

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.06.015

低频脉冲磁场对兔膝关节软骨细胞白介素-1 β 、 肿瘤坏死因子- α 表达与分泌的影响

张志刚, 曹 成, 王根林, 朱雪松, 耿德春, 施 勤, 毛海青, 邹 俊
(苏州大学附属第一医院骨科, 苏州 215006)

【摘 要】目的:测定在低频脉冲磁场(Low frequency pulsed electromagnetic field, LFPEMF)刺激的情况下,兔膝关节软骨细胞白介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)与肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)表达与分泌的变化。方法:分离培养由骨髓干细胞(Marrow stem cells, MSCs)诱导分化形成的软骨细胞,分别使用不同强度的 LFPEMF 进行电磁辐射刺激,用免疫印迹法测细胞中 IL-1 β 与 TNF- α 的表达状况,并用 ELISA 检测细胞培养液中 IL-1 β 与 TNF- α 的水平。结果:施加 LFPEMF 的兔膝关节软骨细胞中 IL-1 β 与 TNF- α 的表达无明显差异,但其培养液中 IL-1 β 与 TNF- α 的水平有明显降低,并且随着施加脉冲磁场刺激强度的增加,IL-1 β 与 TNF- α 的降低程度增强。结论:LFPEMF 可以抑制体外兔膝关节软骨细胞 IL-1 β 与 TNF- α 的分泌。

【关键词】低频脉冲磁场;兔膝关节软骨细胞;白介素-1 β ;肿瘤坏死因子- α

【中国图书分类法分类号】R285.5

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-11-04

Effect of low frequency pulsed electromagnetic field on the expression and secretion of IL-1 β and TNF- α in rabbit's knee chondrocytes

ZHANG Zhigang, CAO Cheng, WANG Genlin, ZHU Xuesong, GENG Dechun, SHI Qin, MAO Haiqing, ZOU Jun
(Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital, Suzhou University)

【Abstract】Objective: To investigate the changes of the expression and secretion of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in rabbit's knee chondrocytes under the stimulation of low frequency pulsed electromagnetic field (LFPEMF). Methods: Marrow stem cells (MSCs) of rabbits were obtained and differentiated into chondrocytes in vitro. PEMF with different intensities was applied to stimulate the chondrocytes. The expression levels of IL-1 β and TNF- α in the chondrocytes were measured by Western blot and their levels in the cultured medium were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Result: PEMF did not exert obvious effect on the expression levels of IL-1 β and TNF- α in the chondrocytes but it can reduce the secretion levels of IL-1 β and TNF- α in the cultured medium in a dose-dependent way. Conclusion: PEMF can inhibit the secretion of IL-1 β and TNF- α in cultured rabbit's chondrocytes.

【Key words】low frequency pulsed electromagnetic field; rabbit's knee chondrocytes; interleukin-1 β (IL-1 β); tumor necrosis factor- α (TNF- α)

白介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β) 与肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α) 是关节炎及关节损伤发生、发展的两种重要介质^[1,2], 这 2 种细胞因子均可由单核细胞、巨噬细胞和滑膜细胞等多种细胞合成并分泌^[2], 有报道称 IL-1 β 与 TNF- α 的过度分泌可能造成大骨节病等退行性骨关节病^[3-6]。电磁场刺激对体外培养细胞生理状况的影响非常复杂, 目前已有较为完善系统的文献报道低频脉冲磁场 (Low frequency pulsed electromagnetic field, LFPEMF) 可以引起多种干细胞以及人软骨细胞^[7-9]的

增殖等多种表型, 本课题旨在探究 LFPEMF 的刺激是否能通过影响 IL-1 β 与 TNF- α 的分泌, 为电磁场引起的软骨细胞表型变化的机制提供可能的解释, 给相关关节疾病的理疗提供分子生物学层面的依据。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

实验动物: 5 月龄健康雄性新西兰白兔, 体重 (2.3 $\pm$ 0.3) kg, 购于苏州大学实验动物中心。

主要设备: 电子天平、脉冲磁场发生器、CO₂ 恒温培养箱、倒置相差显微镜、超净工作台。

1.2 试剂

试剂: DMEM 培养液 (Hyclone)、FBS、淋巴细胞分离液、

作者简介: 张志刚 (1976-), 男, 主治医师, 硕士,

研究方向: 骨科基础与临床研究。

通信作者: 邹 俊, 男, 副主任医师, Email: jzou@suda.edu.cn。

胰蛋白酶(Gibco)、Ⅱ型胶原酶(Sigma)、透明质酸酶、兔 IL-1 β 单克隆抗体(Sigma)、兔 TNF- α 单克隆抗体(Sigma)、辣根酶标记兔抗山羊 IgG 单克隆抗体(Sigma)、兔 IL-1 β 和 TNF- α 双抗体夹心 ELISA 试剂盒(Genzyme)。

1.3 方法

细胞的原代分离及培养:从 5 月龄健康雄性新西兰白兔的双侧髌骨穿刺抽取骨髓液 10 ml,经淋巴细胞分离液(Ficol 比重 1.077)离心,用 Hank's 液洗涤后收集细胞沉淀,使用含 15% FBS 的 DMEM 培养液混匀后接种于培养皿中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5%的 CO_2 孵箱中培养 4 d 后换液,此后每周换液 2 次,除未贴壁生长的细胞。

扩大培养:取胰蛋白酶 0.5 g,用 200 ml 的 PBS 溶液溶解配置为 0.25%胰蛋白酶消化液,无菌过滤分装,冰箱-20 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存,使用前 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴复温。倒置相差显微镜下观察原代细胞融合度达 90%时改用条件培养液,传代后连续使用条件培养液,置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5%的 CO_2 孵箱中培养,按之前条件换液,至细胞再次长满瓶壁,0.25%胰蛋白酶消化传代。

脉冲磁场刺激:于贴壁生长后第 2 天将所有扩大培养的细胞分为 5 组,每组 3 只培养皿细胞,其融合度约为 80%。设其中 1 组为对照组,不给予电磁场刺激;其余各组为实验组,将实验组的培养皿(每组 3 只)侧壁打通,置于脉冲磁场发生器产生的电磁场中,其中电磁场频率为 2 Hz,电磁场强度依次为 0.5、1.0、2.0、3.0 A/m,波形为梯形方波,每天刺激 2 次,每次 30 min,连续 7 d。除电磁场刺激外,实验组与对照组其他培养条件完全相同。

Western blot:羊抗兔 IL-1 β 单克隆抗体(1:1 000)和羊抗兔 TNF- α 单克隆抗体(1:500),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,TBS 洗膜 3 次,每次 5 min,加辣根酶标记兔抗山羊 IgG 单克隆抗体(1:5 000),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min,TBS 洗膜 5 次,每次 5 min,ECL 发光。

双抗体夹心 ELISA:除空白孔外,将不同浓度标准品或细胞培养液(100 μl /孔)加入相应孔中,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,洗板。加入一抗工作液(50 μl /孔),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,洗板。加入酶标二抗工作液(100 μl /孔),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h,洗板。加入底物工作液(100 μl /孔),避光 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min。加入终止液,测量 A492 值。将所测 IL-1 β 与 TNF- α 的 A 值减去空白孔的 A 值,对照标准曲线,查出浓度值。

1.4 统计学分析

应用 SPSS 13.0 软件包进行统计学分析,各组数据采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用独立样本的方差分析检验。以 $\alpha=0.05$ 作为显著性水平,以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 兔膝关节软骨细胞的形态学观察

兔膝关节软骨细胞呈扁平状,以多角形为主,也有少量梭形细胞(图 1),施加不同强度 LFPEMF 刺激的各实验组与对照组细胞形态没有明显区别。

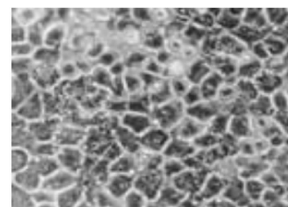


图 1 兔膝关节软骨细胞形态

Fig.1 Morphology of rabbit's knee chondrocytes

2.2 LFPEMF 对培养兔膝关节软骨细胞 IL-1 β 、TNF- α 表达的影响

Western blot 分析显示,施加不同强度 LFPEMF 刺激的各实验组与对照组兔膝关节软骨细胞中 IL-1 β 、TNF- α 蛋白的表达水平没有明显区别(图 2)。

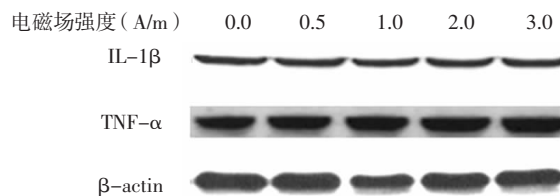


图 2 LFPEMF 对培养兔膝关节软骨细胞 IL-1 β 、TNF- α 表达的影响

Fig.2 Effect of LFPEMF on the expressions of IL-1 β and TNF- α in cultured rabbit's knee chondrocytes

2.3 LFPEMF 对培养兔膝关节软骨细胞 IL-1 β 、TNF- α 分泌的影响

ELISA 分析显示,施加 LFPEMF 的兔膝关节软骨细胞的培养液中 IL-1 β 与 TNF- α 的水平有明显降低,并且随着施加脉冲磁场刺激强度的增加,IL-1 β 与 TNF- α 的降低程度增强(表 1、图 3),方差分析数据显示 LFPEMF 引起的 IL-1 β 与 TNF- α 分泌的变化差异具有统计学意义。

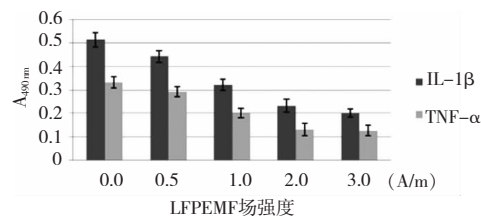


图 3 LFPEMF 对兔膝关节软骨细胞 IL-1 β 、TNF- α 分泌的影响

Fig.3 Effect of LFPEMF on the secretion of IL-1 β and TNF- α in rabbit's knee chondrocytes

表 1 LFPEMF 对培养兔膝关节软骨细胞 IL-1 β 、TNF- α 分泌的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Effect of LFPEMF on the secretion of IL-1 β and TNF- α in cultured rabbit's knee chondrocytes ($\bar{x} \pm s$)						
刺激强度 (A/m)	例数 (n)	0.0	0.5	1.0	2.0	3.0
IL-1 β ¹	3	0.512 $\pm$ 0.031	0.441 $\pm$ 0.024	0.321 $\pm$ 0.023	0.232 $\pm$ 0.028	0.201 $\pm$ 0.017
TNF- α ²	3	0.331 $\pm$ 0.024	0.292 $\pm$ 0.020	0.201 $\pm$ 0.019	0.132 $\pm$ 0.026	0.127 $\pm$ 0.023

注:1. ANOVA 分析显示不同刺激强度(电流分别为 0.0、0.5、1.0、2.0、3.0 A/m)下 IL-1 β 分泌的差异 F 值为 84.965,对应 $P<0.000$;2. 不同刺激强度(电流分别为 0.0、0.5、1.0、2.0、3.0 A/m)下 TNF- α 分泌的差异 F 值为 50.454,对应 $P<0.000$ 1

3 讨 论

目前已经知道 LFPEMF 对细胞的生理生化性状具有复杂的生物学效应,而适当强度的 LFPEMF 刺激不仅可以促进多种干细胞增殖,对人或其他哺乳动物的软骨修复也有一定促进作用^[7,9],前人研究发现适当强度 LFPEMF 可以促进软骨细胞的生长与增殖^[9,10]。这一结果也多次被不同实验室验证,但是对于这种作用的机制研究国际上尚无报道。

本研究采用不同强度的 LFPEMF 对兔膝软骨细胞进行电磁辐射刺激,分别使用 Western blot 和 ELISA 检测细胞中以及细胞培养液中 IL-1 β 与 TNF- α 的水平。发现 LFPEMF 的刺激并没有引起兔膝软骨细胞形态的变化以及细胞内 IL-1 β 与 TNF- α 表达水平的变化,但能够引起细胞增殖能力的增强(数据尚未发表),这与前人的研究结果相一致^[9,10]。同时观察到在 LFPEMF 的刺激下,兔膝软骨细胞培养液中 IL-1 β 与 TNF- α 的水平有明显降低,并且随着施加脉冲磁场刺激强度的增加,IL-1 β 与 TNF- α 的降低程度增大。这些结果说明 LFPEMF 虽然不能影响 IL-1 β 与 TNF- α 在细胞内的合成,但可以抑制它们向胞外分泌的过程,可能是由于电磁场引起的膜电位变化导致膜泡运输和跨膜蛋白从膜上解离这两个过程受到影响而造成,但要进一步了解 IL-1 β 与 TNF- α 分泌水平的下降与细胞膜上哪些活动有关还需要进一步实验探究。IL-1 β 与 TNF- α 是 2 种非常重要的细胞因子,对细胞的生长、增殖与凋亡有着重要的作用^[11,12]。软骨细胞自分泌的 IL-1 β 与 TNF- α 可能与其膜上相关受体结合,诱导核因子- κ B 家族成员 Bcl-3 基因抑制因子的表达从而抑制 Bcl-3 表达,促进软骨细胞凋亡^[11]。同时还能促进 MMP 的表达,抑制透明软骨特异性胶原和蛋白多糖的合成^[12],阻止软骨细胞增殖。TNF 可诱导软骨细胞产生过氧化反应,与 IL-1 β 共同促进软骨吸收^[13],从而介导了骨关节的破坏。因此我们认为阻止其分泌可以打断其自分泌环路,改善软骨细胞微环境,促进已损坏组织的修复,对某些退行性关节疾病可能具有治疗作用。

总之,本研究发现 LFPEMF 不能造成兔膝关节软骨细胞中 IL-1 β 与 TNF- α 表达的差异,但可以明显抑制体外兔膝关节软骨细胞 IL-1 β 与 TNF- α 的分泌,并且随着施加脉冲磁场刺激强度的增加,抑制强度增强,这为电磁场刺激引起的软骨细胞增殖现象提供了一个可能的解释。

参 考 文 献

- [1] Deschner J, Hofman C R, Piesco N P, et al. Signal transduction by mechanical strain in chondrocytes[J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2003, 6(3): 289-293.
- [2] 马大龙. 细胞因子研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 1997, 4(3): 164-166.
- [3] Ma D L. Current progress on cell factor[J]. *J Cancer Biother*, 1997, 4(3): 164-166.
- [4] Lencel P, Delplace S, Pilet P, et al. Cell-specific effects of TNF- α and IL-1 β on alkaline phosphatase: implication for syndesmophyte formation and vascular calcification[J]. *Lab Invest*, 2011, 91(10): 1434-1442.
- [5] Gaspari S, Marcovecchio M L, Breda L, et al. Growth in juvenile idiopathic arthritis: the role of inflammation[J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2011, 29(1): 104-110.
- [6] 孙正明, 凌 鸣, 刘 森, 等. 大骨节病和骨性关节炎患者滑膜白介素 1 β 和肿瘤坏死因子 α 的比较[J]. *南方医科大学学报*, 2009, 29(1): 5-8.
- [7] Sun Z M, Ling M, Liu M, et al. Expression of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α in the synovium and synovial fluid of patients with Kashin-beck disease and osteoarthritis[J]. *J Southern Med University*, 2009, 29(1): 5-8.
- [8] Strand V, Kavanaugh A F. The role of interleukin-1 in bone resorption in rheumatoid arthritis[J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2004, (s3): iii10-iii16.
- [9] Fini M, Giavaresi G, Carpi A, et al. Effects of pulsed electromagnetic fields on articular hyaline cartilage: review of experimental and clinical studies[J]. *Biomed Pharmacother*, 2005, 59(7): 388-394.
- [10] Massari L, Benazzo F, De Mattei M, et al. Effects of electrical physical stimuli on articular cartilage[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2007, 89(s3): 152-161.
- [11] Jahns M E, Lou E, Durdle N G, et al. The effect of pulsed electromagnetic fields on chondrocyte morphology[J]. *Med Biol Eng Comput*, 2007, 45(10): 917-925.
- [12] Yan G, Qian D, Lu Y, et al. The effect of low frequency pulsed electromagnetic field in the growth of rabbit's chondrocytes[J]. *Chin J Joint Surg*, 2010, 14(2): 239-244.
- [13] Jiang Z Y, Guo Y Y, Ren H B, et al. Tumor necrosis factor (TNF)- α upregulates progesterone receptor-A by activating the NF- κ B signaling pathway in human decidua after labor onset[J]. *Placenta*, 2012, 33(1): 1-7.
- [14] Kobayashi M, Squire G, Mousa A, et al. Role of interleukin1 and tumor necrosis factor in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage[J]. *Arthritis Rheum*, 2005, 52(1): 128-135.
- [15] 傅 欣, 林 霖, 张继英, 等. 骨性关节炎兔关节软骨、关节液细胞因子 IL-1 β 和 TNF- α 变化的研究[J]. *中国运动医学杂志*, 2007, 26(6): 709-713.
- [16] Fu X, Lin L, Zhang J Y, et al. The change in histology of cartilage and in IL-1 β and TNF- α of synovial fluid of the knee joint in osteoarthritis rabbit model[J]. *Chinese J Sports Med*, 2007, 26(6): 709-713.

(责任编辑: 冉明会)