

Ⅱ型碳酸酐酶阻断剂抑制 MGC 体外骨吸收研究

赵宁侠 于世凤 庞淑珍



摘要 本文通过分离培养骨巨细胞瘤中的多核巨细胞与骨片共同培养,观察碳酸酐酶阻断剂乙酰唑胺(acetazolamide)对骨吸收的影响。结果显示乙酰唑胺抑制多核巨细胞的骨吸收。浓度为 10^{-6} M 时骨吸收陷窝数和骨吸收面积均显著减少($P < 0.001$)。浓度为 10^{-8} M 时,只对骨吸收面积有显著抑制作用($P_{3天} < 0.05, P_{9天} < 0.001$)。随时间延长,骨吸收陷窝及骨吸收面积呈显著增加($P < 0.001$)。结果表明乙酰唑胺对多核巨细胞骨吸收有抑制作用,说明多核巨细胞与破骨细胞在骨吸收机制方面的相似性。

关键词 Ⅱ型碳酸酐酶 乙酰唑胺 多核巨细胞 破骨细胞 骨巨细胞瘤

Effect of carbonic anhydrase I inhibitor on bone resorption
by multinucleated giant cells from giant cell tumour of bone

Zhao Ningxia, Yu Shifeng and Pang Shuzheng

Department of Pathology, School of Stomatology, Beijing Medical University, Beijing 100081, China

Abstract In this study we separated multinucleated giant cells (MGC) from giant cell tumour of bone (GCT) and cultured them with bone slice. We observed the effect of acetazolamide, carbonic anhydrase (CA) I inhibitor, on bone resorption by MGC. The result showed that acetazolamide inhibited the MGC bone resorption. Compared with the control, acetazolamide at the concentration of 10^{-6} M could not only inhibit the pit numbers but also the areas of pits effectively ($P < 0.001$) and could completely inhibit the bone resorption. But acetazolamide at the concentration of 10^{-8} M could only inhibit the pit areas (on day 3 $P < 0.05$, on day 9 $P < 0.001$). With time prolonged, the pit numbers and areas further increased ($P < 0.001$). It showed that CA I inhibitor plays an important role in MGC bone resorption. It further demonstrated that MGC had the same mechanism in bone resorption as the osteoclasts.

Key words Carbonic anhydrase I Acetazolamide Multinucleated giant cells Giant cell tumour Bone Osteoclasts

破骨细胞内的碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA)为Ⅰ型(CAⅠ),可将 CO_2 和 H_2O 合成 H_2CO_3 ,然后解离($\text{H}_2\text{CO}_3 = \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$),为破骨细胞骨吸收提供酸源。许多研究发现无论在体内还是体外CAⅡ阻断剂皆可抑制破骨细胞骨吸收^[1~4]。最近,我们报道了骨巨细胞瘤

(Giant cell tumor of bone, GCT)中的多核巨细胞(Multinucleated giant cell, MGC)具有与破骨细胞相似的体外骨吸收功能及CAⅡ阳性表达^[5]。为了解骨巨细胞瘤的MGC中CAⅡ的作用,本文采用CAⅡ阻断剂acetazolamide(AZ)研究对MGC体外骨吸收的影响。

1 材料与方法

1.1 MGC 的分离与培养

无菌条件下取新鲜瘤组织,剪碎,吸管反复吹打,静置30秒,待瘤组织碎片沉淀后,将细胞悬液转入24孔培养板,每孔内置6mm×6mm玻片或灭菌牛骨片(10 μ m)及1ml 199培养液(15%血清、100U/ml青、链霉素、25mMHEPES)。置37℃、5% CO₂培养箱内培养16小时后,取出骨片并洗去其表面未贴壁细胞及残碎组织,转入另一24孔培养板继续培养、观察。

1.2 药物

实验分为a、b两组,分别加入AZ10⁻⁸M和10⁻⁶M,空白对照(c组)加入等量培养液。(AZ由芬兰Väänänen教授惠赠)

1.3 相差显微镜观察及摄影

采用Olympus倒置光相差显微镜于第3

天和第9天计数每骨片上的吸收陷窝数,进行摄影。照片进行图像分析。照片各30张(a、b、c组各10张),同样放大倍数,利用西德OPTON公司生产的IBAS-Ⅱ型交互式图像分析系统进行分析。

1.4 统计学分析

各组吸收陷窝数及吸收面积采用SPSS软件的配对t检验进行分析。

2 结果

2.1 形态观察

MGC与骨片共同培养16小时观察吸收陷窝形状为单个圆形或椭圆形,随时间延长,a、c组吸收陷窝数逐渐增加,并变为花瓣样、贝壳样或蚕蚀样。b组吸收陷窝基本无变化。

2.2 功能测定

各组吸收陷窝数及吸收面积见表1~4。

表1 骨吸收陷窝数均值

组别	3天	9天	P值
AZ 10 ⁻⁸ M(a组)	61±5.425	266.125±31.161	<0.001
AZ 10 ⁻⁶ M(b组)	13.375±5.263	15.7±3.732	<0.001
对照组(c组)	60±4.66	275±53.324	<0.001

表2 骨吸收面积数均值

组别	3天	9天	P值
AZ 10 ⁻⁸ M(a'组)	62.004±32.464	950.761±73.923	<0.001
AZ 10 ⁻⁶ M(b'组)	149.831±24.592	152.059±25.744	0.197
对照组(c'组)	53.544±216.655	2159.787±383.587	<0.001

表3 第3天各组骨吸收陷窝数和吸收面积t值及P值

	c组-a组	c组-b组	a组-b组	c'组-a'组	c'组-b'组	a'组-b'组
t值	0.381	16.46	21.80	2.87	8.28	28.62
P值	0.717*	0.000***	0.000***	0.018**	0.000***	0.000***

* P>0.05 ** 0.01<P<0.05 *** P<0.001

表4 第9天各组骨吸收陷窝数和吸收面积t值及P值

	c组-a组	c组-b组	a组-b组	c'组-a'组	c'组-b'组	a'组-b'组
t值	0.51	13.89	24.51	9.51	16.05	31.98
P值	0.604*	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**

* P>0.05 ** P<0.001

经统计学分析:(1)随时间延长,a组和c组的吸收陷窝数及吸收面积均显著增加($P < 0.001$),而b组基本无变化。(2)与对照组相比,a组对吸收陷窝数的抑制作用,不显著($P > 0.05$),对吸收面积有显著抑制作用($0.001 < P_{3天} < 0.05, P_{9天} < 0.001$)。(3)b组对吸收陷窝数及吸收面积均有显著抑制作用($P_{3天}, P_{9天} < 0.001$)。(4)a组与b组相比,吸收陷窝数及吸收面积均有显著差异($P < 0.001$)。

以上结果表明,AZ对MGC体外骨吸收有抑制作用,AZ 10^{-6} M对吸收陷窝数及吸收面积均有显著抑制作用,而AZ 10^{-8} M主要抑制吸收面积。随时间延长,其骨吸收仍显著增加。

3 讨论

破骨细胞骨吸收主要包括酸脱矿和水解酶溶解有机基质两个方面。破骨细胞产酸主要是通过CA I将 CO_2 和 H_2O 结合成 H_2CO_3 ,解离为 $\text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$,并通过质子泵分泌到局部微环境中。泌酸不仅可在局部微环境中降低pH值有利于脱矿,而且对活化及分泌水解酶也有促进作用。如果阻断CA II的产酸作用,便切断了酸源,破骨细胞脱矿和溶解有机质也会受到影响,从而阻断破骨细胞的骨吸收作用。可见CA II在破骨细胞骨吸收中具有重要作用。

1970年Waite等^[6]发现AZ可阻断PTH诱发的鼠血钙升高,许多学者在器官培养、体外分离的破骨细胞培养及体内研究中均观察到AZ可阻断骨吸收作用。最近,我们通过免疫组织化学观察到MGC和破骨细胞均有CA II阳性表达。本文结果表明,AZ对MGC体外骨吸收有明显抑制作用,说明MGC的CA I在骨吸收中有重要调节作用,因此MGC与破骨细胞的骨吸收机制具有相似性。

Yasuo等(1996年)报道^[7],AZ不仅可阻

断破骨细胞产酸而且可阻断组织蛋白酶L分泌。其完全阻断PTH介导的骨吸收剂量为 10^{-4} M。本文阻断骨吸收的浓度较低,为 10^{-6} M,可能是由于无PTH刺激骨吸收的正效应有关。尽管如此,我们认为AZ阻断骨吸收的浓度仍应随不同实验模型和不同作用细胞而变化。

总之,本文研究表明,MGC中的CA II对其体外骨吸收具有重要作用,进一步证实MGC不仅在CA I表达方面与破骨细胞有相似之处,而且在功能上也相似。此外,通过阻断CA II抑制骨吸收,将为今后治疗骨代谢异常性疾病提供广阔的前景。

致谢:本文采用的碳酸酐酶阻断剂由芬兰Väänänen教授惠赠,骨巨细胞瘤标本由北京积水潭医院肿瘤科提供,在此表示感谢

参 考 文 献

- 1 Kenny AD. Role of carbonic anhydrase in bone, partial inhibition of disuse atrophy of bone by parteral acetazolamide. *Calcif Tissue Int*, 1985, 37: 126-133.
- 2 Hall GE, Kenny AD. Role of carbonic anhydrase in bone resorption: effect of acetazolamide on basal and parathyroid hormone-induced bone metabolism. *Calcif Tissue Int*, 1987, 40: 212-218.
- 3 Raisz LG, Summoss HA, Thompson WJ. Effects of a potent carbonic anhydrase inhibitor on bone resorption in organ culture. *Endocrinology*, 1988, 122: 1083-1086.
- 4 Hott M, Marie PJ. Carbonic anhydrase activity in fetal rat bone resorbing cells: inhibition of acetazolamide infusion. *J Devphysiol*, 1989, 12: 277-281.
- 5 赵宁侯,于世凤,庞淑珍. I型碳酸酐酶在骨巨细胞瘤中的表达. *中国骨质疏松杂志*, 1997, 3(3): 1.
- 6 Waite LC, Volkert WA, Kenny AD. Inhibitor of bone resorption by acetazolamide in the rat. *Endocrinology*, 1970, 87: 1129.
- 7 Yasuo Ohba, Tomboko Ohba, Koji Sumitani. Inhibitory mechanism of H^+ -ATPase inhibitor bafilomycin A1 and CA II inhibitor acetazolamide on experimental bone resorption. *FEBS Letters*, 1996, 387: 175-8.