, 1000 转/分离心 3 分钟使细胞沉淀, 用培养液洗两次。细胞计数后移入 25ml 培养瓶中, 每瓶接种细胞密度为  $2 \times 10^4$ , 加入含胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养液, 于 37℃, 饱和湿度, 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养, 每 2 天换培养液一次。原代细胞贴壁并融合成单层后, 传代培养。

**1.2 软骨细胞 DNA 及糖醛酸含量测定** 取生长良好的第 3 代软骨细胞, 按  $2 \times 10^4$ /瓶接种到 50ml 培养瓶中, 各瓶细胞随机分为 4 组, 每组 4 瓶。对照组及加因子前对照组不加因子, 其它各实验组于 24 小时后加入 IGF- I, 使其最终浓度分别

为 10, 100, 200ng/ml。分别作用 2, 4, 6 天。每 2 天换培养液一次, 并相应添加 IGF- I。终止培养时收获细胞, 以二苯胺显色法<sup>[1]</sup>测定细胞 DNA 含量。收集细胞周围基质, 用吡啶硫酸法<sup>[1]</sup>测定基质中糖醛酸水平。检测数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 作组间 *t* 检验。

**1.3 软骨细胞周期测定** 取生长良好的第 3 代软骨细胞, 按  $5 \times 10^5$ /瓶接种于 50ml 培养瓶中。培养 24 小时后, 实验组加入浓度为 100ng/ml 的 IGF- I, 培养 72 小时后收获细胞。制备样本, 用流式细胞仪检测<sup>[1]</sup>细胞 G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub>M 时相所占百分比, 按宋平根等<sup>[2]</sup>方法, 计算出软骨细胞 G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub>M 期所占时间。

## 2 结果

**2.1 软骨细胞 DNA 含量的变化** 实验前各瓶细胞 DNA 含量为  $7.6 \pm 1.28 \mu\text{g}/\text{瓶}$ , 随着培养时间延长, 实验组 DNA 含量均高于对照组, 差异显著 ( $P < 0.01$ ), 且以 IGF- I 浓度为 100ng/ml 作用 4 天效果最佳。各组 DNA 含量及统计分析见表 1, 动态变化见图 1。

**2.2 软骨细胞基质代谢的变化** 细胞培养 24 小时, 糖醛酸含量为  $39.6 \pm 1.85 \mu\text{g}/\text{瓶}$ , 随着培养时间延长, 其基质中糖醛

表 1 培养软骨细胞 DNA 含量( $\bar{x} \pm s, \mu\text{g}/\text{瓶}$ )

组别	IGF I (ng/ml)	n	2d	4d	6d
对照组	0	4	40.3±3.14	49.3±3.82	51.9±4.08
实验组	10	4	56.7±3.46*	79.1±5.12*	75.9±3.10*
	100	4	77.8±2.14*	90.7±3.79*	86.3±2.65*
	200	4	78.1±3.61*	88.5±2.79*	85.6±3.16*

注 实验组与对照组比较, \*  $P < 0.01$

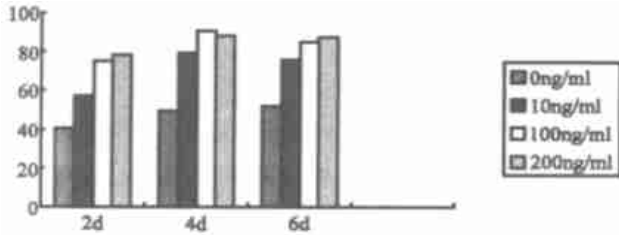


图 1 软骨细胞 DNA 含量动态变化图

酸含量明显增加, 4 天后趋于稳定, 实验组糖醛酸含量均高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 差异显著。各组糖醛酸含量及统计分析见表 2, 动态变化见图 2。

表 2 培养软骨细胞基质糖醛酸含量( $\bar{x} \pm s, \mu\text{g}/\text{瓶}$ )

组别	IGF I (ng/ml)	n	2d	4d	6d
对照组	0	4	98.1±2.09	124.45±6.60	81.78±4.70
实验组	10	4	154.6±5.19*	181.8±4.67*	155.2±12.98*
	100	4	157.8±5.78*	236.6±6.78*	189.9±9.50*
	200	4	158.9±5.16*	233.7±5.33*	187.2±7.66*

注 实验组与对照组比较, \*  $P < 0.01$

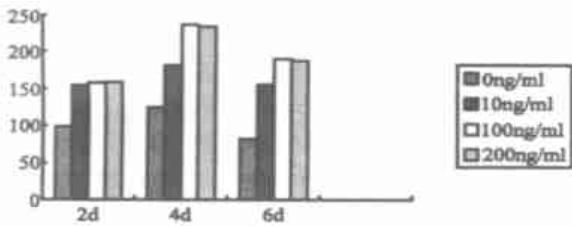


图 2 软骨细胞基质糖醛酸含量动态变化图

2.3 软骨细胞周期分析 实验组在 100ng/ml IGF I 作用下, 细胞周期的  $G_1$  期较对照组大幅度缩短, 其他两期时间无明显改变。培养软骨细胞各亚期细胞比例及各亚期时间见表 3。

表 3 软骨细胞各亚期细胞比例(%)及各亚期时间(h)

组别	$G_1$	S	$G_2M$
对照组	68.6(36.02)	22.8(15.28)	8.6(4.70)
实验组	60.5(20.65)	26.6(12.28)	12.9(7.07)

注 以上数据分别表示亚期细胞比例(亚期时间)

### 3 讨论

正常关节软骨细胞在体外培养过程中逐渐发生反分化, 软骨细胞从形态和机能上逐渐丧失原有细胞特征而向其幼稚方向发展<sup>[3]</sup>。于长隆等<sup>[4]</sup>证明, 三代以内的培养软骨细胞, 细胞形态大多保持多角形或圆形, 具有分泌蛋白多糖(PG)和 II 型胶原的能力。四代之后, 甲苯胺蓝异染转阴, 细胞已不能合成 PG。且由于软骨细胞在反分化过程中, 合成 PG 能力丧失与胶原类型转变是保持一致的<sup>[3]</sup>, 间接说明胶原合成类型

已不是 II 型。因此, 研究软骨细胞生长、代谢时, 应用四代以前的细胞。本实验选择第三代软骨细胞, 这是一种处于“临界状态”的反分化软骨细胞。首先, 它作为实验模型不违反原则。其次, 如果在培养过程中使用抑制软骨细胞反分化因素, 例如用外源性生长因子干预, 如果软骨细胞再次获得旺盛的增殖能力, 且分泌大量基质, 表明在外源性因素作用下, 细胞由幼稚走向成熟, 符合我们的实验设计。

研究表明: IGF-I 可促进软骨细胞 DNA 合成、细胞分化增殖和提高细胞成熟度<sup>[5]</sup>。IGF-I 对软骨基质形成和稳定起关键作用, 可刺激软骨基质合成, 抑制软骨细胞介导的基质分解<sup>[6]</sup>。表 1 说明在一定浓度范围内, IGF-I 对软骨细胞增殖有促进作用, 实验组 DNA 含量均高于对照组, 且以 IGF-I 浓度为 100ng/ml 作用效果最佳。糖醛酸是 PG 的重要组成部分, 又是重要的分解代谢产物。本实验检测糖醛酸含量间接反映基质中 PG 的含量。表 2 说明随着软骨细胞增殖, 基质中糖醛酸含量明显增加, 4 天后趋于稳定, 实验组糖醛酸含量均高于对照组。我们发现在体外培养状态下, 一定浓度范围的 IGF-I 对软骨细胞增殖和代谢有促进作用, 表现出剂量—时间依赖效应, 但当浓度超过一定数值, DNA 及糖醛酸含量不能同步增加, 显示出一定的耐受性。这可以从生长因子的作用机制得以解释, 生长因子通过与细胞膜上相应受体结合而发挥作用。受体数目多少及功能直接影响因子的效应。选用对软骨细胞作用效果最佳因子浓度, 分析细胞周期的改变, 我们发现 IGF-I 能大幅度缩短  $G_1$  期时间, 对其他两期的时间无明显影响。推测细胞在 IGF-I 作用下可能加快了 mRNA 转录、蛋白质翻译合成及各种细胞器的组装。

软骨细胞增殖与代谢是由多种生长因子同时参与调节的。为此, 探讨不同生长因子及其相互协同对软骨细胞增殖、代谢、分化的影响意义更为重要。今后工作需要解决的问题是, 通过观察 IGF-I、转化生长因子  $\beta$ (TGF $\beta$ )、碱性成纤维生长因子(bFGF)、血小板源性生长因子(PDGF)等及其相互协同作用, 探索促进培养软骨细胞生长和代谢的最适剂量及协同配方。

### 参考文献

- [1] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养. 西安: 世界图书社西安公司, 1996. 9-12.
- [2] 宋平根, 李素文. 流式细胞术的原理和应用. 北京: 北京师范大学出版社, 1992. 52-56.
- [3] Von der Mark K, Gauss V, Von der Mark H, et al. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. Nature, 1977, 267(5611): 531-2.
- [4] 于长隆, 曲绵域, 罗葶, 等. 关节软骨细胞体外培养时生物学状态的变化. 中国运动医学杂志, 1986, 5(4): 218-221.
- [5] Lee DA, Bentley G, Archer CW. The control of cell division in articular chondrocytes. Osteoarthritis Cartilage, 1993, 1(2): 137-146.
- [6] Verschure PJ, Van Noorden CJ, Van Marle J, et al. Articular cartilage destruction in experimental inflammatory arthritis: insulin like growth factor 1 regulation of proteoglycan metabolism in chondrocytes. Histochem J, 1996, 28(12): 835-857.

(收稿: 1999-12-24 修回: 2000-03-03 编辑: 房世源)