

β -磷酸甘油诱导离体成骨细胞非矿化阶段的碱性磷酸酶表达

陈璐璐 Jørgen Schøller Niels T. Foged

摘要 普遍认为 β -磷酸甘油(β -GP)是成骨细胞培养中诱导骨基质矿化的重要元素之一。然而它对成骨细胞的其它代谢过程的影响仍不甚清楚。本研究的目的是为了了解 β -GP在成骨细胞的早期培养,即非矿化阶段是如何影响它的生长以及 β -GP的这种影响在不同的传代细胞中有何不同。由于碱性磷酸酶(ALP)是成骨细胞分化的一个特异指征,我们故选择ALP作为研究的主要指标。实验表明,10mmol β -GP/L提高ALP mRNA表达达2倍左右,增加1~4代成骨细胞的ALP活性达10%~30%($P<0.01$)。 β -GP诱导ALP活性增加的作用可被蛋白合成抑制剂环己酰亚胺安全抑制。 ^3H -胸腺嘧啶核苷结合试验表明, β -GP对成骨细胞的增殖无影响。本研究结果显示, β -GP不作用于胎鼠头盖骨成骨细胞的增殖,但在细胞培养的非矿化阶段诱导ALP mRNA表达及增加该酶的活性。

关键词 胎鼠头盖骨成骨细胞 β -磷酸甘油 碱性磷酸酶 矿化

ALP induction by β -glycerophosphate during the non-mineralization phase *in vitro*

Chen Lulu¹, Jørgen Schøller² and Niels T. Foged²

1. Department of Endocrinology, Union Hospital, Tongji Medical University, Wubao, Hubei 430022, P. R. China

2. Basic Research Department, Center for Clinical & Basic Research, Ballerup Byvej 222, DK-2750 Ballerup, Denmark

Abstract: β -Glycerophosphate(β -GP) is accepted as an essential factor for the extracellular matrix mineralization process of osteoblasts *in vitro*. However, the influence of β -GP on other metabolic activities of osteoblasts is still uncertain. The aim of this study was to investigate how β -GP influences rat osteoblast development at the early period of culture, i.e. the non-mineralization phase, and how this varies with the different cell passages. For this purpose, alkaline phosphatase (ALP) was chosen as a main object in this study. By Northern blot analysis, up to two fold increase of ALP mRNA was observed after stimulation of rat osteoblasts with 10 mmol β -GP/L. Likewise, β -GP induced a 10%~30% increase in ALP activity ($P<0.01$) of early passages (1 to 4). The β -GP induced increase in ALP activity was totally inhibited by the protein synthesis inhibitor, cycloheximide (50 $\mu\text{mol/L}$). β -GP stimulation was found to be without effect on cell proliferation. In conclusion, β -GP has no effect on proliferation but induces an increase in both mRNA level and activity of ALP in the non-mineralization phase of cultures, which lasts for several passages but will disappear in older cultures.

Key words: Fetal rat calvarial cells β -Glycerophosphate Alkaline phosphatase activity Mineralization

在含有 β -磷酸甘油(β -GP)及抗坏血酸的培养中,成骨细胞所形成的骨结节或骨样组织

能够矿化^[1,2]。因此,这种培养方法被广泛用于研究离体骨细胞的不同功能^[3~5]。尽管许多年前Robison已报道有机磷酸可能是组织矿化所需的无机磷的一个来源^[6],但由于骨基质矿化是一个复杂的过程,人们对 β -GP在这一过程

作者单位:(430022)湖北省武汉市同济医科大学附属协和医院内分泌科(陈璐璐);丹麦临床与基础研究中心(Jørgen Schøller Niels T. Foged)

中的作用机制仍缺乏了解。一些研究提示, β -GP 除了诱导矿化外还可能影响细胞的增殖及分化。将鸡头盖骨内膜培养在含有 β -GP 的培养液中, ^3H -胸腺嘧啶核苷的结合减少^[7]。矿化的小鼠内软骨培养也显示 β -GP 降低碱性磷酸酶(ALP)的活性^[8]。另一方面, Lee 等人发现 β -GP 增加大鼠成骨细胞培养早期矿化阶段的 ALP mRNA 表达,但对 I 型胶原、骨钙素等无影响^[9]。

本研究的目的是为了了解 β -GP 对离体大鼠胎鼠头盖骨成骨细胞的 ALP 的影响。尤其是对细胞非矿化阶段的作用,以及这种作用在不同传代细胞中的改变。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

细胞分离过程遵循 Bellows 等提出的方法^[2]。所分离的21天的 Sprague-Dawley 胎鼠头盖骨被剪碎,然后经过胶原酶(2mg/ml)及透明质酸酶(1mg/ml)混合液的阶段性消化。消化过程于37°C 下进行并同时加以搅拌。每20分钟收集细胞一次,共得5批细胞。第一批细胞弃之不用,后4批细胞被混合后接种于含有 F-12 培养液的培养瓶中。培养液中同时加入抗生素及10%的小牛血清(FCS)。培养瓶被置于37°C 含有5%CO₂的培养箱中。24小时后,存活细胞经胰蛋白酶作用从培养瓶中分离出来,然后按10⁴个细胞/cm²的密度接种于培养瓶中。当细胞达到融合状态时按前述的胰蛋白酶的方法将细胞分离传代。

所用培养液、抗生素、小牛血清购于 Gibco,药品购于 Sigma。

1.2 ^3H -胸腺嘧啶核苷结合试验

细胞按2×10⁴个细胞/cm²接种于96孔培养板中。在含有10%FCS 的 α -MEM 中生长24小时,然后将培养液换为含0.1%小牛血清白蛋白的无血清 α -MEM 以诱导细胞的静止状态。24小时后,10mmol β -GP/L 被加入培养中并孵育48小时。 ^3H -胸腺嘧啶核苷在最后的24小时内被

加入培养中。细胞被用于分析之前,经磷酸缓冲液洗涤二次,然后用10%(W/V)的三氯乙酸固定,最后用0.3N 的 NaOH 及1%的十二烷基硫酸钠溶液溶解细胞。样本中的放射性含量被液闪计数器所测定。

1.3 ALP 活性的测定

用于 ALP 活性测定的细胞接种方法如上述。细胞被培养4天。10mmol β -GP/L 于第三天加入培养中。在用于观察蛋白抑制剂作用的实验组中,50 μ mol/L 环己酰亚胺于 β -GP 被加入前的2小时加入培养中。ALP 活性通过 PNP 的方法直接在培养孔中测定^[10]。加入 PNP 的培养板被置于37°C 温育60分钟。P-硝基酚的吸收光度用酶联免疫分析测定仪测定(波长405nm)。酶活性最后经用亚甲基蓝染色法测定的平行培养板中的细胞数多少来校正。

1.4 Northern 杂交分析

细胞被培养于含有 β -GP 及标准培养液中5~6天。各份标本的总 RNA 的提取遵循 Chomczynski 等所提出的方法^[11]。20 μ gRNA/每份样品经含1%福尔马林脂胶糖凝胶电泳分离。然后转移至尼龙膜上(Hybond N)。预杂交及杂交均在42°C 下进行。所用的 ALP 探针是从质粒 pS31 中获取的-2.4kb EcoRI cDNA 片段。该片段编码完整的 ALP 基因。分离的探针用 α -32p-dCTP (Amersham UK, 3000 μ Ci/mmol)作随机引物标记。洗涤后的杂交膜被置于 Molecular Dynamics Phosphor 贮存板中曝光5~7天。为了校正各标本上样的差异,杂交膜用³²P 末端标记的28S RNA 寡核苷酸探针再杂交。RNA 的含量通过 Molecular Dynamics Phosphor Imager SF 测定。

2 结果

2.1 细胞增殖

^3H -胸腺嘧啶核苷结合分析试验测定显示,10mmol β -GP/L 对胎鼠头盖骨各代细胞的增殖无影响(图1)。

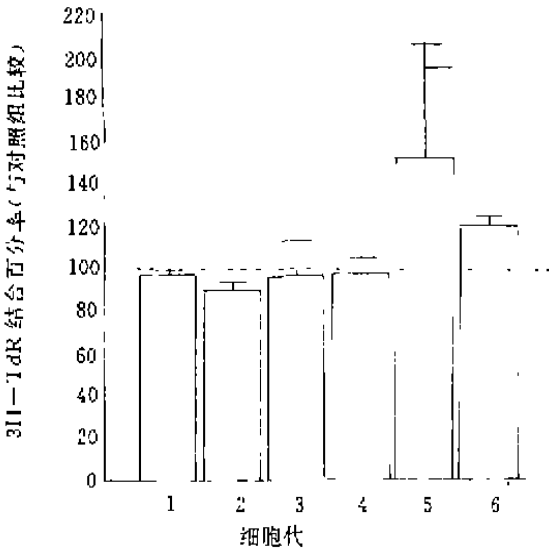


图1 胎鼠头盖骨各代细胞³H-胸腺嘧啶核苷结合试验,对照组的数值被确定为100%。每组结果以均数±标准误表示

2.2 ALP 活性

当胎鼠头盖骨细胞在含有β-GP的培养液中生长4天,ALP活性相对于对照组增加10~30%($P<0.01$),这种增加见于前4代细胞培养(图2)。当同等浓度的β-GP在ALP测定前被加入含有待查细胞的培养板中,结果显示这种化合物本身并不影响ALP的测定结果(图3),证明实验组所显示的ALP增高并不是由于标本中残留的β-GP所致。更进一步的实验表明,蛋白合成抑制剂能够阻断β-GP对ALP活性的影响(图3)。

2.3 ALP mRNA 表达

来自于1~6代细胞的RNA标本被用于Northern杂交分析。结果表明,10mmol β-GP/L使ALP mRNA水平提高1.5~2倍。这种增高见于1~3代细胞(附表)。

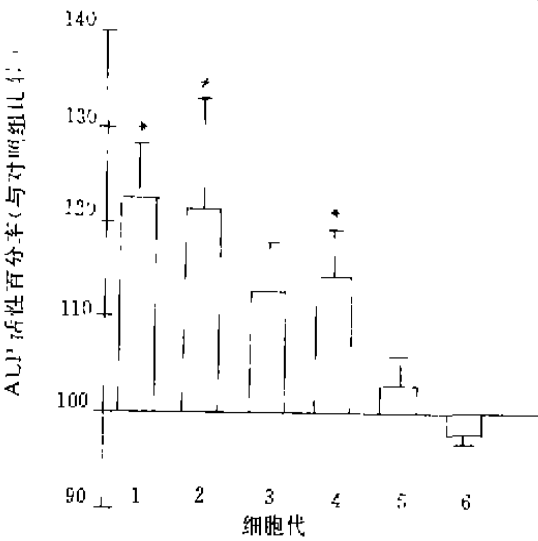


图2 6代胎鼠头盖骨细胞的ALP活性,对照组数值被确定为100%。每组结果以均数±标准误表示,* $P<0.05$

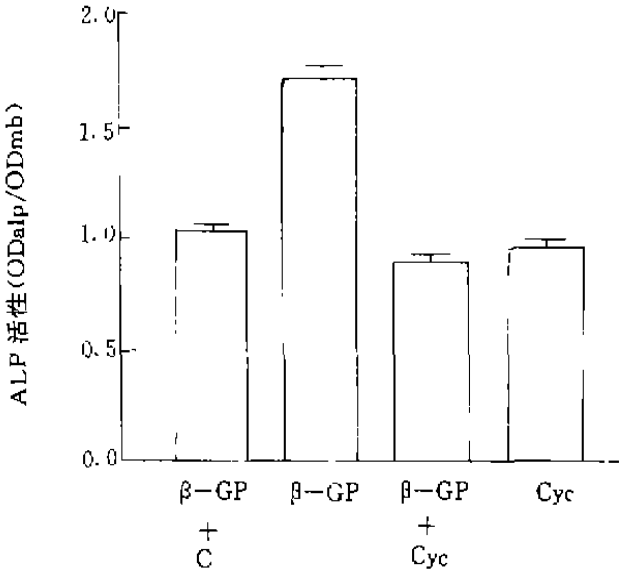


图3 β-GP及蛋白合成抑制剂对ALP活性的影响,C+β-GP;β-GP于ALP测定前加入测定板中;β-GP;培养含β-GP;Cyc+β-GP;培养中含有环己酰亚胺(Cycloheximide)与β-GP;Cyc;培养含环己酰亚胺,无β-GP。每组结果以均数±标准差表示

附表 三批实验所获β-GP诱导的ALP mRNA水平的百分率变化
(与对照组比较)

实验次数	细 胞 代					
	1	2	3	4	5	6
1	+46.5%	+45.3%	+31.9%	-6.5%	-38.4%	ND
2	+23.1%	+13.3%	+57.7%	ND	ND	ND
3	+16.20%	+16.8%	+25.99	-8.26%	ND	ND

注:ND mRNA信号低检测范围

3 讨论

自从 Robison 在他的最早研究中揭示有机磷酸可能是组织培养的无机磷的来源^[6], β -GP 已被广泛用于各种成骨细胞培养以诱导基质的矿化。大量的研究已证明只有在培养中加入 β -GP, 骨基质方能矿化^[2,12,13]。 β -GP 的这种作用被认为与成骨细胞培养中高活性的 ALP 有关。普遍认为, 在离体培养的矿化过程中, β -GP 被 ALP 迅速水解而释放出无机磷, 后者用于羟磷灰石的形成。这一作用可被 ALP 的可逆性抑制剂左旋咪唑所阻断。经发现在被 β -GP 所处理过的培养中, DNA 合成、胶原及总蛋白的合成均下降^[7,14,15], 因此认为 β -GP 可能不仅仅是组织矿化的基础物质, 而且也在某种程度上影响细胞的代谢。作为 ALP 的底物, β -GP 在矿化过程中对 ALP 的影响已得到一定的研究。然而, 这些结果却不相一致。其原因可能因为研究所用的对象来源于不同的培养系统、不同的细胞种类(如原代细胞或细胞系等)。大部份文献报道, 离体成骨细胞培养中, β -GP 可致 ALP 活性下降^[7,8,16]。但当我们认真研究这些报道时, 可以发现, 所有这些研究均将重点放在培养的晚期阶段, 即矿化阶段。在这一阶段中, 激活酶所需的二价离子(如 Zn^{2+}) 由于形成矿化物而被消耗, 因此认为酶活性下降是由于二价离子减少所致^[8]。本研究的意图在于了解 β -GP 在早期培养阶段即非矿化阶段对 ALP 的影响。

本文资料显示, 在早期胎鼠头盖骨成骨细胞培养中, 10mmol β -GP/L 增加 ALP 的活性。这种作用很明显不是由于在 ALP 测定过程中可能存在有痕量的 β -GP 所致, 因为将 10mmol β -GP/L 直接加入 ALP 的测定过程中并不提高该酶的活性。而且, 蛋白合成抑制剂可阻断 β -GP 对 ALP 的影响。再者, ALP mRNA 表达的增加更有力地证实了 β -GP 的刺激作用。

ALP 是成骨细胞分化的特异性标志之一, 在成骨和前成骨细胞中均可测到此酶的存在。有报道显示, ALP 表达紧伴着细胞的增殖

期^[17]。因此, 观察培养早期 ALP 的改变有利于了解 β -GP 的效果。从本研究结果可以看出, β -GP 对 ALP 的作用不是通过促进细胞的增殖而达到的。

当测定不同传代细胞的 ALP 活性及 mRNA 水平, 我们发现, β -GP 的刺激效果仅存在于头 3~4 代细胞, 随着细胞的传代而逐渐消失。这种改变可能是由于随着细胞的传代, 成熟的成骨细胞逐渐丧失它们的分化能力并失去它们的特征。例如, 早先的报道已表明成骨细胞对甲状旁腺素及降血钙素的反应随着细胞的传代而消失。

总之, 本文第一次揭示在成骨细胞培养的非矿化阶段 β -GP 对 ALP 的诱导作用。考虑到它同时是矿化过程中无机磷的供体, 很有可能 β -GP 同时调节成骨细胞分化早期及后期阶段的某些环节。活体循环中的有机磷酸是否也有类似功能有待进一步论证。

参 考 文 献

- 1 Bellows C G, Aubin J E, Heersche J N M, *et al.* Mineralized bone nodules formed *in vitro* from enzymatically released rat calvaria cell populations. *Calcif Tissue Int*, 1986; 38: 143.
- 2 Nefussi J R, Boy-Lefevre M L, Roulekbache H, *et al.* Mineralization *in vitro* of matrix formed by osteoblasts isolated by collagenase digestion. *Differentiation*, 1985; 29: 160.
- 3 Aronow M A, Gerstenfeld L C, Owen T A, *et al.* Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells. *J Cell Physiol*, 1990; 143: 213.
- 4 Whitson S W, Whitson M A, Bowers D E Jr, *et al.* Factors influencing synthesis and mineralization of bone matrix from fetal bovine bone cells grown *in vitro*. *J Bone Miner Res*, 1992; 7: 727.
- 5 Collin P, Nefussi J R, Wetterwald A, *et al.* Expression of collagen, osteocalcin and bone alkaline phosphatase in a mineralizing rat osteoblastic cell culture. *Calcif Tissue Int*, 1992; 50: 175.
- 6 Robison R, Soames K M. The possible significance of hexosephosphoric esters in ossification. *Biochem J*, 1924; 17: 286.
- 7 Tenenbaum H C, McCulloch C A G, Fair C, *et al.* The regulatory effect of phosphates on bone metabolism *in vitro*. *Cell Tissue Res*, 1989; 257: 555.

8 Zimmermann B, Wachtel H C, Vormann J. Kinetics of β -glycerophosphate-induced endochondral mineralization *in vitro*. Calcium accumulation, alkaline phosphatase activity, and effects of levamisole. *Calcif Tissue Int*, 1992, 51: 54.

9 Lee K L, Aubin J E, Heersche J N M. β -glycerophosphate-induced mineralization of osteoid does not alter expression of extracellular matrix components in fetal rat calvarial cell cultures. *J Bone Miner Res*, 1992, 7: 1211.

10 Gray T K, Flynn T C, Gray K M, *et al*. 17β -estradiol acts directly on the clonal osteoblastic cell line UMR106. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 6267.

11 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, 162: 156.

12 Tenenbaum H C, Heersche J N M. Differentiation of osteoblasts and formation of mineralized bone *in vitro*. *Calcif Tissue Int*, 1982, 34: 76.

13 Bellows C G, Aubin J E, Heersche J N M. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed *in vitro*. the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone Miner*, 1991, 14: 27.

14 Harris S E, Sabatini M, Harris M A, *et al*. Expression of bone morphogenetic protein messenger RNA in prolonged cultures of fetal rat calvarial cells. *J Bone Miner Res*, 1994, 9: 389.

15 Tenenbaum H C, Lumbach H, McCulloch C A G, *et al*. Osteogenic phase-specific co-regulation of collagen synthesis and mineralization by β -glycerophosphate in chick periosteal cultures. *Bone*, 1992, 13: 129.

16 Chung C H, Golub E E, Forbes E, *et al*. Mechanism of action of β -glycerophosphate on bone cell mineralization. *Calcif Tissue Int*, 1992, 51: 305.

17 Owen T A, Aronow M, Shalhoub V, *et al*. Progressive development of the rat osteoblast phenotype *in vitro*. Reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol*, 1990, 143: 420.

机关干部骨质疏松与生活习惯的关系

杨建文 李素勤 张晓光 于 华

为了解男性机关干部骨质疏松的发生率与生活习惯的关系,我们在近年来对229名机关干部进行了骨密度及生活习惯的普查,现将结果分析如下:

1. 对象:机关查体中所检查身体健康男性干部229人,年龄40~62岁,平均50.49岁。

2. 骨密度测量方法:采用1993年引进的美国 Lunar 公司的 DPX-L 双能 X 线骨密度仪,测量被检个体腰2~腰4前后位的骨密度,结果判定以面密度(BMD, g/cm²),误差1%。

3. 生活习惯调查:采用问卷方法,根据每日室外活动时间设置了4个组:少于0.5小时组;0.5~1小时组;1~2小时组及多于2小时组。并详细询问了抽烟数量及时间。

以上所得数据均用 DBASE III 处理,统计处理采用 t 检验。

表1 229名机关干部骨密度值(g/cm²)

年 龄	例 数	均值±标准差
40—49	102	1.135±0.133
50—59	120	1.105±0.142
60—69	7	1.121±0.104

作者单位:100842, 总后机关第一门诊部

结果表明:1. 229名机关干部骨密度值及骨质疏松发生率见表1。

按照国际骨质疏松判断标准(峰值减二个标准差),则骨质疏松者为23人,占总人数的10%。

2. 活动时间与骨密度的关系见表2。

表2 229名干部活动时间与骨密度的关系

室外活动时间 (小时/日)	例 数	骨密度值(g/cm ²)
<0.5	73	1.094±0.104
0.5~1	105	1.122±0.159
1~2	39	1.111±0.147
>2	12	1.169±0.130

经统计学检验:<0.5小时组与2小时组有明显差异(P<0.01);>0.5小时组与其它两组有一定差异(P<0.05)。

3. 抽烟调查结果:每日抽烟5支以上并数十年者84人,占总人数的37%;其中每日抽烟10支以上者66人,占总人数的29%。在调查中还发现:在每日活动少于0.5小时组中,抽烟人数高达45%,而在活动时多于1小时以上人群组中,抽烟人数减为24%。

结果表明:活动少加之抽烟更会导致骨密度下降,使骨质疏松发生率增加。