

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12N 5/00 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01816579.6

[45] 授权公告日 2009年7月8日

[11] 授权公告号 CN 100510059C

[22] 申请日 2001.9.28 [21] 申请号 01816579.6

[30] 优先权

[32] 2000.9.29 [33] US [31] 09/677,109

[86] 国际申请 PCT/US2001/042366 2001.9.28

[87] 国际公布 WO2002/026116 英 2002.4.4

[85] 进入国家阶段日期 2003.3.28

[73] 专利权人 里兰斯坦福初级大学理事会

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 R·L·史密斯 D·R·卡特

D·J·舒尔曼

[56] 参考文献

US5752925A 1998.5.19

US5746704A 1998.5.5

审查员 丁慧萍

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 戈泊

权利要求书1页 说明书26页 附图8页

[54] 发明名称

用于软骨和胶原以及骨重塑的体内、离体和体外修复和再生的方法

[57] 摘要

本发明公开了一种用于体内、离体和体外软骨和胶原再生的方法。通过间断应用流体静力压在体内、离体和体外再生并重新形成关节软骨和胶原。外部间断负载的方法由应用流体静力压的重复期和随后间断的再生期构成。间断流体静力压的应用为生理水平 5 - 10Mpa 进行 4 小时，然后修复期多至大约 20 小时，在体外应用到软骨细胞、软骨在离体的植入物和体内应用到软骨的所述的压力保持在动关节的关节区域内不受损伤的水平。间断负载导致基质降解酶、前炎症细胞因子和吸引炎症细胞进入关节腔的趋化因子的选择性抑制，并导致抑制 II 型胶原表达的生长因子的基因表达选择性下降。

1. 一种通过将变性、患病或损伤的软骨、软骨移植片在离体或体外,进行间断施加 0.5 至 30MPa 之间的间断施加流体静力压每天进行 1 至 8 小时、然后通过 16 至 23 小时恢复期、进行 4 至 100 天而再生至其机械和生化功能的软骨。

2. 一种通过将软骨细胞在离体或体外,进行间断施加 0.5 至 30MPa 之间的间断施加流体静力压每天进行 1 至 8 小时、然后通过 16 至 23 小时恢复期、进行 4 至 100 天而再生至其机械和生化功能的软骨。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的软骨,其中所述的压力施加频率为 1Hz。

4. 根据权利要求 3 所述的软骨,其中所述的间断施加的压力进行 4 小时,恢复期进行 20 小时。

5. 根据权利要求 4 所述的软骨,其中所述的压力为 0.1MPa~10MPa。

6. 根据权利要求 5 所述的软骨,其中所述的压力为 5MPa~10MPa。

7. 根据权利要求 6 所述的软骨,其中所述的软骨在体外通过将软骨细胞进行间断流体静力压再生。

用于软骨和胶原以及骨重塑的体内、离体和体外修复和再生的方法

发明背景

技术领域

本发明涉及一种用于体内、离体和体外修复、再生、重新形成和重塑患病和正常间充质或间充质衍生细胞、软骨、胶原和骨的方法。本发明特别涉及通过间断应用流体静力压在体内、离体和体外再生关节软骨和胶原以及骨的重塑。本方法涉及包括应用流体静力压的重复期和随后间断的恢复期构成的应用外部间断负载。本发明具体涉及在0.5-30Mpa水平应用间断流体静力压进行1-8小时期，然后多至大约16-23小时的恢复期，在体外应用到软骨和骨细胞、在离体的软骨植入物和骨移植片以及体内应用到软骨的所述的压力保持在在动关节的关节区域内不受损伤或体内骨组织不受损伤的水平。间断负载导致提供软骨和骨独特表型特性的蛋白质的表达明显增加，还导致基质降解酶、前炎症细胞因子和吸引炎症细胞进入关节腔的趋化因子的选择性抑制，并导致抑制细胞外基质修复和再生的生长因子的基因表达选择性下降。

本发明还涉及治疗关节软骨和胶原再生、修复和移植的方法。

背景技术

关节炎疾病，特别是骨关节炎较其他疾病影响了更多的人。骨关节炎涉及软骨功能的丧失，而在多数关节中软骨都经历缓慢的进展性变性过程。虽然骨关节炎被认为是非炎症性疾病，但是某种程度的炎症还是发生了。骨关节炎与类风湿性关节炎的区别在于类风湿性关节炎是一种慢性炎症性关节疾病。

骨关节炎影响许多中老年人群。与骨关节炎有关的状况降低了个人的生产力和生活质量，在老年社会，通过增加许多其他慢性疾病如骨质疏松的发病率而增加了男性和女性的发病率和死亡率。目前，对末期关节疾病唯一的治疗需要较大的外科手术，涉及不能排除相关并

发症如感染、无菌性松弛和疼痛的全关节置换。然后这些并发症可以导致必须进行修正性关节成形术。通过新的能取消关节置换的必要性外科技技术来逆转早期骨关节炎的发病目前尚在实验阶段。

关节内外科方法已经得到了发展，必须将软骨细胞从关节的健康区转移到患病处的表面以保存关节功能。在本上下文中，使用开放的外科方法，将软骨细胞或小区域的软骨置于关节表面内的部分或全厚缺损。然后将细胞构建物通过原位缝合的骨膜组织固定在原位。然而，正常情况下用自身来源的软骨或异源性软骨植入细胞或置换表面，体重承受。在许多病例中，这些移植片很快变成原纤维并且降解。在一个可选择的方法中，马赛克成形术 (mosaicplasty) 包括将多个小软骨移植片从关节表面的一个区域移植到另一个区域以促进恢复承受体重。不管用何种类型的软骨置换，在使用前的恢复正常软骨的细胞外基质结构后，修复的效率将大大加强。

因此，软骨、胶原和骨疾病是一个主要的问题，特别是在更倾向于患骨关节炎和其他关节变性疾病的老龄人群中。因此，获得一种治疗关节连接软骨和胶原变性和骨重塑的方法将会是很重要的。

关节软骨覆盖长骨的两端，是载重组织，它将压力沿着关节表面分布，因此保护更硬的位于其下部的骨。它还提供了平滑的关节连接和在日常生活中的正常活动中关节的弯曲。

不断的有关于再生关节软骨的尝试。例如美国专利 6, 080, 194 描述了通过将多孔胶原海绵与胶原膜结合性成胶原板。专利 5, 786, 217 描述了修复关节软骨缺损的方法和组合物。专利 5, 206, 023 公开了治疗和修复软骨缺损或损伤的方法和组合物。专利 5, 041, 138 涉及软骨在体内从细胞培养物到新形体形成，以生长和植入软骨结构。然而，这些专利中没有一个公开能将患病的软骨再生到功能状态的方法，这种方法仍然是缺乏的。

人体的临床实验和用动物模型的实验研究确认机械负载为保持正常关节软骨的体内平衡提供了必要的刺激 (Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 190:275(1989))。

由于固定 (Clin. Orthop. Rel. Res., 219:28(1987))、韧带松弛 (Ibid, 213:69(1986))、过多的应力 (J. Biomechanics, 6:51(1973))

或软骨下骨硬度增加(J. Biomechanics, 28:357(1995))导致的关节负载的改变导致骨关节炎特性的病理学改变。

软骨迅速并可逆地改变形状的能力归因于具有高含量的高度可溶性的包绕在胶原中的蛋白多糖的高弹和弹性基质,而胶原是不溶性的纤维网架。在软骨组织中存在的蛋白多糖、胶原和其它分子是由间充质来源的软骨细胞(cartilage cell),软骨细胞(chondrocyte)产生的。

体外研究表明,通过由物理刺激对赋予细胞的应力和弹力的合成代谢或分解代谢反应,软骨细胞,关节软骨细胞能对特异的负载条件反应(Biochem. Biophys. Res. Commun., 240:216(1997); Spine, 22:1085(1997)和 J. Orthop. Res., 15:189(1997))。

机械负载在调节关节软骨细胞代谢中作用的认识部分通过压力通过关节面分布的数学分析描述(J. Biomech., 22:853(1989))。

在 J. Exp. Physiol., 81:535(1996)中描述的生物机械分析确认动关节软骨中的软骨细胞经受了来自日常生活的正常活动导致的7-10Mpa 的流体静力压水平。测定机械压力对组织分化的影响的研究表明,经受间断的较高的压力性流体静力压在动关节区域产生增加厚度的软骨。经受减低的流体静力压以及在关节面正切方向有拉力的区域的软骨较薄(Bone, 11:127(1990))。

在 J. Orthop. Res., 9:1-10(1991)中描述的实验研究确认当体外应用流体静力压时能影响关节软骨基质代谢,并且认为,在体外,5-15Mpa 水平的流体静力压调节 $^{35}\text{SO}_4$ 和 ^3H -脯氨酸进入成年牛关节软骨的比率。

在 J. Biol. Chem., 262:15490(1987)描述的器官培养实验表明,蛋白多糖产生的区域与单纯流体静力压的区域一致。如 J. Orthop. Res., 14: 53 (1996) 中描述的那样,生理水平的流体静力压增加聚合素(aggreacan)和 II 型胶原的 mRNA 信号水平,其测定是负载后马上测量。在牛软骨移植片的控制压力负载的聚合素 mRNA 表达的研究中,在 1 小时的负载之后观察到其短暂上调。

虽然上述研究描述和认识了流体静力压对软骨和 II 型胶原正常功能的重要性,但是这种认识尚不能应用到临床,因为持续应用流体静力压导致软骨代谢潜能耗竭及其损伤,而短暂(<1 小时)的流体静力

压负载导致变化的细胞反应，其干扰了软骨细胞的代谢和稳态。例如，短暂的流体静力压负载导致 II 型胶原 mRNA 表达增加，而持续应用负载并不会保持这种增加的表达。另一方面，在整个负载期间，聚合素信号表达持续增加。显然，这些结果干扰了在聚合素和 II 型胶原之间的细胞平衡。软骨细胞以不可能预知的方式对多种刺激反应，并且反应的可变性依赖于负载的时间、强度和频率。显然，该不可预知性阻止了使用持续长或短期的无差别的流体静力压负载治疗骨关节炎或损伤软骨的再生 (J. Rehab. Res. Dev. 37:153-161(2000))。

考虑到骨关节炎和其它软骨、胶原或骨疾病的严重性和致残作用，提供一种能允许软骨或胶原再生和骨重塑的方法将是重要的。

直到最近，才相信一旦关节软骨的支撑纤维的排列被打乱，其本身就不会再修复 (Articular Cartilage and Osteoarthritis, Workshop Conference Hoechst and Werk, Kalle-Albert, Wiesbaden May 12-16, 1991, Kuettner 等人编辑, Rosen Press, New York)。

现在已经发现，用给间充质细胞或间充质衍生细胞如成纤维细胞、纤维软骨细胞或软骨细胞间断施加流体静力压的特别的治疗方案是可以进行这类再生的，因此，本发明的一个主要目的是提供一种通过刺激其再生、重新形成和骨重塑治疗骨关节炎和其它软骨和胶原疾病的方法，所述的方法提供了一种能使成人软骨和骨细胞再生和修复的限制性机械负载环境。

发明概述

本发明一方面是用于修复、再生和重新形成软骨、补充软骨细胞或沉淀 II 型胶原和刺激和骨重塑的方法。

本发明的另一方面是通过使用间断负载治疗方案刺激软骨和胶原再生和骨重塑治疗软骨、胶原或骨疾病的方法，所述的治疗方法包括在特定的负载间期内应用间断施加流体静力压的重复期，然后是恢复期。

本发明的另一方面是用于修复、再生和重新形成软骨的体内、离体或体外方法，其中所述的再生是通过在原位或其它部位软骨或软骨细胞或体外的软骨或软骨细胞应用包括施加流体静力压的重复期、然

后是恢复期的间断负载治疗方案获得的。

本发明的仍然另一个方面是体内或离体软骨修复、再生和重新形成的方法，该方法包括给需要原位再生的软骨组织或者从原位去除的软骨或软骨细胞、成纤维细胞或粘附到基质的纤维软骨细胞施加流体静力压，并进行包括间断施加流体静力压大约 1-8 小时、然后大约 16-23 小时的恢复期的治疗方案。

本发明的仍然另一个方面是体内胶原修复方法，包括给需要修复和再生的软骨、软骨细胞、其它间充质衍生细胞或胶原组织施加流体静力压。

本发明的仍然另一个方面是体内骨重建方法，包括给需要软骨再生的骨区域施加流体静力压作为前体组织，或使用以下治疗方案的直接机械刺激，治疗方案包括给骨的成骨细胞间断施加流体静力压大约 1-8 小时、然后大约 16-23 小时的恢复期。

本发明的仍然另一个方面是患病关节的再生方法，其中接受间断流体静力压负载和重建为健康承受负载的软骨的软骨移植片放入患病的软骨以恢复其正常功能。

本发明的仍然另一个方面从患病的软骨再生的功能性健康承受负载软骨，其中将所述的患病的软骨进行间断的流体静力压然后是恢复期，直到恢复正常的机械和生物化学特性。

本发明的仍然另一个方面是一种检测软骨功能的方法，其通过测定软骨或骨降解酶、细胞因子和其抑制剂或生长促进物质、生长因子和激素的相对水平或表达水平测定软骨的功能，然后给患病软骨或骨进行间断流体静力压，然后是恢复期。

附图简述

图 1 是适于给关节软骨细胞应用间断流体静力压的伺服液压负载装置示意图。

图 2 显示用不同强度的间断流体静力压的间期负载对聚合素（图 2A）和 II 型胶原（图 2B）在正常人关节软骨细胞表达作用图。

图 3 显示间断流体静力压对聚合素和 II 型胶原 mRNA 在人骨性关节炎软骨细胞表达作用图，负载为 10MPa，4 小时，4 天。

图 4 显示用不同强度的间断流体静力压的间期负载对使用 ELISA 从正常人关节软骨细胞释放的基质金属蛋白酶-2 (图 4A) 和使用酶谱对激活 (+APMA) 和失活制剂的酶活性 (图 4B) 作用图。

图 5 显示用不同强度的间断流体静力压的间期负载对转化生长因子- β (TGF- β) 从正常人关节软骨细胞释放作用图。

图 6 显示用不同强度的间断流体静力压的间期负载对巨噬细胞趋化因子蛋白-1 (MCP-1) 从正常人关节软骨细胞释放的作用图。

图 7 显示没有用不同强度的间断流体静力压的间期负载对成纤维细胞生长因子 (FGF-1) 从正常人关节软骨细胞释放作用图。

图 8 是 II 型和 I 型胶原和 β -肌动蛋白在未负载对照细胞中表达的 RT-PCR 信号水平图。

图 9 显示在暴露于 IHP 和未负载对照细胞中 β -肌动蛋白表达的信号水平图。

图 10 显示在高密度单层培养物暴露于 IHP 后聚合素表达的 RT-PCR 信号水平图。

图 11 显示在高密度单层培养物暴露于 IHP 后 II 型胶原表达的 RT-PCR 信号水平图。

图 12 显示从暴露于间断流体静力压 (10Mpa) 的 MG-63 细胞释放的 TGF- β 1 的时间段分析。

图 13 显示间断流体静力压对 MG-63 细胞释放 TGF- β 1 的剂量效应。

图 14 显示从暴露于 IHP 的 MG-63 细胞释放的 MMP-2 的时间段分析。

定义

在此所用:

“网状骨质”表示具有类网状或海绵状结构的骨。

“间充质”或“间充质干细胞”或“间充质来源细胞”表示位于并且产生软骨的细胞外基质 (软骨细胞)、结缔组织 (成纤维细胞)、纤维软骨 (纤维软骨细胞)、肌腱 (腱细胞) 和骨 (成骨细胞和骨细胞)。

“负载”或“负载间期”表示应用的 IHP 负载的时间或刺激组织、然后不施加外力、而且压力恢复到环境条件的恢复期。

“间期”表示根据需要负载和恢复期重复多次的结合。

“重新形成”表示软骨结缔组织、纤维软骨、肌腱和骨的生成，是在暴露于负载间期后，在支持结构（支架或胶原基质）内附着软骨细胞、成纤维细胞、纤维软骨细胞、腱细胞和成骨细胞。

“成骨细胞”表示来自间充质（成纤维细胞）的骨形成细胞，并形成骨性基质，在其中被封闭成为骨细胞。

“成纤维细胞”或“纤维细胞”表示星状或梭状细胞，存在于结缔组织中，其胞浆能形成胶原纤维。

“聚合素”表示在赋予关节软骨压力弹性和能负载压力中起作用的巨大聚集的蛋白多糖。聚合素代表大约所有总蛋白多糖 85% 的丰富的蛋白多糖。

“II 型胶原”表示 $\alpha 1(11)$ 链的同源聚合多糖分子，它是单基因 COL2A1 的产物。II 型胶原是所有其它类型胶原中最丰富的，占总胶原大约 95%。

“基质金属蛋白酶”或“MMP”代表引起和在患病的关节中与软骨降解有关的蛋白酶。MMP 可以进一步区分为 MMP-1、MMP-2、MMP-9 等。

“巨噬细胞趋化因子蛋白-1”或“MCP-1”表示影响组织免疫状态的前-炎症培养基。其水平增加与组织破坏的开始或增加有关，其水平降低与组织损伤降低或愈合有关。

“转化生长因子- β ”或“TGF- β ”表示在施加间断流体静力压后细胞释放的因子，并意味着细胞代谢的改变。

“成纤维细胞因子 1”或“FGF-1”表示一种已知不参与软骨细胞或类成骨细胞增殖的生长因子。

“Mpa”表示兆帕斯卡。1Mpa 等于 145psi。

“GAG”表示糖化氨基多糖。

“IHP”表示间断流体静力压。

“GAPDH”表示甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

“APMA”表示 4-氨基酚汞乙酸盐，一种活性酶的隐性前酶的激活剂。

发明详述

此处描述的发明涉及一种发现，即在间歇负载期间断和重复地施

加流体静力压影响关节软骨基因表达,诱发负载依赖的胶原 II 型表达,减少基质金属蛋白酶,软骨和胶原,允许间充质或间充质衍生细胞在基质内的重新形成,并改变了骨的重塑。该发现适于变性性关节疾病的修复和治疗,如骨关节炎、关节性疾病、关节软骨的损伤、降解性关节疾病、关节置换、骨结构重建和其它软骨、胶原和骨疾病。

I. 用于软骨和胶原变性和骨重塑的方法

用于软骨和胶原变性和骨重塑以治疗上述疾病的方法在其较广的范围内包括在体内损伤部位、可移植的离体人类骨关节炎或患病软骨或骨的全厚移植片或分离自体外健康或患病软骨、胶原和骨的细胞应用根据本发明的间断间歇负载治疗方案。

A. 一般软骨变性性疾病的治疗方案

治疗方案包括用重复施加流体静力压阶段,然后恢复期(负载间期)刺激治疗组织或分离细胞。优选在每一负载期间施加间断压力。根据选择再生的方法选择方法参数如压力、间期的频率和长度、中断和恢复期,即再生方法是在体内、原位离体或体外,以及根据疾病和软骨变性的严重性不同。

1. 流体静力压

适于未受损软骨、骨、软骨和骨移植片或细胞的修复、再生或重新形成的负载治疗方案一般包括施加 0.5 Mpa 至 30 Mpa 之间的流体静力压,优选 1 Mpa 至 20 Mpa,最优选 5 Mpa 至 10 Mpa 之间,为 1Hz 频率的间断间期。

通常不使用或不推荐使用超过 30 Mpa 的压力,因为它们可以导致细胞损伤,而低于 0.1 Mpa 的压力对细胞或组织的再生没有效果。5-10 Mpa 左右的压力对应于体内关节软骨遭受的正常生理水平。

2. IHP 和恢复期的间期

高压间期的时间一般在几分钟至大约 8 小时之间的范围,优选 1 小时至 8 小时,最优选大约 4 小时。

在恢复期,目的组织/细胞暴露于空气中或足够低的恒定压力。恢复期的范围一般为几分钟至 10 小时,优选大约 16 小时至大约 23 小时,优选大约 20 小时。

3. 频率

在每一间断流体静力压期间，间断施加的压力频率为 0.1Hz 和 10Hz 之间，优选 1Hz 的等级。在用于软骨细胞的优选的实施方案中，负载治疗方案的间期是施加至少 4 个连续天，通常在 1Hz、10 Mpa 施加进行大约 4 小时的负载，然后在恒定环境压力下恢复大约 20 小时。

4. 治疗长度

软骨的治疗时间的长短整个依赖于软骨变性的程度和严重性、胶原丢失的程度、骨疾病的严重性或关节损伤的程度和严重性。一般在大约用 IHP 负载治疗 4 个周期后观察到软骨功能和其再生的改善，即，通常在 4 天的治疗即可观察到。

在变性严重或软骨损伤严重的情况下，这种治疗可以持续长至 100 天而无任何副作用，当软骨和/或胶原功能慢性受损时，该治疗可以无限持续下去。优选的治疗将持续 7 至 30 天和在 7 至 30 天成功。

关于重新形成，胶原基质被健康或被治疗的患病的细胞充满，可以持续治疗直至新组织形成。

5. 功能测试

治疗的长短依赖于功能恢复的速度。软骨的功能依赖于承受负载基质的恢复和/或重建和/或形成。细胞变形、对基质不合适水平的切线应力负载和由于代谢变化导致的变性导致软骨的变性。

这些代谢变化影响着有关聚合素和胶原的软骨细胞的基因表达，特别是 II 型胶原，还有某些生长因子如 TGF- β 。这些变化和软骨细胞代谢也导致在健康功能的软骨细胞通常不表达或表达很低的蛋白的表达或过度表达，如金属蛋白酶 MMP-1、MMP-2、MMP-9 和前炎症细胞因子，如 IL-1 和 IL-6。

结果，在 IHP 负载治疗期间或特别是治疗后，测试了上述因子的某些或全部评价了其活性增加的存在。缺少活性或其活性的降低与软骨完整性的再生和负载承受功能有关。

表 1
功能性测试

生理水平	聚合素	II 型胶原	MMP-2	MMP-1	MMP-9	IL-6	IL-1	MCP-1
	4-7wt% 湿重	10-29 wt%湿重	低	低	nd	低	nd	低
病理水平	0.1-1 wt% 湿重	1-10 wt%湿重	高	高	升高或 高	高	升高	高
再生水平	4-7%	10-20%	低	低	nd	低	nd	低

nd=未检测到或痕量

此处公开的功能测试包括细胞外基质成分如聚合素和 II 型胶原、蛋白酶如 MMP-1、MMP-2、MMP-9、和细胞因子如 IL-6、IL-1 和 MCP1 的相对值的测定。根据组织制备和使用的方法的不同这些值有所不同，但变化趋势相同，即在损伤或变性的软骨和胶原中，胞外基质蛋白水平下降，蛋白酶和细胞因子水平增加。在再生阶段，其水平恢复至其正常生理水平范围。

已经发现根据本发明施加负载治疗方案能刺激关节软骨组织、胶原组织、骨组织和/或其相应分离的细胞的再生。也发现间断负载治疗方案能增加形成关节软骨的功能性胞外基质的蛋白的基因表达。在施加本发明的间断负载治疗方案以后，用阳离子染色的基质的染色证实了胞外基质的增加的存在。

另外，也发现间断负载治疗方案导致基质降解酶、前炎症细胞因子和吸引炎症细胞进入关节腔的趋化因子的选择性抑制。而且，已经发现间断负载治疗方案能抑制 II 型胶原表达，并影响人的类成骨细胞中转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、基质金属蛋白酶如，例如 MMP-1、MMP-2、MMP-9 和金属蛋白酶组织抑制剂 (TIMP) 的表达。这些和其它因子可以方便地用于评价软骨和骨的功能，如表 1 所示。

这些用于检测测定功能性的参数的方法包括但不限于，反转录聚

合酶链式反应(RT-PCR)、酶谱、生化、染色、酶联免疫吸附测定(ELISA)、基因排列技术和蛋白模拟学(proteomimics)。

B. 体外治疗

对于体外治疗来说,损伤的软骨组织是通过外科方法从病人取出的。间断负载治疗方案可以施加到用于离体治疗的未受损组织如骨软骨移植片上。对体外治疗来说,正常或患病的软骨基质降解,间断负载治疗方案施加到获得的悬浮培养在支架/支持或作为单层的软骨细胞中。在应用负载治疗方案后,获得的重新形成的组织或收集的细胞再重新植入患者体内。优选地但非必要地,移植物是自身来源的。

外科手术通常是使用骨软骨移植采用已经开发和使用的关节镜干预方法。在该手术中,软骨的全厚标本从关节表面的周围区域去除,然后转移到环状缺损中。通常接受移植区域的环状面小于被插入的材料以便被插入的区域和移植组织之间的结合能够阻力相配。在对应于间断负载反应产生的材料中,调节恢复的软骨材料的大小以与关节的凹凸表面相配。这与通常的骨软骨移植不同,后者的移植片大于软骨周围表面 2-3mm。能够抗拒正常关节负载的 II 型胶原基的胞外基质的形成使得压力植入的移植片能够与正常关节表面的厚度相配,而正常关节表面的厚度与对应于正常关节区域的可变性的自然厚度一致。

细胞、单层细胞或细胞培养的体外治疗基本上在第 II 部分描述。

C. 离体治疗

离体治疗特别适合治疗关节软骨损伤,如仅仅有部分软骨受损、剩余的软骨是健康的和有功能的,例如半月板撕碎或撕裂,对于离体治疗来说,撕裂或撕碎的软骨作为软骨片以外科方式取出,然后进行 IHP 负载治疗方案。定期测试软骨移植片的功能,直到达到如表 1 所示的正常健康软骨水平的标准。然后,保留其原始形状和大小的移植片被重新植入到关节中。在无菌条件下进行 IHP 离体治疗、测试、外科取出和重新植入。

离体治疗的优点在于组织是自身来源的,只有受损的组织经受治疗,并且移植形状和大小与原来相同,加入的软骨组织不多也不少。另外,仅当组织完全再生以后再重新植入。该方法的缺点是双重的手术。然而,在扩展性关节损伤中,对关节置换或使关节没有软骨或总

共仅有部分软骨来说，该方法仍然是优选的。

D. 体内治疗

合适的体内软骨重建或骨重塑方法包括施加根据本发明间断负载治疗方案给病人的关节和/或肢体的软骨组织或骨施加描述的流体静力压。可以由物理治疗师手动控制，也可以通过电力装置自动控制。

E. 间断负载流体静力压的装置

用于体内、离体和体外治疗的关节软骨基质和/或细胞再生的装置和设备基本包括流体静力压发生器、频率计数器、定时仪和温度控制装置。

合适的体外设备包括容纳目的组织、细胞或细胞培养的压力腔室、与压力腔室液体相连的流体静力压负载装置（压力装置），以给压力腔室施加预定的目标压力，和与负载装置电相连的控制频率的控制电子装置以控制负载装置向目的组织或细胞施加预定的间断负载治疗方案。

向分离的关节软骨细胞施加间断流体静力压用于体外治疗的合适的装置见图 1。图 1 所示的特别的装置是商业购买的，与施加流体静力压负载装置相接的不锈钢压力容器。该设计提供了完全从系统中排除空气，使系统获得单纯施加的流体静力压。

图 1 所示的设备仅仅是示范性的，可以理解，不管怎样修改，含有相似元件并提供相似结果的任何设备和装置都在本发明的范围之内。合适的体内装置包括控制患者关节或肢体的控制件或连接患者组织的连接件、用于控制件沿着预定的通路移动的与控制件结合的马达和与马达电相连的控制电子装置以控制马达移动患者肢体，以便给目的软骨组织施加本发明的间断负载治疗方案。

体内关节的负载是通过旋转有问题的动关节的装置完成的。例如，对膝关节来说，设备旋转的距离是从臀部至足底，以具有保持大腿伸展的相应限制。该装置包括接触装置，通过该接触装置股骨踝软骨可以 0.1 和 10Hz 之间的频率沿着半月板并置在胫骨坪软骨上，并且将产生 1-20MPa 范围的压力，进行 1-8 小时的指定的间期，在正常日常活动下更接近大约 4 小时/天。

II. 人类正常和骨关节炎软骨细胞的间断负载

关节软骨细胞在关节软骨的胞外基质内暴露的机械负载的主要器件是流体静力压。在日常活动期间关节的正常负载使关节软骨暴露在高水平的间断流体静力压下。该部分描述的研究表明，体外保持的骨关节炎软骨细胞对施加的流体静力压的反应是增加了正代谢活性，降低了破坏酶的表达。

间断流体静力压对分离的成人关节软骨细胞中软骨基质蛋白合成的作用集中在 II 型胶原、聚合素和其它降解性和促进生长性蛋白的 mRNA 的表达，如 MMP-2、TGF- β 、MCP-1 和 FGF-1。这些研究的结果见图 2-7。

在这一系列研究中，对用 1MPa 或 10MPa 流体静力压刺激正常健康和骨关节炎人软骨细胞 5 分钟或 4 小时进行 4 天的聚合素、II 型胶原、MMP-2、TGF- β 、MCP-1 和 FGF-1 的 mRNA 表达与对照组的 mRNA 表达进行了比较。当以剂量反应范围从 1、5 和 10MPa 对等的方式进行负载时，限于间断 5 分钟或间断 4 小时/天的 1 MPa 和 10 MPa 的流体静力压，用 1 MPa、5 MPa 和 10 MPa 负载观察到的聚合素 mRNA 增加，如图 2 所示。

图 2 所示的结果清楚证明目前间断负载治疗方案导致聚合素和 II 型胶原基因表达增加。聚合素的量很大，并且有大量的在赋予关节软骨压缩弹性中有重要作用并能够承受持续压力负载的聚集蛋白多糖。II 型胶原使组织具有拉伸强度。因此，本发明的治疗导致软骨弹性增加，并且能够承受较大的负载。

图 3 显示用 10 MPa 的间断流体静力压 (IHP) 间断负载 4 小时进行 4 天后对聚合素和 II 型胶原 mRNA 信号表达的影响，其信号是以人骨关节炎软骨细胞内聚合素或 II 型胶原与细胞内参考蛋白 β -肌动蛋白的比率表示的。

这些结果清楚的证明在软骨细胞外基质中主要的大分子蛋白，即聚合素和 II 型胶原的表达在患病的骨关节炎的人软骨细胞经受 IHP 治疗后增加。

如图 3A 和 3B 所示，施加间断流体静力压导致聚合素对 β -肌动蛋白信号产生的比率从大约 0.1 增加至大约 0.5，即大约有 5 倍的增加。II 型胶原对 β -肌动蛋白信号比率甚至从大约 0.01 增加至大约 0.12，

如图 3B 所示。

也研究了流体静力压对软骨细胞作用的免疫组化分析。免疫组化提供了细胞外基质对机械负载反应的指数。用上述的负载条件，免疫组化分析显示施加流体静力压增加了胞外基质蛋白多糖和胶原沉积（数据没有显示）。

为了研究 IHP 是否能够影响软骨缺失的分子的表达，进行了一系列实验以评价蛋白酶和生长因子的释放和有效的间断负载。

通过在如图 2 中描述的相同的条件测试流体静力压的作用测定间断流体静力压间断负载对基质金属蛋白酶 mRNA 表达抑制的影响。

图 4 中所示的结果显示用不同强度的间断流体静力压进行间断负载对基质金属蛋白酶-2 从正常人关节软骨细胞中释放的作用。

是多种已知与患病关节中软骨降解相关酶中的一种。在以 10 MPa 施加 IHP 4 小时进行 4 天后该酶水平降低表明细胞外基质的修复和再生在进展中。如图 4B 所示的中性金属蛋白酶表达的酶谱分析表明，进行间断流体静力压 4 小时，然后是 20 小时恢复期进行 4 天的 APMA 降低了明胶分解活性水平。

转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 已知参与加速的基质再吸收的代谢变化，而加速的基质再吸收在例如骨关节炎中发生，而其中激活了聚合素代谢的合成和分解通路。因此，TGF- $\beta 1$ 影响了软骨的体内平衡。

TGF- $\beta 1$ 的作用在前祖细胞中作用深远，如骨的骨膜区域的周围。TGF- $\beta 1$ 对分离的软骨细胞的直接作用根据产生的蛋白水平的变化而变化，因为它代表对不同细胞的多向性作用。向培养关节软骨细胞中加入 TGF- $\beta 1$ 降低了被认为是基质产生的 II 型胶原的表达。

图 5 显示用不同强度的间断流体静力压进行间断负载对 TGF- $\beta 1$ 从正常人关节软骨细胞中释放的作用。

如图 5 所示的间断流体静力压对 TGF- β 释放的作用表明细胞代谢是通过机械刺激调节。该生长因子的产生降低明显伴随细胞代谢的其他变化。

如图 5 所示，施加 IHP 4 小时，用高压 (10 MPa) 间断施加更长的时间，正常软骨细胞显示蛋白合成降低。这些结果表明，IHP 刺激以

时间和剂量依赖的方式分别影响了软骨细胞的代谢状态。如以下将会看到的那样，在用 IHP 刺激类成骨细胞后观察到了相似的结果。

图 6 显示用不同强度的间断流体静力压进行间断负载对巨噬细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 从正常人关节软骨细胞中释放的作用。

MCP-1 代表一系列影响组织的免疫状态的前炎症培养基中的一种。MCP-1 在软骨细胞中的降低明显作为细胞代谢有变化的标记，并且是在终止伴随软骨降解或损伤的炎症过程中的标记。MCP-1 的释放通常伴随着单核细胞和巨噬细胞的补充，而单核细胞和巨噬细胞是免疫系统细胞，在组织破坏中具有重要作用。其表达减少显示软骨损伤的缓解。

如图 6 所示，MCP-1 从正常人关节软骨细胞中的释放在以 10 MPa 施加 IHP 4 小时后明显降低了大约 8 倍。

观察到的 MCP-1 释放的降低清楚表明软骨的抗炎症或抗损伤机制较不活跃，由此导致软骨降解和破坏的程度较轻。

为了研究在 IHP 后 MMP-1、MMP-2 或 TGF- β 释放的降低是否对软骨降解中参与的那些蛋白是选择性的，用不参与这种过程、因此与不反应的成纤维细胞生长因子 1 进行了研究。结果在图 7 中显示。

图 7 显示用不同强度的间断流体静力压进行间断负载对成纤维细胞生长因子-1 (FGF-1) 从正常人关节软骨细胞中释放无作用。

图 7 显示不是所有的生长因子都对间断流体静力压都有反应，而仅仅是参与软骨降解或再生的那些因子有反应。图 7 还显示软骨细胞不是由 IHP 损伤导致的，MMP-2、TGF- β 和 MMP-1 的释放降低是由于损伤的软骨细胞所致。

在图 2-7 中描述的本研究的目的是探究在分离的成人软骨细胞对软骨应用间断流体静力压是否导致基质蛋白合成的变化。

图 2-7 结合在一起显示过量或不足 (10 MPa 5 分钟或 1 MPa 4 小时) 的关节软骨的负载不能够提供用于软骨修复和再生的足量的刺激，在某些情况下甚至能导致降解增加，功能丧失。图 2-7 所示的结果证明在 IHP 和导致软骨再生的软骨代谢过程中的有益的变化之间发生之间有相关性。

关节功能的恢复依赖于患病软骨的修复和再生。上述的大量的实验方法证明机械负载影响关节软骨细胞胞外基质成分即聚合素和 II 型

胶原的合成。然而，至今仍没有显示机械 IHP 刺激作为用于软骨修复和再生的动力，建立的机械诱导的软骨基质基因表达之间存在清楚的关联。上述的结果使得在体内、离体和体外进行干预治疗成为可能。

III. IHP 对 II 型胶原和聚合素的 mRNA 表达的时间依赖作用

导致本发明的初始研究表明，通过增加或降低相关蛋白合成的代谢活性的测量，持续施加的流体静力压不会导致软骨修复和再生。短时间施加这种压力导致 II 型胶原 mRNA 表达增加，而持续施加负载不能保持这种增加的表达。另一方面，在整个负载期间，聚合素信号表达持续增加。

第 II 部分记录的研究表明，在 IHP 和软骨细胞代谢过程之间有关联。

本部分描述的研究表明，IHP 对体外正常成年牛关节软骨细胞的 II 型胶原和聚合素 mRNA 表达的时间依赖作用。

本研究的目的是测试施加到软骨细胞的间断压力是否增加 II 型胶原和聚合素 mRNA 水平，而不刺激 I 型胶原 mRNA。实验方法依赖于使用 RT-CPR 的相对于 β -肌动蛋白 mRNA 作为内参信号，对胶原和聚合素 mRNA 水平进行了相对定量。

特别地，本发明测定了两种间断流体静力压负载治疗方案对 II 型胶原和聚合素 mRNA 在正常成年关节软骨细胞中的表达的影响。根据实施例 1 分离软骨细胞。成年关节软骨细胞的定量负载系统使用高密度单层培养 (1.75×10^5 细胞/cm²) 或聚集的细胞簇。

使用间断流体静力压的细胞负载以超过 24 小时的持续方式或根据实施例 3 用每天施加 4 小时的负载作为间断负载进行。使用半定量反转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 测试 II 型胶原、聚合素和 β -肌动蛋白 mRNA 信号测定关节软骨细胞的代谢反应。结果见图 8-12。

图 8 是显示在未负载高活性软骨细胞培养中，通过指定的测试时间 2-24 小时的 II 型胶原和 I 型胶原和 β -肌动蛋白表达的 RT-PCR 信号水平。

图 9 显示在暴露于 IHP 和未负载的对照细胞中的细胞内 β -肌动蛋白表达的信号水平。

图 8 显示通过 RT-PCR 测定的 II 型胶原和 β -肌动蛋白在没有刺激

的根据实施例 3 在 2、4、8、12 和 24 小时的对照细胞中的信号水平。
RT-PCR 条件如实施例 4 的描述。

图 8 显示 II 型胶原和 I 型胶原和 β -肌动蛋白在未负载对照细胞中表达的 RT-PCR 信号水平可以清楚的检测，而且没有变化。

关于 II 型胶原 mRNA 或 β -肌动蛋白 mRNA 的信号水平，在环境压力（未负载对照培养）作为高密度单层培养铺板和保存的关节软骨细胞不显示明显的变化。如图 8 所示，在 2、4、8、12 和 24 小时的时间过程内保持真实水平。

为了测定在对应于施加 IHP 不会变化的参考 mRNA 水平，以提供比较的参考点，选择 β -肌动蛋白是由于其相对丰富的 mRNA，并且基于作为定位。

图 9 显示在未负载对照细胞中暴露于间断流体静力压细胞的 β -肌动蛋白 RT-PCR 信号水平。

如图 9 所示，当与未负载对照细胞比较时，将软骨细胞暴露于间断流体静力压 2、4、8、12 和 24 小时不会改变 β -肌动蛋白 mRNA 信号水平。

与之相反，向在单层培养或聚集培养中的正常软骨细胞应用 IHP 表明 II 型胶原 mRNA 信号在 4 和 8 小时的负载期间并不明显，其后下降。另一方面，在相同条件下，聚合素 mRNA 显示不同的特征，并持续增加 24 小时之久。

关于 II 型胶原的表达结果促使确定施加 IHP 4 小时间期然后是恢复期的间断负载。

使用持续负载通过 24 小时间期使软骨细胞培养聚集物暴露于间断流体静力压。结果见图 10 和 11。

图 10 显示在高密度单层培养物暴露于使用间断负载 4 小时/天、然后 20 小时的恢复进行 4 天的间断流体静力压后，聚合素的 RT-PCR 信号水平。

图 11 显示在高密度单层培养物暴露于使用间断负载 4 小时/天、然后 20 小时的恢复进行 4 天间断流体静力压后 II 型胶原的 RT-PCR 信号水平。

在这些负载条件下，聚合素 mRNA 的信号水平比未负载的对照组增

加了大约 4 倍（图 10）。负载治疗方案的改变导致 II 型胶原 mRNA 信号比未负载的对照组增加大约 7 倍（图 11）。

上述研究和图 8-11 中的结果显示改变负载治疗方案软骨细胞的反应模式包括暴露于间断流体静力压 4 小时、然后是 20 小时的恢复期，II 型胶原 mRNA 的 RT-PCR 信号对应于代表 β -肌动蛋白 mRNA 信号明显升高。聚合素的 mRNA 信号也升高。

这些数据表明，用合适刺激类型的机械 IHP 负载可以调节关节软骨细胞基质大分子的表达。获得的结果证明应用特别的负载治疗方案促进了关节软骨的修复和再生，并导致可移植的软骨移植片的复合物的成功产生。

记载的流体静力压对软骨细胞的作用表明特定负载治疗方案提供了能调节软骨胞外基质大分子合成的有效刺激，并启动与损伤的软骨和 II 型胶原的修复和再生有关的反应。

IV. 间断流体静力压对类成骨细胞 TGF- β 1 和 MMP-2 表达的影响

在正常体重承受活动过程中产生的机械应力归功于骨的结构和功能，这通过特别的成骨细胞的形成和吸收的特定循环实现的。响应负载事件，对于保持正常骨内平衡涉及许多激素、细胞因子和生长因子。

在上述的发现之后，本发明研究了间断流体静力压（IHP）是否调节了多效性生长因子的表达，细胞 MG-63、HOS TE85 中生长因子-的表达，以及它是否作为机械信号调节骨细胞代谢。因为这个缘故，测试了 IHP 对成骨细胞 TGF- β 1 表达的影响，而 TGF- β 1 已知能影响成骨细胞增殖和骨特异蛋白的表型表达。另外，研究了基质金属蛋白酶 MMP-2 的表达。

结果如图 12-14 所示。图 12-14 阐明了 IHP 对类成骨细胞 MG-63 中 TGF- β 蛋白产物或 MMP-2 表达的影响。

图 12 显示 TGF- β 1 从暴露于 10MPa 的 IHP 的 MG-63 细胞释放的时间阶段分析。图 13 显示 IHP 对 TGF- β 1 从 MG-63 细胞中释放的剂量反应作用。图 12 和图 13 中的条块和垂直线分别代表平均值 \pm 标准误差，(n=3)，与对照相比 $p < 0.05$ 。

通过 ELISA 研究了 TGF- β 1 蛋白在 MG-63 条件培养基中的浓度。如图 12 所示，暴露于 IHP 12 小时后没有观察到 TGF- β 1 释放的明显

改变。然而,从图 12 中同样也可以看出,应用 IHP 24 和 48 小时使 TGF- β 1 从 MG-63 细胞中的释放相对于未负载的细胞分别降低了 65% ($p < 0.05$) 和 53 ($p < 0.05$)。在 HOS TE85 细胞中观察到相似的结果(数据没有显示)。

第二系列研究如图 13 所示,用 MG-63 细胞测定 IHP 对 TGF- β 1 表达的剂量反应效应。在 1 和 10 MPa 水平暴露于 IHP 12 小时不改变 TGF- β 1 释放。如图 13 所示,在 1 MPa 或 10 MPa 应用 IHP 24 小时后,与未负载细胞相比,释放进培养基中的 TGF- β 1 分别抑制了 23%和 31%。

图 14 描述通过 ELISA 的 MMP-2 的时间阶段分析,是在暴露在 IHP 下从 MG-63 细胞释放量 (pg/ml)。

图 20 显示使用 ELISA 在条件培养基中 MMP-2 释放的定量分析。在酶谱分析中观察到相似的结果(数据没有显示)。如图 20 所示,在 24 和 48 小时暴露于 IHP 后,相对于对照组, MMP-2 释放分别被明显抑制 46%和 28%。在相同的条件下应用 IHP 也降低了在类成骨细胞条件培养基中 TIMP-1 的释放。在暴露于 IHP 24 和 48 小时之后,相对于未负载细胞, TIMP-1 的释放分别被明显抑制 63%和 29%。在任何时间过程,暴露于 IHP 的细胞或未负载细胞的培养基标本中没有测定到 MMP-1 和 MMP-9 的表达(数据没有显示)。

酶谱分析研究表明 MMP-2 是 MG-63 释放的显著的基质金属蛋白酶。在 IHP 存在下,酶谱表明与未负载细胞标本相比,在暴露于 IHP 24 和 48 小时细胞的培养基标本中,无活性 72kD 形式的和两种激活形式 68kD 和 62kD 的 MMP-2 的释放受到抑制。

VI. 治疗作用

本发明的治疗方法用于矫形外科、风湿病学、运动和康复医学领域。本发明方法允许患病或受损的软骨、特别是关节软骨的重新形成和再生。通过外部应用向患病或损伤关节间断施加流体静力压几小时、然后是恢复期的装置,本发明方法允许软骨原位外部治疗。本发明方法还允许离体再生从患病或损伤的关节取出的软骨或可使用的软骨移植片,再生这些软骨或移植片达到软骨的机械和生化特性恢复到正常水平的程度,一旦软骨胶原基质恢复,可以将移植片植入关节。另外,该方法还允许以下体外治疗:软骨和骨细胞和细胞培养物进入适于移植的功能性组织,重新形成和产生健康正常功能软骨和其他间质衍生

细胞。

实施例 1

软骨细胞的分离

该实施例描述了用于分离软骨细胞的方法。

成年牛关节软骨分离自从当地屠宰场获得的新鲜桡腕关节剖分的全厚软骨。

软骨细胞是通过以下方式从基质中释放的：在 15ml 含有庆大霉素（50 μ g/ml）和 II 型以及 IV 型（Worthington, Freehold, NJ）细菌性胶原酶混合物的 Dubecco 改进的 Eagle 培养基（DMEM）中孵育，每一种胶原酶在 15ml Dubecco 改进的 Eagle 培养基/Ham' s F12（DMEM/F12, Gibco BRL, Grand Island, NJ）中的终浓度为 0.6mg/ml，培养基含有 25 μ g/ml 的 gentoamicin（Sigma, St. Louis, MO）。软骨标本在 37 $^{\circ}$ C 在 7.5% CO_2 和 100%湿度下孵育 18 小时，以确保消化完全。从基质中释放的软骨细胞通过尼龙筛过滤器过滤以分离单细胞。随后通过在 600 \times g 重复离心收集细胞，其中细胞重新悬浮并收集在 Dulbecco 磷酸缓冲盐溶液中（3 \times 50ml）。

最终的细胞沉淀物悬浮在无血清 DMEM/F12 培养基中，细胞在血细胞记数仪中记数，存活性用台盼蓝染色排除评价。在这些条件下获得软骨细胞的正常的存活性大于 95%。

然后将软骨细胞铺板在 60mM 组织培养板上，培养物保持在 37 $^{\circ}$ C 的湿度环境中，在 7.5% CO_2 的空气中。对于无血清条件的附着，单个培养板用多聚 D-赖氨酸（Sigma, 0.1mg/ml）过夜预处理，用无钙或镁的磷酸缓冲盐溶液（PBS）冲洗两次。细胞铺板的密度为 1×10^5 细胞/ cm^2 。

实施例 2

含有血清或无血清的培养基

该实施例描述了含有血清或无血清的组合物。

含有血清的 Dubecco 改进的 Eagle 培养基（DMEM）含有 10%v/v 浓度的经过透析的热灭活胎牛血清。无血清培养基由 1: 1 的添加有硒和脂质体的 Ham' s F12/DMEM 组成。通过在 1ml 的 2: 1 氯仿/甲醇（体积比）中溶解卵磷脂、胆固醇、鞘磷脂和维生素 E 乙酸盐制备脂质体，在氮气下干燥。加入 1ml 的 DMEM/F12，然后将脂质混合物用 70%负载

周期的微量离心管进行超声处理 3 次，每次时间为 3 分钟。该脂质体储存液以 1000 倍的终浓度制备，在氮气下保存，并在 4℃ 储存。在某些实验中，以 50 μ g/ml 的浓度在培养基中加入抗坏血酸盐。

实施例 3

用间断流体静力压进行机械负载

本实施例描述了施加间断流体静力压的负载治疗方案和条件。

以 10MPa 的负载剂量和 1Hz 的频率循环施加流体静力压负载。在 2、4、8、12 和 24 小时的间期去除负载，或通过间断负载治疗方案，4 天的时间后移去细胞，在该期间，间断流体静力压施加并限制在每天 4 小时，然后是 20 小时的恢复期。这种实验每天重复，进行 4 天或者更多天，每一实验时间点测试 3 次，每一实验进行最少 3 次独立的实验。

用商购的如图 1 所示与饲服流体静力压负载装置相连的不锈钢压力容器产生压力。该设计提供从该系统完全排除空气，所以施加的压力是纯粹的流体静力压。在含有 45ml 的培养基中（含有 30mM HEPES，用于在缺少二氧化碳下对 1:1 的 DMEM/F12 的 pH 稳定，pH 值调节至 7.4）的无菌热封口袋中负载培养板。

通过部分浸于保持在 37℃ 的循环水浴中，对流体静力压负载容器控制温度。在多至 96 小时的负载期间没有测到温度变化。对照组培养保持在热封口袋的相同的条件下，置于放置在与负载培养板相同温度控制的水浴中的相同的容器中。

实施例 4

聚合素和 II 型胶原 mRNA 信号水平 (RT-PCR) 的分析

该实施例描述通过 RT-PCR 用于分析聚合素和 II 型胶原 mRNA 信号水平的方法。

为了在每一负载条件下测试多个样品，使用半定量 RT-PCR 的实验方法用于分析聚合素和 II 型胶原 mRNA 信号水平，如 *J. Orthop. Res.*, 15:94(1997) 中描述的。负载，来自暴露于间断流体静力压的细胞和来自未负载细胞的总 RNA 用商购的三联试剂 (Sigma, St. Louis, MO) 通过异硫氰酸胍方法从细胞中提取出来，如 *Biochemistry*, 18:5296(1979) 中描述的方法。每 60mm 培养板的细胞 RNA 的典型产量是 5 微克。

所有的 RNA 制备常规地在琼脂糖凝胶上筛选用于核糖体 RNA 的完

完整性。通过分光光度计测定总 RNA 的浓度，调节至 200ng/ μ l，使用随机六聚体引物进行反转录。使用 m-MLV 反转录酶 (Gibco-BRL) 在 RN 酶抑制剂 (5-Primer, 3-Primer, Inc., Boulder, Co.) 和 500 μ M dNTPs (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT) 存在下将 mRNA 样品转变成单链 cDNA。反应在 37°C 进行 15 分钟，42°C 10 分钟，47°C 10 分钟，最后升至 99°C 使反转录酶失活。反应混合物稀释 10 \times ，用于 PCR。

通过 PCR 扩增反转录 cDNA 样品中的靶序列，使用设计的序列特异寡核苷酸引物产生大约 200-bp 序列，其跨越聚合素 (Anal. Biochem., 225:356(1995)) 和 II 型胶原 (Arch. Biochem. Biophys., 314:90(1994)) 基因之内的不同外显子。用于聚合素和 II 型胶原的引物组基于用于这些基因的出版的序列资料。

特异产物的 DNA 大小分析和 DNA 序列分析确定使用该引物组对产生的产物的有效性。

用 1.0 μ l 的 cDNA 在含有 1.5 μ l 的 PCR 母混合物的 0.5ml 反应管中进行 PCR；反应在 65°C 启动以避免非特异退火。PCR 母混合物含有 125mM Tris HCl、50mM 每一种上游和下游引物，和 0.625U/ml Tf1 DNA 聚合酶 (Epicentre Technologies, Madison, WI)。3000Ci/mmol (Amersham NEN-Corp.) 的 32 P- α -dCTP 加入到反应混合物中，产生 0.1mCi/ml 终浓度的扩增产物的随机放射标记。PCR 起始的总反应体积是 2.5ml。

为了比较相对表达，0.5ml 含有 900nM 用于扩增 β -肌动蛋白的 3 ‘非翻译区的寡核苷酸引物组的引物溶液、50mM Tris HCl、20 mM 硫酸铵、1.5mM 氯化镁加入到第 10 个循环，在相同的反应管中扩增。 β -肌动蛋白 mRNA 用作内参以监测扩增条件中的管与管变化和 cDNA 的初始浓度或载量。热循环程序包括在 95°C 初始加热 3 分钟的 1 个循环，然后是 95°C 1 分钟和 65°C 1 分钟的重复循环。最终的延伸是在 72°C 进行 5 分钟。在本研究中使用的总循环数量对聚合素和 II 型胶原来说是 30 个循环，对 β -肌动蛋白来说是 26 个循环。

PCR 的扩增产物在 5% 聚丙烯酰胺凝胶上分离，使用 PhosphoImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) 直接分析凝胶。mRNA 的相对表达表示为比信号水平，以聚合素和 II 型胶原信号对 β -

肌动蛋白信号的比率表示。

实施例 5

统计方法

本实施例详细描述了用于评价实施例 3 和实施例 4 获得的结果的统计学方法。

用多样本比较测试 (SAS, Gary, NC), 一般线性方法测定负载和未负载标本之间的差异显著性。

通过半定量 RT-PCR 技术确定 mRNA 信号水平, 在处理和未处理标本之间提供了足够的差异, 这样用 5 次独立实验测定 $p < 0.05$ 显著性差异获得动力水平 (power level)。在定量 mRNA 的情况下, 假设的实验是, 相对于 β -肌动蛋白的表达, 基质基因表达有明显的改变。已经测定的 β -肌动蛋白的表达对间断流体静力压反应没有变化。这可以使用成对 t-检验测试不同培养标本之间的显著性。

实施例 6

人成骨细胞培养

本实施例描述了用于制备人成骨细胞培养物的方法。

人的类成骨细胞 MG-63 和 HOS TE85 是从美国模式菌种收集中心 (Manassas, Virginia) 购买的。

细胞在 60mM 含有 α 基本培养基的培养皿 (α -MEM) (Gibco, Grand Island NY) 中, 在 37°C、含有 5%CO₂ 的空气中培养, 在培养基中添加 10%胎牛血清 (Gibco) 和抗细菌-抗真菌剂 (Gibco, 100 U/ml 青霉素, 100ug/ml 链霉素, 0.25ug/ml 两性霉素 B)。

在没有血清存在的情况下, 再培养铺满培养物 24 小时, 使其生长停滞。去除培养基将培养平板置于含有 40ml 的无血清 α -MEM 的热封口袋中, α -MEM 中添加 0.1% BSA、15mM HEPES、抗坏血酸 (50 μ g/ml) 和 β -磷酸甘油钠 (10mM)。热封口袋浸入充满水的高压容器中, 施加 IHP (频率为 1Hz, 1 或 10MPa)。

对照组培养物保持在环境压力下。压力容器和未负载对照培养物也保持在环境压力下。在测试阶段, 压力容器和未负载对照培养物保持在水浴中以保持 37°C 的温度。在图 13-18 的附图说明指定的时间点收集培养基标本, 使用前储存于 -20°C。

为了研究 mRNA 的稳定性，放线菌素 D (2.5mg/ml) 溶解在甲醇中，以 5 μ M 的终浓度加入到培养物中。

以相同的方式获得人软骨细胞，但预先用 0.1mg/ml 的胰蛋白酶处理以去除蛋白酶和胶原抑制剂。

实施例 7

在条件培养基中的 TGF- β 蛋白水平的测定

本实施例描述了用于在培养基中测定 TGF- β 蛋白水平的方法。

配对的抗 TGF- β 1 抗体购自 R & D Systems (Minneapolis, MN)。用 1N HCl 激活条件培养基中的无活性的 TGF- β 1，通过加入 1.2M NaOH/0.5 M HEPES 缓冲液中和条件培养基标本。使用酶联免疫吸附实验 (ELISA) 测定总 TGF- β 1。所有的标本分成 3 份分析。在 450nm、595nm 的背景校正 ELISA 读数器上测定光密度。

实施例 8

TGF- β 的 Northern 印迹分析

本实施例描述了用于 TGF- β 的 Northern 印迹分析的条件。

通过方法从细胞中提取总 RNA。

对 Northern 印迹分析，将 10 μ g 的总 RNA 变性，在 1%琼脂糖 1.1M 甲酰胺凝胶中电泳，用溴化乙啶染色，测定 28S 和 18S 带的完整性。用标准方法转移到尼龙膜上。将膜与 32 P-标记的 cDNA 探针杂交测定 TGF- β 1 (ATCC) 和 GAPDH (ATCC)。

每一杂交探针的放射活性用 PhosphoImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) 分析。

实施例 9

统计分析方法

本实施例详细描述了用于统计分析实施例 7 和实施例 8 描述的研究的方法。

处理和对照组之间的显著性使用 ANOVA 和非配对 Student 两样本的 t-检验 (双尾)，采用多样本比较的 Bonferroni 近似法测定。所有的值以平均值 \pm 标准误差表示。Northern 印迹结果以靶 mRNA 信号 (TGF- β 1) 比看家基因 mRNA 信号 (GAPDH) 的比率表示。用和不用 IHP 处理观察到的 mRNA 比率的差异用 Mann-Whitney U-检验评价， $p < 0.05$

代表具有显著性。

实施例 10

酶谱

本实施例描述了用于酶谱的条件。

通过在 1.0mM 的 4-氨基苯酚乙酸汞 (APMA) 中、在 37°C 孵育 1 小时激活培养基标本。然后将标本与标本缓冲液混合，在浸入 1mg/ml 明胶的 10%SDS-聚丙烯酰胺凝胶中跑电泳。将胶用水冲洗，在水中 2.5% TritonX-100 中浸泡 1 小时。在 37°C 的底物缓冲液 (0.05M Tris-HCl, pH 8.0, 5mM CaCl₂) 中暴露 16 小时后，用 30%乙醇和 10%乙酸中的考马斯亮蓝 R-250 中对胶染色，然后在水中脱色，以观察明胶分解活性。

实施例 11

在条件培养基中测定 MMP 和 TIMP-1 肽

本实施例描述了用于测定 MMP-1、MMP-2、MMP-9 和 TIMP-1 蛋白在培养基中存在的方法。

在负载完成后，从每一袋中收集培养基标本，使用酶联免疫吸附实验 (ELISA) 试剂盒 (Oncogene, Cambridge, MA)，根据制造商的说明测定 MMP-1、MMP-2、MMP-9 和 TIMP-1 蛋白的浓度。

实施例 12

MMP-2 和 TIMP-1 的 Northern 印迹

本实施例描述了用于 MMP-2 和 TIMP-1 Northern 印迹分析的条件。

通过和实施例 8 中描述的相同的方法从细胞中提取总 RNA。对 Northern 印迹分析，10 μg 的总 RNA 变性，在 1%琼脂糖 1.1M 甲酰胺凝胶中电泳，用溴化乙吡啶染色，以测定 28S 和 18S 带的完整性。用标准方法转移到尼龙膜上。

将膜与 ³²P-标记的 cDNA 探针杂交测定 MMP-2 和 TIMP-1 (ATCC, Manassas, VA)。每一杂交探针的放射活性使用 PhosphoImager (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) 分析。

实施例 13

mRNA 稳定性测定

本实施例描述了用于测定 mRNA 稳定性的方法。

根据实施例 6，通过在细胞中加入放线菌素 D 测定机械负载实验期

24 小时后的 mRNA 稳定性。

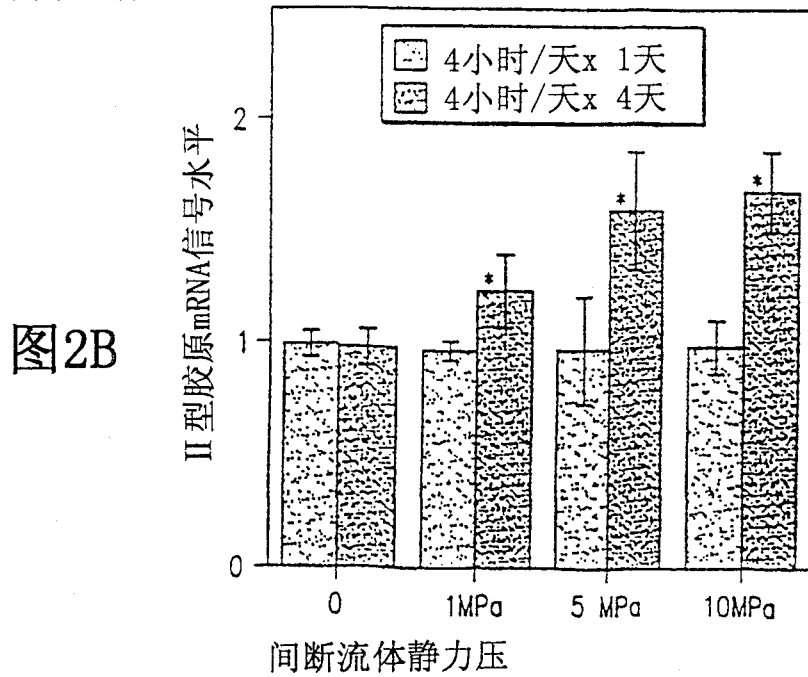
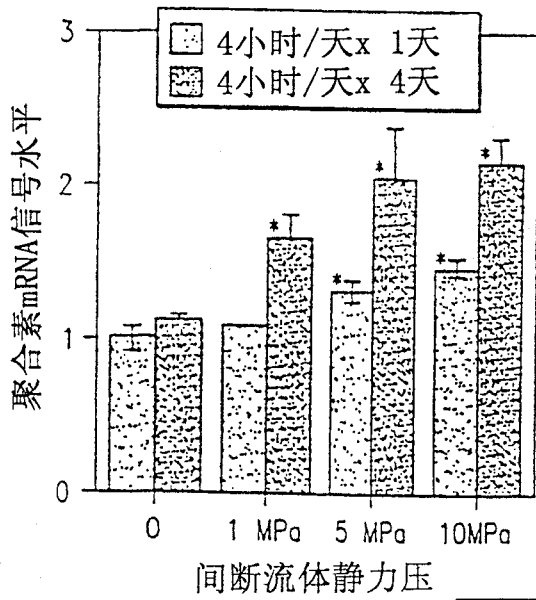
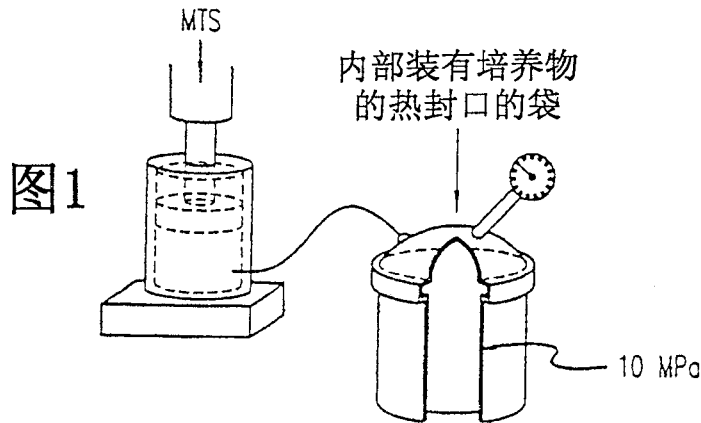
在 4 毫升无血清培养基中。在总细胞 RNA 分离前，将细胞保持 0、1、2 和 4 小时的实验期。mRNA 信号水平的分析如在实施例 11 所述用 Northern 印迹法。mRNA 在对照组中的稳定性用所述没有暴露于 IHP 的细胞测定。

实施例 14

统计学分析

本实施例描述了实施例 10-12 描述的研究中获得的结果的统计分析方法。

处理组和对照组之间的显著性使用 ANOVA 和非配对 Student 两样本的 t-检验（双尾），采用多样本比较的 Bonferroni 近似法测定。所有的值以平均值±标准误差表示。



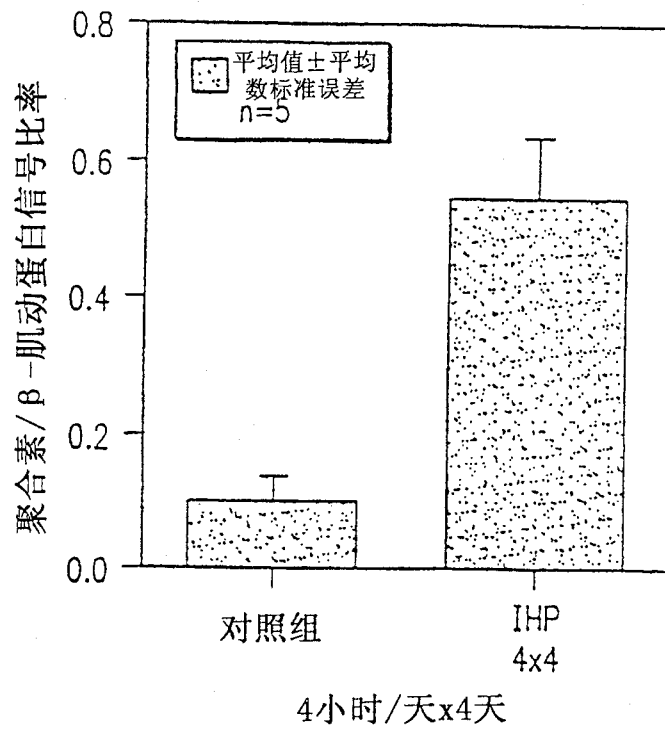


图3A

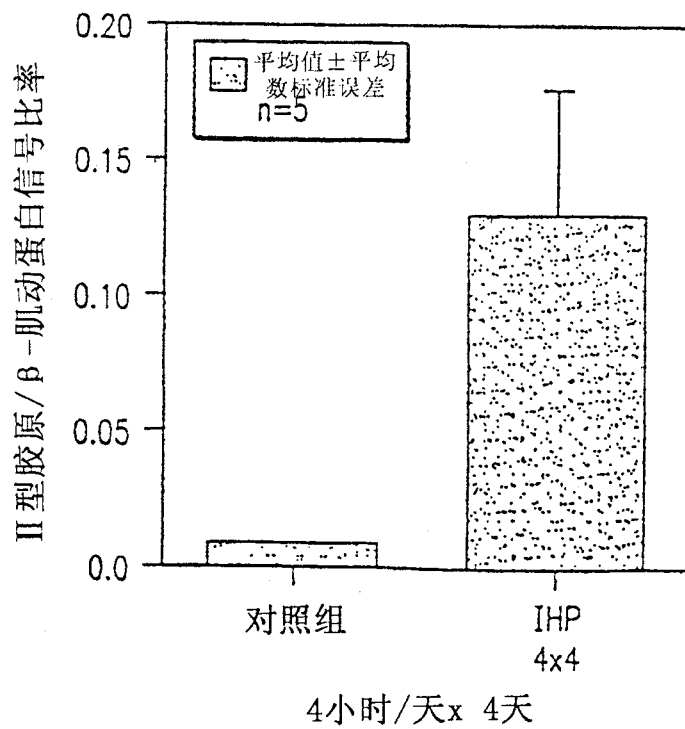


图3B

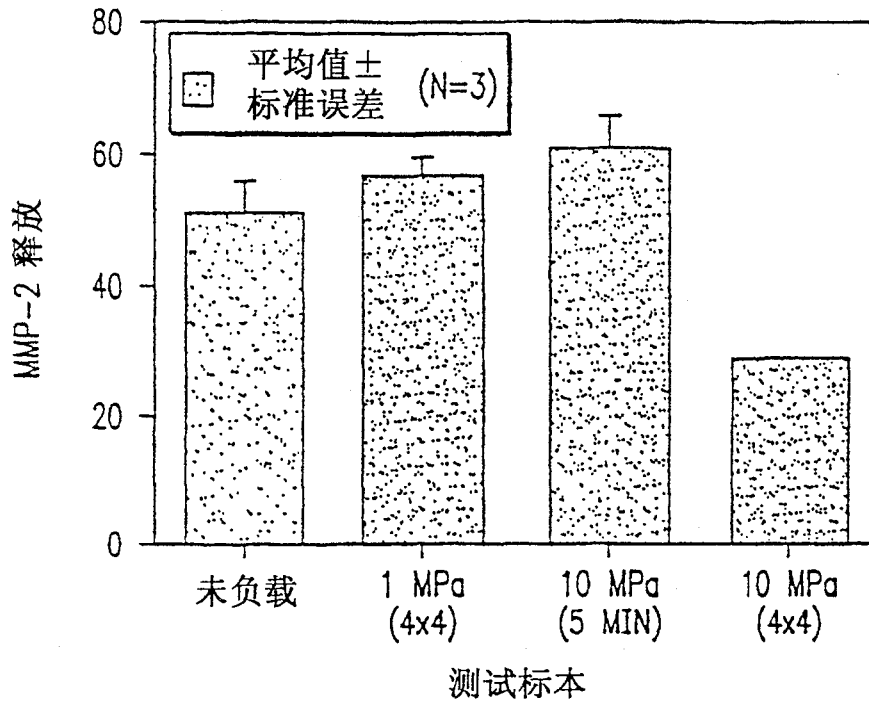
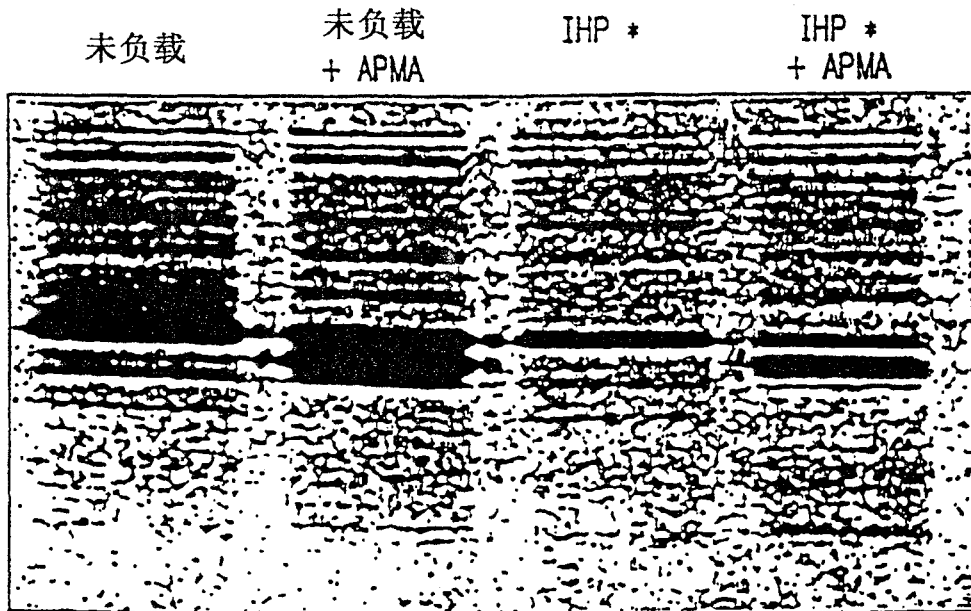


图4A



* 在10MPa、1Hz进行4小时负载和20小时恢复，进行4天。

图4B

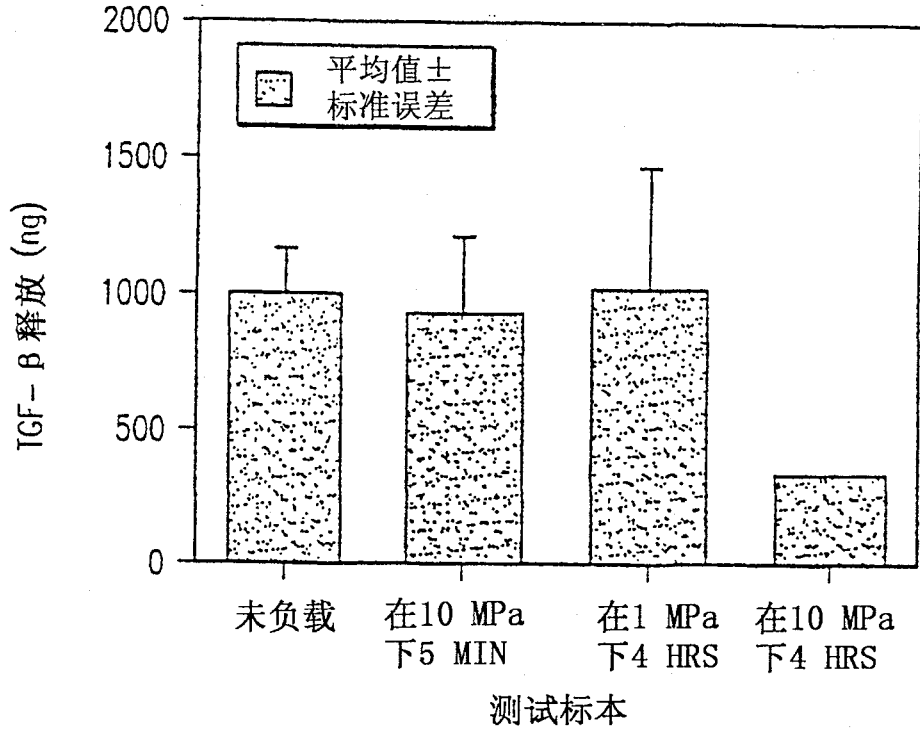


图5

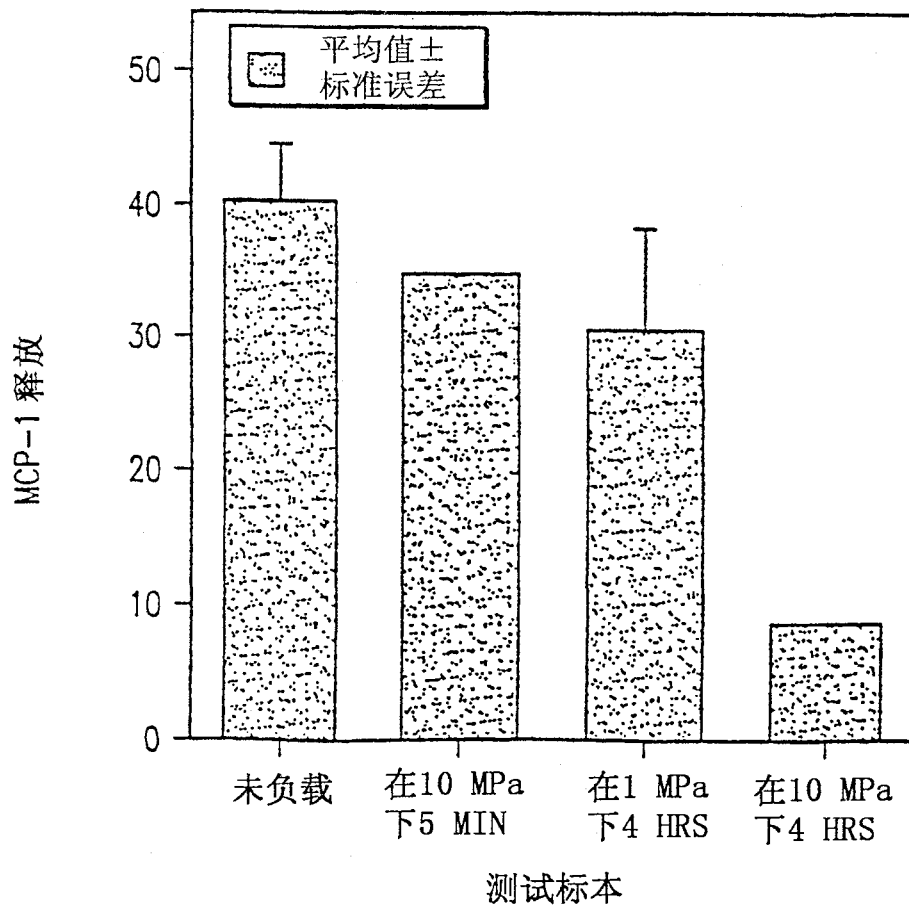


图6

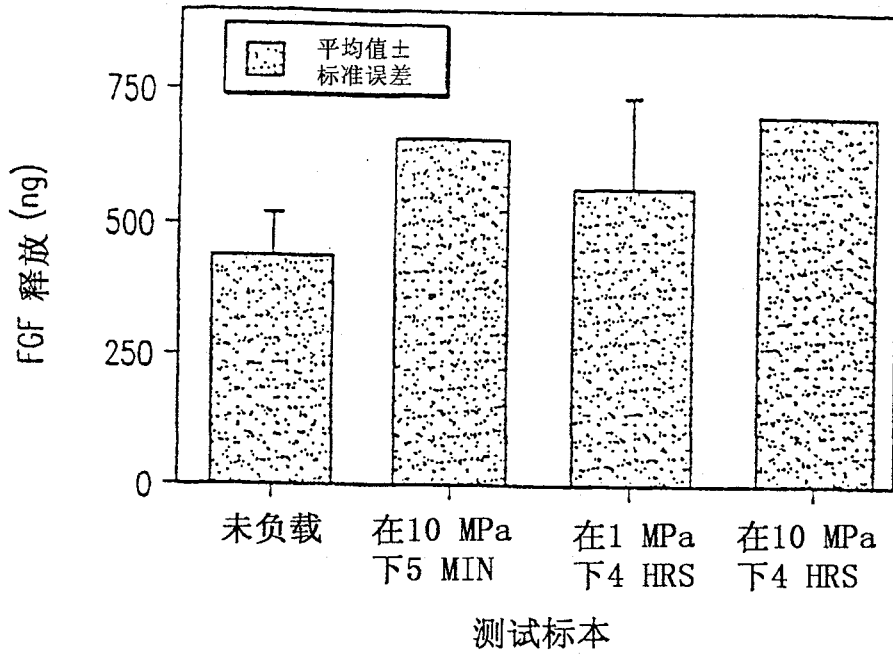


图7

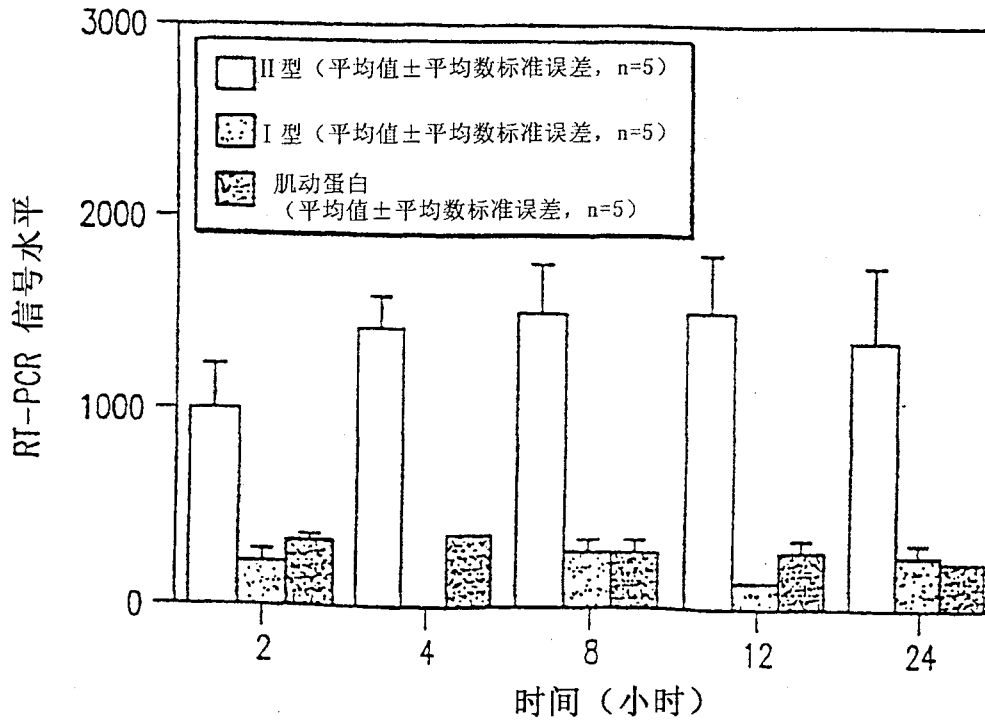


图8

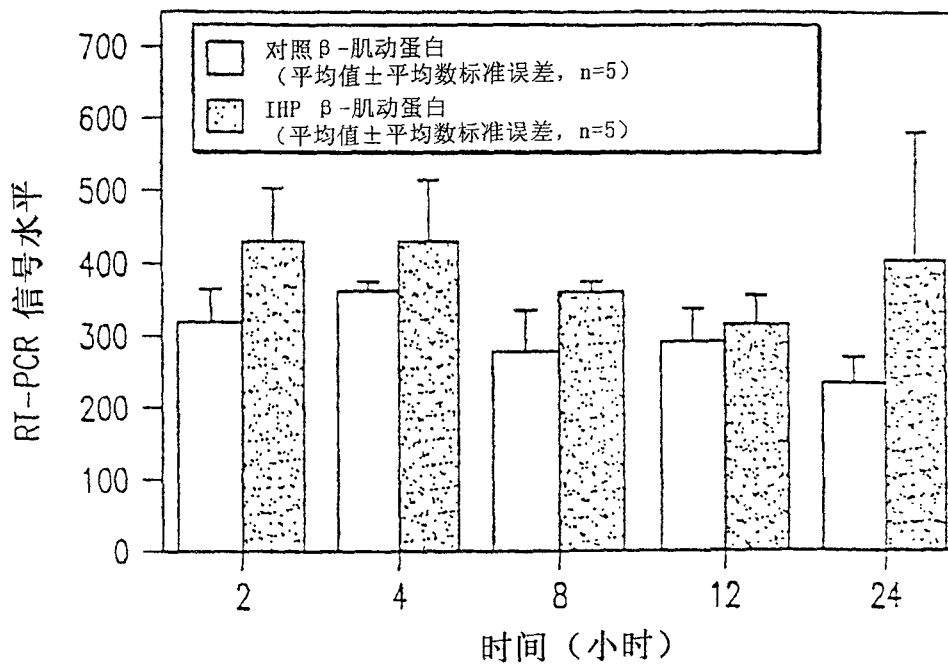


图9

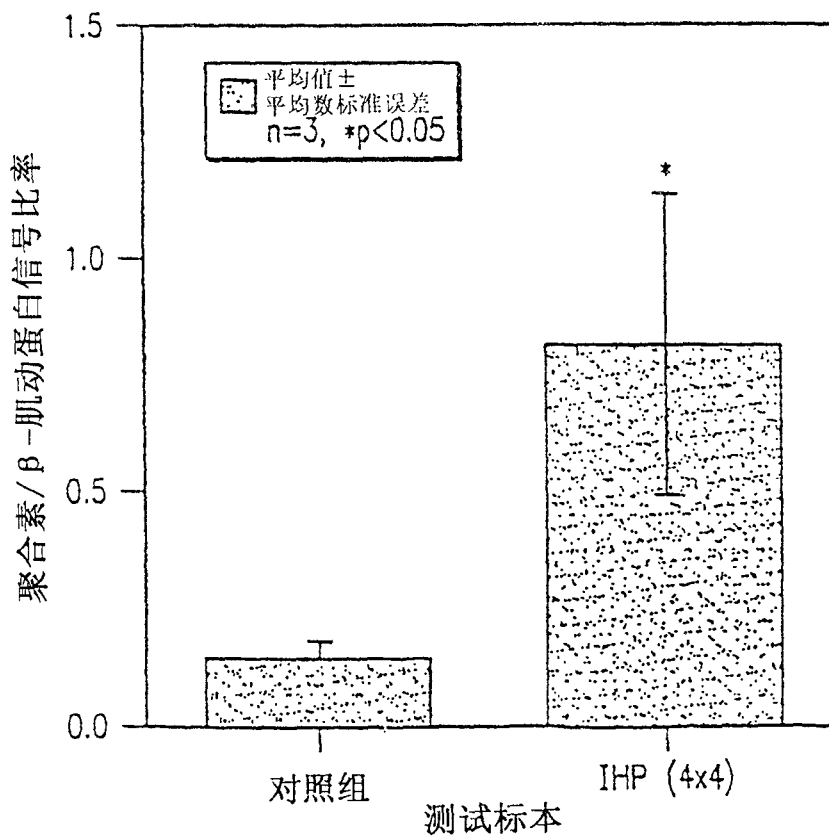


图10

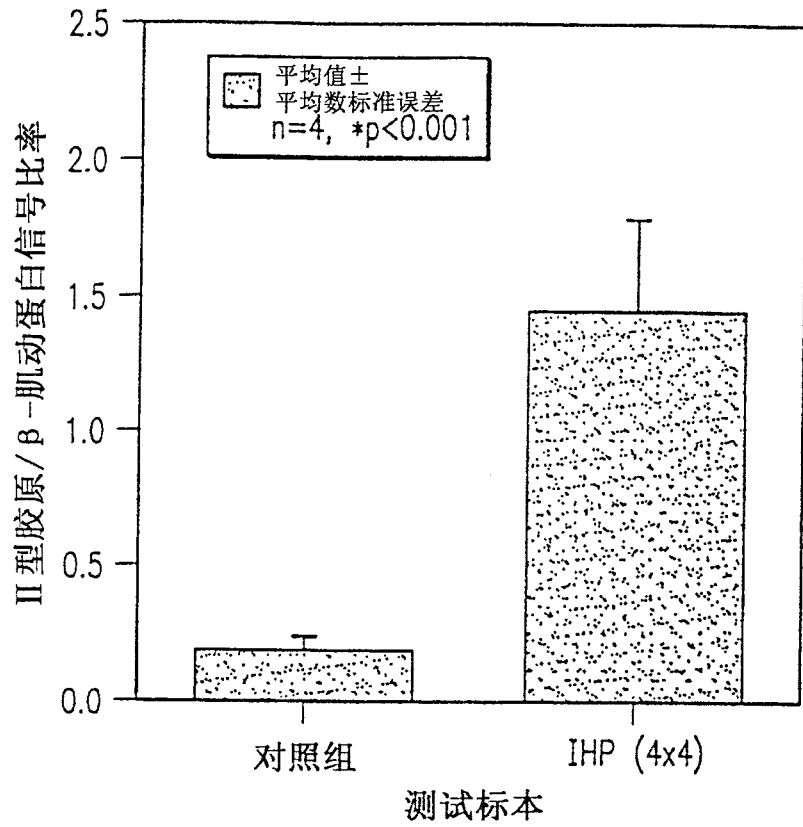


图11

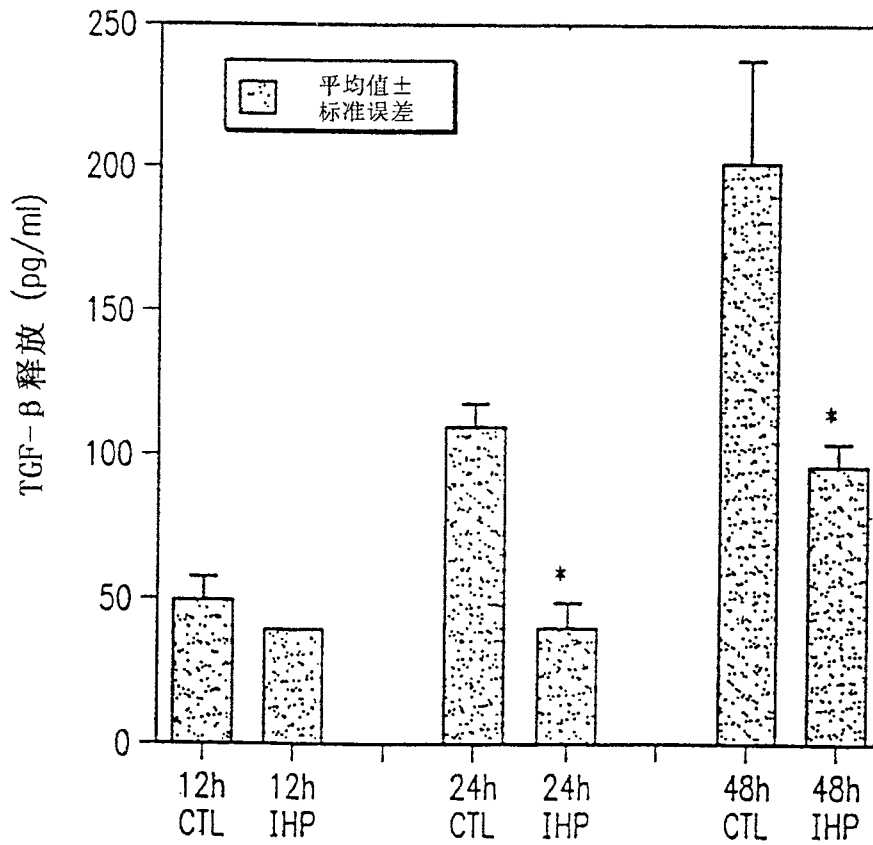


图12

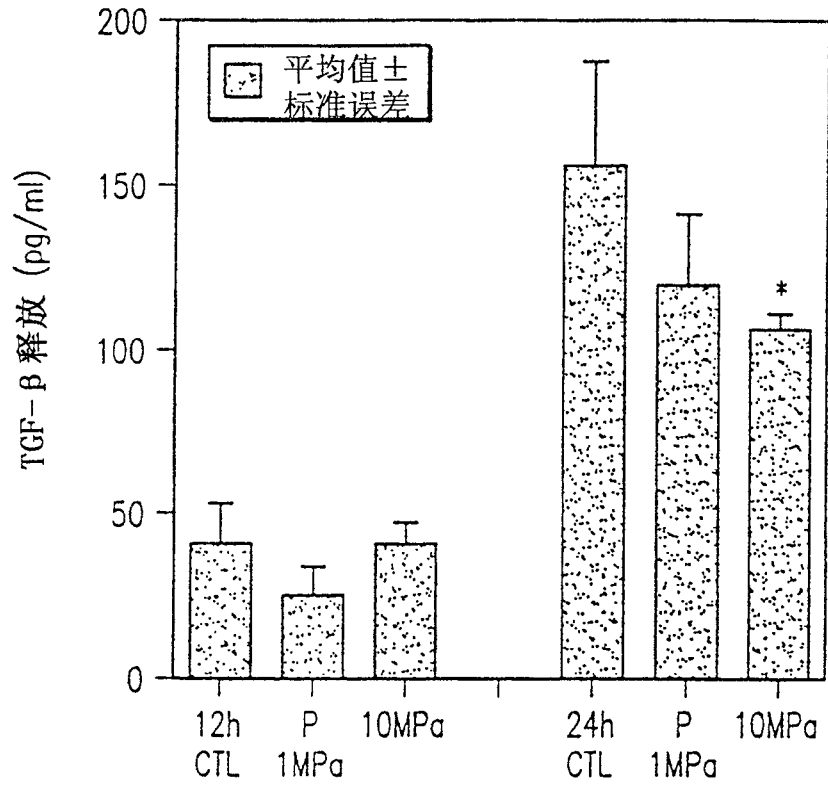


图13

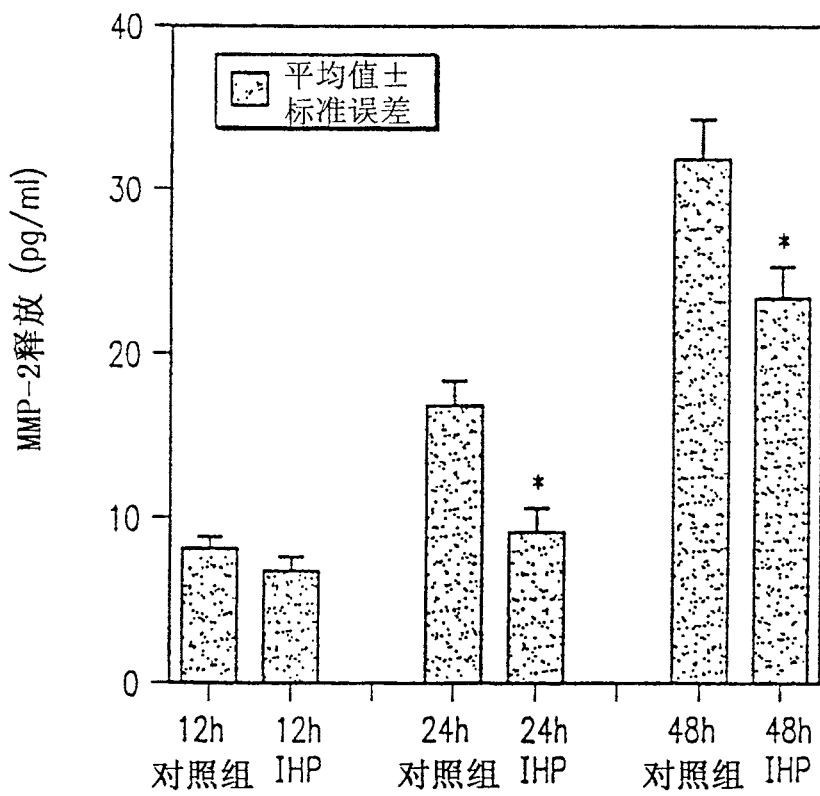


图14