

[文章编号] 1000-1182(2009)04-0378-03

肿瘤坏死因子- α 对大鼠成骨细胞生长影响的实验研究

薛立伟¹ 张君¹ 王旭霞¹ 卜涛¹ 刘梅²

(1.山东大学口腔医院 口腔颌面外科; 2.山东大学齐鲁医院 口腔科, 山东 济南 250012)

[摘要] 目的 通过观察肿瘤坏死因子- α (TNF- α)对大鼠成骨细胞生长的影响, 探讨TNF- α 对成骨细胞的分子生物学调控作用。方法 采用不同质量浓度TNF- α 诱导大鼠成骨细胞, 利用MTT法检测成骨细胞增殖的变化, 利用4-硝基苯基磷酸二钠盐(PNPP)偶氮法检测成骨细胞碱性磷酸酶(ALP)活性情况。结果 大鼠成骨细胞增殖活性及ALP活性随TNF- α 质量浓度的升高而降低, 其中当TNF- α 质量浓度大于50 ng/mL时, 与对照组的差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 TNF- α 对成骨细胞的增殖和分化均有抑制作用, 当TNF- α 质量浓度大于50 ng/mL时, 这种抑制作用更明显。

[关键词] 肿瘤坏死因子- α ; 成骨细胞; 生长

[中图分类号] R 739.8 [文献标志码] A

Effects of tumor necrosis factor- α on the growth of rat osteoblasts XUE Li-wei¹, ZHANG Jun¹, WANG Xu-xia¹, BU Tao¹, LIU Mei². (1. Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Stomatology, Shandong University, Jinan 250012, China; 2. Dept. of Stomatology, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, China)

[Abstract] Objective To investigate the effects of tumor necrosis factor alpha(TNF- α) on the growth of rat osteoblasts. To find out the mechanisms that TNF- α regulates the growth of osteoblasts. **Methods** To assay osteoblasts proliferation by MTT. To assay alkaline phosphatase(ALP) activity of osteoblasts by PP-nitrophenyl phosphate(PNPP).

Results The osteoblasts proliferation and the ALP activity decreased in treatment groups, and the significantly lower levels were observed in above 50 ng/mL groups($P < 0.05$). **Conclusion** TNF- α restrained osteoblasts proliferation and differentiation, and the effects were more significant in above 50 ng/mL groups.

[Key words] tumor necrosis factor- α ; osteoblast; growth

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是以骨量减少, 骨内微细结构破坏, 从而导致脆性增加、骨折风险增高的系统性骨代谢疾病^[1]。其在老年人特别是绝经后妇女中发病率极高^[2]。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)是重要的骨吸收因子之一, 主要作用于破骨细胞和成骨细胞(osteoblast, OB)^[3]。TNF- α 不仅能够刺激破骨细胞的骨吸收作用, 而且能够抑制成骨细胞的骨再生作用。本实验利用大鼠头颅骨来源的成骨细胞研究不同质量浓度的TNF- α 对成骨细胞增殖和分化的影响, 希望为临床上治疗相关的骨代谢疾病提供思路和实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

原代成骨细胞来自出生1周Wistar大乳鼠, 由山东大学动物实验中心提供。TNF- α (HyClone公司, 美国); MTT、DMSO、TritonX-100(Sigma公司, 美国)。

1.2 试剂配置

1.2.1 MTT溶液 称取250 mg MTT, 放入小烧杯中, 加入50 mL PBS(0.01 mol/L, pH 7.4)在电磁力搅拌机上搅拌30 min, 用0.22 μ m的微孔滤器除菌过滤, 分装, 4 $^{\circ}$ C保存, 2周内有效。

1.2.2 ALP作用底物配制 80 mL去离子水中加入97 mL二乙醇胺, 100 mg MgCl₂、200 mg叠氮钠, 用10 mol/L HCl调pH至9.8, 加水至1 000 mL。将4片(每片5 mg)4-硝基苯基磷酸二钠盐(4-nitrophenyl

[收稿日期] 2008-09-18; [修回日期] 2009-02-17

[基金项目] 山东省自然科学基金资助项目(Y2006C26)

[作者简介] 薛立伟(1981—), 男, 山东人, 硕士

[通讯作者] 王旭霞, Tel: 0531-88382840

phosphate hexahydrate, PNPP)溶于19 mL上述溶液。最终浓度为4 mmol/L PNPP的ALP作用底物。

1.2.3 裂解液0.2%TritonX-100的配置 于超净台内在49.9 mL的PBS中缓慢加入0.1 mL的TritonX-100混匀即得。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 将新生Wistar大鼠处死。在无菌条件下取颅骨,原代培养、传代、纯化、扩增细胞。经细胞鉴定培养细胞符合成骨细胞生物学特性。

1.3.2 细胞活力测定 采用MTT法测定细胞活力。接种和培养细胞:将单个细胞悬液,以每孔 1×10^4 个细胞接种于96孔培养板中,每孔体积200 μ L,共5列,培养24 h。待大多数成骨细胞贴壁伸展后,弃去孔内液体,用无血清的DMEM冲洗数次,加入1% FCS的DMEM 200 μ L。每列孔分别加入TNF- α 0(对照组)、5、20、50、100 ng/mL,继续培养48 h。呈色:培养48 h后,每孔加入MTT溶液(5 mg/mL) 20 μ L,37 $^{\circ}$ C继续孵育4 h,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液。每孔加入150 μ L DMSO,振荡10 min。比色:选择490 nm波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔光密度值,记录结果。

1.3.3 碱性磷酸酶活性测定 碱性磷酸酶是成骨细胞分化成熟的标志,采用PNPP法测定碱性磷酸酶活性,反应成骨细胞的分化程度。接种和培养细胞:将单个细胞悬液,以每孔 1×10^4 个细胞接种于96孔培养板中,每孔体积200 μ L,培养12 h。每列孔分别加入TNF- α 0(对照组)、1、5、20、50 ng/mL。继续培养72 h。弃去孔内液体,用pH 7.4 PBS冲洗3次后,吸干。每孔加入100 μ L 0.2%的TritonX-100,振荡30 min。随后在倒置显微镜下观察,见细胞已碎裂,无完整的细胞结构后,各孔取50 μ L上述液体加入ALP作用底物50 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育30 min后,加入1 mol/L的NaOH以终止反应。选择波长405 nm,在酶联免疫检测仪上测定各孔光密度值,记录结果。

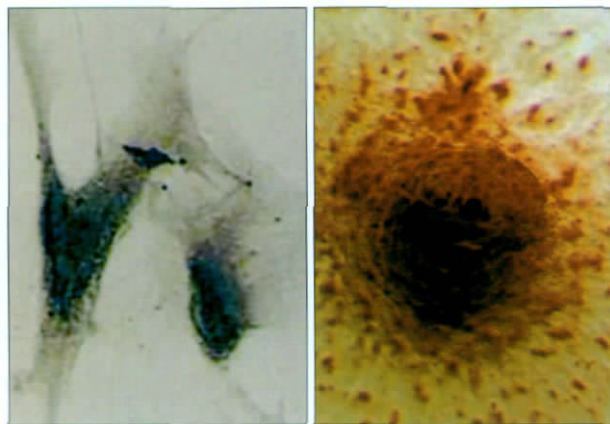
1.4 数据整理和数据统计

数据采用SAS 9.1软件包,采用单因素方差分析对各组间的样本均数进行两两比较。

2 结果

2.1 成骨细胞的鉴定结果

细胞染色结果为阳性,细胞胞浆为蓝色,胞核内可见灰黑色颗粒(图1左);钙化结节茜素红染色后镜下观察可见钙化结节呈鲜红色,由此证明实验中培养的细胞为成骨细胞(图1右)。



左:改良Gomori钙-钴法染色 $\times 400$; 右:钙化结节茜素红染色 $\times 200$

图1 成骨细胞的鉴定结果

Fig 1 The results of osteoblast identification

2.2 TNF- α 对于细胞增殖和分化的影响

加入TNF- α 各组的光密度值改变见表1。组内比较显示,随着TNF- α 质量浓度的增大,细胞增殖活性逐渐降低,其中当TNF- α 质量浓度为50 ng/mL时与对照组比较有统计学意义($P < 0.05$)。当TNF- α 质量浓度为100 ng/mL时TNF- α 对细胞增殖活性有明显的抑制作用($P < 0.01$)。与对照组相比,在TNF- α 质量浓度达到5 ng/mL时,TNF- α 表现为抑制细胞分化(ALP活性)的作用($P < 0.05$),而TNF- α 质量浓度达到20 ng/mL以上时具有明显的抑制作用($P < 0.01$)。

表1 不同质量浓度TNF- α 对于细胞增殖和ALP活性的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effects of TNF- α of different concentration on the proliferation and ALP activity of osteoblasts($\bar{x} \pm s$)

TNF- α 质量浓度/ng·mL ⁻¹	光密度值	
	增殖活性	ALP活性
0(对照组)	0.214 4 \pm 0.017 0	0.073 \pm 0.004 8
1	-	0.068 \pm 0.004 2
5	0.192 0 \pm 0.056 6	0.051 \pm 0.008 7*
20	0.172 4 \pm 0.058 4	0.042 \pm 0.001 3**
50	0.159 0 \pm 0.049 1*	0.033 \pm 0.008 3**
100	0.126 6 \pm 0.025 2**	-

注:与对照组比较,*0.01<P<0.05;**P<0.01

3 讨论

许多资料表明细胞因子水平的变化是老年性骨质疏松及牙槽骨质丢失的重要原因。这些细胞因子包括:白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、TNF- α 、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ)、粒单核细胞集落刺激

因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF)、白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)等^[4]。而TNF-α水平升高是骨质疏松疾病最明显的特征之一。

1975年, Carswell等^[5]首次发现并命名了肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)。TNF家族主要成员有TNF-α和TNF-β。TNF-α主要由活化的单核巨噬细胞产生, 又称恶病质素; TNF-β是由活化T淋巴细胞产生, 一种与TNF-α类似的(有30%左右的同源性)淋巴毒素(lymphotoxin, LT), 并与TNF-α有共同的受体。其中TNF-α与骨质疏松关系密切。例如在绝经后骨质疏松病例中, TNF-α水平上升或有上升倾向^[6-7]; 在2型糖尿病引起的骨质疏松患者血清中TNF-α的水平也有升高^[8-9]。这就提示TNF-α水平变化是骨质疏松等骨代谢疾病的重要原因之一。TNF-α具有很多功能, 包括影响细胞的增殖、分化及生存。在病理性骨缺失如老年性骨质疏松、慢性炎症引起的骨吸收组织中, TNF-α质量浓度均有提高, 说明TNF-α是调节骨代谢的重要因子^[10]。TNF-α是十分重要的破骨细胞激活因子, 它刺激前祖细胞产生新的破骨细胞, 并可间接激活成熟的破骨细胞形成骨吸收陷窝, 导致破骨细胞性骨吸收的增强。研究表明, TNF-α可直接促进破骨细胞前体细胞的有丝分裂及破骨祖细胞的分化^[11], 对成熟破骨细胞的骨吸收功能也有促进作用^[12]; TNF-α可以间接激活成熟的破骨细胞, 增强其吸收功能, 并抑制破骨细胞的凋亡, 呈现出对骨的快速分解效果。研究^[13]发现, 体外培养骨组织时加入TNF-α可以明显促进破骨细胞骨吸收, 表现为促进破骨细胞前体分化成熟、增强破骨细胞活性。总的来说, TNF-α是骨分解作用的动因, 一方面促进骨吸收, 另一方面抑制骨重建, 最终导致骨量减少。

本实验利用较低质量浓度(小于100 ng/mL) TNF-α诱导体外培养的成骨细胞, 来观察不同质量浓度的TNF-α对于成骨细胞生长的影响。结果表明, 当TNF-α质量浓度大于50 ng/mL时能够明显抑制成骨细胞的增殖及分化($P < 0.05$), 根据以上结果可以证明TNF-α对于成骨细胞的增殖和分化有很强的抑制作用。当体内TNF-α质量浓度较高时, 就会影响成骨细胞的功能, 使骨再生减少, 这可能是老年性骨质疏松, 牙槽骨质丢失的原因之一。

[参考文献]

- [1] Jeffcoat MK, Chesnut CH 3rd. Systemic osteoporosis and oral bone loss : Evidence shows increased risk factors[J]. J Am Dent Assoc, 1993, 124(11) :49-56.
- [2] Becker W, Hujoel PP, Becker BE, et al. Osteoporosis and implant failure : An exploratory case-control study[J]. J Peiodontol, 2000, 71(4) :625-631.
- [3] Pacifici R. Estrogen, cytokine and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis[J]. J Bone Miner Res, 1996, 11(8) :1043-1051.
- [4] Weide R, Ehlenz K, Lorenz W, et al. Successful treatment of osteoporosis in systemic mastocytosis with interferon alpha-2b[J]. Ann Hematol, 1996, 72(1) :41-43.
- [5] Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975, 72(9) :3666-3670.
- [6] Pfeilschifter J, Köditz R, Pfohl M, et al. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause[J]. Endocr Rev, 2002, 23(1) :90-119.
- [7] Girasole G, Giuliani N, Modena AB, et al. Oestrogens prevent the increase of human serum soluble interleukin-6 receptor induced by ovariectomy *in vivo* and decrease its release in human osteoblastic cells *in vitro*[J]. Clin Endocrinol(Oxf), 1999, 5(6) :801-807.
- [8] Leiding-Bruckner G, Ziegler R. Diabetes mellitus a risk for osteoporosis[J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2001, 109(Suppl 2) :S493-S514.
- [9] Takagi M, Kasayama S, Yamamoto T, et al. Advanced glycation endproducts stimulate interleukin-6 production by human bone-derived cells[J]. J Bone Miner Res, 1997, 12(3) :439-446.
- [10] Roggia C, Gao Y, Cenci S, et al. Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow : A key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss *in vivo*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(24) :13960-13965.
- [11] Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, et al. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoblast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction[J]. Exp Med, 2000, 191(2) :275-286.
- [12] Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts[J]. J Cell Biol, 1999, 145(3) :527-538.
- [13] 卜涛, 王旭霞. 腺病毒介导的骨形态发生蛋白应用安全性的研究[J]. 国际口腔医学杂志, 2008, 35(1) :41-43.
BU Tao, WANG Xu-xia. Safety assessment of adenoviral-mediated transfer of human bone morphogenetic protein gene[J]. Int J Stomatol, 2008, 35(1) :41-43.

(本文编辑 汤亚玲)