

· 基础研究 ·

# 骨关节炎软骨细胞中结缔组织生长因子与巨噬细胞集落刺激因子和软骨退变相关性的研究

孙剑, 陈朝蔚, 何永淮, 裘敏蕾, 陈永强  
(上海中医药大学附属市中医医院骨伤科, 上海 200071)

**【摘要】 目的:** 观察结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)在骨关节炎软骨细胞中的表达及其与巨噬细胞集落刺激因子 (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF) 和关节炎软骨退变过程中 Mankin 评分的关系, 探讨骨关节炎软骨细胞中 CTGF 与 M-CSF、骨关节炎软骨退变相关性。**方法:** 新西兰大白兔 10 只随机分为正常组、模型组。按照 Hulth 法建立膝骨关节炎模型, 术后第 8 周处死, 取各组胫骨平台关节软骨, 采用番红 O 染色, 进行 Mankin 评分。免疫组织化学染色测定关节软骨中 CTGF 与 M-CSF 表达的阳性指数, 应用 Spearman 相关分析检验 CTGF 分别与 M-CSF 和 Mankin 评分结果之间有无相关性。**结果:** 模型组 CTGF、M-CSF 染色阳性指数与正常组比较增高, 其差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。统计学分析结果显示, CTGF 与 Mankin 评分间呈正相关 ( $r = 0.542, P = 0.001$ ); CTGF 与 M-CSF 的阳性表达的相关性分析结果显示, 软骨细胞中 CTGF 与 M-CSF 的表达呈正相关 ( $r = 0.634, P = 0.007$ )。**结论:** 骨关节炎中 CTGF 和 M-CSF 表达密切相关, M-CSF 表达增强可能是促进 CTGF 表达增强的重要途径之一, CTGF 与 M-CSF 蛋白表达的上调在骨关节炎软骨退变中起重要作用。

**【关键词】** 骨关节炎; 软骨细胞; 巨噬细胞集落刺激因子; 结缔组织生长因子

**Study on correlation between connective tissue growth factor, macrophage colony-stimulating factor and cartilage degeneration in the osteoarthritis chondrocytes** SUN Jian, CHEN Chao-wei, HE Yong-huai, QIU Min-lei, CHEN Yong-qiang. Department of Orthopaedics and Traumatology, Shanghai Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai 200071, China

**ABSTRACT Objective:** To investigate the expression of connective tissue growth factor (CTGF) in osteoarthritis chondrocytes, and the relationship between CTGF, macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) and cartilage degeneration. **Methods:** Ten New Zealand white rabbits were randomly divided into the normal group and OA model group established by Hulth's method. Sections were stained with Safranin O for histological examination. The cartilage histological characteristics were observed according to the method of Mankin. Immunohistochemical staining was performed. Articular cartilages were observed with microscopy and the image analysis method was used to measure the expression intensity of CTGF and M-CSF in each group, and the correlations of the expression of CTGF, M-CSF and cartilage degeneration were analyzed by statistics. **Results:** Immunohistochemical staining indicated that the expression intensity of CTGF, M-CSF in untreated group was significantly increased as compared with that in the normal group ( $P < 0.05$ ). Statistical analysis showed that there was a correlation between the expression of CTGF, M-CSF and cartilage degeneration ( $r = 0.634, r = 0.542, P < 0.01$  respectively). **Conclusion:** The expression of CTGF and M-CSF protein is up regulated in osteoarthritis chondrocytes, which suggests that the activation of M-CSF is involved in the production of CTGF. CTGF and M-CSF play an important role in the pathogenesis of cartilage degeneration.

**Key words** Osteoarthritis; Chondrocytes; Macrophage colony-stimulating factor; Connective tissue growth factor  
Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2009, 22(6):451-453 www.zggszz.com

骨性关节炎(osteoarthritis, OA)基本病理变化为关节软骨和软骨下骨损伤、骨质增生及关节内组织的炎性病变。新近研究发现<sup>[1]</sup>, 在骨关节炎软骨退变中结缔组织生长因子(connec-

tive tissue growth factor, CTGF)作为一种重要的效应分子在软骨细胞和成骨细胞的增殖、分化方面发挥重要作用, 但目前关于 CTGF 在骨关节炎软骨退变中的调控机制尚不十分清楚。巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF) 是骨关节炎滑膜炎环境下的重要信号转导因子, M-CSF 可通过诱导 TNF- $\alpha$ 、IL-1 等众多炎症因子参与炎症作

基金项目: 上海市基础研究重点项目资助(编号: 08JC1418800)  
通讯作者: 陈永强 Tel: 021-56639828-2503

用。本文通过免疫组织化学法检测关节软骨细胞 CTGF、M-CSF 在蛋白水平表达变化, 探讨骨关节炎软骨细胞中 CTGF 与 M-CSF 和骨关节炎软骨退变相关性。

1 材料和方法

1.1 动物及试剂 6 月龄新西兰大白兔 10 只, 雌雄兼用, 体质量(2.3±0.4) kg, 由上海中医药大学实验动物中心提供, 动物合格证号: SCXK(沪)2002-0011, 标准环境下饲养。随机分为正常组、模型组, 每组 5 只。

1.2 OA 模型建立 模型组按照 Hulth 法<sup>[2]</sup>建立膝骨关节炎模型; 3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)耳缘静脉麻醉, 麻醉满意后, 手术切开兔左膝关节, 剪断内侧副韧带和前后交叉韧带, 完整切除内侧半月板, 术中注意保护关节软骨面不受损伤。彻底止血, 逐层缝合关节囊、皮下和皮肤等组织, 不予固定。正常组不予任何手术处理。

1.3 标本采集 全部动物于第 8 周处死、取材。于左胫骨平台取关节软骨, 置于 4%多聚甲醛固定, 100 g/L 乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)脱钙 5 周, 每周换液 1 次。脱钙达到终点后, 磷酸盐缓冲液充分冲洗, 常规石蜡包埋。

1.4 观察项目与方法

1.4.1 关节软骨组织评分 关节软骨病理切片采用 SafraninO-Fast Green 染色进行 Mankin 评分<sup>[3]</sup>, 从软骨外观改变、软骨细胞数和形态变化、软骨基质降解导致番红 O 着色改变、软骨钙化层和软骨下骨改变、潮线形态变化、血管穿透潮线和骨赘形成等方面评分。

1.4.2 免疫组织化学实验 常规 7 μm 石蜡切片, 贴在涂有切片黏合剂的干净载玻片上, 58 ℃烘烤 18 h, 常规二甲苯脱蜡至水。0.1 mol/L pH 7.4 PBS 洗 3 min×3 次, 抗原修复(antigen retrieval, AR)95 ℃ 20 min, 自然冷却, PBS 洗 3 min×3 次。按 1:50 稀释一抗, 4 ℃过夜, PBS 洗 3 min×3 次, 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 抑制内源性过氧化物酶, Envision 37 ℃ 30 min, PBS 洗 3 min×3 次; 0.05% DAB+0.03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 显色 8~12 min, 流水冲洗终止反应; 苏木素衬染 30 s, 水洗, 蓝化(37 ℃), 0.5% 盐酸乙醇分化, 水洗蓝化, 常规树脂封片。观察反应: 阳性产物为棕黄色或呈棕褐色, 背景为紫蓝色。图像分析: 每个标本取 5 张切片, 每张切片 OLYMPUS BH2 显微镜下放大 100 倍, 随机取 5 个视野, 采用 IMS 细胞图像分析系统, 医学图像分析软件, 阳性强度用阳性指数表示。

1.5 统计学分析 应用 SPSS 12.0 软件处理, 数值用均数±标准差表示, 根据实验设计, 正常组与模型组间样本均数比较采用成组设计定量资料的 t 检验; 应用 Spearman 相关分析检验 CTGF 表达阳性指数分别与 M-CSF 阳性指数和关节软骨 Mankin 评分结果之间有无相关性。

2 结果

2.1 关节软骨组织评分结果 正常组番红 O 染色示软骨层次清楚, 细胞排列整齐, 番红 O 染色均匀, 软骨细胞少, 分布均匀。模型组软骨面糜烂、剥脱, 软骨变薄, 基质染色不均, 嗜染度下降甚至失染, 纤维组织大量增生, 软骨细胞减少, 排列不均, 出现成簇现象。模型组 Mankin 评分与正常组比较, 差异有统计学意义, 评分结果见表 1, 模型组评分高于正常组。

表 1 软骨细胞中 CTGF 与 M-CSF 变化

Tab.1 The change of CTGF, M-CSF in chondrocytes

组别	CTGF 阳性指数	M-CSF 阳性指数	Mankin 评分
正常组	0.68±0.06	0.83±0.04	1.25±0.21
模型组	1.26±0.08*	1.39±0.14**	6.25±0.23***

注: 与正常组比较, \*t=2.105, P=0.042; \*\*t=2.05, P=0.034; \*\*\*t=2.175, P=0.004

Note: Compared with normal group, \*t=2.105, P=0.042; \*\*t=2.05, P=0.034; \*\*\*t=2.175, P=0.004

2.2 免疫组织化学结果 CTGF 主要表达在肥大区和矿化区, CTGF 与 M-CSF 阳性指数结果见表 1。模型组 CTGF 染色强度的阳性指数高于正常组, 其差异有统计学意义。模型组在簇集的软骨细胞的胞浆和细胞核内 M-CSF 染色呈黄褐色, 正常组软骨细胞中 M-CSF 染色呈淡黄色。各组关节软骨切片 M-CSF 染色强度分析: 模型组 M-CSF 染色强度的阳性指数高于正常组, 其差异有统计学意义。

2.3 CTGF 与 M-CSF 和 Mankin 评分之间相关性分析 CTGF 阳性指数与 Mankin 评分间呈正相关(r=0.542, P=0.001)。CTGF 与 M-CSF 的阳性表达的相关性分析结果显示, 软骨细胞中 CTGF 与 M-CSF 的表达呈正相关(r=0.634, P=0.007)。

3 讨论

骨关节炎是一种退行性多关节性疾病, 其病理改变主要发生在关节软骨、软骨下骨和滑膜等组织, 目前一般认为关节软骨退变是 OA 发生的最主要因素。随着细胞分子学的研究进展, 发现骨关节炎中众多的细胞因子参与了软骨退变, M-CSF 是具有多种生物学功能的细胞因子, 对单核细胞的增殖、分化及维持其活性有重要作用。既往研究认为 M-CSF 主要由成骨细胞产生<sup>[4]</sup>, 通过 RANKL 信号转导通路介导破骨细胞形成, 使造血的前体细胞分化为破骨细胞从而促进破骨细胞的增殖和分化。同时 M-CSF 还可通过特异性作用于单核-巨噬细胞系统, 诱导炎症细胞因子的产生<sup>[5]</sup>。然而 M-CSF 在骨关节炎关节腔炎症环境中通过调节下游细胞因子, 从而使关节软骨细胞凋亡软骨退变, 目前缺乏相关研究。

CTGF 是一种新发现的多功能生长因子, 在软骨细胞和成骨细胞的增殖、分化方面发挥着重要作用。Eguchi 等<sup>[6]</sup>通过对 OA 关节软骨研究, 结果显示在早期的 OA 中 CTGF 阳性的软骨细胞主要在软骨浅层表达, 在严重的 OA 中在软骨细胞增殖区中呈强表达, 而在骨赘中 CTGF 在肥大区与增殖区均呈强表达。CTGF 表达与基质金属蛋白酶-3(MMP-3)表达变化密切相关<sup>[7]</sup>。病理状态下, CTGF 过度表达可介导 MMP-3 的表达增加。基质金属蛋白酶(MMPs)和基质金属蛋白酶抑制剂(TIMPs)之间的平衡调节着软骨细胞外基质处于一种动态平衡之中, 平衡的破坏将导致软骨基质的病理降解。CTGF 可能通过对 TIMPs 和 MMPs 表达的调节来维持正常关节软骨或恢复病变关节软骨 TIMPs 和 MMPs 之间的平衡, 从而抑制关节软骨细胞外基质的病理性降解。Nakao 等<sup>[8]</sup>研究认为骨关节炎发病进程中炎症刺激有可能通过 M-CSF 诱导 CTGF 在蛋白水平变化, 骨关节炎的关节局部软骨破坏、骨赘形成是由破骨细胞通道激活所引起的, 破骨细胞的激活在 OA 骨质破坏

进程中起关键作用。

本实验结果中模型组较正常组在关节软骨细胞中 M-CSF、CTGF 的表达阳性指数明显增加,同时 CTGF 与 Mankin 评分结果间呈正相关,提示骨关节炎软骨细胞 CTGF 的变化与软骨退变进程密切相关,机体可能通过调控 CTGF 在 OA 软骨细胞中的表达,进而调控下游细胞因子维持细胞外基质的平衡。CTGF 与 M-CSF 的阳性表达的相关性分析结果显示,软骨细胞中 CTGF 与 M-CSF 的表达呈正相关,提示骨关节炎中 CTGF 和 M-CSF 表达密切相关,M-CSF 表达增强可能是促进 CTGF 表达增强的重要途径之一,CTGF 与 M-CSF 蛋白表达的上调在骨关节炎软骨退变中起重要作用。骨关节炎发病进程中软骨的破坏可能是由破骨细胞通道激活所引起的,破骨细胞的激活与细胞外基质的失衡在 OA 软骨破坏进程中起重要作用。

参考文献

[1] Blaney Davidson EN, Vitters EL, Mooren FM, et al. Connective tissue growth factor/CCN2 overexpression in mouse synovial lining results in transient fibrosis and cartilage damage. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(5): 1653-1661.

[2] Pfander D, Jörgensen B, Rohde E, et al. The influence of laser irradiation of low-power density on an experimental cartilage damage in

rabbit knee-joints; an in vivo investigation considering macroscopic, histological and immunohistochemical changes. *Biomed Tech (Berl)*, 2006, 51(3): 131-138.

[3] Jansen EJ, Emans PJ, Van Rhijn LW, et al. Development of partial-thickness articular cartilage injury in a rabbit model. *Clin Orthop Relat Res*, 2008, 466(2): 487-494.

[4] Kawaguchi H. Endochondral ossification signals in cartilage degradation during osteoarthritis progression in experimental mouse models. *Mol Cells*, 2008, 25(1): 1-6.

[5] Omoto S, Nishida K, Yamaai Y, et al. Expression and localization of connective tissue growth factor (CTGF/Hcs 24/CCN2) in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 2004, 12 (10): 771-778.

[6] Eguchi T, Kubota S, Kawata K, et al. Novel transcription-factor-like function of human matrix metalloproteinase 3 regulating the CTGF/CCN2 gene. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(7): 2391-2413.

[7] Kubota S, Takigawa M. Role of CCN2/CTGF/Hcs 24 in bone growth. *Int Rev Cytol*, 2007, 257: 1-41.

[8] Nakao K, Kubota S, Doi H, et al. Collaborative action of M-CSF and CTGF/CCN2 in articular chondrocytes: possible regenerative roles in articular cartilage metabolism. *Bone*, 2005, 36(5): 884-892.

(收稿日期:2009-02-03 本文编辑:连智华)

### 第三届中国国际骨科学术会议

由中国科学技术协会和中华医学会骨科分会共同主办,北京大学第三人民医院和中国国际科技会议中心共同承办的“第三届中国国际骨科学术会议”将于 2009 年 8 月 7-9 日在北京国际会议中心召开。

“第三届中国国际骨科学术会议”是继 2007 年和 2008 年两次成功地在上海召开之后移师北京举办的。在这里我们要衷心地感谢 2007 年和 2008 年赴上海出席前两届国际骨科学术会议的各位同道,在你们的大力支持下,共同造就了骨科领域的一个高水平、别具风格的学术盛会。本届会议将继续坚持第一和第二届会议办会的初衷,有重点、高效率的交流与传播骨科领域的新技术和新理论,加强基础与临床、海内外以及我国东西部之间的沟通与合作,通过分会场向民众传播科普知识,并将骨科学的发展放在整个社会发展的大背景下进行审视,开设大师讲坛,引发对骨科学及其临床、研究工作者未来发展的思考与讨论。

在会议形式上,将设立 5 个分会场(基础会场、创伤会场、脊柱会场、关节会场、骨病会场),并成立讲师组作专题指导讲座和经验交流、分专题展示板报,以及展览现代化医疗设备、器械、药品、图书及视频教材,还将提供多个手术演示平台,将不同的手术风格、更细致的手术技巧、更新的手术理念真实地展现给与会者。这些都将成为本次会议的特色和亮点。相信您的出席将不虚此行。

报名参会或阅读具体日程请登陆: [www.congress.com.cn/cico](http://www.congress.com.cn/cico)

### 本刊关于“通讯作者”有关事宜的通知

本刊要求集体署名的文章必须明确通讯作者。凡文章内注明通讯作者的稿件,与该稿件相关的一切事宜(包括邮寄稿件、收稿通知单、退稿、退修稿件、校样、版面费、稿费、赠刊等)均与通信作者联系。如文内未注明通讯作者的文章,按国际惯例,有关稿件的一切事宜均与第一作者联系,特此声明!

《中国骨伤》杂志社