

低强度脉冲超声对兔关节软骨细胞增殖及Ⅱ型胶原表达的影响

郭 杨¹, 马 勇^{1,2}, 董 睿¹, 刘尚仑¹, 屠 娟³, 黄桂成¹

摘要 目的 探讨低强度脉冲超声(LIPUS)对体外培养兔关节软骨细胞增殖及其合成Ⅱ型胶原的影响。方法 选取生长状况良好的第3代兔膝关节软骨细胞,随机分为空白组及3种强度的LIPUS干预组,其超声强度分别为40、50、80 mW/cm²,其余作用参数相同,中心频率:1.0 MHz,脉冲重复频率:1.0 KHz,脉冲宽度:200 μs,作用周期:50。各LIPUS干预组每日照射20 min,连续照射3 d后,采用CCK-8比色法检测软骨细胞增殖情况,免疫组化染色分析Ⅱ型胶原表达量的变化。结果 强度50、80 mW/cm²的LIPUS干预组软骨细胞增殖较空白组显著增多($P < 0.01$),且50 mW/cm² LIPUS的作用最为明显,而40 mW/cm² LIPUS促软骨细胞增殖效应与空白组相比差异无统计学意义($P = 0.249$);各强度LIPUS组Ⅱ型胶原表达量均高于空白组($P < 0.01$),尤以50 mW/cm² LIPUS组Ⅱ型胶原表达量增加最为显著,优于40、80 mW/cm² LIPUS的效应($P < 0.01$)。结论 LIPUS能够促进体外培养关节软骨细胞增殖,增加软骨细胞Ⅱ型胶原的分泌,且强度为50 mW/cm²时效应较为明显。

关键词 低强度脉冲超声; 软骨细胞; 细胞增殖; Ⅱ型胶原
中图分类号 R 274.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)12-1739-04

低强度脉冲超声(low intensity pulsed ultrasound, LIPUS)能够影响机械运动场中运动的细胞、生物大分子等结构,独特的空化效应可以增强细胞生长因子、药物分子等大分子物质的跨膜转运能力,且具有安全、价廉等优势,在软骨修复领域逐渐受到研究者的青睐。研究^[1-2]显示LIPUS能够促进关节软骨分泌Ⅱ型胶原,减轻骨关节炎患者的关节疼痛,改善关节功能。该研究通过LIPUS干预体外培养兔膝关节软骨细胞,探讨其对关节软骨细胞增殖及其合成Ⅱ型胶原的影响,并初步筛选最佳的超声作

用参数。

1 材料与方法

1.1 实验动物 2周龄健康新西兰大白兔2只,体重150~200 g,雌雄不限,由南京江宁区青龙山动物繁殖场提供,饲养于南京中医药大学动物实验中心。
1.2 主要试剂及仪器 低糖DMEM、胎牛血清(美国Hyclone公司);Ⅱ型胶原酶、胰酶、青链霉素混合液(美国Gibco公司);Ⅱ型胶原免疫组化试剂盒(KGSP03,南京凯基生物公司);Ⅱ型胶原免疫组化一抗(AF5710,美国ACRIS公司);甲苯胺蓝粉末(北京索莱宝科技发展有限公司);CCK-8(日本同仁化学研究所);酶标仪(Elx800,美国BioTek公司);相关超声设备由南京大学声学研究所提供,包括信号源、功率放大器与探头等,频率及强度均可调。

1.3 兔膝关节软骨细胞的分离与培养 2周龄新西兰大白兔耳缘静脉空气栓塞处死,简易固定后常规消毒铺巾,无菌操作下充分暴露膝关节,用手术刀片轻轻刮取股骨髁关节面处关节软骨,将切取下的软骨碎块儿放入预先置有3%青链霉素混合液的PBS中培养皿中冲洗3次,切碎至1 mm³大小,再放入预先装有10 ml、0.2%Ⅱ型胶原酶的25 cm²培养瓶内,37℃、5% CO₂饱和湿度培养箱内过夜,次日收集消化液于15 ml离心管内,1 500 r/min离心8 min,弃上清液,加入适量完全培养液重悬后接种至25 cm²的培养瓶内,静置于37℃、5% CO₂的细胞培养箱内培养,每2~3 d换液1次,待细胞铺满瓶底70%~80%时进行传代培养。

1.4 软骨细胞的形态学观察与鉴定

1.4.1 形态学观察 倒置显微镜下逐日观察体外培养软骨细胞的形态变化、生长情况,并及时摄片记录。

1.4.2 甲苯胺蓝染色 取第3代软骨细胞,用完全培养液制成细胞悬液,调整细胞密度为 1×10^5 /ml,按每孔2.5 ml将细胞悬液接种至预先置有经多聚赖氨酸处理过的盖玻片的6孔培养板内,制作细胞爬片。常规培养3 d后,弃掉培养液,PBS洗3次,常温晾干;用4%多聚甲醛固定盖玻片1 h;吸弃多聚甲醛,PBS漂洗3次,常温晾干;加1%甲苯胺蓝

2014-06-13 接收

基金项目:江苏省“六大人才高峰”项目(编号:2010-WS-082);江苏省自然科学基金(编号:BK2011812)

作者单位:¹南京中医药大学骨伤研究所,南京 210023

²南京中医药大学附属医院骨伤科,南京 210029

³南京大学声学研究所,南京 210093

作者简介:郭 杨,男,博士研究生;

黄桂成,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: 286745885@qq.com

浸染 2 h; 去除多余染液, 自来水浸洗 1 min, 无水乙醇迅速脱水; 镜下观察, 满意后晾干, 中性树胶封片, 拍照。

1.5 细胞分组及 LIPUS 干预 取第 3 代软骨细胞悬液, 调整细胞密度为 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 后置于 8 个 $\phi 35$ mm 培养皿内, 每皿 2 ml, 随机分为空白对照组及 3 种不同强度的 LIPUS 组, 超声强度分别为 40、50、80 mW/cm^2 , 每组 2 个皿。各 LIPUS 干预组基础参数为: 中心频率: 1.0 MHz, 脉冲重复频率: 1.0 KHz, 脉冲宽度: 200 μs , 作用周期: 50。空白组置于探头下但无超声照射, 各 LIPUS 组每日超声辐照 20 min, 连续照射 3 d。

1.6 检测指标

1.6.1 CCK-8 法检测软骨细胞增殖情况 干预 3 d 后, 消化收集培养皿细胞, 全培重悬后, 以每孔 100 μl 细胞悬液, 接种于 96 孔培养板内, 每组 6 个复孔, 同时取 6 孔加入不含细胞的完全培养液作为调零组; 向每孔加入 10 μl 的 CCK-8 溶液, 将培养板放入培养箱内孵育 3 h 后, 于酶标仪上 450 nm 处测各组光密度值(optical density, OD)。

1.6.2 II 型胶原免疫细胞化学染色 收集培养皿内细胞, 置于 6 孔板内制成细胞爬片, 待细胞完全贴壁后倾去培养液, 0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次; 4 $^{\circ}\text{C}$ 、4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 漂洗; 3% H_2O_2 浸泡 10 min, PBS 漂洗; 0.3% Triton $\times 100$ 通透 30 min, PBS 漂洗; 山羊血清覆盖盖玻片 10 min; 滴加适量 II 型胶原免疫组化一抗, 覆盖玻片 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, PBS 漂洗; 滴加适量二抗滴覆盖 10 min, PBS 漂洗; 加入适量链亲和素标记 HRP, 孵育 10 min, PBS 漂洗; 加入 DAB 染色液覆盖玻片 10 min, 自来水漂洗; 苏木精复染, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 显微镜下观察、摄片。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析及 Dunnett t 、LSD 法比较, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 形态学观察 倒置显微镜下见原代培养软骨细胞接种 24 h 后, 大部分细胞贴壁, 呈短梭形或不规则状, 见图 1; 48 h 后, 细胞逐渐展开, 呈三角形或不规则多角形; 培养 3 d 后, 细胞数量明显增多。5 d 时, 细胞铺满瓶底 80% ~ 90%, 单层细胞成片生长, 呈“铺路石”状, 见图 2。传代培养细胞贴壁时间较原代细胞稍短, 大部分可在 8 h 内即贴壁, 生长速度也较快, 3 ~ 4 d 即可传代。前 3 代细胞生长速度较快, 形态较稳定, 而当培养至第 4 代时, 部分细胞呈长梭形生长, 开始去分化, 且随传代次数增多呈递增趋势。

2.2 甲苯胺蓝染色 甲苯胺蓝能使细胞中的蛋白多糖等酸性黏液物质变为深蓝色, 核酸及其他物质(如细胞核)呈紫红色。本研究培养出的软骨细胞经甲苯胺蓝染色后, 镜下清晰可见细胞外基质中散在分布着深蓝色的异染颗粒, 大部分细胞的胞核被染成紫色, 见图 3。

2.3 不同强度 LIPUS 对软骨细胞增殖的影响 不同强度 LIPUS 照射 3 d, CCK-8 法检测所得各组软骨细胞 OD 值经单因素方差分析显示, 各组软骨细胞增殖差异不全相同($F = 12.433$, $P < 0.01$)。Dunnett t 法比较显示 50、80 mW/cm^2 LIPUS 组软骨细胞增殖高于空白组($P < 0.01$), 而 40 mW/cm^2 LIPUS 组软骨细胞 OD 值与空白组相比, 差异无统计学意义。LSD 法进一步比较显示 50 mW/cm^2 LIPUS 组软骨细胞增殖最为显著, OD 值明显高于 40、80 mW/cm^2 LIPUS 组, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 1。

2.4 不同强度 LIPUS 对软骨细胞 II 型胶原表达的影响 各组软骨细胞经免疫细胞化学染色后均可见 II 型胶原阳性表达, 呈棕黄色异染颗粒, 粗略可看出各强度 LIPUS 组的棕黄色异染颗粒较空白组多, 提示 LIPUS 能够促进体外兔关节软骨细胞分泌 II 型胶原。见图 4。

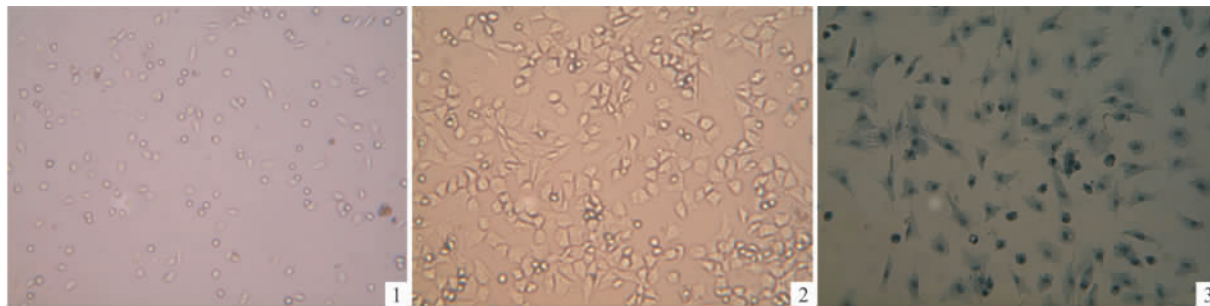


图 1 24 h 后软骨细胞贴壁、变形 $\times 100$

图 2 5 d 后软骨细胞呈“铺路石”状 $\times 100$

图 3 软骨细胞甲苯胺蓝染色 $\times 100$

表1 不同强度 LIPUS 对兔膝关节软骨细胞增殖的影响 ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	OD 值
空白	0.189 ± 0.005
40 mW/cm ² LIPUS	0.204 ± 0.004 ^{##}
50 mW/cm ² LIPUS	0.248 ± 0.010 ^{**}
80 mW/cm ² LIPUS	0.221 ± 0.003 ^{**##}

与空白组比较: ^{**} $P < 0.01$; 与 50 mW/cm² LIPUS 组比较: ^{##} $P < 0.01$

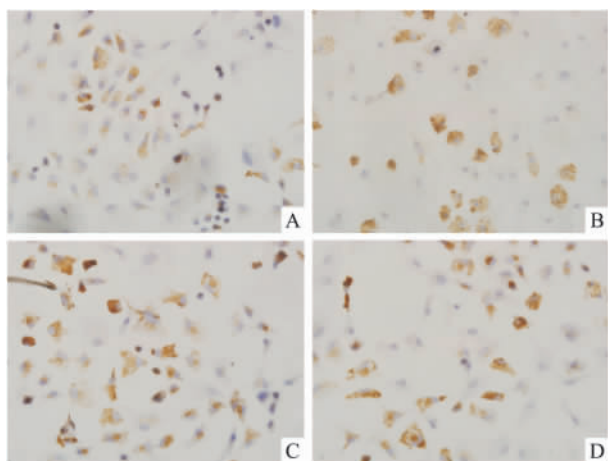


图4 各组兔关节软骨细胞Ⅱ型胶原免疫组化染色 ×200

A: 空白组; B: 40 mW/cm² LIPUS 组; C: 50 mW/cm² LIPUS 组; D: 80 mW/cm² LIPUS 组

对所得图像采用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行半定量检测与分析,测定Ⅱ型胶原染色阳性表达的面积(Areas)、积分光密度值(integral optical density, IOD),见表2。不同强度 LIPUS 照射 3 d 后,各组软骨细胞Ⅱ型胶原阳性表达 Areas 值与 IOD 值经单因素方差分析显示,各组软骨细胞Ⅱ型胶原表达水平不全相同($F=83.949, 128.345$, $P < 0.01$),Dunnett t 法比较显示 40、50、80 mW/cm² LIPUS 组Ⅱ型胶原相对表达水平均高于空白组($P < 0.01$),LSD 法进一步比较显示 50 mW/cm² LIPUS 组软骨细胞Ⅱ型胶原表达量最为显著,Areas 值与 IOD 值均高于 40、80 mW/cm² LIPUS 组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表2。

表2 不同强度 LIPUS 对软骨细胞Ⅱ型胶原表达的影响($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

组别	Areas(μm ²)	IOD 值
空白	58 926 ± 3 827	9 288 553 ± 590 852
40 mW/cm ² LIPUS	83 325 ± 2 573 ^{**##}	12 587 114 ± 273 188 ^{**##}
50 mW/cm ² LIPUS	126 929 ± 3 798 ^{**}	21 413 529 ± 558 237 ^{**}
80 mW/cm ² LIPUS	99 811 ± 1 794 ^{**##}	16 079 810 ± 319 997 ^{**##}

与空白组比较: ^{**} $P < 0.01$; 与 50 mW/cm² LIPUS 组比较: ^{##} $P < 0.01$

3 讨论

Naito et al^[1]采用强度为 30 mW/cm²、频率 1.5 MHz、脉冲重复频率 1.0 KHz 的 LIPUS 直接作用于动物模型患处 28 d,发现 LIPUS 能够促进Ⅱ型胶原分泌,从而保护关节软骨。Korstjens et al^[3]发现 LIPUS 能促进体外培养人软骨细胞增殖及Ⅱ型胶原的表达。张迪等^[4]研究发现 LIPUS 能够提高 SD 大鼠前软骨干细胞的细胞外基质Ⅱ型胶原、转化生长因子 β1 及 Sox9 基因 mRNA 的表达。对其作用机制,众学者也是各抒己见。有研究^[5-6]指出 LIPUS 能够促进 TGF-β1、BMP-2、BMP-4、FGF-7、TGF-β R1、VEGF 等细胞因子的合成,从而发挥生物学效应。周崑等^[7]则认为当 LIPUS 作用于软骨表面时,超声波可将软骨表面合适大小的物质、分子通过组织间隙被“推挤”进入软骨内,促进软骨细胞与外界进行物质交换,从而发挥相关的生物学作用。

LIPUS 是一种机械波,生物学效应与其强度、频率、作用时间、作用周期等有密切的关系。而目前 LIPUS 修复软骨损伤相关参数多是参考了治疗骨折愈合的作用参数,但这些参数并非适用于所有的组织。因此,寻找 LIPUS 干预软骨细胞增殖与基质合成等的最佳刺激频率、强度及时间等参数显得至关重要。目前多数研究^[1,6]显示 30 mW/cm² 的 LIPUS 在软骨损伤修复中的生物学效应,但最佳的刺激强度至今尚无定论。在 LIPUS 的作用时间上也存在异议,有学者^[8]认为超声辐射 10 min 时细胞活性及细胞增殖指数最高,一旦超过 10 min 后,相应生物学效应会随着时间延长而下降。有研究^[6]显示用于骨折愈合与软组织损伤的最佳治疗时间是 20 min。

本研究 LIPUS 基础参数来源于南京大学物理系声学研究所,其中 LIPUS 刺激强度是基于南京大学声学研究所多年来的研究成果,并参考相关文献而设定,结果表明在 1.0 MHz 频率、1.0 KHz 脉冲重复率、200 μs 脉冲宽度基础参数相同条件下,50、80 mW/cm² 的 LIPUS 均可促进体外软骨细胞增殖,而不同强度的 LIPUS 均可促进软骨细胞Ⅱ型胶原的表达,且 50 mW/cm² 的 LIPUS 的生物学效应最为明显,这也被筛选为本课题组后续实验所需的最佳 LIPUS 刺激参数。由于研究时间、经费有限,本研究未能对 LIPUS 的全部参数进行优化筛选,对其作用机

制及量效关系亦未深入探讨。另外,在三维培养条件下,LIPUS对软骨细胞的影响,以及在LIPUS干预下构建的组织工程软骨修复软骨缺损的效应,值得进一步探索。

参考文献

- [1] Naito K, Watari T, Muta T, et al. Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) increases the articular cartilage type II collagen in a rat osteoarthritis model[J]. *J Orthop Res*, 2010, 28(3): 361-9.
- [2] Loyola Sánchez A, Ramirez Wakamatzu M A, Vazquez Zamudio J, et al. Effect of low-intensity pulsed ultrasound on regeneration of joint cartilage in patients with second and third degree osteoarthritis of the knee[J]. *Reumatol Clin*, 2009, 5(4): 163-7.
- [3] Korstjens C M, van der Rijt R H, Albers G H, et al. Low-intensity pulsed ultrasound affects human articular chondrocytes *in vitro* [J]. *Med Biol Eng Comput*, 2008, 46(12): 1263-70.
- [4] 张迪, 祁军, 江淳, 等. 低强度脉冲超声波对SD大鼠前软骨干细胞增殖及细胞外基质 mRNA 表达的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(6): 1075-9.
- [5] Lai C H, Chen S C, Chiu L H, et al. Effects of low-intensity pulsed ultrasound, dexamethasone/TGF- β 1 and/or BMP-2 on the transcriptional expression of genes in human mesenchymal stem cells: chondrogenic vs. osteogenic differentiation[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2010, 36(6): 1022-33.
- [6] Mukai S, Ito H, Nakagawa Y, et al. Transforming growth factor- β 1 mediates the effects of low-intensity pulsed ultrasound in chondrocytes[J]. *Ultrasound Med Biol*, 2005, 31(12): 1713-21.
- [7] 周崑, 周伟, 陈文直, 等. 低强度脉冲超声对美蓝渗入正常兔膝关节软骨的作用[J]. *重庆医科大学学报*, 2012, 37(2): 121-4.
- [8] 于海生. 低强度脉冲超声促进骨髓来源细胞增殖的研究[D]. 重庆医科大学, 2012.

Effect of low intensity pulsed ultrasound on the cell proliferation and type II collagen expression of rabbit articular chondrocytes

Guo Yang¹, Ma Yong^{1,2}, Dong Rui¹, et al

(¹*Institute of Traumatology & Orthopedics, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023;*

²*Dept of Traumatology & Orthopedics, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029*)

Abstract Objective To investigate the effect of low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) on the cell proliferation and type II collagen expression of rabbit articular chondrocytes cultured *in vitro*. **Methods** The third generation of rabbit knee articular chondrocytes in good condition were randomly divided into 4 groups: control group (without LIPUS), low-intensity LIPUS group, mid-intensity LIPUS group and high-intensity LIPUS group. The cells in LIPUS groups were stimulated with an intensity of 40 mW/cm², 50 mW/cm² and 80 mW/cm² respectively. The frequency was 1.0 MHz with a sine wave of 200 μ s tone burst repeated at 1.0 KHz and 50 cycles. The ultrasound exposure time was 20 minutes per day in LIPUS groups. After 3 days, the cell proliferation was determined by Cell Counting Kit-8 assay. The immunocytochemical staining was used to analyze the expression of type II collagen. **Results** Compared with control group, an intensity of 50 mW/cm² and 80 mW/cm² LIPUS both could significantly promote chondrocytes proliferation ($P < 0.01$). The effect of 50 mW/cm² LIPUS was more obvious. There was no statistical difference between 40 mW/cm² LIPUS group and control group ($P = 0.249$). The expression of type II collagen in each LIPUS group was significantly higher than that of control group ($P < 0.01$). The effect of 50 mW/cm² LIPUS group was the most significant and superior to that of the other two LIPUS groups ($P < 0.01$). **Conclusion** LIPUS can promote the cell proliferation and type II collagen expression of articular chondrocytes, which has better biological effect at 50 mW/cm² intensity.

Key words low intensity pulsed ultrasound; chondrocytes; cell proliferation; type II collagen