

# 硫酸软骨素对软骨细胞增殖的影响及意义

林 熹<sup>1</sup>, 易自翔<sup>1</sup>, 陈奕权<sup>2</sup>, 张 榕<sup>1</sup>, 杨劲松<sup>1</sup>

**摘要:** 目的 探讨硫酸软骨素对软骨细胞增殖的影响。方法 MTT法研究硫酸软骨素对外培养软骨细胞存活与增殖的影响。结果 在含 20, 10, 5 mg/mL 硫酸软骨素的培养液中, 软骨细胞的增殖不受影响, 用 MTT 法测得的光密度值与对照组无明显差异 ( $P > 0.05$ )。结论 具有软骨细胞保护作用的硫酸软骨素不会促进软骨细胞的过度增殖。

**关键词:** 软骨细胞; 软骨素, 硫酸盐类; 细胞, 培养的; 耳硬化病

中图分类号: R329.24 R764.32 文献标识码: A 文章编号: 1672-4194(2003)02-0191-02

在耳硬化病中, 镫骨底板的前庭侧及底板与前庭窗之间的关节面的软骨组织的破坏吸收是病理改变重要的起始环节<sup>[1]</sup>。因此, 使用具有保护软骨细胞作用的药物可防止病变的发展, 减少对患者听力的损害。但 Jang 等发现在耳硬化病病变的修复期, 镫骨底板和前庭窗周围的软骨组织的过度增殖和骨化可能是耳硬化病中镫骨底板过度增生并固定于前庭窗从而导致听力下降的一个重要环节<sup>[2-4]</sup>。因此, 在治疗耳硬化病时, 必须注意药物对软骨细胞的增生可能产生的影响。已有大量的实验依据表明硫酸软骨素(CS)具有软骨保护作用<sup>[5-7]</sup>。笔者采用体外培养的软骨细胞作为实验材料, 研究 CS 对软骨细胞增殖的影响, 并探讨其运用于耳硬化病防治的可能性。

## 1 材料与方法

1.1 主要试剂 Ham's F12 干粉为美国 Gibco 公司产品, 胎牛血清为杭州四季青公司产品, 胰蛋白酶自英国 EML 公司, 梭状芽胞杆菌胶原酶 II 型、透明质酸酶、硫酸软骨素 A (CSA)、噻唑蓝 (MTT) 均购自 Sigma 公司。

1.2 动物 日本小白兔 (2~3 月龄) 体质量 1.5~2 kg, 由福建医科大学中心动物室提供。

## 1.3 方法

1.3.1 软骨细胞的体外培养 兔软骨单个细胞的分离、接种及原代培养采用体外单层软骨细胞培养方法<sup>[8]</sup>。在原代培养软骨细胞形成单层后 (10 d) 进行实验。

1.3.2 CSA 对软骨细胞增殖的影响的 MTT 法测定 取第一次传代的软骨细胞, 调节细胞含量为  $3 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ , 在 96 孔培养板上每孔加入  $100 \mu\text{L}$ , 接种

24 h, 见细胞已贴壁后吸出原培养液, 换入含 10% 胎牛血清的 F12 培养液, 再加入含不同质量浓度 (0, 5, 10, 20 mg/mL) 的 CSA (用 F12 溶解,  $0.22 \mu\text{m}$  滤膜过滤除菌), 每孔体积  $100 \mu\text{L}$ , 每种 CSA 的质量浓度均设 3 个复孔, 同时设不含 CSA 的细胞对照孔和不含细胞只加培养液的空白对照孔。将此培养板置于  $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱内培养, 每两天换液一次。第 10 天时, 每孔加入 MTT 溶液  $20 \mu\text{L}$  (5 mg/mL), 继续在 5%  $\text{CO}_2$   $37^\circ\text{C}$  的培养箱内培养 4 h, 然后终止培养, 小心吸弃上清液, 每孔加入 2% 十二烷基硫酸钠 (SDS)-50% 二甲基甲酰胺 (DMF)  $100 \mu\text{L}$ , 振荡器上振荡 15 min,  $37^\circ\text{C}$  孵育 18 h 后在酶标仪 (Model  $\Sigma 960$  型) 上  $570 \text{ nm}$  波长处进行比色测定。

1.4 统计学处理 数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示, 统计学处理采用 Student's *t* 检验。

## 2 结果

分别含 20, 10, 5 mg/mL 的 CSA 的条件培养液对软骨细胞的生长无明显影响, 实验组和对照组软骨细胞的形态及大小均未见明显差异 (图 1, 2) 用 MTT 法测得的光密度值 (*D* 值) 与对照组差异无显著性 ( $P > 0.05$ , 表 1)。



图 1 对照组软骨细胞  
F12 培养液中不含 CSA  $\times 250$

收稿日期: 2002-10-18

修回日期: 2003-04-17

作者单位: 福建医科大学 1. 附属第一医院耳鼻咽喉科, 福州

350005 2. 人体解剖学与组织胚胎学系, 福州 350004

作者简介: 林 熹 (1968~), 男, 主治医师, 博士研究生。

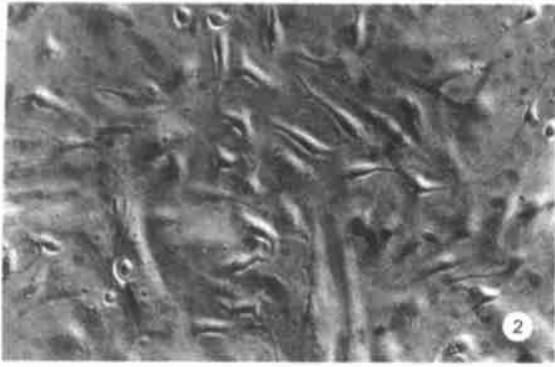


图 2 实验组软骨细胞  
F12培养液中含 20 mg/mL CSA  $\times 250$

表 1 不同质量浓度 CSA对软骨细胞增殖的影响

CSA (mg/mL)	D
0	0.53 $\pm$ 0.043
5	0.505 $\pm$ 0.039
10	0.495 $\pm$ 0.027
20	0.472 $\pm$ 0.046

### 3 讨论

耳硬化病的病因至今未完全明了。其病变常自骨迷路的内生软骨层开始<sup>[1]</sup>, 镫骨底板的前庭侧及底板与前庭窗之间的关节面的软骨组织的破坏吸收常是重要的始动环节, 因此, 使用具有保护软骨细胞作用的药物, 可望保护这些部位的软骨组织, 防止耳硬化病病灶的发展, 减少对患者听力的损害。

Pipitone证明CS能抑制补体、透明质酸酶、弹性蛋白酶等<sup>[7]</sup>, 因此CS具有保护软骨组织免受这些损伤因子作用的功能, 即具有软骨保护作用。进一步的研究发现, 其口服后吸收良好, 能浓集于软骨基质, 无毒性, 无致畸性<sup>[5]</sup>。在国外已成功地应用于病理特征为关节软骨受损的骨关节炎的治疗, 发现其具有良好的减轻临床症状, 缓解功能受损的功效<sup>[5]</sup>。因此, 可以考虑利用CS或其衍生物的软骨保护作用来治疗耳

## Effects of Chondroitin Sulfate on the Proliferation of Chondrocytes *in vitro*

LIN Xi<sup>1</sup>, YI Zi xiang<sup>1</sup>, CHEN Yi quan<sup>2</sup>, ZHANG Rong<sup>1</sup>, YANG Jin song<sup>1</sup>

1. Department of Otorhinolaryngology, The First Affiliated Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350005, China

2. Division of Anatomy, Histology and Embryology, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China

**ABSTRACT:** Objective To figure out the influence of chondroitin sulfate on the proliferation of chondrocytes and the possible role in treating otosclerosis. **Methods** The effect of chondroitin sulfate on proliferation and viability of the chondrocytes were studied by MTT method. **Results** In the conditioned medium containing 5, 10, and 20 mg/mL of chondroitin sulfate, the proliferation of the chondrocytes was not found. **Conclusion** Chondroprotective agent of chondroitin sulfate will not cause the over-proliferation of chondrocytes *in vitro*.

**KEY WORDS:** chondrocyte; chondroitin sulfates; cells, cultured; otosclerosis

硬化病, 以取得保护骨迷路的软骨组织, 防止病灶发展的作用。

本实验发现, 在培养液中含不同浓度的CS对软骨细胞的增殖无明显的影响, 其D值与对照组无明显的差异。光镜下细胞的形态与大小亦无明显差异, 说明CS不会促进软骨细胞的过度增殖。另外, 有研究证明CS对软骨细胞的生物活性也无明显影响<sup>[9]</sup>。因此, 具有软骨保护作用的CS在治疗耳硬化病时不仅可以保护骨迷路中的软骨组织, 防止病变的进展, 而且不会在病变的修复过程中促进软骨组织的过度增生及进一步的过度骨化。因此CS在耳硬化病的治疗上应有良好的前景。

### 参考文献:

- [1] 黄选兆, 汪吉宝. 实用耳鼻咽喉科学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998 973-977.
- [2] Jiang SC, Yi ZX. Significance of chondrification in the development of otosclerotic stapedial footplate [J]. *J Otolaryngol*, 1994, 23(6): 406-410.
- [3] Ye SN, Yi ZX, Wang PY, et al. The role and significance of chondroitin sulfate in the development of otosclerosis [J]. *Laryngoscope*, 1995, 105: 1005-1009.
- [4] 王沛英, 姜泗长, 叶胜难, 等. 波形蛋白-9在耳硬化症病变中的意义 [J]. 中华耳鼻咽喉科杂志, 1993, 28(1): 6-7.
- [5] Bartolucci C, Cellai L, Corradini C, et al. Chondroprotective action of chondroitin sulfate. Competitive action of chondroitin sulfate on the digestion of hyaluronic acid by bovine testicular hyaluronidase [J]. *J Tissue React*, 1991, 13(6): 311-317.
- [6] Baici A, Bradamante P. Interaction between human leukocyte elastase and chondroitin sulfate [J]. *Chem Biol Interact*, 1984, 51: 1-2.
- [7] Pipitone V R. Chondroprotection with chondroitin sulfate, drugs [J]. *Exp Clin Res*, 1991, 17(1): 3-7.
- [8] 魏西秦, 曹峻岭, 熊咏民. 兔软骨细胞培养方法研究 [J]. 中国地方病学杂志, 1987, 6(2): 89-92.
- [9] 林 熹, 易自翔, 陈奕权, 等. 硫酸软骨素对软骨细胞琥珀酸脱氢酶活性的影响及意义 [J]. 福建医科大学学报, 1998, 32(2): 142-144.