

[文章编号] 1000-1182(2009)05-0483-04

尼古丁对人成骨细胞生物学性能的影响

白冰 钟丽芳 朱静涛

(中国医科大学口腔医院 修复科, 辽宁 沈阳 110002)

[摘要] 目的 研究不同浓度尼古丁对人成骨细胞(MG63)生物学性能的影响。方法 用含 1×10^{-4} mol·L⁻¹、 1×10^{-3} mol·L⁻¹尼古丁的DMEM高糖培养基体外培养MG63细胞,分别于第3、5、7、10、14天采用MTT比色法检测MG63细胞的增殖力;用PNPP偶氮法测定细胞的碱性磷酸酶(ALP)活性;用逆转录聚合酶链式反应检测细胞 型胶原(COL1)与骨钙素(OCN)基因的表达。结果 对照组和 1×10^{-4} mol·L⁻¹尼古丁组ALP的表达在第10天出现峰值。对照组和 1×10^{-4} mol·L⁻¹尼古丁组COL1的表达在第10天出现峰值, 1×10^{-3} mol·L⁻¹尼古丁组COL1的表达在第10天降至最低,在第14天升高。对照组中OCN的表达在第10天达到峰值, 1×10^{-4} mol·L⁻¹尼古丁组OCN的表达持续增高, 1×10^{-3} mol·L⁻¹尼古丁组OCN的表达无明显变化。与对照组相比,尼古丁组对细胞增殖起抑制作用;并降低了细胞ALP活性;对COL1、OCN的基因表达有抑制作用。结论 尼古丁通过抑制成骨细胞的ALP活性和COL1的分泌而抑制成骨细胞分化。

[关键词] 尼古丁; 碱性磷酸酶; MG63细胞

[中图分类号] R 780.1 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1000-1182.2009.05.004

Nicotine affects biological properties of the human osteosarcoma cell line MG63 BAI Bing, ZHONG Li-fang, ZHU Jing-tao. (Dept. of Prosthodontics, School of Stomatology, China Medical University, Shenyang 110002, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the effect of nicotine on cell proliferation. **Methods** The cells were cultured with DMEM medium containing 10% fetal bovine serum with 0, 1×10^{-4} mol·L⁻¹, and 1×10^{-3} mol·L⁻¹ nicotine for up to 3, 5, 7, 10, 14 days. The cell proliferation was evaluated by MTT. The alkaline phosphatase(ALP) activity was estimated by PNPP. The expression of collagen type (COL1) and osteocalcin(OCN) were estimated by reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR). **Results** Nicotine suppressed the cell proliferation. ALP activity increased to peak on 10 days in control and 1×10^{-4} mol·L⁻¹ nicotine. COL1 expression increased to peak on 10 days in control and 1×10^{-4} mol·L⁻¹ nicotine, but there was decreased to the minimum on 10 days and increased on 14 days in 1×10^{-3} mol·L⁻¹ nicotine. OCN expression increased to peak on 10 days in control, and increased in 1×10^{-4} mol·L⁻¹ nicotine from 3 days to 14 days, but there wasn't significant change in 1×10^{-3} mol·L⁻¹ nicotine. **Conclusion** Nicotine suppresses osteogenesis through a decrease in ALP and COL1 production by osteoblasts.

[Key words] nicotine; alkaline phosphatase; MG63

吸烟会通过降低中性粒细胞和巨噬细胞的功能、抑制T细胞的增殖、降低细胞免疫反应来损伤机体正常的免疫功能和防御反应^[1]。烟草的主要成分为尼古丁,尼古丁可以造成牙龈组织中的血管改变和牙周感染初期时的渗出性脉管炎^[2-3]。当上皮细胞暴露于高浓度尼古丁($500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)时,胶原蛋白和非胶原蛋白的分泌降低了近50%;在分析尼古丁作用的鼠成骨细胞样细胞时发现其抑制了细胞增殖并提高了碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性^[4]。本实验应用尼古丁作用于人成骨肉瘤(MG63)

细胞系,通过检测细胞增殖、ALP活性、型胶原(collagen type , COL1)、骨钙素(osteocalcin, OCN)的表达来研究尼古丁对骨形成的影响。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

MG63细胞(北京基础医学细胞中心),尼古丁(Wako公司,日本),DMEM高糖培养基、MTT试剂(Gibco公司,美国),焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate, DEPC)、胰酶(南京凯基生物科技发展有限公司),胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司),考马斯亮兰(Sigma公司,美国),二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)(Amresco公司,美国),ALP检测试剂盒(北京柏定生物工程有限公司),合

[收稿日期] 2009-01-12; [修回日期] 2009-03-05

[作者简介] 白冰(1978—),女,辽宁人,讲师,博士

[通讯作者] 白冰, Tel: 024-22891420

成引物(上海生工生物工程技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞增殖检测(MTT法) 实验分为3组,即对照组、 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼古丁组、 $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼古丁组。取MG63细胞消化后,用含10%血清DMEM配制成每毫升 1×10^5 个的细胞悬液,接种到5块96孔培养板中,每孔加入100 μL 细胞悬液,接种24 h后弃培养液,更换为无血清培养基培养24 h后,按实验分组换入含0、 1×10^{-4} 、 $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼古丁的10%血清培养液,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度培养箱中培养,每48 h换液1次,分别于培养第3、5、7、10、14天在每孔加入MTT溶液($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)20 μL ,在培养箱中继续培养4 h,然后小心吸弃孔内培养液,每孔加入DMSO 200 μL ,在室温下放置并振荡20 min,充分溶解结晶物并混匀。酶标仪在490 nm波长下测定各孔的光密度值(A值),将每个浓度相应A值的平均值作为最后实验结果。A值代表细胞的增殖情况,细胞增殖能力被抑制的越强,A值越小。

1.2.2 ALP活性检测 用PNPP偶氮法检测ALP活性。取处理后的MG63细胞,方法同上,于第3、5、7、10、14天分别从每组中选取6孔弃培养液,PBS洗2遍,加入0.2%Triton X-100后4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。取40 μL 细胞裂解产物与100 μL 反应底物37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30 min,加0.4 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 100 μL 终止反应,用酶标仪于405 nm波长下测定A值,按照样品A值在ALP标准曲线上读取酶活性值。

1.2.3 逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测COL1和OCN的基因表达 取处理后的MG63细胞,方法同上,在第3、5、7、10、14天应用Trizol提取细胞总RNA,应用RT-PCR扩增目的基因后,1%琼脂糖凝胶电泳,紫外灯激发光成像,检测引物的特异性。实时荧光聚合酶链反应:所有反应均在Lightcycler基因扩增仪上进行,反应体系25 μL 包括:SYBR Premix Ex Taq($2 \times$)12.5 μL 、cDNA 2 μL 、上游和下游引物各0.5 μL 、 dH_2O 9.5 μL ,反应条件如下:95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,随后是40个循环包括95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s。上、下游引物设计用Primer 5软件完成,引物序列见表1。

表 1 PCR引物设计

Tab 1 PCR primers used in the experiment

基因	引物	长度
COL1	5'-TGTTTCAGCTTTGTGGACCTC-3'	234 bp
	5'-CTTGGTCTCGTCACAGATCA-3'	
OCN	5'-ATGAGAGCCCTCACACTCCTC-3'	302 bp
	5'-CTAGACCGGGCCGTAGAAGCG-3'	
GAPDH	5'-TTAGCACCCCTGGCCAAGG-3'	540 bp
	5'-CTTACTCCTTGGAGGCCATG-3'	

GAPDH为管家基因,根据绘制的动力学曲线得到目的基因与管家基因的量,再将目的基因同管家基因的比值(*i*值)作为待测细胞目的基因相对拷贝数即定量的最后结果。

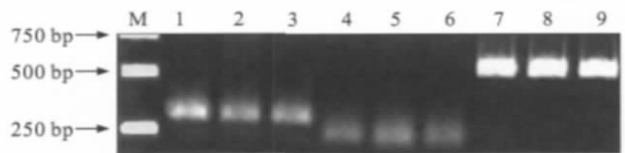
1.3 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 13.0统计分析软件对数据进行处理, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 引物的特异性

采用RT-PCR法扩增产物,1%琼脂糖凝胶电泳结果见图1。每个目的基因的表达采用3复孔检测。OCN扩增片段为302 bp, COL1扩增片段为234 bp,内参GAPDH扩增片段为540 bp。



M: Marker DL2000; 1-3: OCN扩增片段; 4-6: COL1扩增片段; 7-9: GAPDH扩增片段。

图 1 引物的特异性

Fig 1 The specific of primers

2.2 不同浓度尼古丁对细胞增殖的影响

不同浓度尼古丁对MG63细胞增殖的影响见图2。由图2可见,在每一时间点尼古丁对细胞增殖起抑制作用并呈剂量依赖性。高浓度尼古丁组的A值均低于低浓度尼古丁组;高浓度尼古丁对细胞增殖的抑制作用强于低浓度尼古丁的抑制作用。

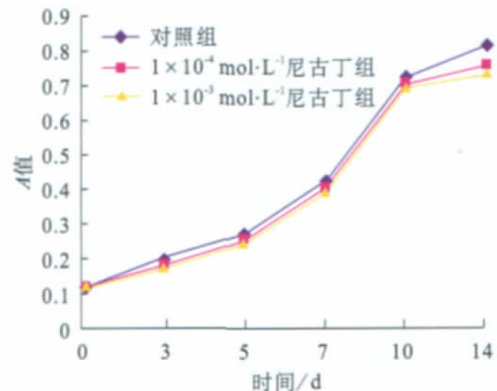


图 2 尼古丁对细胞增殖的影响

Fig 2 Effect of nicotine on cell proliferation

2.3 不同浓度尼古丁对ALP活性的影响

不同浓度尼古丁对MG63细胞ALP活性的影响见图3。对照组和 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼古丁组于第10天ALP活性达到最大值,第14天时降低。在第3、5、7、10、14天, $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼古丁组的ALP活性明显低于对照组($P < 0.05$);在第5、10、14天, $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼古丁组的ALP活性明显低于对照组($P < 0.05$);在第

3、5、7、10天, $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼古丁组的ALP活性明显低于 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼古丁组 ($P < 0.05$)。

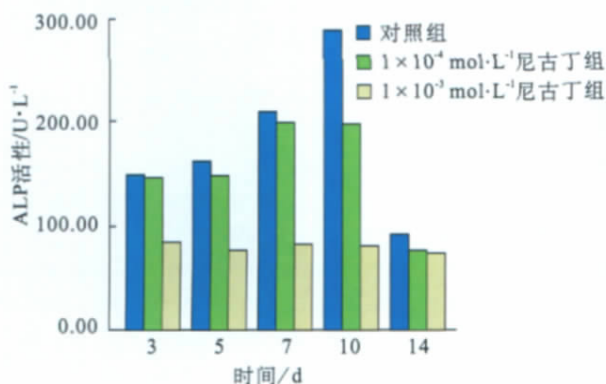


图3 尼古丁对ALP活性的影响

Fig 3 Effect of nicotine on ALP activity

2.4 不同浓度尼古丁对COL1和OCN基因表达的影响

在培养的第3、5、7、10、14天, 对照组、 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼古丁组COL1和OCN基因的表达情况见图4、5。

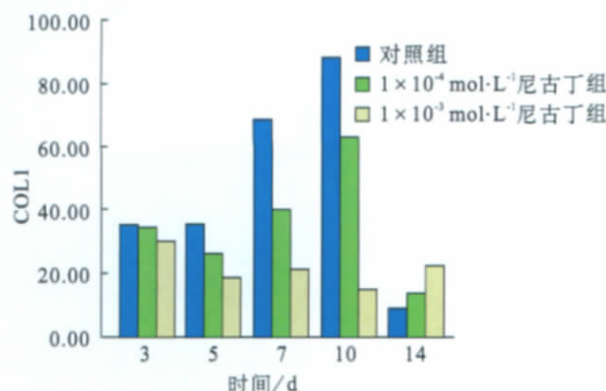


图4 成骨MG63细胞系COL1的表达

Fig 4 Effect of nicotine on the expression of type I collagen

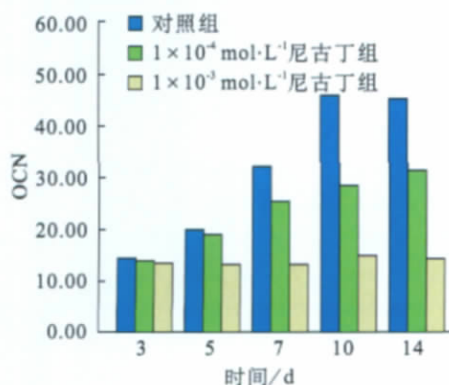


图5 成骨MG63细胞系中OCN的表达

Fig 5 Effect of nicotine on the expression of OCN

对照组和 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼古丁组COL1的表达在第10天达到峰值, 在第3、5、7、10天, $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼古丁组的COL1活性明显低于对照组 ($P < 0.05$); 在第5、7、10天, $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼古丁组的COL1活性明显低于对照组 ($P < 0.05$); 在第5、

7、10天, $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼古丁组的COL1活性明显低于 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼古丁组 ($P < 0.05$)。 $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼古丁组COL1的表达在第10天降至最低, 但在第14天时, $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼古丁组的COL1表达却增高。

对照组中OCN的表达在第10天达到峰值, 第14天仍然保持较高的水平; 在第3、5、7、10、14天, $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼古丁组的OCN活性明显低于对照组 ($P < 0.05$); 在第5、7、10、14天, $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼古丁组的OCN活性明显低于对照组 ($P < 0.05$); 在第5、7、10、14天, $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼古丁组的OCN活性明显低于 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼古丁组 ($P < 0.05$)。 在第5、7、10、14天, $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼古丁组OCN的表达持续增高, $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼古丁组OCN的表达无明显变化。

3 讨论

吸烟是牙周病的促发因素, 吸烟人群的牙槽骨丧失也明显大于非吸烟人群^[5], 但关于尼古丁对骨的形成和改建影响的研究较少, 因此本实验进行了尼古丁对MG63成骨细胞功能影响的研究, 尽管MG63细胞是人成骨肉瘤细胞, 但很多实验已将其作为典型的成骨细胞样细胞进行研究^[6-8]。

成骨细胞主要功能是合成、分泌骨基质并促进基质矿化形成骨组织。成骨细胞分泌COL1、骨结合素(osteonectin, ON)、OCN、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、纤维连接蛋白(fibronectin, FN)及一系列生长因子。还能通过基质小泡释放钙离子和ALP等酶类物质, 钙离子在ALP作用下沉积在胶原纤维丝上, 完成基质矿化过程。体外培养的成骨细胞表现为增殖态和功能态2种相对状态, 按顺序进入增殖期、胞外基质合成期和钙化期。COL1从增殖期开始表达, 基质合成期达到高峰; ALP是成骨细胞分化的早期标志物, 基质合成期开始出现, 钙化期达到高峰; OCN是成骨细胞分化成熟的标志, 钙化早期开始表达, 钙结节成熟后达到高峰, 一般将COL1、ALP、OCN作为成骨细胞功能状态的评价指标^[9]。

本实验表明尼古丁抑制了成骨细胞的增殖、ALP活性和COL1的分泌。对照组和 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼古丁组于第10天ALP活性达到最大值, 14 d时降低。在第5、10、14天, $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼古丁组ALP活性低于对照组 ($P < 0.05$)。这与以前的尼古丁促进ALP活性的结果不一致, 这种差异可能是由于实验对象和实验组的尼古丁处理浓度不同所导致。在第3、5、7、10天, $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼古丁组的ALP活性明显低于 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼古丁组 ($P < 0.05$), 说明高浓度的尼古丁对成骨细胞分化产生了较强的抑制作

用。在骨形成过程中ALP不仅通过水解焦磷酸盐和三磷酸腺苷以解除它们对骨形成的抑制作用；它还能提供羟磷灰石沉淀所需要的高浓度磷酸盐^[10]，磷酸钙沉积在细胞周围基质的胶原中形成新生骨。本实验观察到与细胞外基质形成密切相关的高浓度的ALP活性先于代表骨矿化的OCN的发生，这与Tanabe等^[11]的研究结果相同。同时尼古丁可以阻止矿化的产生和羟磷灰石结晶的生长。

OCN是存在于骨基质中的非胶原蛋白，能够调节矿物质形成的速率和方向，在维持正常骨钙化率和抑制软骨钙化中起重要作用。其基因调节需在胶原合成的基础上进行，在基质矿化期开始分泌。研究发现在成骨细胞的分化过程中，ALP mRNA从晚期的成骨祖细胞到成骨细胞阶段都有表达，而OCN mRNA只在成熟的成骨细胞中有表达，所以普遍将OCN作为成骨细胞分化成熟的标志，是成骨细胞的特异性生化指标^[12]。本实验中对照组OCN在第10天达到峰值，第14天仍然保持较高的水平。第5、7、10、14天， $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼古丁组的OCN活性明显低于对照组($P < 0.05$)；在第5、7、10、14天， $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼古丁组对OCN的抑制强于 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼古丁组； $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼古丁组的OCN表达均处于较低的水平，且没有明显的波动，说明尼古丁不仅抑制成骨细胞的早期分化，同时也抑制成骨细胞骨基质的矿化，并且这种抑制作用呈剂量依赖性。

COL1是骨组织中的重要有机成分，电镜下可见骨的羟磷灰石晶体呈针状或长条状结晶，位于胶原纤维的表面及内部结构中，沿纤维长轴有间隔、规律地出现，COL1作为成骨细胞表型及基质钙化的基础而在骨钙化过程中起重要的作用^[13]。Casser-Bette等^[14]研究表明成骨细胞在COL1涂层上培养有更强的成骨能力，可刺激多潜能间充质细胞向成骨细胞转化，并促进成骨细胞ALP、ON、OCN、OPN mRNA的表达。Green等^[15]证实COL1对成骨细胞的作用途径是激活蛋白激酶C通路。本实验中对照组和 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼古丁组COL1的表达在第10天最高。在第5、7、10天， $1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼古丁组的COL1活性明显低于 $1 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尼古丁组($P < 0.05$)。显示尼古丁通过抑制COL1的合成能力而降低骨的钙化，并且这种抑制作用呈剂量依赖性。

尼古丁对人成骨细胞抑制作用的受体和信号转导途径尚不清楚。本实验通过检测成骨细胞COL1、ALP、OCN的表达而表明尼古丁通过降低ALP的活性和COL1的表达而抑制骨形成，尼古丁对成骨细胞

分泌的其他骨基质的影响和相应的信号转导途径有待于进一步研究。

[参考文献]

- [1] Benowitz NL, Jacob P 3rd, Yu L. Daily use of smokeless tobacco : Systemic effects[J]. *Ann Intern Med*, 1989, 111(2) :112-116.
- [2] Clarke NG, Shephard BC, Hirsch RS. The effects of intra-arterial epinephrine and nicotine on gingival circulation[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1981, 52(6) 577-582.
- [3] Clarke NG, Shephard BC. The effects of epinephrine and nicotine on gingival blood flow in the rabbit[J]. *Arch Oral Biol*, 1984, 29 (10) :789-793.
- [4] Giannopoulou C, Roehrich N, Mombelli A. Effect of nicotine-treated epithelial cells on the proliferation and collagen production of gingival fibroblasts[J]. *J Clin Periodontol*, 2001, 28(8) :769-775.
- [5] Haffajee AD, Socransky SS. Relationship of cigarette smoking to the subgingival microbiota[J]. *J Clin Periodontol*, 2001, 28(5) : 377-388.
- [6] Banai K, Brady K, McDonald F. A preliminary optical and electron microscopic study of the beta(1) integrin distribution pattern of human osteosarcoma-derived cells[J]. *Histochem Cell Biol*, 2004, 122(1) :75-80.
- [7] Chaplet M, Detry C, Deroanne C, et al. Zoledronic acid up-regulates bone sialoprotein expression in osteoblastic cells through Rho GTPase inhibition[J]. *Biochem J*, 2004, 384(Pt 3) :591-598.
- [8] Postiglione L, Di Domenico G, Ramaglia L, et al. Different titanium surfaces modulate the bone phenotype of SaOS-2 osteoblast-like cells[J]. *Eur J Histochem*, 2004, 48(3) :213-222.
- [9] 杨志明. 组织工程基础与临床[M]. 成都：四川科学技术出版社, 2004 :125.
YANG Zhi-ming. Basic and clinical research on tissue engineering [M]. Chengdu : Sichuan Science and Technology Publishing Co, 2004 :125.
- [10] Anderson HC. Mechanism of mineral formation in bone[J]. *Lab Invest*, 1989, 60(3) 320-330.
- [11] Tanabe N, Ito-Kato E, Suzuki N, et al. IL-1alpha affects mineralized nodule formation by rat osteoblasts[J]. *Life Sci*, 2004, 75 (19) 2317-2327.
- [12] Ducey P. Principles of bone biology[M]. 2nd ed. San Diego : California Academic Press, 1996 :183.
- [13] Boskey AL. Mineral-matrix interactions in bone and cartilage[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 1992, (281) 244-274.
- [14] Casser-Bette M, Murray AB, Closs EI, et al. Bone formation by osteoblast-like cells in a three-dimensional cell culture[J]. *Calcif Tissue Int*, 1990, 46(1) :46-56.
- [15] Green J, Schotland S, Stauber DJ, et al. Cell-matrix interaction in bone : Type collagen modulates signal transduction in osteoblast-like cells[J]. *Am J Physiol*, 1995, 268(5 Pt 1) :C1090-C1103.

(本文编辑 王晴)