

胰岛素样生长因子 对组织工程肌腱细胞增殖影响的量效关系

邱南海¹, 夏英鹏², 李明新³, 李瑞华³, 阚世廉³

Dose-effect relationship of insulin-like growth factor and the proliferation of tenocytes in tissue engineering

Qiu Nan-hai¹, Xia Ying-peng², Li Ming-xin³, Li Rui-hua³, Kan Shi-lian³

Abstract

AIM: Insulin-like growth factor (IGF-) is a potent mitogen and powerful stimulator for the division and growth of tenocytes. In this study, we cultured the tenocytes of the second generation with IGF- at different doses to verify the effects of IGF- on cell proliferation and the dose effect.

METHODS: The experiment was performed in the laboratory of Tianjin Hospital from November 2004 to April 2005. 200 France Lohmann fertilized eggs were provided by the laboratory of Tianjin Hospital. On day 19, the tendons of 10 embryo chickens were obtained. Tenocytes were isolated and cultured. The cell morphous and growth rules were observed. The second generation cells were seeded onto 6-well culture plate and added with fetal calf serum (FCS) of different concentrations. The effects of serum concentration on cell attachment and growth were observed. The second generation tenocytes were seeded onto 96-well culture plate and divided into 7 groups. The former 5 groups were cultured in 0.02 volume fraction FCS culture medium containing IGF- at doses of 1, 5, 10, 50, 200 $\mu\text{g/L}$; the sixth group was cultured in 0.05 volume fraction FCS culture medium as positive control, and the seventh group was cultured in 0.02 volume fraction FCS culture medium as negative control. The effects of IGF- on cell proliferation were observed with MTT test and Swiss-gimmsa taint test.

RESULTS: The tenocytes grew very fast after attaching to the wall. The primary cells started to passage in about 1 week. The proliferative rate of tenocytes was positively correlated with the concentration of FCS in culture medium. The proliferative rate of tenocytes was accelerated with the increase in IGF- dose. There was no difference among the 1 $\mu\text{g/L}$ and 5 $\mu\text{g/L}$ IGF- groups and negative control group on days 2 and 4 ($P > 0.05$); There was no difference among the 10 $\mu\text{g/L}$, 50 $\mu\text{g/L}$ and 200 $\mu\text{g/L}$ IGF- groups ($P > 0.05$). On the second day, the proliferative rate of tenocytes in the positive control group was significantly higher than that in 1 $\mu\text{g/L}$ and 5 $\mu\text{g/L}$ IGF- groups but lower than in 10 $\mu\text{g/L}$, 50 $\mu\text{g/L}$ and 200 $\mu\text{g/L}$ IGF- groups ($P < 0.000$ or < 0.006). On the fourth day, the proliferative rate of tenocytes in the positive control group was significantly higher than that in each IGF- group and negative control group ($P < 0.000$ or < 0.006). On days 2 and 4, the proliferative rate of tenocytes in 1 $\mu\text{g/L}$ and 5 $\mu\text{g/L}$ IGF- groups was significantly lower than that in 10 $\mu\text{g/L}$, 50 $\mu\text{g/L}$ and 200 $\mu\text{g/L}$ IGF- groups ($P < 0.000$); the positive control group was remarkably higher than the negative control group ($P < 0.000$).

CONCLUSION: IGF- promotes the proliferation of tenocytes in a dose-dependent manner. 10 $\mu\text{g/L}$ is found to be the most effective concentration. Meanwhile, the proliferative rate of tenocytes is accelerated when the cells are cultured in higher concentration of FCS.

Qiu NH, Xia YP, Li MX, Li RH, Kan SL. Dose-effect relationship of insulin-like growth factor and the proliferation of tenocytes in tissue engineering. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu 2008;12(2):221-226(China)
[www.zglckf.com/zglckf/ejournal/upfiles/08-2/2k-221(ps).pdf]

摘要

目的: 胰岛素样生长因子 是一种潜在的促有丝分裂剂, 对肌腱细胞有促进分裂增殖的作用。实验将不同剂量胰岛素样生长因子 作用于第2代肌腱细胞, 进一步验证其对细胞增殖的影响并探讨其量效关系。

方法: 实验于2004-11/2005-04在天津医院实验室完成。实验材料: 天津医院实验室提供的精选法国罗曼鸡受精卵200只, 在孵育19d时, 随机取出10只鸡胚肌腱。实验过程及分组: 分离培养肌腱细胞, 观察肌腱细胞形态及生长规律。取第2代肌腱细胞接种于六孔板, 分别给予不同浓度的胎牛血清, 观察血清浓度对肌腱贴壁及生长的影响。取第2代肌腱细胞接种于96孔板, 分为7组。前5组分别加入含不同剂量胰岛素样生长因子 (1, 5, 10, 50, 200 $\mu\text{g/L}$) 的体积分数为0.02的胎牛血清培养液; 第6组加入体积分数为0.05的胎牛血清培养液做为阳性对照, 第7组加入体积分数为0.02的胎牛血清培养液做为阴性对照。实验评估: 采用四甲基偶氮唑盐法及瑞士-姬姆萨染色观察不同剂量的胰岛素样生长因子 对细胞增殖的影响。

结果: 肌腱细胞贴壁后生长很快, 原代细胞1周左右即可传代, 增殖速度与培养液中胎牛血清浓度呈正相关。肌腱细胞增殖速度随胰岛素样生长因子 剂量加大而有增加趋势。第2天、第4天, 胰岛素样生长因子 1 $\mu\text{g/L}$ 组、5 $\mu\text{g/L}$ 组和阴性对照组之间差异无显著性($P > 0.05$); 胰岛素样生长因子 10 $\mu\text{g/L}$ 组、50 $\mu\text{g/L}$ 组和200 $\mu\text{g/L}$ 组之间差异无显著性($P > 0.05$)。第2天, 阳性对照组增殖高于胰岛素样生长因子 1 $\mu\text{g/L}$ 组与5 $\mu\text{g/L}$ 组, 低于10 $\mu\text{g/L}$ 组、50 $\mu\text{g/L}$ 组和200 $\mu\text{g/L}$ 组, 差异有显著性($P < 0.000$ 或 < 0.006); 第4天, 阳性对照组增殖高于胰岛素样生长因子 各剂量组和阴性对照组, 差异有显著性($P < 0.000$ 或 < 0.006)。第2天、第4天, 胰岛素样生长因子 1 $\mu\text{g/L}$ 组、5 $\mu\text{g/L}$ 组和阴性对照组低于10 $\mu\text{g/L}$ 组, 50 $\mu\text{g/L}$ 组, 200 $\mu\text{g/L}$ 组, 差异有显著性($P < 0.000$); 阳性对照组增殖高于阴性对照组, 统计分析差异有显著性($P < 0.000$)。

结论: 胰岛素样生长因子 对肌腱细胞增殖的促进作用, 随胰岛素样生长因子 浓度增高而有增高趋势, 10 $\mu\text{g/L}$ 为其较适合浓度, 同时发现培养血清浓度对肌腱细胞有其特殊作用, 浓度越高, 肌腱细胞贴壁越快, 并对增殖有明显促进作用。

关键词: 肌腱/细胞; 胰岛素样生长因子 ; 组织构建

邱南海, 夏英鹏, 李明新, 李瑞华, 阚世廉. 胰岛素样生长因子 对组织工程肌腱细胞增殖影响的量效关系[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(2):221-226 [www.zglckf.com/zglckf/ejournal/upfiles/08-2/2k-221(ps).pdf]

¹Department of Orthopedics, Tianjin Haihe Hospital, Tianjin 300350, China; ²Tianjin People's Hospital, Tianjin 200121, China; ³Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China

Qiu Nan-hai, Master, Attending physician, Department of Orthopedics, Tianjin Haihe Hospital, Tianjin 300350, China
qiunanhai@126.com

Received: 2007-09-08
Accepted: 2007-12-03

¹天津市海河医院骨科, 天津市300350; ²天津市人民医院; 天津市300121; ³天津市医院, 天津市300211

邱南海★, 男, 1970年生, 江西省信丰县人, 汉族, 2005年天津医科大学毕业, 硕士, 主治医师, 主要从事手显微外科的研究。
qiunanhai@126.com

中图分类号: R329.4
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225
(2008)02-00221-06

收稿日期: 2007-09-08
修回日期: 2007-12-03
(07-50-9-4927/W·A)

>>本文导读<<

<p>应用要点: ①为了突出研究胰岛素样生长因子 I 对肌腱细胞体外培养条件下增殖的影响,并初步探讨其量效关系,作者采用罗曼鸡的肌腱细胞完成实验,干扰因素少,操作较简便,效果较稳定。②实验结果发现胰岛素样生长因子 I 在 10 μg/L 浓度时效价比最高,而在超过 10 μg/L 时,细胞增殖并非呈上升趋势,而有下降趋势。</p>	<p>偏倚或不足: 一方面,罗曼鸡肌腱与人体肌腱存在一定差别,所以试验结果的临床意义受一定限制。另外,虽然对胰岛素样生长因子 I 作用的量效关系作了初步探讨,但是由于经费和时间等条件的限制,试验的大环境是在传代第 2 代的肌腱细胞,这一代细胞本身增殖活力较强,外界因素的干扰作用就相对较弱,所以具体的量效关系指标可能需要进一步推敲不能盲目定论。</p>	<p>相关链接: 目前,关于组织工程人工肌腱的研究主要包括以下几个方面的内容: ①细胞支架的研究。②种子细胞的研究。③生长因子对肌腱细胞增殖的研究。④力学刺激对肌腱细胞作用的研究。</p>
---	---	---

0 引言

大量研究表明肌腱细胞是一种分化程度很高的细胞,在体外培养条件下,肌腱细胞增殖相对缓慢,尤其体外多次传代后,肌腱细胞甚至丧失进入增殖期的能力,而研究表明胰岛素样生长因子 能显著刺激肌腱细胞的DNA和I型胶原的合成,并引起核因子 B这一早期即时转录因子基因表达的增强。DNA合成代表肌腱的增殖, 型胶原是**肌腱基质**的主要成分。核因子 B因子的表达增加,提示胰岛素样生长因子 可能通过核因子 B关的作用信号传递途径使肌腱细胞的DNA和I型胶原的合成增加。但胰岛素样生长因子 量效关系中胰岛素样生长因子 最适合的剂量尚不清楚,基于胰岛素样生长因子 在肌腱细胞增殖中的重要作用,本实验成功培养肌腱细胞,然后加入生长因子,用四甲基偶氮唑盐实验方法测量细胞增殖并进行比较,为以后进一步研究提供条件。

1 材料和方法

设计:分组对比观察。

单位:天津医院动物与细胞实验室。

材料:实验于2004-11/2005-04在天津医院实验室完成。天津医院实验室提供的精选法国罗曼鸡受精鸡蛋200只,在孵育19 d 时,随机取出10只鸡胚。胎牛血清、碱性成纤维细胞生长因子(均为澳大利亚TBDSCIENCE公司);胶原酶(型及 型)(SIGMA公司);胰蛋白酶(SIGMA公司);锥虫蓝(SIGMA公司)。

设计、实施、评估者:设计为第五作者,实施为第一、二、三、四作者,评估为第五作者和天津医院细胞实验室主任李秀兰。

技术路线:

肌腱细胞取出与分离培养:在无菌条件下,将鸡蛋大头打破,取出鸡胚,在显微镜下取出肌腱组织,放无菌盐水小瓶内漂洗后,并放入含青霉素的Hank 's 10 min

后再放入Hank 's液中漂洗后,并放入含消化液10 mL的小瓶内,用封口胶带封好。将含肌腱小瓶内加入10 mL消化液,放在摇床中,160 r/min,40 min,然后吸出消化液过滤后加入1mL体积分数为0.1的胎牛血清终止消化,将滤液加入两个离心管内5 mL,放入离心机内离心,1 000 r/min,共5 min,可见离心管底有细胞团块,将管内上清液吸出并加入5 mL体积分数为0.2的胎牛血清培养液,用吸管将细胞团块吹散,吹匀,然后将此细胞混悬液加入另一离心管内,并吸取100 μL细胞悬液加入一瓶盖内,再吸20 μL锥虫蓝吹匀,吸取10 μL细胞锥虫蓝悬液滴入计数板上盖玻片的一侧,在显微镜下,用10倍物镜观察计数板四角大方格中的细胞数,细胞数/毫升原液=(4大格细胞数之和/4) × 10⁴。用同样的方法重复3次,取出细胞混悬液加入同一培养瓶内。然后在培养瓶内加入10 mL体积分数为0.2的胎牛血清培养液,放入37 ℃,体积分数为0.05的CO₂饱和湿度细胞培养箱中培养。

肌腱细胞观察:每日观察培养液颜色及透明度的变化,细胞生长概况,细胞形态变化;细胞透明度、折光性、轮廓、微生物的污染情况。当培养液颜色变浅变黄,倒掉培养液,根据不同需要重新加入不同浓度的胎牛血清培养液,继续培养,当细胞贴壁达80%以上时,需要传代,倒掉营养液加入1 g/L的胰蛋白酶10 mL,然后在显微镜下观察细胞伪足回缩,细胞间隙增大后立即终止消化,倒掉消化液,加入胎牛血清培养液50 mL,观察可见培养瓶的毛玻璃样细胞被吹掉,把细胞混悬液分成两个培养瓶中培养,每日观察细胞生长及贴壁情况。

四甲基偶氮唑盐实验:取第2代细胞经1 g/L胰蛋白酶消化后,加入体积分数为0.1的胎牛血清培养液5 mL,取细胞悬液,锥虫蓝染色,在显微镜下用100倍观察,计数板四角大方格中的细胞数;用体积分数为0.02的胎牛血清培养液配成浓度为4 × 10⁷ L⁻¹细胞悬液,分别加入二块96孔板中,每孔加入100 μL,共加7组,每组8孔。前5组分别加入含不同剂量胰岛素样生长因子 (1, 5, 10, 50, 200 μg/L)的体积分数为0.02的胎牛血清培养

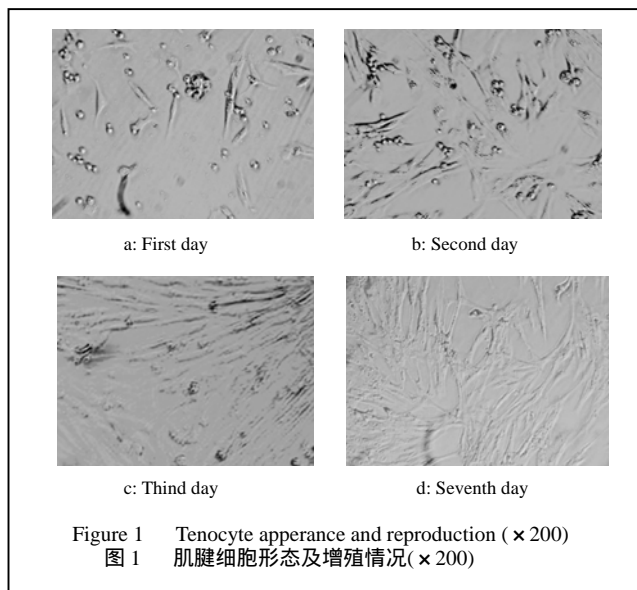
液;第6组加入体积分数为0.05的胎牛血清培养液做为阳性对照,第7组加入体积分数为0.02的胎牛血清培养液做为阴性对照。瑞士-姬姆染色组将24孔板的每孔营养液吸出,每孔加入1 mL的Hank's液冲洗后吸出;每孔加入试剂1复合染液3~5滴,轻轻摇动24孔板,使染色充分混匀,15 min后用水冲去染液晾干;倒置相差显微镜下观察染色情况并拍片。

主要观察指标: 肌腱细胞形态及增殖情况。不同浓度胰岛素样生长因子 对细胞增殖的影响。

统计学分析: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 由本文作者采用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 肌腱细胞形态及增殖情况 肌腱细胞形态类似成纤维细胞, 开始呈圆形, 贴壁后伸出伪足成梭形。贴壁后生长很快, 原代细胞一般1周左右即可传代, 传代后细胞进入旺盛增殖阶段, 见图1。



2.2 不同浓度胰岛素样生长因子 I 对细胞增殖的影响 增殖速度与营养液中胎牛血清浓度呈正相关。肌腱细胞在体积分数为0.05及0.1的胎牛血清浓度下增殖过快, 四甲基偶氮唑盐作用不明显, 采用体积分数为0.02的胎牛血清培养液培养时, 发现胰岛素样生长因子 对肌腱细胞增殖速度有明显促进作用。

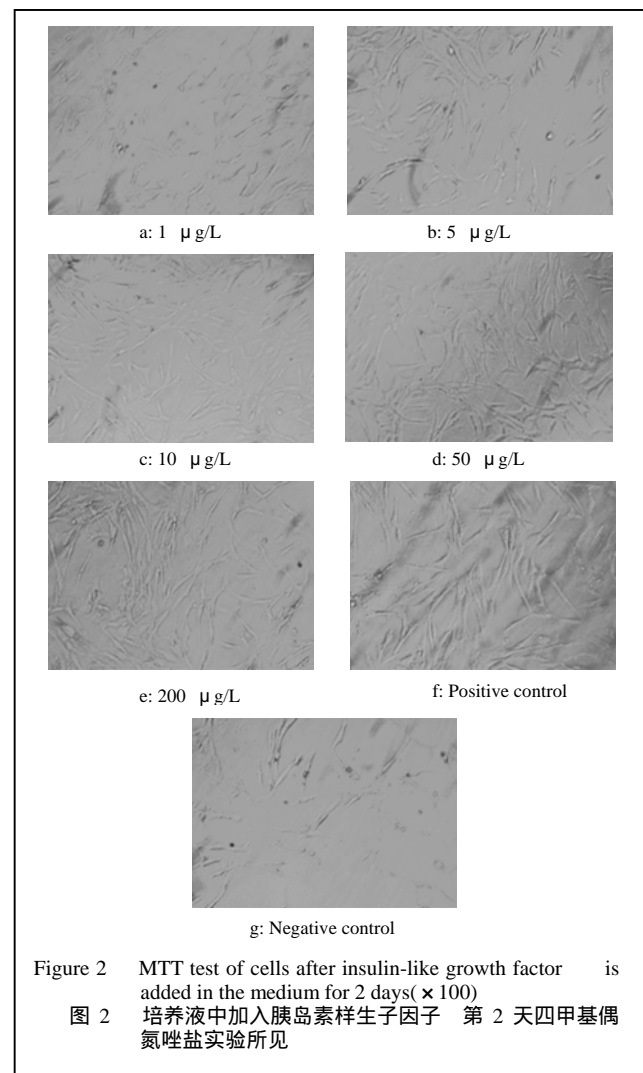
四甲基偶氮唑盐实验结果显示: 见表1。加胰岛素样生长因子 胎牛血清培养液第2天、第4天可见: 肌腱细胞增殖速度随胰岛素样生长因子 剂量加大而有增加趋势: 第2, 4天, 胰岛素样生长因子 1, 5 $\mu\text{g/L}$ 组和阴性对照组之间差异无显著性 ($P > 0.05$); 胰岛素样生长因子 10, 50 $\mu\text{g/L}$ 组和200 $\mu\text{g/L}$ 组之间差异无显著性 ($P > 0.05$)。第2天, 阳性对照组增殖高于胰岛素

样生长因子 1, 5 $\mu\text{g/L}$ 组, 低于10, 50, 200 $\mu\text{g/L}$ 组 ($P < 0.000$ 或 < 0.006); 第4天, 阳性对照组增殖高于胰岛素样生长因子 各剂量组和阴性对照 ($P < 0.000$ 或 < 0.006)。第2, 4天, 胰岛素样生长因子 1, 5 $\mu\text{g/L}$ 组和阴性对照组低于10, 50, 200 $\mu\text{g/L}$ 组 ($P < 0.000$); 阳性对照组增殖高于阴性对照组, 统计分析差异有显著性。第2天结果见图2; 第4天结果见图3。

表1 不同浓度胰岛素生长因子 作用于肌腱细胞第2天、第4天四甲基偶氮唑盐值
Table 1 MTT test of tenocytes cultured with insulin-like growth factor at different concentrations on days 2 and 4 ($\bar{x} \pm s$)

Group	2 nd day	4 th day
Insulin-like growth factor		
1 $\mu\text{g/L}$	0.151 13 \pm 0.011 79	0.351 02 \pm 0.039 94
5 $\mu\text{g/L}$	0.170 16 \pm 0.010 15	0.401 53 \pm 0.051 75
10 $\mu\text{g/L}$	0.273 42 \pm 0.012 02 ^{ab}	0.481 03 \pm 0.032 98 ^{ab}
50 $\mu\text{g/L}$	0.284 37 \pm 0.021 93 ^{ac}	0.462 71 \pm 0.033 01 ^{ac}
200 $\mu\text{g/L}$	0.279 86 \pm 0.023 18 ^{ac}	0.458 91 \pm 0.015 04 ^{ac}
Positive	0.241 35 \pm 0.021 02 ^a	0.551 07 \pm 0.031 97 ^a
Negative	0.146 50 \pm 0.012 94	0.351 63 \pm 0.032 20

^a $P = 0.000$, vs. 1 $\mu\text{g/L}$ group, 5 $\mu\text{g/L}$ group and negative group; ^b $P = 0.006$, ^c $P = 0.000$, vs. positive group



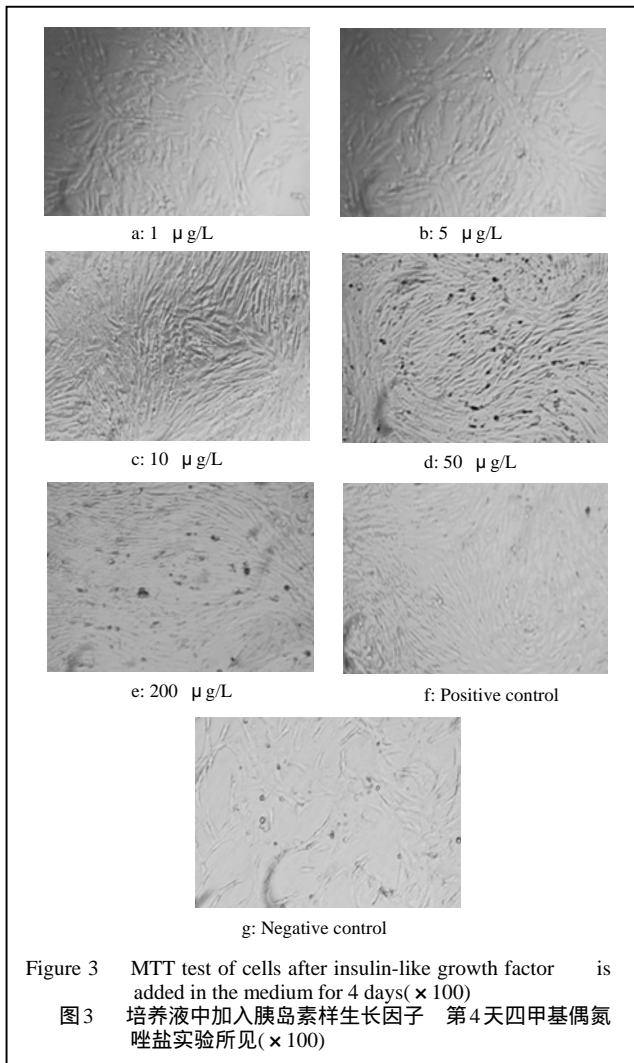


Figure 3 MTT test of cells after insulin-like growth factor is added in the medium for 4 days ($\times 100$)
图3 培养液中加入胰岛素样生长因子 第4天四甲基偶氮唑盐实验所见($\times 100$)

肌腱细胞的生长过程：肌腱细胞增殖随着胰岛素样生长因子 浓度增加而增大趋势，到10 $\mu\text{g/L}$ 时肌腱细胞增殖达到最高水平，到第6代开始增殖速度减慢，细胞开始出现负增长，即细胞死亡的数大于细胞增殖的数量。

瑞士-姬姆萨染色结果：进一步证实肌腱细胞增殖速度随胰岛素样生长因子 浓度增加而有增大趋势，阳性对照组增殖高于1 $\mu\text{g/L}$ 组、5 $\mu\text{g/L}$ 组、10 $\mu\text{g/L}$ 组、50 $\mu\text{g/L}$ 组、200 $\mu\text{g/L}$ 组及阴性对照组。见图4。

3 讨论

肌腱缺损是临床常见疾病之一，肌腱损伤后若未予及时修复常会导致肢体功能障碍，重者甚至残废，因此肌腱损伤或缺失后，手术的修复和功能的重建是手外科十分重要的研究课题之一。随着细胞培养技术和移植技术的发展以及生物材料科学的发展，一种全新的思想肌腱替代物——组织工程人工肌腱，将最终解决缺损肌腱的修复问题。目前，关于组织工程人工肌腱的研究主要包括以下几个方面的内容：细胞支架的研究。种

子细胞的研究。生长因子对肌腱细胞增殖的研究。力学刺激对肌腱细胞作用的研究。肌腱组织的功能细胞是肌腱细胞，它合成和分泌胶原，接受机体的神经-体液调控，维系肌腱组织的新陈代谢。1976年Grcenlee首次从大鼠屈趾肌腱分离培养出肌腱细胞^[1]。经研究表明，肌腱细胞与成纤维细胞体外培养在贴壁时间、延展时间、排列方向及合成胶原类型方面有差异^[2]。因此在本次肌腱组织工程实验中，选择肌腱细胞为种子细胞。作为种子细胞具有以下特点：取材部位恒定，方式简单，不易污染对人体无干扰；体外增殖能力要强，并能定向分化；能适应材料和受区环境；能够方便地通过分子生物学技术进行基因修饰，以便能让种子细胞具有更丰富的基因表型来提高望值。

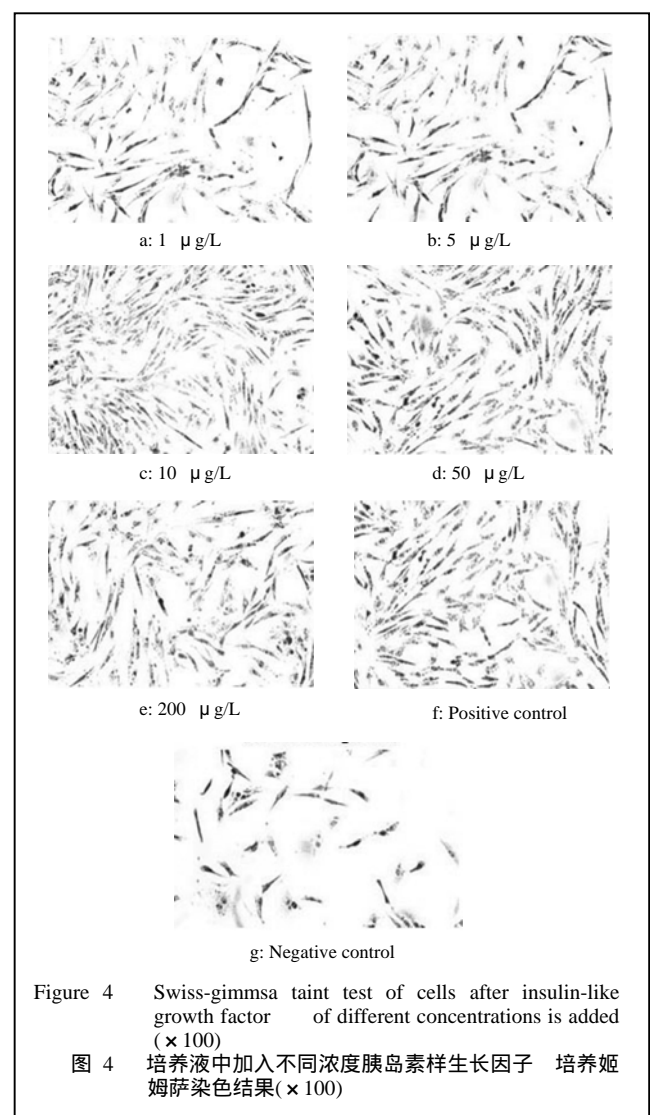


Figure 4 Swiss-gimmsa taint test of cells after insulin-like growth factor of different concentrations is added ($\times 100$)
图4 培养液中加入不同浓度胰岛素样生长因子 培养姬姆萨染色结果($\times 100$)

3.1 不同浓度的胰岛素样生长因子 I 对第2代肌腱细胞体外培养的增殖作用和量效关系 组织工程研究需要相当数量和功能的种子细胞，同时，评价用于同一种工程化组织的支架材料的优劣，也需要用相同的细胞系，才能使研究结果更有可比性。因此，建立可长期传代培

养的标准细胞系成为组织工程研究的一项不可缺少的工作。肌腱细胞是一种分化程度很高的细胞,在体外培养下,肌腱细胞增殖相对缓慢,尤其在体外多次传代后,肌腱细胞甚至丧失进入增殖期的能力。为了突出研究胰岛素样生长因子 对肌腱细胞体外培养条件下增殖的影响,并初步探讨其量效关系,作者采用罗曼鸡的肌腱细胞完成实验,干扰因素少,操作较简便,效果较稳定^[3]。

生长因子是具有诱导和刺激细胞增殖、维持细胞存活等生物效应的蛋白类物质。它通过调节细胞增殖,分化过程改变细胞产物的合成而作用于组织形成的过程。为了使种子细胞更好增殖,有时需要加入生长因子或调节因子碱性成纤维生长因子、胰岛素样生长因子、血小板源性生长因子等生长因子的相关研究很多,其中对胰岛素样生长因子的研究最为深入。项舟等^[4]对胰岛素样生长因子的研究发现胰岛素样生长因子 能使培养的肌腱细胞增殖加快,提前进入平顶期,肌腱细胞的增殖与胰岛素样生长因子 的浓度在一定范围内呈现量效应关系^[5]。同时胰岛素样生长因子 的作用并不导致肌腱细胞的肥大,并得出结论:胰岛素样生长因子 对人胚胎肌腱细胞增殖具有促进作用。Redaelli等^[6]研究发现胰岛素样生长因子 对肌腱细胞的DNA合成及基质合成有剂量依赖性,而且不同部位的肌腱对其反应不同。杨志明等^[7]还发现胰岛素样生长因子 促进肌腱细胞增殖主要是通过加快肌腱细胞mRNA的转录和各种蛋白的翻译合成,并加速其有丝分裂的完成,缩短了肌腱细胞的形成周期。胰岛素样生长因子 功能的发挥离不开它与各类受体以及结合蛋白的相互作用,胰岛素样生长因子 与其受体相结合在细胞的分裂增殖中发挥着十分重要的作用^[8]。而且无论是原代肌腱细胞还是经过多次传代后的肌腱细胞,其胰岛素样生长因子 受体数量及其mRNA的含量均无明显差异^[9]。在培养基中加入外源性胰岛素样生长因子 ,可促进肌腱细胞分裂增殖。胰岛素样生长因子 激活的生物学效应是促进细胞的分裂增殖,其物质基础首先是位于细胞膜系统内的胰岛素样生长因子 受体和细胞间质中存在的胰岛素样生长因子 ^[10]。许多细胞都能自行合成胰岛素样生长因子 ^[11],在体外培养条件下,由于细胞不断增殖,细胞在分裂过程中必须转录并表达胰岛素样生长因子 及胰岛素样生长因子 受体才能保持细胞的生理平衡^[12]。

而宏观上,肌腱细胞生长的调控,在防止肌腱术后粘连和人工肌腱的构建等方面均有十分重要的作用^[13]。如何在实际应用中实施肌腱细胞生长的正负调控措施是一个十分重要的课题,本次实验,在第2代肌腱细胞培养过程中通过添加外在因素胰岛素样生长因子 ,初步探讨其对肌腱细胞增殖作用的量效比,试验过程中发现: 罗曼鸡肌腱细胞很容易贴壁。肌腱细胞贴壁后即进入快速增殖阶段,一般1周后即可进行传代,传代

后细胞增殖进一步加快,有时3天就需要再次传代。

肌腱细胞在6代后增殖开始减慢。培养过程中胎牛血清的浓度直接影响细胞增殖的速度,体积分数为0.05及0.1的胎牛血清培养液时,细胞增殖平稳,发现胰岛素样生长因子 对肌腱细胞增殖速度有明显促进作用^[14]。但这种整形作用并非一种单向曲线,无限度的促进。实验结果发现胰岛素样生长因子 在10 $\mu\text{g/L}$ 浓度时效价比最高,而在超过10 $\mu\text{g/L}$ 时,细胞增殖并非呈上升趋势,而有下降趋势。这一发现,对今后进行肌腱细胞的增殖有直接的指导意义。从分子生物学角度分析过高浓度的生长因子作用下可能会使胰岛素样生长因子 受体系统受到削弱,细胞的正常生长受到干扰,所以对细胞的增殖没有作用,甚至产生抑制作用^[15]。这次试验结果表明: 罗曼鸡的肌腱细胞有独特的生长规律,在传代后细胞进入快速增殖阶段,到第6代开始增殖速度减慢,并迅速进入老化阶段,既细胞凋亡数大于细胞增殖的数量。血清浓度对肌腱细胞有其特殊重要作用,浓度越高肌腱细胞贴壁越快,并对增殖有明显促进作用。体外培养条件下,对于第2代肌腱细胞的增殖类胰岛素因子 有明显的促进作用,随其浓度的增高细胞增殖加速,10 $\mu\text{g/L}$ 为其较适合浓度^[16]。

肌腱细胞是分化程度高而相对静止的细胞生长很差,经研究表明,胰岛素样生长因子是一种潜在的促进有丝分离剂,对肌腱细胞有促进分裂增殖作用,促进胶原,蛋白多糖等细胞外基质的生成,同时能促进肌腱细胞的分裂增殖及细胞外基质的产生^[17],这说明,生长因子的转基因治疗将有望应用于肌腱细胞的研究,如果能够构建成功引导外源基因特异性在肌腱细胞的真核表达启动子,并成功作用于增殖实验,将有望成功揭示胰岛素样生长因子在肌腱生长过程中的作用真谛,简化目前正在进行的各种细胞增殖实验^[18]。反义寡核苷酸链可以进入细胞并发挥其作用^[19],是随着对分子生物学的深入研究带来的一个新发现,是近年来发展起来的一次高生物技术,是目前生物医学研究中的一个新热点。

3.2 四唑盐比色实验用于细胞增殖的比较 四唑盐比色实验是一种检测细胞存活和生长的方法。实验所用的显色剂四唑盐是一种能接受氢原子的染料四甲基偶氮唑盐。检测原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性的四甲基偶氮唑盐还原为难溶性的蓝紫色甲缇并沉积在细胞中,而死细胞无此功能。二甲基亚砷能溶解细胞中的甲缇,用酶连免疫检测仪在490 nm波长处测定其光吸收值,可间接反映活细胞数量。在一定细胞数范围内,四甲基偶氮唑盐结晶物形成的量与细胞数成正比。该方法已广泛用于一些生物活性因子的活性检测,大规模的抗肿瘤药物筛选,细胞毒性实验等。它的特点是灵敏度高,重复性好,操作简便,经济,快速,易自动化,无放射性污染,与其他检测细胞活性的方法(如

细胞计数法, 软琼脂克隆形成实验和H-胸腺嘧啶核苷掺入试验等)有良好的相关性^[20]。本次实验采用这种方法在较短时间内完成了大量的细胞数量比较, 值得在以后的工作中进一步完善和推广作用。

3.3 本次实验尚存在的不足 一方面, 罗曼鸡肌腱与人体肌腱存在一定差别, 所以试验结果的临床意义受一定限制, 今后可试行用人胚胎肌腱, 弥补其不足。另外, 虽然对胰岛素样生长因子 作用的量效关系作了初步探讨, 但是由于经费和时间等条件的限制, 试验的大环境是在传代为第2代的肌腱细胞, 这一代细胞本身增殖活力较强, 外界因素的干扰作用就相对较弱, 所以具体的量效关系指标可能需要进一步推敲不能盲目定论。同时, 当肌腱细胞传代到几十代以上时, 本实验得到的量效关系是否仍然存在, 还需要从更深层的分子生物学角度进行研究, 从而彻底阐明其作用机制。也为下步研究指明了方向。

此外, 在确定了种子细胞和生长因子的前提下, 如何选择细胞生长的支架, 不同种类的支架对生长因子的作用发挥是否存在影响, 都需要做更深的研究。

4 参考文献

- 1 Zhang AY, Pham H, Ho F, et al . Inhibition ofTGF-beta-induced collagen production in rabbit flexor tendons . J Hand Surg 2004 ; 29(2) : 230-235
- 2 Zhai HL,Xu F,Cao DJ,et al.Shanghai Dier Yike Daxue Xuebao 2004;24(4): 271-274
翟华玲,许锋,曹德君,等. 生长因子在人肌腱细胞和皮肤成纤维细胞中的表达差异[J]. 上海第二医科大学学报,2004,24(4): 271-274
- 3 Zhang QF,Yang ZM,Peng WZ. Zhongguo Xiufu Zhongjian Waike Zazhi 1997;11(1):46-48
张前法,杨志明,彭文珍.兔肌腱细胞与成纤维细胞生物学特性研究[J].中国修复重建外科杂志,1997,11(1):46-48
- 4 Xiang Z Yang ZM,Xia QJ,et al. Zhongguo Xiufu Zhongjian Waike Zazhi 1997;11(6):369
项舟,杨志明,夏庆杰,等.胰岛素样生长因子 及其受体mRNA在培养肌腱细胞内的表达[J].中国修复重建外科杂志,1997,11(6):369
- 5 Liu W, Chen B, Deng D,et al. Repair of tendon defect with dermal fibroblast engineered tendon in a porcine model.Tissue Eng 2006;12(4):775-788

- 6 Redaelli A, Vesentini S, Soncini M, et al . Possible role of decorin glycosaminoglycans in fibril to fibril force transfer in relative mature tendons--a computational study from molecular to microstructural leve . J Biomech 2003;36(10) : 1555-1569
- 7 Yang ZM,Xiang Z,Zou LQ.Zhongguo Xiufu Zhongjian Waike Zazhi 1997;11(5):296-299
杨志明,项舟,邹立群.胰岛素样生长因子 作用下肌腱细胞的周期改变[J].中国修复重建外科杂志,1997,11(5):296-299
- 8 Zhai HL.Guowai Yixue:Shengwu Yixue Gongcheng Fenche 2004;27(2): 104-107
翟华玲. 组织工程人工肌腱的研究进展[J]. 国外医学:生物医学工程分册,2004,27(2): 104-107
- 9 Xu F,Liu W,Cao DJ,et al.Shanghai Dier Yike Daxue Xuebao 2004;24(4): 275-278
许锋,刘伟,曹德君,等. 人肌腱与皮肤组织及其细胞中 型和型胶原表达的比较研究[J].上海第二医科大学学报,2004,24(4): 275-278
- 10 Xu Y,Tang JB.Zhonghuang Chuangshang Zazhi 2003;19(6): 348-351
徐燕,汤锦波.核因子- B诱导激酶和I B激酶在碱性成纤维细胞生长因子作用下基因表达及肌腱细胞增殖[J].中华创伤杂志,2003,19(6): 348-351
- 11 Zou YT,Xiang Z,Yang FC,et al.Zhongguo Xiufu Zhongjian Waike Zazhi 2003;17(2): 152-156
周悦婷,项舟,阳富春,等. 生物衍生材料构建组织工程肌腱体内植入的实验研究[J].中国修复重建外科杂志,2003,17(2): 152-156
- 12 Zhang ZF,Shang QX,Cao YL.Zhongguo Linchuang Kangfu 2002;6(22): 3376-3377
张兆锋,商庆新,曹谊林. 体外培养肌腱细胞功能老化的观测[J].中国临床康复,2002,6(22): 3376-3377
- 13 Wang W,Wang ZC,Bao YY,et al.Diyi Junyi Daxue Xuebao 2001;21(7): 481-484
王尉,王子灿,鲍永耀,等. 人胚腱细胞转化生长因子- 受体 、密度分析[J]. 第一军医大学学报,2001,21(7): 481-484
- 14 Beanes SR, Dang C, Soo C,et al . Down-regulation of decorin, a transforming growth factor-beta modulator, is associated with scarless fetal wound healing . J Pediatr Surg 2001;36(11):1666-1671
- 15 Yang ZM,Xiang Z,Zou LQ,et al. Zhongguo Xiufu Zhongjian Waike Zazhi 1998;12(3): 164-168
杨志明,项舟,邹立群,等. 肌腱细胞胰岛素样生长因子 受体密度分析[J]. 中国修复重建外科杂志,1998,12(3): 164-168
- 16 Tsubone T, Moran SL, Amadio PC, et al . Expression of growth factors in canine flexor tendon after laceration in vivo.Ann Plast Surg 2004;53(4):393-397
- 17 Harrison RK,Mudem V, Grobbelaar AO, et al . Synovial sheath cell migratory response to flexor tendon injury : an experimental study in ratsJ Hand Surg 2003;28(6) : 987-993
- 18 Klein MB, Pham H, Yalam anchi N ' et al . Flexor tendon wound healin in vitro : the effect of lactate on tendon cell proliferation and collageproduction . J Hand Surg Am 2001;26(5) : 847-854
- 19 Samiric T, Ilic MZ, Handley CJ . Characterisation of proteoglycans and their catabolic products in tendon and explant cultures of tendon.Matrix Biol 2004;23(2):127-140
- 20 Skutek M, Van Griensven M, Zeichen J, et al . Cyclic mechanical stretching mod ulates secretion pattern of growt h factors in human tendon fibmblasts . EurJ Appl Physiol 2001;86(1) : 48-52