

26,27-F₆-1,25(OH)₂D₃, 1,25(OH)₂D₃和17-β-Estradiol 对培养胎鼠头盖骨的影响

王学娅 宫原龍郎 小宫山裕子 松本真明 狐塚寛 郭季安

摘要 26,26,26,27,27,27-Hexafluoro-1α,25-dihydroxy vitamin D₃[26,27-F₆-1,25(OH)₂D₃]是一种新合成的具有刺激骨代谢和细胞分裂生物活性的药物。实验研究了26,27-F₆-1,25(OH)₂D₃、1α,25-dihydroxyvitamin D₃[1,25(OH)₂D₃]和17β-Estradiol[Estradiol]在骨形成和骨吸收等方面的作用,以探讨其对治疗骨质疏松症的基本作用。实验使用妊娠20日龄大鼠胎鼠的成对头盖骨,于强化 BGJ₂ 培养基中培养7天,测定骨干重、Ca含量及羟脯氨酸含量。26,27-F₆-1,25(OH)₂D₃对胎鼠头盖骨干重、Ca含量和羟脯氨酸含量都有较明显的增加作用。其作用优于Estradiol 单纯提高胎鼠头盖骨中Ca的含量,而对骨的干重和羟脯氨酸含量无显著影响;也强于1,25(OH)₂D₃仅增加胎鼠头盖骨干重和羟脯氨酸含量,却不能提高骨Ca含量的作用。由于26,27-F₆-1,25(OH)₂D₃在骨形成中对胎鼠头盖骨包括骨盐和骨基质中的重要物质Ca和羟脯氨酸都有促进作用,因此它很可能成为一种有潜力的治疗骨质疏松症的新型药物。

关键词 26,26,26,27,27,27-Hexafluoro-1α,25dihydroxyvitamin D₃ 1α,25-Dihydroxyvitamin D₃ 17β-Estradiol 骨质疏松 骨干重 钙 羟脯氨酸

Effects on cultured fetal rat calvaria of 26,26,26,27,27,27-hexafluoro-1α,25-dihydroxyvitamin D₃, 1α,25-dihydroxyvitamin D₃ and estradiol

Wang Xueya, T. Miyabara, H. Komiyama, M. Matsumoto, H. Kozukb, and Guo Ji'an

^(a)Institute of Basic Medical Science of Liaoning Province, Shenyang 110005, China)

^(b)Department of Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Science, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama-shi, Japan)

Abstract 26,26,26,27,27,27-Hexafluoro-1α,25-dihydroxyvitamin D₃[26,27-F₆-1,25(OH)₂D₃] is a new synthesized agent with a greater biological activity than that of 1α,25-dihydroxyvitamin D₃[1,25(OH)₂D₃] in stimulating bone metabolism and cell differentiation. The effects of 26,27-F₆-1,25(OH)₂D₃, 1,25(OH)₂D₃ and 17β-estradiol[estradiol] on bone formation and resorption in a mineralizing bone organ culture system were studied to research their potencies to treat osteoporosis. Parietal bone from 20-day old fetal rat calvaria were cultured up to 7 days in serum-free BGJ₂ medium. Then bone dry weight and calcium and hydroxyproline content were measured. 26,27-F₆-1,25(OH)₂D₃ has great potency to increase dry weight and calcium and hydroxyproline in cultured fetal rat calvaria. Its potency is greater than that of estradiol, which only increases calcium content in fetal rat calvaria but has no significant effects on dry weight and hydroxyproline content. It's also better than that of 1,25(OH)₂D₃, which only increases bone dry weight and hydroxyproline content, but cannot increase calcium content. As 26,27-F₆-1,25(OH)₂D₃ can increase both calcium and hydroxyproline contents in fetal rat calvaria, it is likely to become a new agent for treating osteoporosis with great potential.

Key words 26,26,26,27,27,27-Hexafluoro-1α,25-dihydroxyvitamin D₃ 1α,25-Dihydroxyvitamin D₃ 17β-Estradiol Osteoporosis Bone dry weight Calcium Hydroxyproline

26, 26, 26, 27, 27, 27-Hexafluoro-1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃[26, 27-F₆-1, 25(OH)₂D₃]是近几年合成的新型药物。它具有比1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃[1, 25(OH)₂D₃]更明显的生物活性。如刺激骨的代谢^[1]和细胞分裂^[2]等。由于26, 27-F₆-1, 25(OH)₂D₃对骨的作用已引起广泛的重视, 我们将进一步研究其对骨吸收、骨形成中骨盐、骨基质及骨量的影响, 以对26, 27-F₆-1, 25(OH)₂D₃进行治疗骨质疏松症基础研究的探索。

1 材料和方法

实验动物妊娠大鼠由日本实验动物中心提供, 主要实验药物26, 27-F₆-1, 25(OH)₂D₃与1 α , 25(OH)₂D₃由日本大正制药工业公司提供, Estradiol 由日本大阪和光纯药工业株式会社提供。

在无菌条件下, 于妊娠20日大鼠腹中迅速取出胎鼠, 在不损伤骨膜的条件下, 分离结缔组织, 取出头盖骨。用 ϕ 3mm的环形取样器从头盖骨矢状缝两侧各取一对同样大小的圆形骨片, 骨片被立即放置于 ϕ 35mm具有6孔穴的培养皿中。每穴含1.0ml BGJ₆培养基, 置37 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C恒温中培养。经1小时前培养后, 将培养基吸出, 移入含不同药物及浓度的强化BGJ₆培养基, 将培养皿置于一个7次/分连续摇动的平台上, 并将

其一同置于37 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C且通入5%CO₂气体的恒温培养箱中培养, 于3天后用与上述相同新鲜制备的强化培养基替换原培养基, 继续培养3天。

1.1 骨干重测定法:从培养皿中取出头盖骨片, 终止培养, 用滤纸吸干水份, 分别置入含1.0ml 脱Ca液的小瓶中盖紧, 于4 $^{\circ}$ C冰箱中放置3天脱Ca。将骨片取出后, 用1.0ml 丙酮脱水3次, 1.0ml 乙醚脱水1次, 在60 $^{\circ}$ C干燥箱中放置12小时再降至室温稳定6小时, 于微量天平称其干重。

1.2 骨钙测定法:分别取骨脱Ca液0.2ml, 用4.8ml SrCL₂-HCLO₄稀释液稀释, 充分混匀, 用原子吸收光谱仪测定Ca含量。

1.3 羟脯氨酸测定法:将4N NaOH 0.2ml 分别加入放置骨片的试管中, 于高压釜中120 $^{\circ}$ C, 1.2个大气压持续30min, 静置降至室温后, 每管加入1.8M Citriacid 0.16ml, 充分振摇, 再以20min 间隔分别向每试管中加入Chloramine T 和 Ehrlich 液。于65 $^{\circ}$ C水浴中放置15' 然后用DU^h-64分光光度计测定骨中羟脯氨酸含量。

2 结果

2.1 26, 27-F₆-1, 25(OH)₂D₃, 1, 25(OH)₂D₃和 Estradiol 对培养胎鼠头盖骨干重的影响

由表1可见26, 27-F₆(OH)₂D₃对培养胎

表1 26, 27-F₆-1, 25(OH)₂D₃, 1, 25(OH)₂D₃和 17- β Estradiol 对培养胎鼠头盖骨干重, Ca 含量和羟脯氨酸的影响(μ g, $\bar{x} \pm s$)

组别	浓度 (M)	干重 (μ g)	钙 (μ g)	羟脯氨酸 (μ g)
26, 27-F ₆ -1, 25(OH) ₂ D ₃	10 ⁻¹²	0.2263 $\pm$ 0.0138*	111.21 $\pm$ 5.313*	10.46 $\pm$ 0.2801*
	10 ⁻¹¹	0.2686 $\pm$ 0.0103*	108.15 $\pm$ 3.2510*	10.42 $\pm$ 0.1954
	10 ⁻¹⁰	0.2525 $\pm$ 0.0149	94.89 $\pm$ 3.524	10.57 $\pm$ 0.4906
	10 ⁻⁹	0.225 $\pm$ 0.0225	91.46 $\pm$ 10.922	9.61 $\pm$ 0.5470
1, 25(OH) ₂ D ₃	10 ⁻¹²	0.2650 $\pm$ 0.0267	107.53 $\pm$ 4.990	13.43 $\pm$ 0.6765
	10 ⁻¹¹	0.2488 $\pm$ 0.0127*	111.00 $\pm$ 6.908	13.78 $\pm$ 0.4206**
	10 ⁻¹⁰	0.2738 $\pm$ 0.0136**	97.29 $\pm$ 4.520	13.88 $\pm$ 0.3822*
	10 ⁻⁹	0.2137 $\pm$ 0.0146	103.26 $\pm$ 6.698	12.37 $\pm$ 0.5444
Estradiol	10 ⁻¹²	0.2550 $\pm$ 0.0130	94.79 $\pm$ 3.148**	11.06 $\pm$ 0.7199
	10 ⁻¹¹	0.2663 $\pm$ 0.0229	91.37 $\pm$ 3.880	10.83 $\pm$ 0.5104
	10 ⁻¹⁰	0.2500 $\pm$ 0.0146	92.30 $\pm$ 2.977**	11.091 $\pm$ 0.5104
	10 ⁻⁹	0.2200 $\pm$ 0.0146	98.90 $\pm$ 4.768*	11.25 $\pm$ 0.5597

注: 本资料为8对胎鼠头盖骨的平均值, 与对照组比较*P<0.05, **P<0.01

鼠头盖骨干重有明显刺激作用,在 10^{-12} M和 10^{-11} M溶度时与对照组比较都有显著差异($P < 0.05$)。在其它剂量组虽然比对照组有所增加,但差异不明显。 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 对培养骨干重与对照组相比在 10^{-11} M和 10^{-10} M浓度时差异显著,其中在 10^{-10} M浓度时差异非常显著。与前二者相比较 Estradiol 却无提高骨干重的作用。

2.2 $26,27\text{-F}_2\text{-}1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 和 Estradiol 对培养胎鼠头盖骨 Ca 含量的影响

$26,27\text{-F}_2\text{-}1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 对培养胎鼠头盖骨 Ca 在较低浓度 10^{-12} M和 10^{-11} M时与对照组比较有显著增加作用($P < 0.05$)。1,25(OH) $_2\text{D}_3$ 对培养骨 Ca 含量影响并不显著,与对照组比较未见差别。而 Estradiol 却能大大提高培养胎鼠头盖骨 Ca 含量, 10^{-12} M至 10^{-9} M浓度都有提高作用,特别在 10^{-12} M和 10^{-10} M浓度与对照组相比差异非常显著($P < 0.01$)。

2.3 $26,27\text{-F}_2\text{-}1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 和 Estradiol 对培养胎鼠头盖骨羟脯氨酸的影响

骨羟脯氨酸的含量多少直接反映了骨胶原乃至骨基质合成的量。 $26,27\text{-F}_2\text{-}1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 对羟脯氨酸的影响与对照相比在 10^{-12} M浓度时,可见明显差异($P < 0.05$),但它不如1,25(OH) $_2\text{D}_3$ 作用更强。1,25(OH) $_2\text{D}_3$ 在 10^{-11} M浓度与对照组比较差异非常显著($P < 0.01$)。其次 10^{-10} M浓度也有明显差异($P < 0.05$)。Estradiol 与对照组比较却无差别。

以上结果表明(表1),1,25(OH) $_2\text{D}_3$ 对培养胎鼠头盖骨干重和羟脯氨酸有明显增加作用,但对 Ca 含量却无显著影响。Estradiol 与之相反,可明显提高培养头盖骨中 Ca 的含量,却不能增加骨干重和羟脯氨酸含量。 $26,27\text{-F}_2\text{-}1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 综合了前二者的作用,对骨干重、骨 Ca 含量和羟脯氨酸含量三者都有明显的增加作用。

3 讨论

实验对体外培养的大鼠胎鼠头盖骨,在强化 BGJ_b 培养基中培养,对比观察了新型药物

$26,27\text{-F}_2\text{-}1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 和已应用于临床的药物1,25(OH) $_2\text{D}_3$ 和 Estradiol 对胎鼠头盖骨干重、Ca 含量和羟脯氨酸含量的影响。1,25(OH) $_2\text{D}_3$ 和 Estradiol 用此种培养方法得到的实验结果与临床和基础实验的文献报道的结果^[1-3]是一致的,表明本实验方法是可靠的。

$26,27\text{-F}_2\text{-}1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 兼具1,25(OH) $_2\text{D}_3$ 和 Estradiol 两者对骨形成的促进作用,无论对培养胎鼠头盖骨中 Ca 的含量、骨干重还是羟脯氨酸含量都有明显的增加作用。它具有类似于 Estradiol 使头盖骨中 Ca 含量增加,从而提高骨盐含量促进骨形成的作用,这一结果文献是吻合的^[6]。 $26,27\text{-F}_2\text{-}1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 之所以能引起骨 Ca 含量的升高,很可能与其分子中具有6个氟原子有关。它是否能与体内游离 Ca 以配位键结合,生成络合物而有利于骨对 Ca 的吸收,但增加骨 Ca 的作用与 Estradiol 相比较弱。Estradiol 提高培养胎鼠头盖骨中 Ca 的含量,是通过单纯增加骨盐含量而对骨形成产生促进作用的。这与 Christiansen 的给予闭经后雌激素水平低下而引起骨质疏松症病人以适量 Estradiol,可使骨盐水平明显增加的结果是一致的。但是,Estradiol 对骨盐的增加作用被它促进骨吸收的作用^[3]所抵消,最终使骨羟脯氨酸含量和骨干重没有明显改变。 $26,27\text{-F}_2\text{-}1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 是1,25(OH) $_2\text{D}_3$ 的衍生物,二者具有相似的基本母核,因此它具有1,25(OH) $_2\text{D}_3$ 促进骨胶原羟脯氨酸生成和骨干重增加的作用。已知1,25(OH) $_2\text{D}_3$ 在骨胶原合成中是必须的^[7],可能由于药物结构的差别, $26,27\text{-F}_2\text{-}1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 对骨胶原羟脯氨酸生成的作用不如1,25(OH) $_2\text{D}_3$ 强,但因1,25(OH) $_2\text{D}_3$ 对骨 Ca 的摄取和释放有双重促进作用^[4],因此它对骨 Ca 含量没有明显改变。

实验证明 $26,27\text{-F}_2\text{-}1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 对培养胎鼠头盖骨的干重、骨 Ca 含量和骨胶原合成三方面的促进作用,综合了1,25(OH) $_2\text{D}_3$ 和 Estradiol 两药物的作用,而且其作用较后二者温和,很可能成为一种有潜力的 (下转第12页)

苷酶和 β -葡萄糖醛酸酶则能够降解糖蛋白和蛋白多糖。体外培养的破骨细胞具有丰富的不同的溶酶体酶和厌氧脱氢酶,提示破骨细胞骨吸收是一个复杂的代谢过程,累及到大量蛋白溶酶和能量产生,并需要不断提供能量给胞浆用于酶的胞吐、胞吞活动。

综上所述,培养和新鲜组织印片的破骨细胞含有丰富的参与骨吸收的多种溶酶体酶和厌氧脱氢酶,培养破骨细胞多数脱氢酶的活性低于印片破骨细胞。

(本文图 a~h 见插图第1页)

参 考 文 献

- 1 Zheng MH, Nicholson G, Warton A. What is new in osteoclast ontogeny? (review). *Path Res Pract*, 1991; 187: 117-125.
- 2 Chambers TJ, Magnus CJ. Calcitonin alters behaviour of isolated osteoclasts. *J Pathol*, 1982; 136: 27.
- 3 Osadoby P, Martini MC, Caplan L. Isolated osteoclasts and their presumed progenitor cell, the monocyte, in culture. *J EXP Zool*, 1982; 224: 331.
- 4 Zamboni ZA, Teti A, Primavera MV. Isolated osteoclasts in primary culture: First observations on structure and survival in culture media. *Ana Embryol*, 1982; 165: 405.
- 5 Zheng MH, Papadimitriou JM, Nicholson GC. Aquantita-

tive cytochemical investigation of osteoclasts and multinucleate giant cells. *Histochem J*, 1991; 23: 180.

- 6 Hayashi M, Nakajima Y, Fishman WH. The cytochemical demonstration of β glucuronidase employing naphthol AS-BI glucuronide and hexazonium pararosaniline; preliminary report. *J Histochem Cytochem*, 1964; 12: 293.
- 7 Bancroft JD, and Stevens A. *Theory and practice of histological techniques*, 3rd ed Churchill-livingstone, Edinburgh, 1990; 379.
- 8 Bancroft JD, and Hand NM. *Enzyme histochemistry, microscopy handbooks* 14. Oxford University Press Royal Microscopical Society, 1987; 52-55.
- 9 Zheng MH, McCaughan HB, Papadimitriou JM, et al. Tartrate resistant acid phosphatases in rat cultured osteoclasts is inhibited by carboxyl terminal peptide (osteostatin) from parathyroid hormone-related protein. *J Cell Biochem*, 1994; 54: 145.
- 10 Walker DG. Citric acid cycle in osteoclasts and osteoblasts. A histochemical study of normal and PTH treated rats. *Bull Johns Hos*, 1961; 108: 80.
- 11 Walker DG. Enzymatic and electron microscopic analysis of isolated osteoclasts. *Cal Tissue Res*, 1972; 9: 296.
- 12 Addison WC. Enzyme histochemical properties of kitten osteoclasts in bone imprint preparations. *Histochem J*, 1978; 10: 645.
- 13 Fullmer HM. Enzymes in mineralised tissues. *Clin Orthop*, 1966; 48: 285.

(上接第15页)

治疗骨质疏松症的新型药物。

参 考 文 献

- 1 Okumura H, Yamamoto T, Higuchi S, et al. 26, 27-Hexafluoro-1, 25-dihydroxyvitamin D₃ (F₂₆-1, 25(OH)₂D₃) prevents osteoporosis induced by immobilization combined with ovariectomy in the rat. *Bone Miner*, 1990; 9: 101.
- 2 Inada M, Okuno S, Nishizawa Y, et al. Biological activity of fluorinated vitamin D analogs at C-26 and C-27 on human promyelocytic leukemia cells, HL-60. *Arch Biochem Biophys*, 1987; 258: 421.
- 3 Caputo CB, Meadows D, Raisz LG. Failure of estrogens and androgens to inhibit bone resorption in tissue culture. *Endocrinology*, 1976; 98: 1065.
- 4 Schwartz Z, Soskolne WA, Atkin I, et al. A direct effect of

24, 25-(OH)₂D₃ and 1, 25-(OH)₂D₃ on the modeling of fetal mice long bones in vitro. *Bone Med J*, 1989; 4: 157.

- 5 Zusman I, Hursh BE, Edelstein S, et al. Transplacental effects of 1, 25-dihydroxycholecalciferol and of 24, 25-dihydroxycholecalciferol on the limb skeleton of fetuses and offspring of rats. *Acta Anat*, 1981; 111: 343.
- 6 Harada M, Miyahara T, Miyata M, et al. Effects on cultured neonatal mouse calvaria of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃, 26, 26, 26, 27, 27-hexafluoro-1 α , 25-dihydroxy vitamin D₃ and 26, 26, 26, 27, 27, 27-hexafluoro-1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃. *Bone and Mineral*, 1992; 18: 41.
- 7 Kurihara N, Ikeda K, Hakeda Y, et al. Effect of 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ on alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in osteoblastic cells clone MC3T3-E1. *Biochemical and biophysical research communications*, 1984; 119(2): 767.