

软骨细胞周基质对软骨细胞作用的研究进展

韩俊亮, 段王平, 史光华, 苑伟, 卫小春

(山西医科大学第二医院骨科, 山西省骨与软组织损伤修复山西省重点实验室, 太原 030001)

【摘要】 软骨细胞周基质(pericellular matrix, PCM)是软骨细胞周围的狭窄基质条带, 与其包绕的软骨细胞共同组成软骨单位。大量研究表明 PCM 富含蛋白多糖、胶原蛋白和纤维蛋白, 且在调节软骨细胞代谢微环境方面发挥着重要作用。用微管吮吸技术直接检测软骨单位发现, PCM 与软骨细胞和软骨细胞外基质的力学特性明显不同。然而, 关于 PCM 的功能还不是十分明确, 仍需进一步研究。

【关键词】 软骨细胞; 细胞周基质; 综述文献

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2015.06.022

Research on pericellular matrix properties for chondrocytes HAN Jun-liang, DUAN Wang-ping, SHI Guang-hua, YUAN Wei, and WEI Xiao-chun. Department of Orthopaedics, the Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi, China

ABSTRACT Pericellular matrix (PCM) is a narrow tissue region surrounding chondrocytes, which "chondron" with its enclosed cells. A number of studies suggested that PCM is rich in proteoglycans, collagen and fibronectin, and plays an important role in regulating microenvironment of chondrocytes. Direct measures of PCM properties through micropipette aspiration technique showed that PCM was different from mechanical property of chondrocytes and nature extracellular matrix. However, the function of PCM is not clear, and need further study.

KEYWORDS Chondrocytes; Pericellular matrix; Reviews literature

Zhongguo Gu Shang/China J Orthop Trauma, 2015, 28(6): 576-579 www.zggszz.com

软骨细胞周基质(pericellular matrix, PCM)是软骨细胞外的环形基质条带, 与其包绕的软骨细胞共同构成软骨单位(chondron)^[1]。长期以来, 一直采用机械匀化法^[2]分离软骨单位, 此方法获得的量少且不完整, 关于软骨单位的研究报道较少。近年来人们通过体外酶消化法^[3]获得大量较完整的软骨单位, 且能更好地保留组织中的蛋白多糖和胶原纤维^[4], 这为软骨单位及 PCM 的体外研究提供依据。大量研究证实, PCM 为软骨细胞提供代谢微环境, 在软骨细胞生物学、力学信号传导方面发挥着重要作用, 并对软骨细胞有力学保护作用^[5]。本文就 PCM 对软骨细胞生长代谢的影响及其生物学、力学方面的功能作一综述。

1 PCM 的主要组成成分

PCM 的组成成分与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)相似, 但前者蛋白多糖和胶原纤维的含

量更高, 对软骨细胞的影响更大^[6]。PCM 中的蛋白多糖类主要包括聚集蛋白聚糖、透明质酸糖胺多糖、核心蛋白多糖、基底膜蛋白多糖等^[7], 其中基底膜蛋白多糖是 PCM 中主要的硫酸肝素类蛋白聚糖, 参与细胞增殖、黏附和细胞基质组装, 其主要存在于软骨基质、血管基底膜和肝脏中^[8]。PCM 中的胶原纤维主要包括 II、VI、IX 型胶原, 其中 VI 型胶原是 PCM 的特异性胶原, 也是 PCM 与 ECM 的主要不同之处^[9]。除此之外, PCM 中蛋白还有转化生长因子 β 诱导蛋白、过氧化物还原蛋白 4 (PRDX-4)、金属蛋白酶 28 (ADAM-28)、磷酸异构酶等催化蛋白^[10]。

基底膜蛋白多糖在关节软骨中的作用还不是十分明确, 然而在维持软骨细胞结构功能方面有重要作用, 基底膜蛋白多糖通过 HS 链与 VI 型胶原产生静电亲和力^[11], 同时又可与纤维连接蛋白和层连蛋白相互作用, 并通过 HS 链传递电子^[12]。Gustafsson 等^[13]敲除小鼠蛋白多糖基因后发现, 小鼠长骨生长板排列紊乱、出现软骨内骨化、胶原纤维网减少且异常。类似地, Wilusz 等^[14]用基底膜蛋白多糖酶消化 PCM 中的基底膜蛋白多糖后, 发现软骨单位的弹性模量比未处理时高, 表明基底膜蛋白多糖在 PCM 力学功能方面也有重要作用。

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31271033, 31340010); 2013 年山西省基础研究计划项目(编号: 2013021036-3)

Fund program: Provided by National Natural Science Foundation of China (No. 31271033, 31340010)

通讯作者: 卫小春 E-mail: weixiaochun11@126.com

Corresponding author: WEI Xiao-chun E-mail: weixiaochun11@126.com

VI型胶原是 PCM 中的特异性胶原,其结构为异质三聚体[$\alpha 1(140\text{kDa})$ 、 $\alpha 2(130\text{kDa})$ 、 $\alpha 3(\sim 200\text{kDa})$],形成纤维网状结构把软骨细胞固定在 PCM 中^[15]。研究发现,破坏 VI型胶原后,PCM 将快速降解促使软骨细胞去分化,同时,将小鼠的 VI型胶原基因敲除后,其关节软骨退变速度加快,说明 VI型胶原对关节软骨结构功能的维持有重要作用^[16]。Wilusz 等^[17]用原子力显微镜刚性映射技术与免疫荧光造影技术对 PCM 冰冻组织切片研究分析,发现人类关节软骨不同层次 PCM 的弹性模量差异不大,且缺乏 VI型胶原的 PCM 弹性模量较高,提示 PCM 的力学功能主要是通过 VI型胶原发挥作用。

2 PCM 的生物学功能

2.1 PCM 对软骨细胞生长代谢的影响

PCM 为软骨细胞提供代谢微环境,通过调控细胞生物化学因子和生物物理因子的表达,对细胞的生物合成进行调节^[18]。PCM 决定软骨细胞与周围组织的相互作用,可影响细胞的黏附、细胞增殖(有丝分裂)、细胞的移动、细胞分子转移和细胞机械力学传导^[19]。段王平等^[1]研究证实,软骨单位在培养初期增殖较慢,而后期随着 PCM 的降解,释放出的软骨细胞能快速增殖,提示在体外培养时 PCM 可能较好保留软骨细胞基因表达和增殖能力。Farnsworth 等^[20]用聚乙二醇凝胶(PEG)包裹牛新鲜软骨细胞,使其发生光聚合反应,检测到细胞内的氧自由基增多且细胞膜发生脂质过氧化反应;同时用保留 PCM 的软骨细胞进行相同的实验发现,其产生的氧自由基和细胞膜的脂质过氧化反应均降低,并且软骨细胞合成和分泌蛋白多糖、II、VI型胶原的量增多。Youn 等^[21]对软骨单位和软骨细胞加以力学刺激发现,保留 PCM 的软骨细胞合成和分泌糖胺多糖、II型胶原的能力较单纯软骨细胞强;用其他支架材料(如几丁糖)包裹的软骨细胞进行同样的力学刺激,其糖胺多糖和 II型胶原的表达也有一定的增高,但仍低于 PCM 存在时软骨细胞的表达量,表明 PCM 在传导力学作用的同时还可影响软骨细胞的代谢合成。Twomey 等^[22]通过慢病毒载体干扰 VI型胶原、核心蛋白多糖的基因表达,结果显示,VI型胶原和核心蛋白多糖可在骨髓间充质干细胞向软骨细胞分化层面发挥作用,影响 PCM 的组成成分、生物力学功能,另外发现 PCM 中抑制软骨细胞应力变形作用的成分也是 VI型胶原和核心蛋白多糖。

2.2 PCM 对软骨细胞生物信号转导作用

PCM 紧密包绕在软骨细胞周围,理论上称为软骨细胞与 ECM 相互作用的主要“媒介”,细胞表面的受体(例如整合素)与 ECM 组分之间的相互作用是

在 PCM 水平上进行,软骨细胞接受的生物信号可能被 PCM 影响^[11]。在 PCM 中,影响软骨细胞生物信号转导的主要是蛋白多糖分子,PCM 中蛋白多糖种类较多且对生长因子具有亲和力,较易捕获从 ECM 释放的生长因子,形成复合物并对其修饰调节。Chuang 等^[23]用免疫纯化法从人类胎儿软骨细胞中提取基底膜蛋白多糖进行研究分析发现,基底膜蛋白多糖与成纤维细胞生长因子(FGFs)及成纤维细胞生长因子受体(FGFRs)形成 HS-依赖性三聚体,是基底膜蛋白多糖传递生物信号的主要途径。PCM 还可修饰 ECM 中传导生物信号的蛋白多糖。Sandy 等^[24]用同位素标记法标记兔膝关节软骨 ECM 的蛋白多糖前体的硫酸根(35SO_4),分离关节软骨后提取蛋白多糖检测,1.5 h 后仅有 5%的蛋白聚糖与透明质酸盐结合,24 h 后约有 30%的蛋白多糖与透明质酸结合,表明 PCM 可促进蛋白多糖与透明质酸盐形成复合物的成熟,进而实现生物信号的转导。另外,Wang 等^[25]也对骨细胞的 PCM 做了相关研究,用光漂白成像后复原法与流体动力学相结合的方法对鼠骨细胞的 PCM 进行测定,证实 PCM 作为骨细胞的传感器可调节细胞的压力刺激、细胞的敏感性和细胞在体外的适应性。

3 PCM 的力学作用

3.1 PCM 对软骨细胞力学保护作用

关节软骨在正常低负荷生理应力作用下,关节液与软骨基质内液之间相互交换使软骨细胞获取营养进而维持软骨正常的结构和功能,然而过度的负荷、持续静压力、动态压力则可能使软骨细胞产生一些病理改变。在压缩应力作用下,PCM 表现出黏弹性反应,对软骨细胞具有明显的应力保护作用,PCM 的弹性模量(40~70 kPa)和渗透系数(10~17 m⁴/Ns)比 ECM 的弹性模量(0.5~1.0 MPa)和渗透系数(10~16 m⁴/Ns)低一个数量级,且不同层次 PCM 的泊松比、弹性模量和渗透性并无明显差异,这对软骨细胞的液体流动和应力-应变有重要影响^[26]。段王平等^[27]用微管吸吮结合半无限体细胞力学模型定量分析软骨细胞及软骨单位黏弹性力学特性,结果显示,软骨单位与软骨细胞相同,在微管吸吮负压状态下发生黏弹性蠕变行为,表现为黏弹性固体特征。但软骨单位发生黏弹性蠕变行为时所需的微管负压较高,并且发生蠕变的幅度降低,蠕变时间更短。de Vries 等^[28]把软骨单位在海藻酸盐中立体培养,对其进行持续的压力刺激,在不同时间点用组织学和生物化学方法检测 PCM 的厚度和软骨细胞的应力变形,用反向有限元模型检测 PCM 和软骨细胞的力学功能,结果显示,PCM 可降低软骨细胞的死亡率,并对受

到机械刺激的软骨细胞具有保护作用。Alexopoulos 等^[29]用双向有限元模型研究细胞-PCM-ECM 结构, 结果发现, PCM 除可以缓解软骨细胞受力外, 还可阻止细胞周围的液体流动, 然而与之不相符的是, PCM 还能区域性使扩大细胞应力变形, 这与前期一些学者的研究结果也存在矛盾, 详细机制还需进一步明确。通过共聚焦显微镜对成年猪膝关节软骨单位进行三维立体重建后, 发现关节软骨浅层和深层 PCM 的结构明显不同, 从浅表层到深层软骨单位包含的细胞数逐渐增多, 浅层以包含 1 个细胞为主, 中、深层的软骨单位主要包含 2~4 个软骨细胞, 这种形态结构的改变对软骨细胞的应力-应变有重要影响^[21]。Han 等^[30]从微观和宏观尺度对不同层次的软骨单位研究发现: 关节软骨浅层 PCM 含量较少、细胞硬度较大, 主要靠细胞硬度抵抗应力-应变; 中、深层的 PCM 含量较多, 主要靠 PCM 抵抗应力-应变, 来缓解软骨细胞受力。另外, PCM 还可改变软骨细胞的受力方向, Appelman 等^[5]用细胞基质的有限元模型法研究 PCM 的作用, 结果显示: 无 PCM 存在时软骨细胞的应力梯度为“Z”字形, 细胞受到不可逆的损伤; 而有 PCM 存在时软骨细胞的应力梯度为辐射状, 且受力范围更大, 使细胞受到的损伤减小。为进一步明确 PCM 对软骨细胞的保护作用, Peters 等^[31]用碘醋酸-钠处理软骨细胞和软骨单位后发现, 软骨细胞的死亡率和凋亡率分别为 27% 和 9%, 而软骨单位的死亡率和凋亡率分别为 12% 和 1.6%; 类似地, 用星状孢子素处理后发现, 软骨细胞的凋亡率为 13%, 软骨单位的凋亡率为 3%, 此结果说明 PCM 对软骨细胞在生物化学方面也有保护作用。

3.2 PCM 对软骨细胞力学信号的传导作用

软骨细胞对机械力学刺激(压缩、拉伸、剪切力和静水压力)非常敏感, 其应力环境非常复杂, 受多方面因素的影响, 整合素是细胞膜表面最重要的应力受体, 通过 ECM—整合素—细胞骨架传导通路完成力学信号的传导^[32]。整合素是一种重要细胞膜黏附蛋白, 由一个 α 亚基和一个 β 亚基构成二聚体结构, 两个亚基均含有细胞外片段、跨膜片段和胞内片段三部分, 它与相应的细胞周基质胶原蛋白相互作用是软骨细胞力学信号转导的前提。Luechinetti 等^[33]对牛关节软骨施加连续 6 h 和 24 h 的周期性压力后, 用流式细胞仪检测软骨细胞整合素亚基的表达量, 发现整合素亚基 $\alpha 5$ 的表达增加, 且在加压 6 h 后其表达量达峰值, 卸载压力 24 h 后又恢复到施压前的水平, 说明整合素 $\alpha 5$ 可能是软骨细胞的主要力学感受器。PCM 中胶原蛋白与整合素的作用还不是十分明确, 初步研究证实, PCM 主要是通过 II、VI 型

胶原与整合素家族中的 $\alpha 1\beta 2$ 和 $\alpha 2\beta 1$ 亚基相互作用对软骨细胞力学信号进行传递和调节。Lahiji 等^[34]又对体外培养的软骨细胞施加连续 24 h 的牵张力后, 结果发现 II 型胶原的表达上调, 且整合素 $\alpha 2$ 和 $\alpha 5$ 的表达也有上调, 表明整合素亚基的表达量与基质成分的变化具有一定的协同性, 提示 PCM 通过 II 型胶原调节整合素的表达来应答力学刺激。整合素的亚基较多, 与胶原蛋白的作用复杂, 转导力学信号的详细机制还需进一步深入研究。

4 展望

综上所述, PCM 为软骨细胞提供代谢微环境, 调节软骨细胞的合成和分泌, 在软骨细胞生物学和力学信号传导方面有重要作用; 当软骨受到外力作用时, 不同层次不同形态的 PCM 可以对压力进行分解, 减少细胞受力进而保护软骨细胞。另外, 在保留 PCM 时, 软骨细胞还可保持原有的基因表型和增殖能力, 使其在体外培养时不易发生分化。目前, 软骨组织工程修复关节软骨损伤常用的种子细胞是单纯软骨细胞, 软骨单位的出现为种子细胞的选择提供新思路, 是否可将软骨单位作为组织工程的种子细胞, 还需进一步更深入的研究。

参考文献

- [1] 段王平, 孙振伟, 卫小春. 关节软骨中最基本的解剖功能结构: 软骨单位[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(24): 4557-4560.
Duang WP, Sun ZW, Wei XC. Chondron: a basic microanatomical unit in articular cartilage[J]. Zhongguo Zu Zhi Gong Cheng Yan Jiu Yu Lin Chuang Kang Fu, 2010, 14(24): 4557-4560. Chinese.
- [2] 卫小春. 关节软骨[M]. 北京: 科学技术出版社, 2007: 10-11.
Wei XC. Articular Cartilage[M]. Beijing: Science and Technology Press, 2007: 10-11. Chinese.
- [3] 段王平, 孙振伟, 李琦, 等. 兔膝关节软骨单位体外酶解法消化分离的实验研究[J]. 中国药物与临床, 2010, 10(8): 874-877.
Duan WP, Sun ZW, Li Q, et al. Rabbit knee joint cartilage in vitro experimental study on the enzymatic digestion of separation[J]. Zhongguo Yao Wu Yu Lin Chuang, 2010, 10(8): 874-877. Chinese.
- [4] Lee GM, Poole CA, Kelley SS, et al. Isolated chondrons: a viable alternative for studies of chondrocyte metabolism in vitro[J]. Osteoarthritis Cartilage, 1997, 5(4): 261-274.
- [5] Appelman TP, Mizrahi J, Seliktar D. A finite element model of cell-matrix interaction to study the differential effect of scaffold composition on chondrogenic response to the mechanical stimulation[J]. J Biomech Eng, 2011, 4: 041010.
- [6] Vonk LA, Doulabi BZ, Huang CL, et al. Preservation of the chondrocyte's pericellular matrix improves cell-induced cartilage formation[J]. J Cellular Biochem, 2010, 110(1): 260-271.
- [7] Poole CA, Ayad CA, Schofield JR. Chondrons from articular cartilage. (IV). Immunolocalization of proteoglycan epitopes in isolated canine tibial chondrons[J]. J Histochem Cytochem, 1991, 39(9): 1175-1187.
- [8] Kvist AJ, Nystrom A, Hultenby K, et al. The major basement mem-

- brane components localize to the chondrocyte pericellular matrix-a cartilage basement membrane equivalent[J]. *Matrix Biol*, 2008, 27(1): 22-33.
- [9] Poole CA. Articular cartilage chondrons: form, function and failure[J]. *J Anat*, 1997, 191(Pt1): 1-13.
- [10] Zhang Z, Jin W, Beckett J, et al. A proteomic approach for identification and localization of the pericellular components of chondrocytes[J]. *Histochem Cell Biol*, 2011, 136(2): 153-162.
- [11] Tillet E, Wiedemann H, Golbik R, et al. Recombinant expression and structural and binding properties of alpha1 (VI) and alpha 2 (VI) chains of human collagen type VI[J]. *Eur J Biochem*, 1994, 221(1): 177-185.
- [12] Hopf M, Göhring W, Mann K, et al. Mapping of binding sites for nidogens, fibulin-2, fibronectin and heparin to different IG modules of perlecan[J]. *J Mol Biol*, 2001, 311(3): 529-541.
- [13] Gustafsson E, Aszodi A, Ortega N, et al. Role of collagen type II and perlecan in skeletal development[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 995: 140-150.
- [14] Wilusz RE, Defrate LE, Guilak F. A biomechanical role for perlecan in the pericellular matrix of articular cartilage[J]. *Matrix Biol*, 2012, 31(6): 320-327.
- [15] Guilak F, Alexopoulos LG, Upton ML, et al. The pericellular matrix as a transducer of biomechanical and biochemical signals in articular cartilage[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1068: 498-512.
- [16] Alexopoulos LG, Youn I, Bonaldo P, et al. Developmental and osteoarthritic change in Col6a1-knockout mice; biomechanics of type VI collagen in the cartilage pericellular matrix[J]. *Arthritis Rheum*, 2009, 60(3): 771-779.
- [17] Wilusz RE, Defrate LE, Guilak F, et al. Immunofluorescence-guided atomic force microscopy to measure themicromechanical properties of the pericellular matrix of porcine articular cartilage[J]. *J R Soc Interface*, 2012, 9(76): 2997-3007.
- [18] Larson CM, Kelley SS, Blackwood AD, et al. Retention of the native chondrocyte pericellular matrix result in significantly improved matrix production[J]. *Matrix Biol*, 2002, 21(4): 349-359.
- [19] McLane LT, Chang P, Granqvist A, et al. Spatial organization and mechanical properties of the pericellular matrix on chondrocytes[J]. *Biophys J*, 2013, 104(5): 986-996.
- [20] Farnsworth N, Bensard C, Bryant SJ. The role of the PCM in reducing oxidative stress induced by radical initiated photoencapsulation of chondrocytes in poly(ethylene glycol) hydrogels[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2012, 20(11): 1326-1335.
- [21] Youn I, Chou JB, Vao L, et al. Zonal variations in the three dimensional morphology of the chondron measured in situ using confocal microscopy[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2006, 9: 889-897.
- [22] Twomey JD, Thakore PI, Hartman DA, et al. Roles of type VI collagen and decorin in human mesenchymal stem cell biophysics during chondrogenic differentiation[J]. *European Cells Materials*, 2014, 27: 237-250.
- [23] Chuang CY, Lord MS, Melrose J, et al. Heparan sulfate-dependent signaling of fibroblast growth factor by chondrocyte-derived perlecan[J]. *Biochemistry*, 2010, 49(26): 5524-5532.
- [24] Sandy JD, O'Neill JR, Ratzlaff LC. Acquisition of hyaluronate-binding affinity in vivo by newly synthesized cartilage proteoglycans[J]. *Biochem J*, 1989, 258(3): 875-880.
- [25] Wang B, Lai X, Price C, et al. Perlecan-containing pericellular matrix regulates solute transport and mechanosensing within the osteocytelacunar-canalicular system[J]. *J Bone Miner Res*, 2014, 29(4): 878-891.
- [26] Alexopoulos LG, Williams GM, Upton ML, et al. Osteoarthritic changes in the biphasic mechanical properties of the chondrocyte pericellular matrix in articular cartilage[J]. *Biomech*, 2005, 38(3): 509-517.
- [27] 段王平, 孙振伟, 李琦, 等. 兔膝关节软骨单位微管吸吮黏弹性力学分析[J]. *中华骨科杂志*, 2011, 31(4): 379-383.
- Duan WP, Sun ZW, Li Q, et al. Viscoelastic properties of chondrons enzymatically isolated from rabbit knee articular cartilage in vitro[J]. *Zhonghua Gu Ke Za Zhi*, 2011, 31(4): 379-383. Chinese.
- [28] de Vries SA, van Turnhout MC, Oomens CW, et al. Deformation thresholds for chondrocyte death and the protective effect of the pericellular matrix[J]. *Tissue Eng Part A*, 2014, 20(13-14): 1870-1876.
- [29] Alexopoulos LG, Setton LA, Guilak F. The biomechanical role of the chondrocyte pericellular matrix in articular cartilage[J]. *Acta Biomater*, 2005, 1(3): 317-325.
- [30] Han SK, Federico S, Herzog W. A depth-dependent model of the pericellular microenvironment of chondrocyte in articular cartilage[J]. *Comput Methods Biomech Biomed Engin*, 2011, 7(14): 657-664.
- [31] Peters HC, Otto TJ, Enders JT, et al. The protective role of the pericellular matrix in chondrocyte apoptosis[J]. *Tissue Eng Part A*, 2011, 17(15-16): 2017-2024.
- [32] Garmy-Susini B, Avraamides CJ, Schmid MC, et al. Integrin $\alpha 4 \beta 1$ signaling is required for lymphangiogenesis and tumor metastasis[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(8): 3042-3051.
- [33] Luechinetti E, Bhargava MM, Torzilli PA. The effect of mechanical load on integrin subunits $\alpha 5$ and $\beta 1$ in chondrocytes from mature and immature cartilage explants[J]. *Cell Tissue Res*, 2004, 315(3): 385-391.
- [34] Lahiji K, Polotsky A, Hungerford DS, et al. Cyclic strain stimulates proliferative capacity, $\alpha 2$ and $\alpha 5$ integrin, gene marker expression by human articular chondrocytes propagated on flexible silicone membranes[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anita*, 2004, 40(5-6): 138-142.

(收稿日期: 2014-05-20 本文编辑: 王玉蔓)