

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.10.006

人软骨细胞压力实验模型的建立与评估*

王鑫^{1,2} 靳雷¹ 肖春¹ 颜世举¹ 孙聪¹ 张开亮¹ 袁秀春¹ 范清宇¹ 马保安^{1△}

(1 第四军医大学唐都医院全军骨科中心暨全军骨肿瘤研究所 陕西 西安 710038;

2 中国人民解放军第 69066 部队 新疆 乌鲁木齐 830002)

摘要 目的:人承重关节内受到的多种机械应力(剪切力、张力、静水压力等)在调节关节软骨细胞的生理功能方面起着重要作用。建立对人膝关节软骨细胞施加不同强度周期性静水压的压力模型,观察不同压力强度下软骨细胞的生长形态、增殖和凋亡情况。**方法:**采用酶消化法分离培养正常成人膝关节软骨细胞,将培养的第 3 代软骨细胞分为 6 组:对照组、0.5 MPa 组、1.0 MPa 组、3.0 MPa 组、5.0 MPa 组、8.0 MPa 组,应用高压恒温静水压加载系统分别给予各组不同强度压力作用 5 d,每日 1 h。甲苯胺蓝染色法和Ⅱ型胶原免疫组织化学染色法鉴定软骨细胞,倒置相差显微镜观察细胞形态和生长状况,流式细胞术检测细胞凋亡,四甲基偶氮唑蓝(MTT)法绘制细胞生长曲线。**结果:**与对照组相比,0.5 MPa、3.0 MPa 组无明显差异($P>0.05$);1.0 MPa 组能促进软骨细胞增殖,抑制凋亡($P<0.05$);5.0 MPa 组出现细胞增殖能力下降,细胞活力降低,凋亡率增加($P<0.05$);8.0 MPa 组则表现出明显的细胞增殖的抑制和细胞凋亡趋势($P<0.05$),以及细胞形态学的改变。**结论:**不同强度的周期性压力对人软骨细胞的新陈代谢产生了不同影响,尤其在软骨细胞的增殖和凋亡水平方面。利用本压力实验模型能体外模拟人负重关节软骨细胞的受压情况,初步确定了人软骨细胞压力实验中压力梯度的选择。为软骨细胞的压力损伤研究提供了实验数据,为进一步探寻压力作用与骨关节炎的关系提供了实验平台。

关键词:人软骨细胞;压力;模型

中图分类号:R318.17,R684.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)10-1825-05

The Establishment and Assessment of the Pressure Experimental Model in Human Chondrocytes*

WANG Xin^{1,2}, JIN Lei², XIAO Chun², YAN Shi-ju², SUN Cong², ZHANG Kai-liang², QIU Xiu-chun², FAN Qing-yu², MA Bao-an^{2△}

(1 Department of Orthopedic Surgery and Orthopedic Oncology Institute of PLA, Tangdu hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710038, China; 2 69066 Unit of PLA, Urumqi, Xinjiang, 830002, China)

ABSTRACT Objective: Varieties of mechanical stresses inside human weight-bearing joints (shear force, tensile force and hydrostatic pressure) play an important role in the regulation of physiological function of articular chondrocytes. To establish a model of different intensities of periodic hydrostatic pressures in human knee joint chondrocytes and observe cell morphology, proliferation and apoptosis under different intensities of pressures. **Methods:** The normal human knee joint chondrocytes were isolated and cultured from surgical specimens. The third generation of chondrocytes were treated with different hydrostatic pressures (0, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 and 8.0 MPa) for 1 h daily for 5 days. Toluidine blue staining and immunohistochemical staining of type II collagen were employed to identify the chondrocytes. Cell growth and morphology were observed in all groups by light microscopy. Cell apoptosis and proliferation were examined by flow cytometry and MTT assay respectively. **Results:** Compared with the control group, the 0.5 MPa and 3.0 MPa groups did not show any significant difference ($P>0.05$); The 1.0 MPa group hydrostatic pressures promoted proliferation of chondrocytes and inhibited apoptosis ($P<0.05$); The proliferation activity of 5.0 MPa group chondrocytes was decreased, and the apoptosis was increased ($P<0.05$); The 8.0 MPa group showed significant trend in inhibition of cell proliferation and promotion of cell apoptosis ($P<0.05$), along with cell morphology changes were observed. **Conclusion:** Different intensities of periodic pressures had different influence on the metabolism of human chondrocytes, especially in the levels of proliferation and apoptosis. We could simulated the compression on chondrocytes of weight-bearing joints by using this model in vitro, and preliminarily determined the human chondrocytes pressure experiment in the choice of pressure gradient. Our experiment provides experimental data and experimental basis for research of pressure injury to chondrocytes, in order to explore the relationship between pressure and osteoarthritis for further research.

Key words: Human chondrocytes; Pressure; Model

Chinese Library Classification(CLC): R318.17, R684.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)10-1825-05

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81072194)

作者简介:王鑫(1986-),男,硕士研究生,主要研究方向:骨关节炎发病机制,E-mail:wangxin090@126.com

△通讯作者:马保安,男,教授,博导,主任医师,E-mail:maban@fimmu.edu.cn

(收稿日期:2013-07-29 接受日期:2013-08-27)

前言

关节软骨是关节的重要组成部分,它一直处在负重和肌肉收缩所产生的压力下。软骨基质主要由蛋白聚糖和胶原蛋白组成,这实现了基质对机械应力的缓冲作用。然而,如果机械应力上升到高于生理承受范围的过高水平,软骨基质将受到损害,可能导致骨关节炎(OA)的发生。经研究,OA 的临床改变多始于负重区域^[1],许多 OA 相关的动物模型也是通过改变机械应力建立的^[2-7],证实了 OA 的疾病进展过程与压力密切相关。软骨细胞在软骨基质的代谢和维持中扮演着重要的角色,因此,压力作用对软骨细胞影响的研究是非常必要的。目前,软骨细胞的压力实验及相关实验数据多基于动物模型,因种属的差异,不能完全替代人类,故建立一个理想的人软骨细胞压力实验模型是进一步压力对软骨细胞的影响的基本前提。鉴于此,本研究通过原代培养获取人膝关节正常软骨细胞,并设计了一种高压恒温静水压加载系统,藉此建立人软骨细胞压力实验模型,通过对软骨细胞形态学变化、细胞生长特点、增殖率和凋亡率的观察,对该模型进行了评价。人软骨细胞压力实验模型的建立使压力实验的数据结果更贴近人类的生理及病理情况,可以更好的模拟人承重关节内部的压力环境,较以往的动物模型更具优势。为进一步研究和发现压力作用与骨关节炎疾病发生发展之间的关系奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 标本来源

从第四军医大学唐都医院骨科急诊截肢患者或骨肿瘤截肢患者的手术废弃标本中获得无菌的正常膝关节软骨组织,均经患者知情同意。

1.2 实验试剂与仪器

DMEM/F12 培养基、胎牛血清(FBS, PAA, Austria);胰蛋白酶(Gibco, USA);Ⅱ型胶原酶(Sigma, USA);四甲基偶氮唑盐(MTT, Sigma, USA);鼠抗-人Ⅱ型胶原一抗(Abcam, UK);二抗试剂盒(Gene Tech, CHINA);二甲基亚砜(DMSO, Sigma, USA);酶标仪(Bio-Rad 680, USA);倒置相差显微镜及照相系统(Olympus, Japan);细胞培养箱(Thermo, USA);BD-Aria FACS Calibur 流式细胞仪(BD, USA)。

1.3 压力装置



图1 高压恒温静水压加载系统

Fig.1 Constant Temperature and High Hydrostatic Pressure Loading System

本实验采用自行设计的高压恒温静水压加载系统(图1)。该系统主要由高压反应釜、水浴加热锅、空气压缩机、高压气罐四部分组成,并配有压力监测仪、恒温温度监测计、压力控制调节阀等配套设备。高压恒温静水压加载系统以注入压缩气体来升高容器内压力,以培养瓶内培养液作为媒介将压力传递给软骨细胞^[8]。压力装置压力最小值 0.05 Mpa,最高值 12.0 Mpa。该装置严格密封以保证细胞受到持续恒定压力;压力装置置于水浴锅内,通过恒温温度计监测,保证压力过程中细胞培养的恒定温度。每次使用前紫外灯照射 30 min 可达到有效灭菌。

1.4 试验方法

1.4.1 关节软骨细胞的分离与培养 采用酶消化法分离、原代培养正常成人软骨细胞。将手术室取得的软骨标本剪切成 1-3 mm³ 左右碎块, PBS 冲洗 3 遍。加入 0.25% 胰蛋白酶 10 mL, 37 ℃ 消化 30 min, 加入含血清培养液终止消化, 1000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 收集细胞。再加入 0.2% Ⅱ型胶原酶 10 mL, 37 ℃ 摇荡消化 8 h, 以 200 目尼龙网筛过滤、收集消化液, 离心, 弃上清, PBS 洗 2 遍, 加入含 10% 血清 DMEM/F-12 培养液制成细胞悬液, 移入 75 cm² 培养瓶内。置于 37 ℃, 5% CO₂ 浓度培养箱内培养。48h 后换液, 以后隔天换液, 并在倒置相差显微镜下观察照相, 记录软骨细胞形态和贴壁情况。待细胞贴壁 80% -90% 后, 用 0.25% 胰蛋白酶消化、传代。收集第 3 代细胞用于实验。

1.4.2 软骨细胞鉴定 (1) 甲苯胺蓝染色法鉴定软骨细胞。取软骨细胞, 在 6 孔板的玻片上进行细胞爬片。待细胞贴壁后, 弃去培养液, PBS 清洗 2 遍, 4% 多聚甲醛固定, 1% 甲苯胺蓝染色 30 min, 无水乙醇脱水, 中性树胶封片。倒置相差显微镜下观察并照相记录。(2) 采用Ⅱ型胶原免疫组化法鉴定软骨细胞。取软骨细胞, 在 6 孔板中的玻片上进行细胞爬片。待细胞贴壁后, 取出玻片, PBS 洗 2 次。4% 的多聚甲醛固定, 1% Tritonx-100 处理 10 min, PBS 洗 3 次, 3% H₂O₂ 处理 15 min, PBS 洗 3 次。血清封闭 20 min, 去除血清, 加一抗, 4 ℃ 过夜。按照二抗试剂盒说明书加二抗。滴加 DAB 显色 3 min, 双蒸水冲洗, 苏木素复染 30 s, 无水乙醇脱水, 中性树胶封片。倒置相差显微镜下观察并照相记录。

1.4.3 软骨细胞压力分组及模型制作 本实验压力的强度选择以计算得出的人正常活动中膝关节软骨单位面积^[9]所受压力为参考标准。取第 3 代软骨细胞, 将软骨细胞浓度调整为 1×10⁶/mL 的 75 cm² 培养瓶分成 6 组, 待细胞贴壁约 30%-40% 时, 分别放入高压恒温静水压加载系统中加压培养。A 组为不施加压力的对照组, 常规条件下培养; B、C、D、E、F 组为压力实验组, 将加压系统内压力分别设置为 0.5 MPa、1.0 MPa、3.0 MPa、5.0 MPa、8.0 MPa, 每天加压培养 1 h, 共 5 d。

1.5 观察与检测

1.5.1 倒置相差显微镜观察 通过倒置相差显微镜观察正常软骨细胞和经不同压力处理后软骨细胞的形态特征和贴壁生长情况, 并照相记录。

1.5.2 流式细胞术检测细胞凋亡 取对照组和压力实验组软骨细胞, 弃去培养液, PBS 清洗 2 次, 用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞 3-5 min, 显微镜下见细胞回缩变圆, 部分脱壁, 即加入含血清培养液终止消化, 轻轻吹打细胞使其脱壁, 收集细胞混和液, PBS

清洗2次,加入含有RNA酶的1%碘化丙啶(PI)0.6 mL 避光染色30 min,用PBS清洗细胞2次,洗去PI。用PBS调整样本体积至1 mL, 置入BD-Aria FACS Calibur 流式细胞仪中检测细胞凋亡。

1.5.3 测量绘制细胞生长曲线 采用MTT比色法测量绘制软骨细胞经不同强度压力处理后的生长曲线。取对照组和压力实验组软骨细胞,以 1×10^4 /mL 细胞浓度接种在96孔板中,设1排空白调零孔,A、B、C、D、E、F组各接种1排,每孔200 μ L,共接

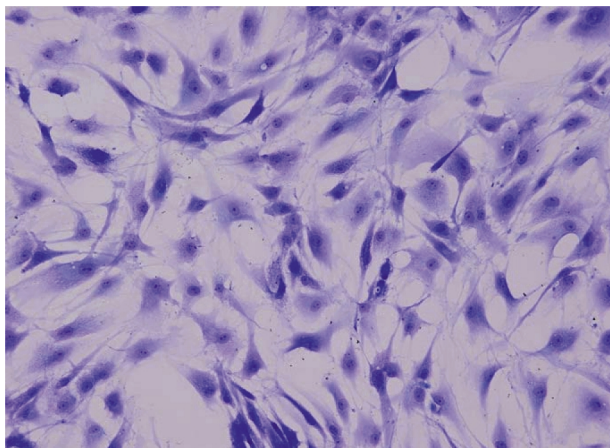


图2 软骨细胞甲苯胺蓝染色图

Fig.2 Toluidine blue staining of chondrocytes

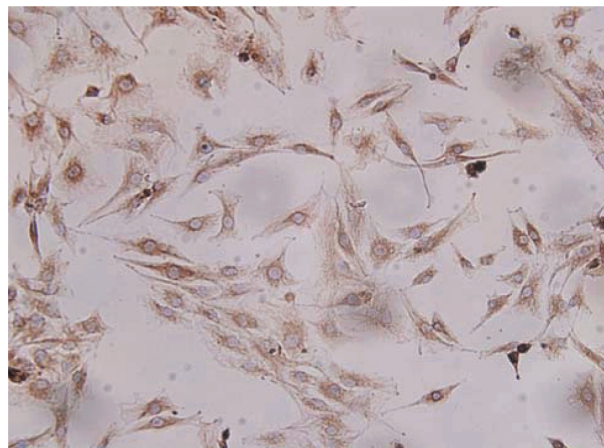


图3 软骨细胞II型胶原免疫组织化学染色

Fig.3 Type II collagen immunohistochemical staining of chondrocytes

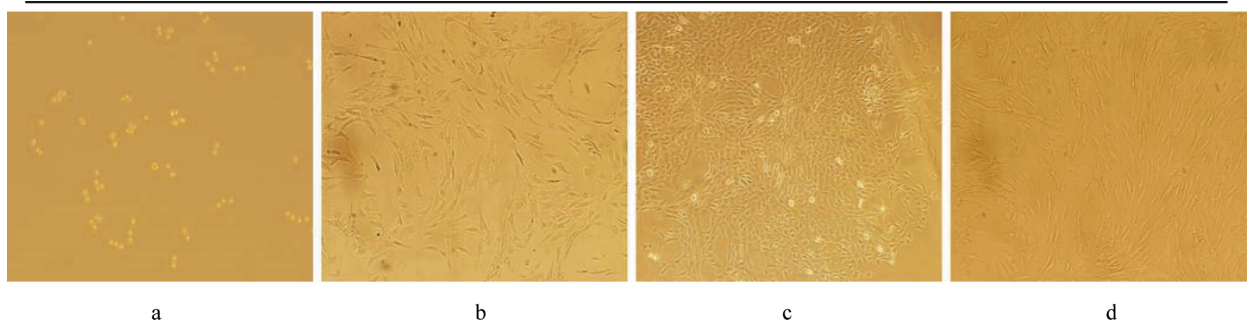


图4 光学显微镜观察软骨细胞生长形态图

Fig.4 The growth and morphological changes of chondrocytes were observed by light microscopy

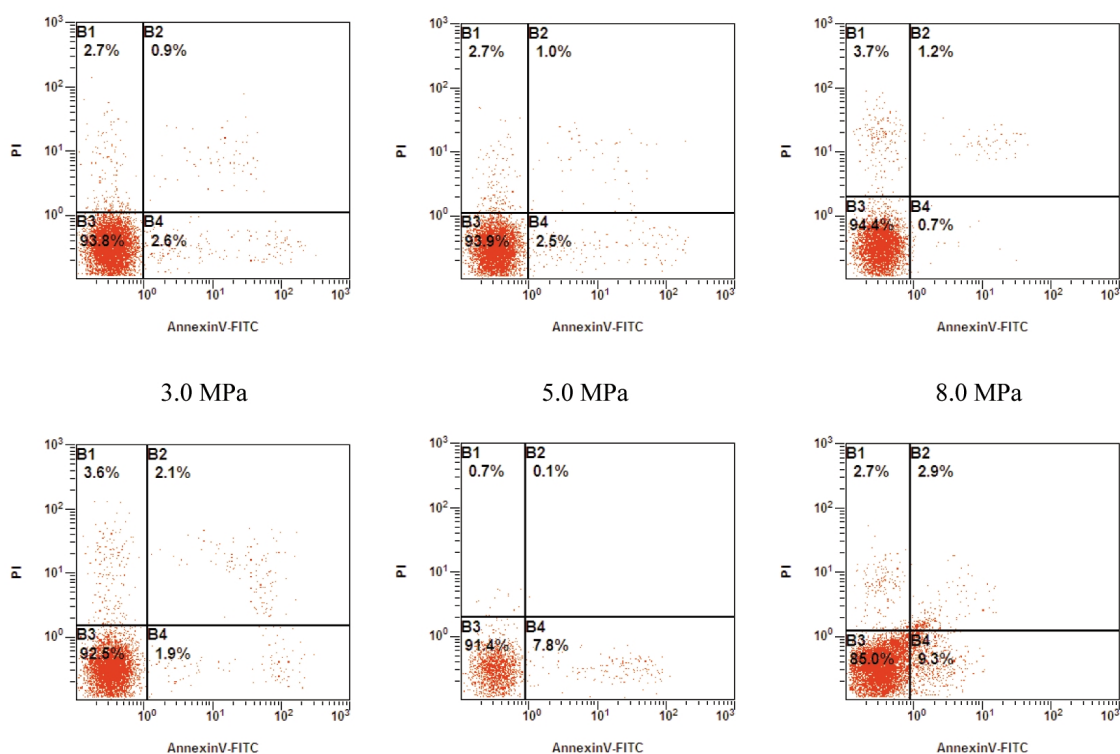


图5 不同压力强度作用后流式细胞仪检测软骨细胞凋亡图

Fig. 5 The apoptosis of chondrocytes measured by flow cytometry after different pressure applied

种 10 块板。每 48 h 更换培养液,每天取一板进行测量。每孔加入 5 mg/mL 的 MTT 20 μ L,继续培养 4 h,弃上清,每孔加入 DMSO 150 μ L,震荡 10 min,酶标仪 490 nm 波长测量并记录 OD 值,共测 10 d,绘制细胞生长曲线。

1.6 统计处理

本实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 17.0 统计软件运用单因素平方方差分析的方法对组间比较数据进入统计处理。令 $\alpha=0.05$ 。P<0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 甲苯胺蓝染色与 II 型胶原免疫组织化学染色

实验用软骨细胞经甲苯胺蓝染色(图 2)和 II 型胶原免疫组织化学染色(图 3)鉴定。

2.2 倒置相差显微镜观察

分离的原代软骨细胞呈漂浮状,圆形或椭圆形,折光性强(图 4a)。软骨细胞通常在 24-48 h 陆续贴壁,48 h 后细胞贴壁较充分,细胞膜逐渐伸展呈多边形或不规则形,边缘光滑锐利,单层生长(图 4b)。软骨细胞一般 8-10 d 可长满瓶底,细胞间接触紧密,呈典型铺路石样(图 4c)。传代细胞形状和生长贴壁情况基本与原代相似。从 7 代细胞开始,逐渐出现老化的细胞,表现为梭形的成纤维样细胞开始出现,增殖能力下降,贴壁生长时间增长(图 4d)。0.5 MPa 组、3.0 MPa 组软骨细胞在细胞形状和生长贴壁情况上与对照组相比,无明显的区别;1.0 MPa 组则要优于对照组,其第 8、9 代依然可以在 10 d 长满瓶底;5.0 MPa 组软骨细胞从第 7 代细胞形状开始发生变化,出现长梭形细胞,边缘不光滑,细胞边界不清或重叠,且第 7 代细胞接近 15 d 才能长满瓶底;8.0 MPa 组软骨细胞从第 5 代细胞形状就开始发生变化,细胞活性明显下降,贴壁时间超过 72 h,第 7 代细胞 20 d 仍不能长满瓶底。

2.3 流式细胞术检测细胞凋亡

流式细胞仪检测结果显示(图 5、表 1),经不同强度压力作用后,与未施加压力的对照组相比,0.5 MPa 组、3.0 MPa 组细胞凋亡率与其相近,差异无统计学意义(P>0.05);1.0 MPa 组细胞凋亡率下降,差异有统计学意义(P<0.05);5.0 MPa 组细胞凋亡率增高,差异有统计学意义(P<0.05);8.0 MPa 组相比对照组凋亡率显著升高,具有显著统计学差异(P<0.05)。

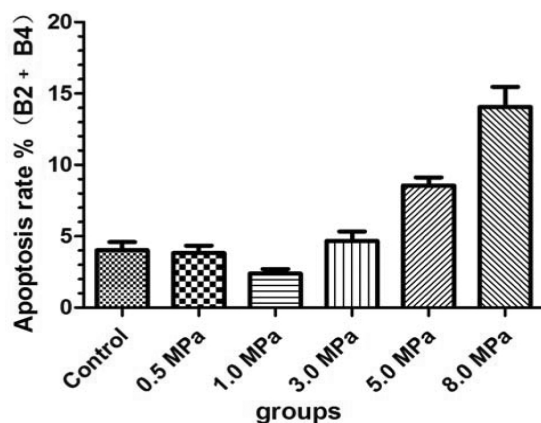


图 6 不同压力强度作用后流式细胞仪检测软骨细胞凋亡率($\bar{x} \pm s$)

Fig.6 The apoptosis of chondrocytes measured by flow cytometry after different pressure applied($\bar{x} \pm s$)

2.4 软骨细胞生长曲线

在细胞生长曲线中(图 6),3-4 d 各组细胞快速增殖,4-7 d 细胞增殖达到高峰,7 d 后逐渐平缓、下降,进入平台期。前 1-3 d 中 1.0 MPa 组的细胞增殖率最高,8.0 MPa 组细胞增殖明显趋缓,其它各组细胞相对数量差异不大;4-7 d 时 1.0 MPa 组仍然保持较高的细胞增殖率,5.0 MPa 组细胞增殖率出现明显减慢,8.0 MPa 组经过生长高峰后其第 7 d 细胞相对数量仍不及对照组的 1/2;至第 10 d,取各组 OD 值进行方差分析,与未施加压力的对照组相比,除 0.5 MPa 组、3.0 MPa 组生长曲线与对照组相仿,差异无统计学意义(P>0.05)外,其他各组与对照组 A 组比较差异均有统计学意义(P<0.05)。

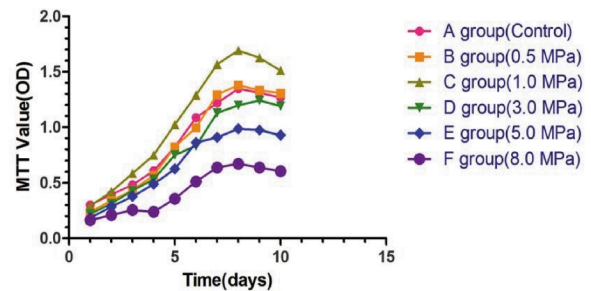


图 7 不同压力强度作用后软骨细胞的生长曲线图

Fig.7 The growth curve of chondrocytes after different pressure applied

3 讨论

在生理情况下,关节软骨受到周期性的压力负荷刺激,并通过这些刺激来调控软骨细胞和细胞外基质的代谢活动。这些压力负荷可以通过较为复杂的方式改变软骨细胞的细胞外环境^[1]。

许多形式的压力作用都会对软骨细胞产生影响,如拉伸张力、剪切力、静水压力等都已不同程度的应用于压力相关的组织和细胞层面的实验研究,其中静水压力对软骨细胞的新陈代谢作用最为显著^[2]。研究结果表明,机械压力作用下,在同一软骨组织的不同区域的软骨细胞和细胞外基质会对压力刺激表现出不同的反应^[3],考虑到软骨组织和软骨细胞在压力实验中各自特性的不同,运用软骨组织建立压力模型虽然能更好的模拟体内条件,但直接对软骨组织施加较高的压力会造成组织和细胞的形变,组织液的流动、渗出,蛋白多糖量的增加等现象^[4,5],而这些因素会影响压力实验的结果,使分析压力对软骨细胞造成的真实影响变得很困难。因此,我们选择建立细胞模型,研究不同强度周期性静水压对软骨细胞产生的影响。在我们的研究中,施加的压力强度在人膝关节的生理范围内。事实上,3-5 MPa 的压力水平在正常步态中的膝关节是经常遇到的,而在一些剧烈活动或高负荷损伤中,压力可以达到甚至超过 8-10 MPa^[6]。我们采用的周期性静水压的时间尽可能短(1 h),以尽量模拟生理条件下的人膝关节。

利用压力装置对软骨细胞施加不同强度的周期性静水压力后,与对照组相比,0.5 MPa 组无论在细胞生长形态和时间,以及细胞增殖水平和凋亡率上都与对照组无区别;而 1.0 MPa 组对细胞凋亡的抑制作用高于对照组,细胞生长增殖水平明显增强,3.0 MPa 的检测数据也与对照组相近,由此得出的较

低周期性静水压(1-3 MPa)刺激下的实验结果同其他作者发现的结果基本一致^[17-21],说明较低的周期性静水压力相对应生理条件下膝关节在轻度活动时关节内所受的压力对软骨细胞可能起到一定的保护作用;5.0 MPa 的压力强度虽在膝关节的生理压力范围内,却出现小幅度的细胞生长增殖能力的下降、凋亡率的升高和细胞形态学的改变;8.0 MPa 在较高强度的压力作用下,已达到人正常活动膝关节软骨所受压力范围的上限水平,表现出明显的细胞增殖的抑制和细胞凋亡趋势,细胞形态改变明显,贴壁、生长时间大幅延长。说明较高或过高的周期性静水压力相对应生理条件下膝关节在剧烈活动和承受高负荷时关节内所受的压力对软骨细胞可能具有不同程度的损伤作用。

我们通过建立人软骨细胞压力实验模型,并利用本模型体外模拟人负重关节软骨细胞的受压情况,初步确定了人软骨细胞压力实验中压力梯度的选择,同时研究证实了周期性静水压在人软骨细胞代谢和形态保持中的重要性,说明了不同强度的周期性压力对人软骨细胞的新陈代谢产生了不同影响,软骨细胞的增殖和凋亡水平对这种周期性静水压的作用强度具有依赖性,但这种依赖关系并非是简单的线性关系。此模型的建立具有性能稳定、安全、可重复性强等特点,对进一步研究软骨细胞的压力损伤机制,探索此种损伤的病理生理改变提供了实验数据与研究思路。为进一步探寻压力作用与骨关节炎(OA)的关系奠定了良好的实验基础。

参考文献(References)

- [1] Dippe P, Kirwan J. The localization of osteoarthritis[J]. Br J Rheumatol, 1994, 33(3): 201-204
- [2] Hoch DH, Grodzinsky AJ, Koob TJ, et al. Early changes in material properties of rabbit articular cartilage after meniscectomy [J]. J Orthop Res, 1983, 1(1): 4-12
- [3] 黄正, 傅文成, 冯伟, 等. 不同类型静水压对兔软骨细胞表型的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2007, 15(2): 29-33
Huang Zheng, Fu Wen-huo, Feng Wei, et al. The effect of different hydrostatic pressure on the stability of chondrocyte phenotype in vitro [J]. Chinese J Trad Med Traum & Orthop, 2007, 15(2): 29-33
- [4] 郑帅, 王吉兴, 任海龙, 等. 不同强度持续静态压力对兔腰椎小关节软骨细胞活性影响的实验研究[J]. 中华创伤骨科杂志, 2012, 14(3): 232-235
Zheng Shuai, Wang Ji-xing, Ren Hai-long, et al. Effects of continuous hydrostatic pressures on chondrocytes of the lumbar facet joint in rabbits[J]. Chinese Journal of Orthopaedic Trauma, 2012, 14(3): 232-235
- [5] 李松, 郭维华, 徐芸. 不同静压力对新生 SD 大鼠髌突软骨细胞增殖与凋亡的影响[J]. 实用口腔医学杂志, 2007, 23(6): 822-825
Li Song, Guo Wei-hua, Xu Yun. Effects of the static compressive stress on the proliferation and apoptosis of condylar chondrocytes in vitro [J]. Journal of Practical Stomatology, 2007, 23(6): 822-825
- [6] 岳海涛, 范卫民, 马益民, 等. 不同强度周期性压力对组织工程软骨的影响[J]. 中华创伤骨科杂志, 2007, 9(7): 661-664
Yue Hai-tao, Fan Wei-min, Ma Yi-min, et al. Tissue engineered cartilage in response to different cyclic pressures[J]. Chinese Journal of Orthopaedic Trauma, 2007, 9(7): 661-664
- [7] Takashi Toyoda, Bahaa B Seedhom, Jian Q Yao, et al. Hydrostatic pressure modulates proteoglycan metabolism in chondrocytes seeded in agarose[J]. Arthritis & Rheumatism, 2003, 48(10): 2865-2872
- [8] Nakai H, Niimi A, Ueda M, et al. The influence of compressive loading growth of cartilage of the mandibular condyle in vitro [J]. Archives of Oral Biology, 1998, 43(7): 505-515
- [9] Yousefian J, Firouzian F, Shanfeld J, et al. A new experimental model for studying the response of periodontal ligament cells to hydrostatic pressure[J]. Am J Orthop, 1995, 108(4): 402-409
- [10] 蒋欣, 李箭, 岑石强. 半月板大小与 X 线片上胫骨平台骨性标志物的相关性研究[J]. 中国临床医学影像杂志, 2011, 22(6): 443-444
Jiang Xin, Li Jian, Cen Shi-qiang. The correlation study of the meniscus size and the tibia plateau bone markers on X-ray films[J]. Journal of China Clinic Medical Imaging, 2011, 22(6): 443-444
- [11] Chen J, Irianto J, Inamdar S, et al. Cell mechanics, structure, and function are regulated by the stiffness of the three-dimensional microenvironment[J]. Biophys J, 2012, 103(6): 1188-1197
- [12] Urban JPG. The chondrocyte: a cell under pressure[J]. Br J Rheumatol, 1994, 33(10): 901-908
- [13] Wong M, Wuethrich P, Buschmann MD, et al. Chondrocyte biosynthesis correlates with local tissue strain in statically compressed adult articular cartilage[J]. J Orthop Res, 1997, 15(2): 189-196
- [14] Takahashi K, Kubo T, Arai Y, et al. Hydrostatic pressure induces expression of interleukin 6 and tumour necrosis factor alpha mRNAs in achondrocyte-like cell line [J]. Ann Rheum Dis, 1998, 57(4): 231-236
- [15] Ashwell MS, Gonda MG, Gray K, et al. Changes in chondrocyte gene expression following in vitro impaction of porcine articular cartilage in an impact injury model[J]. J Orthop Res, 2013, 31(3): 385-391
- [16] Hodge WA, Fijan RS, Carlson KL, et al. Contact pressures in the human hip joint measured in vivo[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83(9): 2879-2883
- [17] Parkkinen JJ, Ikonen J, Lammi MJ, et al. Effects of cyclic hydrostatic pressure on proteoglycan synthesis in cultured chondrocytes and articular cartilage explants [J]. Arch Biochem Biophys, 1993, 300(1): 458-465
- [18] Smith RL, Lin J, Trindade MC, et al. Time-dependent effects of intermittent hydrostatic pressure on articular chondrocyte type II collagen and aggrecan mRNA expression [J]. J Rehabil Res Dev, 2000, 37(2): 153-161
- [19] Fioravanti A, Nerucci F, Annesfeld M, et al. Morphological and cytoskeletal aspects of cultivated normal and osteoarthritic human articular chondrocytes after cyclical pressure: a pilot study [J]. Clin Exp Rheumatol, 2003, 21(6): 739-746
- [20] Ikenoue T, Trindade MCD, Lee MS, et al. Mechanoregulation of human articular chondrocyte aggrecan and type II collagen expression by intermittent hydrostatic pressure in vitro [J]. J Orthop Res, 2003, 21(1): 110-116
- [21] Reid Wenger, Mark G. Hans, Jean F. Welter, et al. Hydrostatic pressure increases apoptosis in cartilage-constructs produced from human osteoarthritic chondrocytes[J]. Frontiers in Bioscience, 2006, 11: 1690-1695