

·基础研究·

压应力下兔软骨细胞的凋亡和 IL-1 β 、TNF- α 的相关性研究

刘文华¹ 刘 亚¹ 邱玉金¹ 田云虎¹ 常炳营¹

摘要 目的:观察持续及间歇压应力下关节软组织的组织学变化、软骨细胞的凋亡并测定关节液中细胞因子(IL-1 β 、TNF- α),探讨压应力下软骨细胞凋亡和关节软骨退变的相互关系及压应力下软骨细胞凋亡的相关机制。**方法:**在活体新西兰大白兔左后肢的髌股关节间造成持续及间歇的不同压应力模型,60只新西兰大白兔,随机分为7组:A组,对照组;B组,持续伸直位;C组,持续屈曲80°;D组,持续屈曲140°;B1组,间歇伸直位;C1,间歇屈曲80°;D1组,间歇屈曲140°。持续组于1周、2周、4周、6周、8周,间歇组于4周、8周、12周先进行髌股关节间压应力测试,然后取材利用HE染色、甲苯胺蓝染色、TUNEL等方法观察关节软骨细胞及关节软组织的组织学变化,并采用酶联免疫检测方法测定关节液中细胞因子的含量。**结果:**关节间持续及间歇的较高压应力可以引起关节软骨细胞凋亡并伴有软骨退变,并同时伴有关节液中细胞因子含量的升高;持续的压应力引起的变化大于间歇的压应力;较长时间的关节制动也可以引起上述变化。**结论:**关节间持续及间歇的较高压应力可以引起软骨细胞凋亡,并继而出现软骨退变,IL-1 β 和TNF- α 在软骨细胞凋亡过程中可能起重要作用。

关键词 压应力;软骨细胞;凋亡;退变;细胞因子

中图分类号:R493,R684.3 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2006)-09-0800-04

Effects of chondrocyte apoptosis and IL-1 β ,TNF- α under compressive stress/LIU Wenhua,LIU Ya, QIU Yujin, et al/Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2006, 21(9):800—803

Abstract Objective:To investigate the histologic changes of articular cartilage and the apoptosis of chondrocyte under continuous or intermittent compressive stress. To explore the relationship between chondrocyte apoptosis and the degeneration of cartilage,the possible mechanism of chondrocyte apoptosis under compressive stress. **Method:** Different continuous and intermittent compressive press model were designed between the patella and femur. 58 New Zealand white rabbits were randomly grouped into 7:group A:control group: group B:continuous straight; group C: continuous bend 80°; group D:continuous bend 140°;B1 group:intermittent straight;C1 group:intermittent bend 80°;D1 group:intermittent bend 140°. Continuous groups were killed at the time of 1week、2week、4week、8week,intermittent groups were killed at the time of 4week、8week、12week. Before killing,the compressive press between the patella and femur was firstly measured.The histologic changes of cartilage were investigated. The apoptosis of chondrocyte was detected. The amount of cytokines was analysed through ELISA method. **Result:**The higher compressive stress can induce the apoptosis of chondrocyte,then lead to the degeneration of cartilage. The amount of cytokine in synovial fluid also increased at the same time. The changes under the continuous compressive stress were more. The long period immobilization could induce the same changes. **Conclusion:**The higher compressive stress can induce the apoptosis of chondrocyte and lead to the degeneration of cartilage. IL-1 β and TNF- α may play an important role in the apoptosis of chondrocyte.

Author's address Dept. of Orthopaedics,the Affiliated Hospital of Weifang Medical College,Weifang 261031

Key words compressive stress; chondrocyte; apoptosis; degeneration; cytokine

骨性关节炎(osteoarthritis,OA)是最常见的关节疾病,但OA发生的原因及机制尚不完全清楚。生物力学是OA发生发展的原因之一,有关其发生机制的学说较多,但尚未确定^[1-4]。本研究通过动物模型在活体上对兔髌股关节造成不同压应力,在动态过程中观察了髌骨及股骨髌股关节面软骨细胞及关节软组织的组织学变化。旨在探讨压应力下软骨细胞凋亡和关节软骨退变的相互关系,以及压应力下软骨细

胞凋亡的相关机制,为阐明OA的发病机制及其临床防治提供一些新的线索。

1 材料和方法

1.1 动物模型的制作

1 潍坊医学院附属医院骨科,山东潍坊,261031

作者简介:刘文华,男,住院医师,硕士

收稿日期:2005-11-21

选兔左后肢为实验侧。持续组用管型石膏将左膝关节分别固定于伸直位、屈曲 80°位、屈曲 140°位。间歇组用石膏夹板将左膝关节分别固定于伸直位、屈曲 80°位、屈曲 140°位,每天固定 8h,常规饲养。

1.2 动物实验分组及标本的获取

取健康新西兰大白兔 60 只,随机分为 7 组,A 组:对照组;B 组:持续伸直位;C 组:持续屈曲 80°位;D 组:持续屈曲 140°位;B1 组:间歇伸直位;C1 组:间歇屈曲 80°位;D1 组:间歇屈曲 140°位。A 组 12 只,B、C、D 组各 10 只, B1、C1、D1 组各 6 只。持续组分别于 1 周、2 周、4 周、6 周、8 周取材,间歇组分别于 4 周、8 周、12 周取材。分别于相应的时间点,抽取关节液,于液氮中保存,然后处死动物,凿取髌骨及股骨髌股关节面软骨。

1.3 髌股关节面压应力测试

分别于相应的时间点,抽取关节液后,麻醉动物后立刻取实验侧肢体,保持膝关节所维持角度,在髌股关节间置入富士超低压敏片,然后取出已显色的压敏片,用 FD301 浓度计测量显色的浓度值,输入 FDP302 压力转换器,微电极自动计算后显示髌股关节之间的接触压应力值,单位是 kgf/cm²。

1.4 光镜标本的制备、染色和观察

体积分数 10%的福尔马林过夜、体积分数 5%盐酸脱钙、冲洗、脱水、透明、浸蜡、包埋、切片。HE 染色、甲苯胺蓝染色。

1.5 电镜标本的制备和观察

将标本切成 1mm³ 大小组织块,于 4℃、20g/L 戊二醛磷酸盐缓冲液(PBS)中固定 24h。后经 20%乙二

胺四乙酸二钠(EDTA-Na₂)脱钙 2 周,经 PBS 漂洗后,10g/L 四氧化锇固定 2h,脱水、浸透、环氧树脂包埋,超薄切片。醋酸双氧肟与柠檬酸铅双重染色,透射电镜下观察软骨细胞的改变。

1.6 原位末端标记 (TDT-mediate X-DUTP nick end labeling,TUNEL)检测软骨细胞凋亡率

将切成 5.0μm 厚的连续石蜡切片贴于涂有多聚赖氨酸的载玻片上,切片常规脱蜡水化。TUNEL 具体操作步骤详见博士德试剂说明书。以 PBS 代替一抗做阴性对照。凋亡的细胞核呈黄色,连续观察 10 个高倍视野,采用双盲法计数每 100 个细胞中的阳性细胞数,取其平均值作为该标本的细胞凋亡率。

1.7 IL-1β 和 TNF-α 含量的测定

关节液解冻后,分别用 IL-1β、TNF-α 双抗体用酶联免疫检测法(enzyme-linked immunosorbent Assay,ELISA)常规检测,在酶标仪(450nm)上测光密度(Optical Density,OD)值,查标准曲线得出 IL-1β(或 TNF-α)的值,单位为 ng/joint(或 mg/joint)。

1.8 统计学分析

计数资料以均数±标准差表示,组间比较采用配对资料 *t* 检验。对两变量资料行线性相关分析。

2 结果

2.1 兔髌股关节面压应力测试

同一组内各时期髌股关节间的平均压应力无明显的变化,差异无显著性(*P*>0.05)。同一时期,不同组 B、C、D 组间和 B1、C1、D1 组间差异有显著性意义(*P*<0.01),B、B1 组间和 C、C1 组间及 D、D1 组间差异无显著性(*P*>0.05),(见表 1)。

表 1 各组不同时期髌股关节平均接触压应力的比较

($\bar{x} \pm s$, kgf/cm²)

	B 组	C 组	D 组	B1 组	C1 组	D1 组
1 周	0.17±0.13	9.80±3.02	19.72±2.92			
2 周	0.11±0.02	9.34±1.84	21.30±1.97			
4 周	0.09±0.03	9.40±1.13	20.76±3.07	0.13±0.03	9.17±2.17	19.92±1.92
6 周	0.13±0.02	9.20±1.14	21.92±2.17			
8 周	0.10±0.02	8.96±1.27	20.60±1.29	0.12±0.02	9.25±1.27	21.62±1.98
12 周				0.09±0.03	9.43±1.47	20.60±2.23

2.2 关节软骨

HE、甲苯胺蓝染色观察 正常对照组各时期软骨细胞排列整齐,胞核大小均匀,着色较深,胞浆染色较淡,软骨细胞排列呈柱状。甲苯胺蓝染色深且分布均匀,遍布于关节软骨的全层。B、C 两组第 8 周时可见软骨细胞总的柱状排列稍紊乱,软骨表面仍然平整。甲苯胺蓝染色强度减弱。B1、C1 两组各期变化不明显。D 组 1 周时变化不明显,2 周时软骨细胞柱状排列异常,4 周时各层软骨细胞排列紊乱,并出现软骨空陷窝,软骨细胞数量减少,表层出现裂隙。6

周时软骨表层有裂隙形成,有大量的软骨空陷窝,软骨细胞数量明显减少,软骨细胞散在分布,8 周时表层有破溃形成,软骨厚度变薄,细胞数量进一步减少,软骨细胞退变严重,出现大量的空陷窝。甲苯胺蓝异染反应自 2 周起减弱,并渐加重。D1 组 4 周时无明显变化,8 周可见柱状排列异常,出现软骨空陷窝,12 周时可见柱状排列紊乱加重,出现大量的软骨空陷窝,软骨细胞数量明显减少。甲苯胺蓝异染反应 8 周时稍减弱,12 周时明显减弱,出现软骨陷窝,(见图 1—2,见后置彩色插页 1)。

2.3 透射电镜观察

正常对照组各期软骨细胞和软骨基质的形态结构相似,没有明显的差别。软骨细胞膜完整,细胞表面有突起和皱褶,细胞核形态正常,核呈偏心位,核膜明显,细胞器多见,无肿胀,胶原原纤维排列整齐。退变各组中可见凋亡的软骨细胞突起缩短消失,胞质中出现大量的空泡,细胞核边移变小并固缩成匀质状、高电子密度染色质块,胞质浓缩,少见线粒体,伴胶原原纤维排列紊乱、断裂、残端呈絮状(图3,见后置彩色插页1)。

2.4 TUNEL 观察结果

结果显示对照组关节软骨细胞凋亡数为0-3个/高倍视野。和对照组比B1、C1两组变化不明显($P>0.05$)。B、C两组8周时差异才有显著性($P<0.05$)。D组自1周起差异便有显著性($P<0.01$),后随时间延长软骨细胞凋亡率渐增多,8周时软骨细胞凋亡

率达最多。D1组4周时差异也有显著性($P<0.01$),后随时间延长渐增多,12周时达最多。D、D1两组同时期比较D组软骨细胞凋亡率高于D1组($P<0.05$)(图4,见后置彩色插页1)(表2)。

2.5 ELISA 检测结果

IL-1 β 、TNF- α 测定值和对照组相比,B、C两组8周时两者均略少增加($P<0.05$)。B1、C1两组各期变化不明显($P>0.05$)。D组1周时两者均高于对照组($P<0.01$),8周时达到最高。D1组4周时两者也高于对照组($P<0.01$),12周时达到最高,(见表3-4)。

2.6 软骨细胞凋亡率和细胞因子含量的线性相关分析

对软骨细胞凋亡率分别和IL-1 β 、TNF- α 行两变量资料线性相关分析, r 均 >0 。说明软骨细胞凋亡率分别随IL-1 β 、TNF- α 的含量的增高而增加,软骨细胞凋亡率和细胞因子含量分别成正相关。

表2 各组不同时期关节软骨细胞凋亡计数

(个/高倍视野, $\bar{x}\pm s$)

	A组	B组	C组	D组	B1组	C1组	D1组
1周	0.62±0.32	0.59±0.45	0.51±0.37	5.96±1.64			
2周	0.57±0.46	0.67±0.58	0.45±0.41	6.34±1.45			
4周	0.82±0.27	0.49±0.53	0.38±0.49	11.88±2.27	0.59±0.31	0.62±0.56	5.24±1.45
6周	0.65±0.51	1.67±0.43	1.73±0.57	19.80±2.10			
8周	0.59±0.51	3.96±0.67	4.09±0.37	32.94±5.48	0.63±0.31	0.71±0.48	10.06±2.04
12周	0.71±0.47				0.59±0.41	0.67±0.39	15.32±2.23

表3 各组不同时期关节液中IL-1 β 含量

(ng/joint, $\bar{x}\pm s$)

	A组	B组	C组	D组	B1组	C1组	D1组
1周	0.02±0.010	0.03±0.010	0.04±0.011	0.13±0.014			
2周	0.05±0.007	0.05±0.009	0.04±0.009	0.19±0.021			
4周	0.03±0.010	0.07±0.014	0.05±0.011	0.27±0.025	0.04±0.010	0.03±0.007	0.03±0.009
6周	0.02±0.008	0.09±0.013	0.07±0.013	0.38±0.030			
8周	0.04±0.011	0.11±0.015	0.12±0.017	0.44±0.031	0.05±0.009	0.04±0.010	0.14±0.016
12周	0.03±0.009				0.03±0.011	0.03±0.009	0.31±0.029

表4 各组不同时期关节液中TNF- α 含量

(ng/joint, $\bar{x}\pm s$)

	A组	B组	C组	D组	B1组	C1组	D1组
1周	0.06±0.02	0.09±0.05	0.10±0.06	0.59±0.07			
2周	0.09±0.03	0.10±0.04	0.11±0.06	0.73±0.09			
4周	0.10±0.01	0.21±0.08	0.37±0.07	0.96±0.11	0.07±0.01	0.11±0.07	0.39±0.09
6周	0.08±0.02	0.39±0.13	0.36±0.11	1.45±0.17			
8周	0.11±0.01	0.51±0.13	0.46±0.07	3.10±0.29	0.10±0.03	0.13±0.06	1.38±0.12
12周	0.07±0.02				0.09±0.02	0.15±0.05	2.10±0.19

3 讨论

3.1 压应力和软骨细胞凋亡及细胞因子的关系

在本实验中通过TUNEL法检测软骨细胞凋亡率、ELISA法检测细胞因子含量,并结合髌股关节间的压应力测试,表明D组及D1组髌股关节间较高的压应力在软骨细胞凋亡、细胞因子含量的升高中起到了重要作用,并且这种持续存在的较高的压应力所起的作用要大于间歇的。但B、C两组8周时也观察到软骨细胞凋亡率和细胞因子含量高于对照组,考虑到由于日常的关节活动使软骨内的液体与滑液经常保持平衡,从而维持关节软骨的营养,而

B、C两组持续固定影响到软骨滑液的交换,软骨营养障碍,如果营养障碍持续时间较长,大量代谢废物聚集,可引起细胞因子含量的升高并伴有软骨细胞凋亡,但其作用显然要低于关节间的较高压应力。

3.2 软骨细胞凋亡和关节软骨退变的相互关系

在本实验中通过光镜观察,并结合TUNEL法检测软骨细胞凋亡率。我们发现软骨细胞凋亡异常的出现要早于组织学退变,表明关节间较高的压应力可引起软骨细胞凋亡,软骨细胞凋亡之后功能丧失,达到一定程度,继而出现关节软骨甲苯胺蓝异染减弱、HE染色的组织学退变。

3.3 软骨细胞凋亡和 IL-1 β 、TNF- α 的相互关系

通过软骨细胞凋亡率和细胞因子含量的线性相关分析,表明软骨细胞凋亡率分别随 IL-1 β 、TNF- α 的含量的增高而增加,软骨细胞凋亡率和细胞因子含量分别成正相关。实验表明外源性 IL-1 β 、TNF- α 等细胞因子可刺激关节软骨产生高水平的 NO,通过 NO 途径介导软骨细胞凋亡^[5-7]。因此我们推测在活体关节间较高的压应力可以使关节软骨细胞分泌上述细胞因子,从而诱导软骨细胞凋亡。IL-1 β 和 TNF- α 在较高压应力下软骨细胞凋亡过程中可能起重要作用。

虽然本实验还不能明确解释压应力下细胞因子的具体来源及分泌机制,但避免关节间较高的压应力和持续关节固定,可以减缓软骨细胞凋亡及软骨退变,为 OA 临床防治提供一些新的线索。进一步明确压应力对软骨细胞产生细胞因子的影响及细胞因子来源将会有助于了解 OA 的发病机制。

参考文献

- [1] Behrens F,Kraft EL,Oegema TR.Biochemical changes in articular cartilage after joint immobilization by casting or external fixation [J].J Orthop Res,1989,7(3):335—343.
- [2] Burger E,Klein-nulend J,Veldhuizen JP.Mechanics stress and osteogenesis in vitro [J].J Bone Min Res,1992,(suppl 2):s397—s401.
- [3] Najima H,Oberlin C,Alnot JY,et al. Anatomical and biomechanical studies of the pathogenesis on trapeziometacarpal degenerative arthritis [J]. J Hand Surg Br,1997,22 (2):183—188.
- [4] Sah RL,Yang AS,Chen AC,et al. Physical properties of rabbit articular cartilage after transection of the anterior crtuciate ligament [J]. J Orthop Res,1997,15(2):197—203.
- [5] Hashimoto S,Takahashi K,Amiel D,et al.Chondrocyte apoptosis and nitic oxide producti- on during experimentlly induced osteoarthritis [J]. Arthritis Rheum,1998,41(7):1266—1274.
- [6] Blanco FJ,Lotz M.IL-1-induced nitric oxide inhibits chondrocyte proliferation via PGE-2 [J]. Exp Cell RES,1995,218(1):319—325.
- [7] Aizawa T,Kon T,Einhorn TA,et al. Induction of apoptosis in chondrocytes by tuor necrosis factor -alpha [J].J Orthop R, 2001,19(5):785—796.

(上接 785 页)

BMP 含量改变,是 SCI 后机体的代偿反应之一。

另外,PGE2、NO 和瘦素等既是局部 RANKL、OPG 基因表达的调节者,也是应力在骨骼中信号的重要转导者;SCI 后损伤平面下应力减少或消失,是否引起局部 PGE2、NO 和瘦素等水平的改变? 继而导致 BMSCs RANKL 基因表达的改变? 对此的进一步研究将有助于揭示 SCI 继发 OP 的发病机制。

4 结论

SCI 6 周时,BMSCs RANKLmRNA 表达上调、RANKL/OPG 比值增高,导致骨代谢偶联失调、破骨吸收活性增强,可能是引起 SCI 继发 OP 的根本原因。

参考文献

- [1] 叶超群,纪树荣,张庆民,等. 脊髓损伤后大鼠骨代谢和骨密度变化[J].中国康复医学杂志,2005,20(4):258—260.

- [2] 叶超群,纪树荣,张昆亚,等. 脊髓损伤后大鼠后肢骨形态计量学和生物力学性能的变化[J].中国康复医学杂志,2006,21(1):42—46.
- [3] 廖二元,谭利华.代谢性骨病学[M].北京:人民卫生出版社,2002. 209—241.
- [4] 叶超群,纪树荣.骨保护蛋白与骨质疏松的研究进展[J].中国康复理论与实践,2004,10(6):355—357.
- [5] 杜卓民主编.实用组织学技术[M].北京:人民卫生出版社.1982.
- [6] Demulder A,Guns M,Ismail A. In-creased osteoclast-like cells formation in long-term bone marrow cultures from patients with a spinal cord injury [J].Calcif Tissue Int,1998,63:396—400.
- [7] 曾晓峰,赵建宁.肿瘤坏死因子受体和配体.超家族的新成员[J].生命的化学,2003,23(4):252—255.
- [8] Siggelkow H,Eidner T,Lehmann G,et al.Cytokines,osteoprotegerin, and RANKL in vitro and histomorphometric induces of bone turnover in patients with different bone diseasea [J].Journal of Bone and Mineral Research,2003, 18(3):529—537.
- [9] 李靖,王全平,李新奎.脊髓损伤对大鼠松质骨 BMP、IL-6 及 TNF- α 表达的影响[J].中国矫形外科杂志,2003,11(2):106—107.