

• 基础研究 •

EGF 和 IGF 对体外培养兔关节软骨细胞的影响

王振海¹ 付勤² 赵忠海² 肖逸鹏²

(1. 中国人民解放军第 463 医院骨科, 辽宁 沈阳 110042; 2. 中国医科大学第二临床医院)

【摘要】 目的 了解表皮生长因子(EGF)和胰岛素样生长因子(IGF)对体外培养兔关节软骨细胞存活数目和分裂增殖百分数的影响。方法 体外培养兔关节软骨细胞传至第 2 代,分别以 EGF、IGF,以及二者不同的浓度组合作用于软骨细胞。通过酶联免疫检测仪(MTT)测定软骨细胞存活数,流式细胞仪测定软骨细胞分裂增殖百分数。结果 不同浓度 EGF 对兔关节软骨细胞存活和分裂增殖均有促进作用,作用浓度强度次序为:10 ng/ml > 0.1 ng/ml > 100 ng/ml。不同浓度 IGF 对兔关节软骨细胞的存活和分裂增殖均有较强促进作用,浓度为 50 ng/ml 时,刺激效果最显著。EGF 与 IGF 联合使用时,刺激效果优于任何一种因子单独使用,而以 EGF 10 ng/ml 和 IGF 50 ng/ml 为最佳浓度组合。结论 EGF 和 IGF 都可促进兔关节软骨细胞存活和分裂增殖,但以协同作用效果最佳。

【关键词】 表皮生长因子; 胰岛素样生长因子; 软骨; 细胞,培养的

Influence of EGF and IGF on articular cartilage cells of rabbit in vitro WANG Zhenhai, FU Qin, ZHAO Zhonghai, et al. The 463rd Hospital of PLA (Liaoning Shenyang, 110042, China)

【Abstract】 Objective To study the influence of epidermal growth factor(EGF) and insulin like growth factor(IGF) on the survival number and the splitting proliferation percentage of articular cartilage cells in rabbit in vitro **Methods** The cultured monolayer cells of articular chondrocytes in rabbit in vitro have been transferred to the second generation and the articular chondrocytes were treated with EGF or IGF, as well as the combinations of the both in various concentrations. The survival number of chondrocytes was investigated by MTT enzyme linked immunometric meter and the splitting proliferation percentage of chondrocytes was determined by flow cytometer. **Results** EGF with various concentrations had auxo action on the survival number and the splitting proliferation percentage of articular chondrocytes in rabbit. The intensity of the auxo action decreases in the following order: 10 ng/ml > 0.1 ng/ml > 100 ng/ml. IGF of various concentrations exhibited stronger auxo action on the survival number and the splitting proliferation percentage of articular chondrocytes in rabbit than that of EGF. The most significant stimulation occurred at the concentration of 50 ng/ml. The cooperation of EGF and IGF was superior to either of the growth factors in stimulation and the best combining concentration was 10 ng/ml of EGF and 50 ng/ml of IGF. **Conclusion** It is shown that EGF and IGF are able to promote the survival number and the splitting proliferation percentage of articular chondrocytes in rabbit, but the cooperation of the both exhibits the best result.

【Key words】 Epidermal growth factor(EGF); Insulin like growth factor(IGF); Cartilage; Cells, cultured

外伤或疾病引起的关节软骨损伤在临床上很常见,但软骨组织中不具有血管与神经,其损伤后不易自我修复。对于关节软骨损伤的修复在目前的骨科临床、基础研究中是一个重要的课题。许多研究表明,生物活性因子在关节软骨的损伤、修复机制中,起着重要的调节作用。如胰岛素样生长因子(Insulin-like Growth Factor, IGF)可刺激软骨细胞分化

的表型^[1,2]。表皮生长因子(Epidermal Growth Factor, EGF)具有很强的促有丝分裂和刺激合成代谢的作用^[3]。在体内许多细胞表面都表达 EGF 受体^[4]。本实验在培养 2 周龄新西兰白兔关节软骨细胞中,通过 EGF、IGF 的分别作用和协同作用,了解其对软骨细胞存活数目和分裂增殖的影响,为关节软骨细胞的修复提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 软骨细胞的培养 无菌条件下, 片状切取 2 周龄新西兰白兔关节面软骨 (肱骨近端、股骨近、远端及胫骨近端), 放入 PBS 液冲洗 2 次, 将软骨片切成 1.0 mm × 1.0 mm × 1.5 mm 左右小粒。经 0.2% II 型胶原酶 10 ml, 37 °C 条件下振荡消化 3.5 h, 再用 200 目不锈钢滤网过滤, 去除杂质, 获取细胞。此细胞用 PBS 液洗、1500 rpm 离心 5 min 3 遍, 弃上清, 沉淀物接种到含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 调整细胞数目约 2×10^5 /ml, 在培养瓶中培养, 培养条件为 37 °C、5% CO₂。原代细胞贴壁后, 隔日更换培养基, 汇合成单层细胞后, 传代培养。

1.2 细胞因子对软骨细胞存活数目的影响 取第 2 代软骨细胞, 在培养液中配成 1×10^4 /ml 浓度, 接种 4 块 96 孔培养板, 每板接种 48 孔, 24 h 待细胞贴壁后, 每块板加入相应浓度细胞因子, 即将每块多孔板上的细胞随机分成 12 组, 每组 4 孔。其中 1- 3 组加不同浓度的 EGF; 4- 6 组加不同浓度的 IGF; 7- 11 组加不同浓度的 EGF 和不同浓度的 IGF 的各种组合; 第 12 组为对照组, 不加任何因子。各孔中分别加入细胞生长因子的量为 0.1 ml (详见表 1)。

表 1 每组中 EGF 和 IGF 浓度 (ng/ml)

组别	EGF	IGF	组别	EGF	IGF
1	0.1	/	7	0.1	100
2	10	/	8	10	50
3	100	/	9	10	10
4	/	10	10	100	50
5	/	50	11	100	10
6	/	100	12	/	/

24 h 以后, 于相应培养板的各小孔加入 5 mg/ml MTT 液 0.02 ml, 送 5% CO₂ 孵育箱内培养 5 h, 取出后吸除培养液, 仅留少量残液, 加入 0.2 ml DMSO (二甲基亚砷) 振荡 10 min。以酶联免疫检测仪测定光密度值 (OD 值)。

1.3 细胞因子对软骨细胞增殖的影响 将第 2 代软骨细胞按 3.96×10^4 /ml 浓度, 接种 2 块 24 孔培养板, 每板接种 12 孔, 在含 3% 胎牛血清的培养基中培养。然后随机分成 4 个组, 每组 3 孔, 即第 1 组加浓度为 10 ng/ml 的 EGF; 第 2 组加浓度为 50 ng/ml 的 IGF; 第 3 组加浓度为 10 ng/ml 的 EGF 和浓度为 50 ng/ml 的 IGF; 第 4 组不加任何因子, 为对照组。各孔中分别加入细胞生长因子的量为 0.1 ml。

1 周后, 用胰蛋白酶消化后将各孔分别收集, 制备样本, 行激光流式细胞仪检测^[5]。每个样本测得

的细胞周期图形, 使用机器自备的软件处理, 计算出细胞 G₂/M 期和 S 期的百分比, 采用增殖指数 (处于 G₂/M 期和 S 期的百分比) 表示细胞增殖情况。

1.4 数据统计 数据结果使用 SAS 6.12 软件, 通过多因素析因设计分析方法进行统计, 并进行组间两两比较。

2 结果

2.1 细胞存活数情况 以酶联免疫检测仪 (MTT) 测定的光密度 (OD) 值, 检测波长为 490 nm, 参考波长为 600 nm。因为细胞存活数与 OD 值成正比, 所以 OD 值可作为细胞相对数, 可直接反映细胞数。根据结果绘出加不同浓度 EGF 或 (和) IGF 后的 OD 值直方图 (见图 1)。

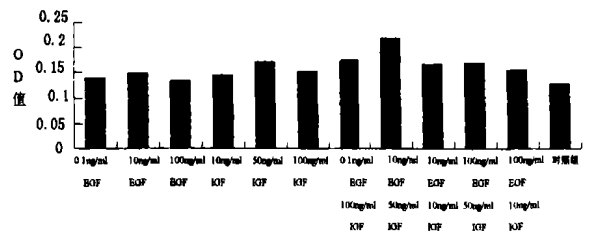


图 1 加不同浓度 EGF 或 (和) IGF 后的细胞存活数 OD 值直方图

2.2 细胞增殖数情况 将流式细胞仪测定结果按 G₂/M 期和 S 期的百分数比值, 转换成增殖指数, 表示增殖情况, 绘出直方图 (见图 2)。各组经统计分析, 与对照组比较, 表明 EGF 和 IGF 都可促进软骨细胞增殖, 而 IGF 效果优于 EGF, 当二者联合使用时, 促进效果最显著 ($P < 0.01$)。

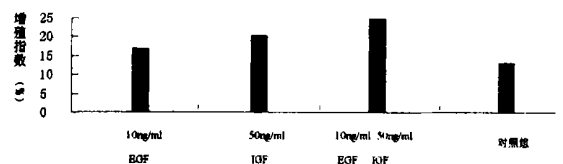


图 2 加入不同因子后软骨细胞增殖指数 (%) 直方图

3 讨论

EGF、IGF 都是体内重要的生长因子之一, 具有重要的生理学特性^[4]。EGF 对多种组织来源的上皮细胞具有强的致有丝分裂活性, 同时还刺激各种间充质细胞的增殖分化^[6], 它可刺激培养的兔肋软骨细胞分化的表型^[7]。IGF 作为一族依赖生长激素的多肽蛋白, 能在骨与软骨发育的不同阶段起作用。IGF 对体外培养的软骨细胞可刺激分化中的软骨细胞的增殖, 并合成软骨基质, 同时可维持软骨细胞表型^[8]。

在本实验中, 通过 MTT 检测软骨细胞存活数,

以及通过流式细胞仪对软骨细胞增殖指数的测定,从图 1 可以看出,不同浓度 EGF 对软骨细胞的存活数有不同的促进作用($P < 0.01$),不同浓度强度次序为 $10 \text{ ng/ml} > 0.1 \text{ ng/ml} > 100 \text{ ng/ml}$,浓度为 10 ng/ml 时刺激效果最强。目前认为,EGF 对软骨细胞的效应是通过 EGF 受体进行调节的^[9],这种作用的基础是致有丝分裂活性^[10]。Bonassar 等^[11] 研究发现:用 EGF 处理后的软骨细胞可刺激蛋白合成增加 $30\% \sim 50\%$,这种增加是由于增加了每个受体的数量,而受体亲和力未改变。Yoon 等^[12] 认为:外源性 EGF 抑制间充质细胞的软骨细胞分化。在本实验中,在 EGF 高浓度(100 ng/ml)时对细胞增殖数促进作用不如低浓度,说明 EGF 活性可能有强的剂量依赖。从图 1 中,不同浓度 IGF 对软骨细胞的增殖均有较强的促进作用,但浓度为 50 ng/ml 时,刺激效果最显著。综合图 1、图 2,EGF 与 IGF 的联合应用中,各浓度组合均有刺激软骨细胞分裂增殖作用,但是以 EGF 10 ng/ml 和 IGF 50 ng/ml 的浓度组合刺激能力最强,此浓度组合优于任何一种因子单独的刺激作用($P < 0.01$)。这种协同机制是通过生长激素-IGF 轴而进行的^[11]。Bonassar 等^[11] 进行研究时发现,用 EGF 处理后 IGF 对软骨细胞有丝分裂活性增加 90% ,蛋白聚糖合成增加 60% ,说明二者在软骨生长调节中起相互促进的协同作用。通过本实验证实了这一点。

本实验筛选出了对体外软骨细胞增殖刺激作用最强的 EGF 和 IGF 浓度组合,即 EGF 浓度为 10 ng/ml 、IGF 浓度为 50 ng/ml 时为最佳。应用 EGF 单因子时对软骨细胞存活数和增殖数在一定浓度范围内有不同增加,应用 IGF 单因子时对软骨细胞存活数和增殖数增加明显,而 EGF 与 IGF 协同作用时,效果最强,且优于单独应用 EGF 或 IGF。说明细胞生长因子对软骨细胞的作用效应依赖于多种因

素,同时也可说明,各种生长因子在相互促进、相互抑制的平衡机制中发挥协同作用,对于这种复杂机制的揭示有利于对体内因子相互作用机制的进一步认识。

参考文献

- 1 Salmon WD Jr, Daughaday WH. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J Lab Clin Med*, 1990, 116(3): 408-419.
- 2 Carrascosa A, Audi L. Human studies on the biological actions of IGF-1. Evidence suggesting that human fetal and postnatal epiphyseal cartilage is a target tissue for IGF-1 action. *J Pediatr Endocrinol*, 1993, 6(3-4): 257-261.
- 3 Brown GL, Nanney LB, Griffen J, et al. Enhancement of wound healing by topical treatment with epidermal growth factor. *N Engl J Med*, 1989, 321(2): 76-79.
- 4 Carpenter G, Wahl MI. The epidermal growth factor family. Zn: Sporn MB, Roberts AB, Eds. *Peptide growth factors and their receptors*. Berlin: Springer-Verlag, 1990. 169-171.
- 5 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养. 西安: 世界图书出版社西安公司, 1996. 9.
- 6 Laato M. The effect of epidermal growth factor on granulation tissue formation in the rat. *Acta Chir Scand Suppl*, 1988, 546: 1-44.
- 7 Hiraki Y, Inoue H, Kato Y, et al. Combined effects of somatomedin-like growth factors with fibroblast growth factor or epidermal growth factor in DNA synthesis in rabbit chondrocytes. *Mol Cell Biochem*, 1987, 76(2): 185-193.
- 8 Isgaard J, Nilsson A, Lindahl A, et al. Effects of local administration of GH and IGF-1 on longitudinal bone growth in rats. *Am J Physiol*, 1986, 250(4): 367-372.
- 9 Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *Ann Rev Biochem*, 1979, 48: 193-216.
- 10 Taylor JM, Mitchell WM, Cohen S. Epidermal growth factor. Physical and chemical properties. *J Biochem*, 1972, 247(18): 5928-5934.
- 11 Bonassar LJ, Trippel SB. Interaction of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I in the regulation of growth plate chondrocytes. *Exp Cell Res*, 1997, 234(1): 1-6.
- 12 Yoon YM, Oh CD, Kim DY, et al. Epidermal growth factor negatively regulates chondrogenesis of mesenchymal cells by modulating the protein kinase C alpha, Erk-1 and P38 MAPK signaling pathways. *J Biol Chem*, 2000, 275(16): 12353-12359.

(收稿: 2002-05-13 编辑: 李为农)

北京天东电子医用设备公司供货信息

北京天东医疗设备有限公司生产部是多年生产口腔正畸材料、骨科器械及小针刀系列产品的专业厂家。审批文件: 京药器监(准)字 2001 年第 2550313 号, 京医械广审(文)200203021 号。

理办理小针刀邮购业务, 售价: I 型(20 支装)每套 120 元; II~III 型(10 支装)每套 90 元。每套加收 10 元包装邮资, 款到发货。地址: 北京天东医疗设备有限公司, 北京市丰台区三路居乙 12 号。邮编: 100073 电话: 010-63266458 63488112