

# 阿仑膦酸盐诱导破骨细胞 凋亡 FAS 基因的表达

王晓敏 于世凤 庞淑珍 刘忠厚

**摘要** 本研究采用 $10^{-8}$ M  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 诱导 SD 鼠骨髓细胞形成破骨细胞,通过检测细胞上 FAS 基因的表达,探讨骨吸收因子阿仑膦酸盐的作用机制。骨髓细胞培养6天即有多核巨细胞形成,加入阿仑膦酸盐致终浓度为 $100\mu\text{M}$ ,继续培养48小时后,发现用药组破骨样细胞及圆形单核细胞的前体细胞呈现凋亡的形态学特征:胞浆收缩,核固缩等。FAS 抗原是与细胞凋亡密切相关的细胞表面蛋白,用抗 FAS 抗体免疫组化方法,检测凋亡的破骨细胞及其前体细胞上 FAS 基因的表达,结果呈阳性,而未凋亡细胞呈阴性,提示阿仑膦酸盐导致的破骨细胞及其前体细胞的凋亡,可能与细胞表面的 FAS 基因表达相关。

**关键词** 阿仑膦酸盐 破骨细胞 破骨细胞前体细胞 凋亡 FAS 抗原

## The expression of FAS gene in apoptotic osteoclasts induced by alendronate

Wang Xiaomin, Yu Shifeng, Pang Shuzhen

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

**Abstract** In order to investigate the mechanisms by which bisphosphonate (alendronate) inhibit bone resorption, brought about by osteoclasts. We have developed a new in vitro model to study osteoclast survival.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  causes formation of multinucleated cells with several osteoclast characteristics in cultures of SD rat marrow. Osteoclast-like cells were grown from SD rat bone marrow examined morphologically for features of apoptosis after treatment with alendronate for 48h. The definitive of apoptosis features are cytoplasmic contraction, chromatin condensation and nuclear fragmentation.

The FAS antigens are protein on the surface of lymphocyte or other cells and relate with apoptosis. By immunohistochemistry method, we use anti-FAS antibodies to determine whether apoptotic osteoclast and its progenitor cells express FAS gene. The result is that apoptotic cells were positive, and non-apoptotic cells were negative. So it is proposed that FAS gene may be involved in the event of apoptosis of osteoclast and its progenitor cells treated by alendronate.

**Key words** Alendronate Osteoclast Progenitor cell of osteoclast Apoptosis FAS antigen

双膦酸盐是含有不溶性 P—C—P 结构,对骨矿有较高亲和力的焦磷酸盐的类似物,被广泛用于治疗由于破骨细胞过度骨吸收引起的骨代谢性疾病<sup>[1,2]</sup>。尽管双膦酸盐抑制骨吸收的确切机制还不清楚,但已有报道<sup>[1,4]</sup>,经过双磷酸

盐处理的破骨细胞表现为质变的、退行性变的形态学特征,包括细胞收缩,核固缩,核碎裂等。从而得出双膦酸盐抑制骨吸收,至少部分是由于引起破骨细胞凋亡而起作用。

FAS 抗原是细胞表面的一种蛋白,和细胞

凋亡密切相关,抗 FAS 抗体可以使含有 FAS 抗原的细胞凋亡。有研究证实 FAS 抗原的 mRNA 在胸腺细胞上大量表达,在肝、肺、心脏和卵巢细胞上也有表达<sup>[6,7]</sup>。关于破骨细胞上是否存在 FAS 基因的表达还未见报道。本研究利用 SD 鼠骨髓体外培养破骨细胞体系,并用阿仑膦酸盐处理破骨细胞及其前体细胞,观察其 FAS 基因的表达情况。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料:

1) 动物:五周龄 SD 雄性大鼠(购自国家计生委动物室)

2) 药品及试剂:阿仑膦酸盐(alendronate)(河北制药集团馈赠),抗 FAS 抗体及免疫组化通用型试剂盒(购自中山生物技术有限公司), $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (协和医院内分泌科馈赠) $\alpha$ -MEM 培养基(Sigma Chemical Co. 生产)。新生牛血清(Gibco 生产)。

### 1.2 方法:

1) 盖玻片及骨磨片的处理:用玻璃刀将盖玻片分切成 $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ 大小,经常规高压灭菌后,于无菌条件下,将一面涂上 $0.1\%$ 多聚赖氨酸,晾干备用。将新鲜牛股骨,用金钢砂片将皮质骨切割成 $5\text{ mm} \times 5\text{ mm}$ 厚约 $200\mu\text{m}$ 的小片,再用粗细不同的金钢砂石将其磨成厚约 $10\mu\text{m}$ ,经超声清洗处理后,浸泡于含抗菌素(青霉素 $1000\text{U/ml}$ ,链霉素 $1000\mu\text{g/ml}$ )的 $\alpha$ -MEM 培养液中,以达到消毒灭菌的目的。

2) 诱导破骨细胞的形成:将 SD 大鼠断颈处死,无菌条件下取四肢长骨,去净附着在骨表面的软组织,暴露髓腔,用 $5\text{ ml}$ 一次性注射器吸取 $1\text{ ml}$  $\alpha$ -MEM 全培养液( $15\%$ 新生牛血清,青霉素 $100\text{ U/ml}$ ,链霉素 $100\mu\text{g/ml}$ , $25\text{ mM}$  HEPES)冲洗髓腔,收集冲洗液并用筛网过滤,细胞悬液注入培养皿内 $1$ 小时,收集含未附着细胞悬液,备用。取 $24$ 孔培养板,其中 $8$ 个孔内放处理过的骨片, $16$ 个孔内放经处理过的玻片,将备用悬液中细胞悬液计数,每孔种植细胞数为 $1 \times 10^6$ 个,细胞悬液内 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 浓度为 $10^{-8}$

M,每三天换液一次。

3) 阿仑膦酸盐的添加:于培养第 $6$ 天骨片上出现骨吸收陷窝时除去含有玻片孔的旧培养液,换上新全培养液(含 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  $10^{-8}\text{ M}$ ),并在其中 $8$ 个孔内加入阿仑膦酸盐致终浓度为 $100\mu\text{M}$ ,另 $8$ 个孔内加入等体积的 PBS 液作为对照组,继续培养 $48$ 小时。

### 4) 检测方法:

倒置相差显微镜:观察培养细胞的形态及生长状况,骨吸收陷窝形成情况,并拍照。

HE, TRACP(抗酒石酸酸性磷酸酶),姬姆萨染色:用药后 $48$ 小时,取用药组和非用药组玻片于 $10\%$ 中性福尔马林固定,甲醇固定,分别进行 HE, TRACP 染色和姬姆萨染色。

免疫组化染色:用 SP 法,即过氧化酶标记的链霉卵白素染色试剂盒方法。

## 2 结果

倒置相差显微镜观察:细胞悬液和骨片玻片共同培养 $3$ 天换液后,骨片上未见骨吸收陷窝,但可见密集的单核细胞,玻片上圆形单核细胞胞浆丰满,内含许多空泡。未见多核巨细胞。于培养第 $4$ 天,可见许多单核细胞向一处集聚,胞浆突起明显向一方延展,仍未见多核巨细胞。于培养第 $5$ 天偶见多核巨细胞,有的细胞核集聚在细胞中央,有的细胞核散在细胞周边(如图 1),但骨片上仍未出现骨吸收陷窝。于培养第 $6$ 天骨片上可见散在骨吸收陷窝,于培养第 $7$ 天骨吸收陷窝数明显增加(如图 2),玻片上未用药组多核巨细胞显著增加,而用药组多核巨细胞及圆形单核细胞胞浆收缩。

光镜观察:于培养第 $3$ 天,进行 HE、姬姆萨及 TRACP 染色,未见多核巨细胞,且 TRACP 阴性。于培养第 $7$ 天,玻片上多数多核巨细胞及圆形单核细胞 TRACP 染色阴性,即胞浆呈紫红色。HE 染色可见未用药组圆形单核细胞及破骨细胞(多核巨细胞)胞浆丰满,内含许多空泡结构,核大呈椭圆形,核仁清晰(如图 3)。而用药组破骨细胞及圆形单核细胞(破骨细胞前体细胞)胞浆收缩,核固缩深染,有的细胞可见核

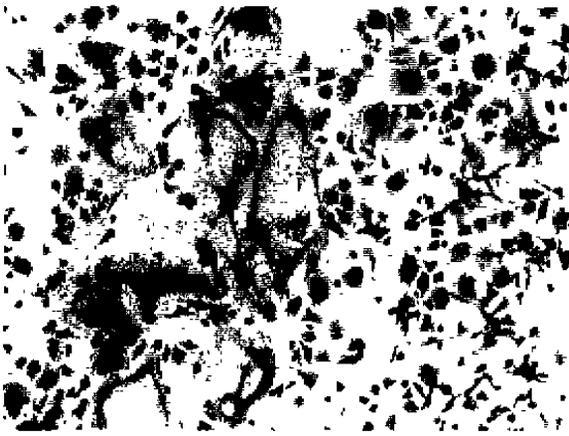


图1 HE染色,可见破骨细胞形成,核或聚集细胞中央或散在周边。光镜 $\times 252$

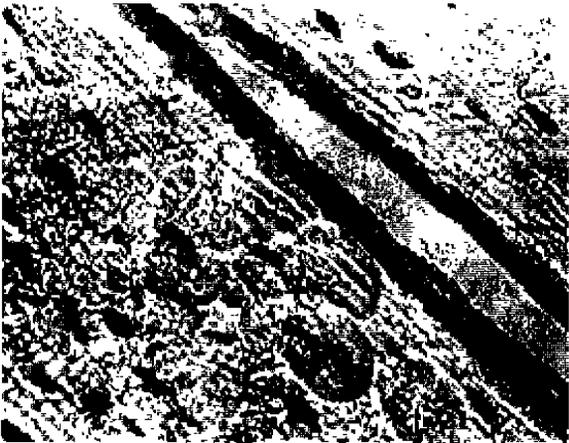


图2 破骨细胞在骨片上形成的骨吸收陷窝。相差显微镜 $\times 192$

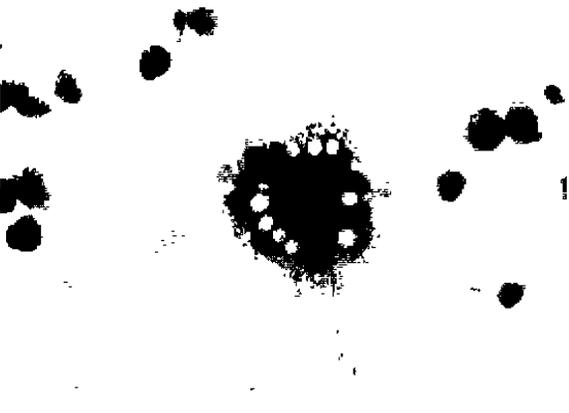


图3 HE染色,未凋亡破骨细胞,核大,核仁清晰,胞浆丰满。光镜 $\times 300$

碎裂(如图4)。免疫组化染色结果,用药组凋亡细胞胞浆浓缩,呈棕褐色,核固缩,染色质凝聚成块,有的细胞可见核碎裂呈棕黑色。而未凋亡

的基质单核细胞,胞浆丰满,呈淡色,胞浆突起延展,相互连接成片,胞核轮廓清晰,呈蓝色,核大呈椭圆形,核仁清晰(如图5)。

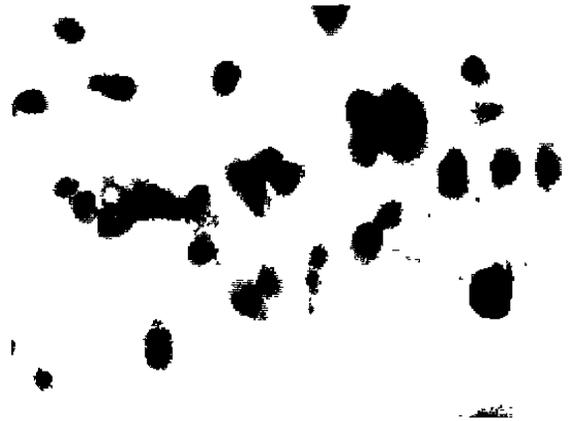


图4 HE染色,凋亡细胞胞浆收缩,核固缩。光镜 $\times 252$

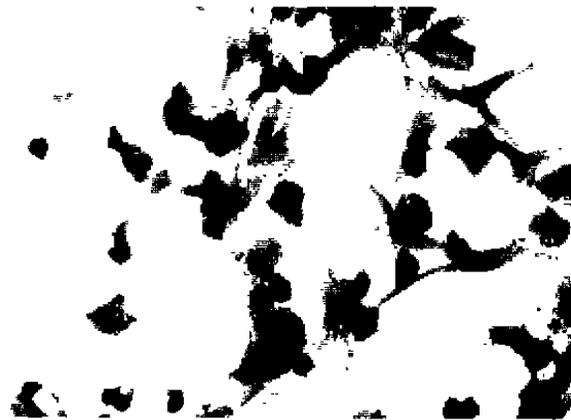


图5 免疫组化染色,凋亡细胞呈阳性表达。光镜 $\times 252$

### 3 讨论

许多研究表明 $10^{-8}$  M  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 可以诱导骨髓单核细胞形成 TRACP 阳性的多核细胞,且具有骨吸收功能<sup>[8]</sup>。在 $10^{-8}$  M  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 诱导下,本研究将 SD 鼠骨髓细胞和骨片及玻片共同培养,发现培养6天可在骨片上出现骨吸收陷窝,而且玻片上的多核巨细胞及圆形单核细胞 TRACP 染色阳性,说明所形成的多核巨细胞与破骨细胞相一致。

双膦酸盐对破骨细胞性骨吸收具有较强的抑制作用,将阿仑膦酸盐加入培养体系中48小时后,破骨细胞及其前体细胞呈现为凋亡的形态学特征:胞浆收缩,核固缩,染色质凝聚成块,

常聚集于核膜呈界线分明的颗粒块状。阿仑膦酸盐是如何介导破骨细胞及其前体细胞凋亡的?有人认为,正常细胞的程序化死亡是间接发生的,而正在凋亡细胞的某些特异 mRNA 转录增加,尽管还没有确证由这些 mRNA 编码的何种蛋白可引起细胞凋亡。说明致凋亡基因转录和翻译是导致细胞凋亡的必要条件<sup>[5]</sup>。

FAS 抗原是能够介导细胞凋亡的细胞表面蛋白,其结构与 TNF 受体和神经生长因子受体相似,属于 TNF 受体家族,能将凋亡信号转导给细胞。抗 FAS 抗体或其它细胞分泌的 FAS 配体可促进 FAS 基因表达与 FAS 抗原相互作用,从而引起细胞凋亡<sup>[9]</sup>。阿仑膦酸盐致使破骨细胞及前体细胞凋亡,免疫组化结果证明这些细胞上 FAS 抗原呈阳性表达。由此推测,阿仑膦酸盐是否促使骨髓基质细胞分泌 FAS 配体,作用于破骨细胞及其前体细胞的 FAS 抗原,引起凋亡。为进一步确证此点,还需进一步探讨。

#### 参 考 文 献

- 1 Fleisch H. Bisphosphonates. Pharmacology and use in the treatment of tumor-induced hypercalcaemic and metastatic bone disease. *Drugs*, 1991, 42: 919~942.
- 2 Storm T, Thamsborg G, Steniche T, et al. Effect of intermittent cyclical endronate therapy on bone mass and fracture rate in women with postmenopausal osteoporosis. *New Engl J Med*, 1990, 322: 1265~1271.
- 3 Flanagan AM, Chambers. 1989 Dichloromethylene bisphosphonate (Cl<sub>2</sub> MBP) inhibits bone resorption through injury to osteoclasts that resorb Cl<sub>2</sub> MBP-coated bone. *Bone Miner*, 1989, 6: 33~43.
- 4 Hughes DE, Wright KR, Uy HL, et al. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and vivo. *J. Bone Miner Res*, 1995, 10: 1478~1487.
- 5 Martinc Raff. Social controls on cell survival and cell death. *Nature*, 1992, 356: 397~400.
- 6 Itoh N, Yonehara S, Ishii A, et al. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen FAS can mediate apoptosis. *Cell*, 1991, 66: 233~238.
- 7 Watanabe-funaga R, Prannan C I, Itoh N, et al. The cDNA structure, expression and chromosomal assignment of the mouse FAS antigen. *J Immunol*, 1991, 148: 1274~1280.
- 8 Naoyuki Takahashi, Hironu Yamana, Shusaku Yoshiki, et al. Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse marrow cultures 1998, 122: 1373~1382.
- 9 Naoto Itob, Yoshuhide Tsujimoto, Shigekazu Nagata. Effect of bcl-2 on FAS antigen-mediated cell death. *J Immunol*, 1993, 151: 621~627.

## 首届全国中医变态反应病学术研讨会征文

由中国中医药学会主办,中国中医基础医学杂志社承办的首届全国中医变态反应病学术研讨会,将于1999年8月在山东青岛市举行,现将征文内容及要求介绍如下:

一、征文内容 1. 中医治疗变态反应疾病的医史学研究; 2. 中医治疗变态反应疾病的文献研究; 3. 变态反应疾病的临床流行病学研究; 4. 变态反应疾病的中西医结合治疗; 5. 抗变态反应的药物研究; 6. 变态反应疾病的中西医比较研究; 7. 抗变态反应的试验研究; 8. 民间验方效方的整理研究; 9. 民族医药治疗变态反应疾病的研究等。

二、征文要求 1. 文章紧扣主题,书写规范,一律用打印稿件; 2. 已经发表过的论文请不要投寄; 3. 来稿一式两份,注明会议字样,并在文章的结尾写明作者的姓名、性别、年龄、职称、职务、工作单位、通讯地址、邮政编码、联系电话等; 4. 所有来稿经专家审阅通过后,即被列为入选论文,并集结出版; 5. 来稿请寄20元的论文审稿费,以便及时送审; 6. 请自留底稿,恕不退稿。一经评审结果即通知作者。

三、截稿日期1999年5月31日

四、来稿请寄 北京市东直门内北新仓18号 中国中医基础医学杂志社编辑部刘艳骄收。