

# 氟化钠及其拮抗剂硫酸锌对成骨细胞的影响

陈璐璐 柯俐 曾天舒 夏文芳 陈荣安

**[摘要]** 目的 观察不同剂量氟化钠(NaF)对成骨细胞的影响及硫酸锌( $\text{ZnSO}_4$ )的拮抗作用,为临床治疗提供实验依据。方法 取新生 24 hSD 鼠头盖骨分离成骨细胞,在不同浓度的 NaF 和/或  $\text{ZnSO}_4$  ( $10^{-5}\text{mol/L}$ )中培养。经 MTT 法测定细胞增殖,细胞分化由碱性磷酸酶(ALP)和骨钙素水平测定得到。结果 NaF 对成骨细胞增殖及分化呈双向调节,主要表现为大剂量抑制,小剂量促进。当 NaF 浓度为  $10^{-6}\text{mol/L}$  及  $10^{-5}\text{mol/L}$  时,细胞增殖及碱性磷酸酶活性(ALP)均增加( $P<0.05$ )。但当 NaF 浓度增加至  $10^{-4}\text{mol/L}$  及  $5\times 10^{-4}\text{mol/L}$  时,其对细胞增殖及 ALP 活性呈现抑制作用。然而,不同剂量的 NaF 对骨钙素均表现为促进其分泌( $P<0.05$ )。 $\text{ZnSO}_4$  与低浓度的 NaF ( $10^{-6}\text{mol/L}$ 、 $10^{-5}\text{mol/L}$ )有协同作用,而对高浓度的 NaF ( $10^{-4}\text{mol/L}$ 、 $5\times 10^{-4}\text{mol/L}$ )拮抗,使 NaF 对细胞增殖率及 ALP 活性的抑制作用减弱,并降低高浓度 NaF 所刺激的骨钙素分泌。结论 NaF 对离体成骨细胞的增殖呈双向调节,而对细胞分化的影响呈多样性,早期表现为剂量依赖性双向调节,后期仅呈现单向刺激。 $10^{-5}\text{mol/L}$   $\text{ZnSO}_4$  拮抗大剂量 NaF,对低浓度 NaF 无拮抗作用。

**[关键词]** 氟化钠 硫酸锌 成骨细胞

**Effect of sodium fluoride and its antagonist zine sulfate on rat osteoblasts** Chen Lulu, Ke Li, Zeng Tianshu, et al. Department of Endocrinology, Union Hospital, Tongji Medical University, Wuhan 430022, China

**[Abstract]** **Objective** To assess the effect of sodium fluoride(NaF)on rat osteoblasts and the antagonism of zinc sulfate( $\text{ZnSO}_4$ )on NaF. **Methods** Osteoblasts obtained from the calvariae of newborn rats were cultured in medium with different concentrations of NaF and/or  $\text{ZnSO}_4$ . Cell proliferation was detected by MTT method and differentiation was determined by measuring alkaline phosphatase(ALP) activity and osteocalcin secretion. **Results** NaF increased cell proliferation and differentiation in a double-regulation manner, i. e. low doses of NaF stimulated both proliferation and ALP activity of osteoblasts, while high doses suppressed them. However, all doses of NaF we used increased osteocalcin production.  $\text{ZnSO}_4$  was synergistic with low doses of NaF and antagonistic to high doses of NaF by restoring partly the suppressive effect of NaF on cell proliferation and ALP activity, as well decreasing the enhancement of osteocalcin secretion by NaF. **Conclusion** NaF acts on osteoblast proliferation in a double-regulated manner and possesses multiple effects on cell differentiation.  $10^{-5}\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$  antagonizes high doses of NaF, but does not antagonizes low doses of NaF.

**[Key words]** Sodium fluoride; Zinc sulfate; Osteoblasts

氟是人体重要的微量元素,主要分布在硬

组织内,现为治疗骨质疏松的药物之一。然而,摄入过量的氟将会对机体产生损害,包括氟骨症。我国不仅地方性氟病流行较严重,工业氟暴露所致的职业损害亦较明显。对于氟骨症患者,如何找到一种有效的防治药物;对于骨质疏松

基金项目:国家九五攻关课题项目(96906040210)

作者单位:430022 武汉,同济医科大学协和医院内分泌科(陈璐璐、柯俐、曾天舒、夏文芳),公共卫生学院(陈荣安)

症患者,如何获得适当的氟制剂治疗,仍是亟待解决的重大问题。本文通过对离体成骨细胞培养,研究不同剂量氟化钠(NaF)对成骨细胞的影响及观察硫酸锌(ZnSO<sub>4</sub>)是否直接在细胞水平对抗 NaF 的作用。

1 材料和方法

1.1 细胞分离与培养

选取新生 24 h SD 大鼠(同济医科大学动物中心提供),拉颈处死后周身用 75%乙醇消毒,无菌条件下取颅骨并清除表面血迹及软组织,用 DMEM 洗 2 次,将骨片剪碎成糜状,然后经过胶原酶(2 mg/ml)及透明质酸酶(1 mg/ml)混合液的阶段性消化<sup>[1]</sup>,收集 2~4 批细胞接种到含有 DMEM(含抗生素及 10%的小牛血清)的培养瓶中,置 37℃、5%CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养,待细胞接近融合时,用 0.25%胰蛋白酶、0.02%EDTA 消化,以 2×10<sup>4</sup>/cm<sup>2</sup> 个细胞的密度种板。

1.2 细胞增殖率测定

细胞接种至 96 孔培养板,24 h 后换为含有 0.1%牛血清白蛋白的 DMEM,次日加入不同浓度(10<sup>-6</sup> mmol/L、10<sup>-5</sup> mmol/L、10<sup>-4</sup> mmol/L、5×10<sup>-4</sup> mmol/L)的 NaF 和/或 ZnSO<sub>4</sub>,继续培养 48 h,在最后 4 h 每孔滴入 20μl MTT(5 mg/ml),37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中孵化 4 h,吸出上层液体,每孔滴加 100 μl 20% SDS-50% DMF,震荡 15 min 后 37℃再孵育 4 h,用酶标仪读数(波长 570 nm)。

1.3 碱性磷酸酶(ALP)活性测定

细胞接种至 24 孔板,24 h 后加入前述浓度 NaF 和/或 ZnSO<sub>4</sub>,继续培养 4 d。吸出培养液,加 0.1%tritonX-100 100μl/孔以裂解细胞,然后加入 2.5 mmol/L PNPP 及缓冲液 50 μl/孔,37℃孵育 30 min,0.1 mmol/L 氢氧化钠 50μl/孔终止反应。将各孔液体分别移入 96 孔板,用酶标仪读取 OD 值(波长 570 nm)

1.4 骨钙素(OC)放免测定

细胞接种至 6 孔板,24 h 后加入前述浓度 NaF 和/或 ZnSO<sub>4</sub> 及 50μg/ml 维生素 C,继续培养 12 d,其间每 3 d 换液一次。第 12 天收集每孔 100 ul 上清液,用骨钙素放免试剂盒(北京中山生物技术公司)测定骨钙素水平。试剂盒批内变异系数 2.61%,批间变异系统 5.74%±0.51%。

1.5 统计分析

实验结果以均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间用 *t* 检验。

2 结果

2.1 细胞增殖

NaF 对细胞增殖表现为双向调节,NaF 浓度偏低时(10<sup>-6</sup> M、10<sup>-5</sup> mol/L),细胞增殖率明显增加,与无 NaF 组相比,*P*<0.05。但培养液中 NaF 浓度增至 10<sup>-4</sup> mol/L 及 5×10<sup>-4</sup> mol/L 时,细胞增殖率受抑制。10<sup>-5</sup> mol/L ZnSO<sub>4</sub> 本身具有一定的增加成骨细胞增殖的作用,在与 NaF 联合作用时,其加强小剂量 NaF 对细胞增殖的刺激,并部分恢复大剂量 NaF 抑制细胞增殖的影响(表 1)。

表 1 细胞 MTT 测定结果(*n*=8)

| ZnSO <sub>4</sub><br>(mol/L) | NaF(mol/L)               |                           |                          |                          |                           |
|------------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
|                              | 0                        | 10 <sup>-6</sup>          | 10 <sup>-5</sup>         | 10 <sup>-4</sup>         | 5×10 <sup>-4</sup>        |
| 0                            | 0.344±0.027              | 0.377±0.03 <sup>*</sup>   | 0.367±0.026 <sup>*</sup> | 0.332±0.019 <sup>*</sup> | 0.336±0.022 <sup>*</sup>  |
| 10 <sup>-5</sup>             | 0.361±0.028 <sup>*</sup> | 0.408±0.019 <sup>*△</sup> | 0.397±0.03 <sup>*△</sup> | 0.369±0.02 <sup>*△</sup> | 0.358±0.019 <sup>*△</sup> |

注:与 0 组比,\**P*<0.05(0 组即 NaF、ZnSO<sub>4</sub> 浓度均为 0);与相对应无 ZnSO<sub>4</sub>、NaF 浓度相同组比,<sup>△</sup>*P*<0.05

## 2.2 ALP 活性测定

不同剂量 NaF 及  $\text{ZnSO}_4$  与 NaF 共同培养

对成骨细胞 ALP 活性影响的方式与细胞增殖率的改变基本一致(表 2)。

表 2 细胞 ALP 活性测定结果(OD 值,  $n=6$ )

| $\text{ZnSO}_4$<br>(mol/L) | NaF(mol/L)          |                        |                        |                         |                         |
|----------------------------|---------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                            | 0                   | $10^{-6}$              | $10^{-5}$              | $10^{-4}$               | $5 \times 10^{-4}$      |
| 0                          | $0.35 \pm 0.03$     | $0.396 \pm 0.07^*$     | $0.425 \pm 0.028^*$    | $0.274 \pm 0.016^*$     | $0.115 \pm 0.017^*$     |
| $10^{-4}$                  | $0.378 \pm 0.051^*$ | $0.428 \pm 0.027^{**}$ | $0.45 \pm 0.025^{***}$ | $0.318 \pm 0.031^{***}$ | $0.236 \pm 0.019^{***}$ |

注:与 0 组比, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; 与相对应无  $\text{ZnSO}_4$ 、NaF 浓度相同组比,  $\Delta P < 0.05$ 

## 2.3 骨钙素分泌

各剂量 NaF 对细胞骨钙素的分泌均有促进作用,差异具有显著性( $P < 0.05$ )。  $\text{ZnSO}_4$  协

同小剂量 NaF,但对抗大剂量 NaF 的影响(表 3)。

表 3 细胞骨钙素分泌量(ng/ml,  $n=3$ )

| $\text{ZnSO}_4$<br>(mol/L) | NaF(mol/L)        |                    |                      |                    |                      |
|----------------------------|-------------------|--------------------|----------------------|--------------------|----------------------|
|                            | 0                 | $10^{-6}$          | $10^{-5}$            | $10^{-4}$          | $5 \times 10^{-4}$   |
| 0                          | $1.23 \pm 0.07$   | $1.35 \pm 0.049^*$ | $1.37 \pm 0.052^*$   | $1.59 \pm 0.067^*$ | $2.33 \pm 0.09^{**}$ |
| $10^{-4}$                  | $1.38 \pm 0.05^*$ | $1.78 \pm 0.06^*$  | $1.52 \pm 0.05^{**}$ | $1.3 \pm 0.068^*$  | $1.36 \pm 0.072^*$   |

注:与 0 组比, \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; 与相对应无  $\text{ZnSO}_4$ 、NaF 浓度相同组比较,  $\Delta P < 0.05$ 

## 3 讨论

氟化物能明显增加骨密度,组织学研究亦显示它能促进类骨质沉积而提高骨量<sup>[2]</sup>,体外研究则表明氟具有促进成骨细胞有丝分裂,增加骨形成的作用<sup>[3,4]</sup>,因此在过去 30 年中,它是治疗骨质疏松的一种重要药物。同时,氟剂量过大会导致氟骨症(骨硬度增加),如地方性氟病及工业氟暴露。如何寻求最有效而安全的剂量来治疗骨质疏松症及寻找有效的拮抗剂对抗过量氟所致的损害仍是人们关心的问题。

体外胎鼠或新生鼠颅骨成骨细胞培养,是观察不同药物对离体成骨细胞影响的良好模型。通过对细胞增殖及分化不同时期标志物如 ALP、骨钙素、骨小结形成等的测定,可客观地评价所选择的实验药物在细胞水平的效果。我们的结果显示,NaF 对成骨细胞增殖,分化的作用依赖于其剂量, $10^{-6}$  mol/L、 $10^{-5}$  mol/L NaF 促进增殖及 ALP 活性; $10^{-4}$  mol/L 及  $5 \times$

$10^{-4}$  mol/L NaF 反而对细胞有毒性作用,抑制其增殖和早期分化,但  $5 \times 10^{-4}$  mol/L、 $10^{-4}$  mol/L、 $10^{-5}$  mol/L 及  $10^{-6}$  mol/L NaF 组骨钙素水平均较对照组增高,其中  $5 \times 10^{-4}$  mol/L 组骨钙素水平最高。这些数据与其他作者对人和鸡成骨细胞研究所得的结果相似,但也有不同之处。Khokher 等报道氟化钠浓度至少在  $100 \mu\text{mol/L}$  才能刺激人成骨细胞 ALP 活性,至少  $250 \mu\text{mol/L}$  才能显著提高  $^3\text{H}$  掺入率<sup>[4]</sup>。Wergedal 等则观察到  $50 \mu\text{mol/L}$  为促进人成骨细胞增殖和分化的最适剂量<sup>[5]</sup>。这些差异可能是由于所用细胞的种类及培养条件不同所致。NaF 对骨钙素分泌的促进作用是导致骨基质不适当矿化的基础。有研究揭示,氟离子( $\text{F}^-$ )半径与骨基质中的  $\text{OH}^-$  具有相同的半径及电荷,故易发生置换而使羟磷灰石结晶变为更稳定的氟磷灰石结晶,但后者可比前者体积大 2~9 倍。当氟过量时,这种巨大的板块状结晶将使骨力学框架的连续性、规律性遭到破

坏<sup>[6]</sup>。

NaF 对骨细胞作用的分子生物学机制尚有争议。Lau 等认为促有丝分裂剂量的氟能特异性抑制成骨细胞内磷酸激酶而增加有丝分裂原活化蛋白激酶磷酸化作用和活性以促进成骨细胞增殖<sup>[7]</sup>。近来, Burgener 等提出氟通过直接增加特异性酪氨酸激酶活性(与抑制 PTPP 相反)而促进成骨细胞增殖<sup>[8]</sup>。

锌( $Zn^{2+}$ )是氟的拮抗剂之一,可被用于治疗氟骨症。锌的作用认为在体内能与氟结合,形成难以溶解的氟化物,降低体内氟含量<sup>[9]</sup>。但锌在细胞水平如何拮抗氟的作用现不详,且未见报道。我们的实验显示  $10^{-5}mol/L$   $ZnSO_4$  本身亦有刺激成骨细胞的作用,在与 NaF 共同加入成骨细胞培养时,表现为协同小剂量 NaF 增加细胞增殖及分化,但抑制大剂量 NaF 的作用,并降低大剂量 NaF 促进骨钙素分泌的影响,这一观察解释了临床上锌为何可以对抗过量氟所致的骨硬化症。目前的研究证明锌与骨质疏松也有关系,给绝经期妇女补充微量元素锌,结果钙缺乏组和不缺乏组密度均增加<sup>[10]</sup>。刘秀明等在胎鼠头盖骨细胞的体外培养中加入  $10^{-5}mol/L$   $ZnSO_4$  即能够促进成骨细胞增殖和分化<sup>[11]</sup>。因此,将适量的锌和氟共同作用于成骨细胞,有可能既对抗氟的毒性,又加强治疗骨质疏松的效果。我们的上述结果为骨质疏松症治疗的新思路提供了一定的实验依据。

总之,本实验提示 NaF 对成骨细胞增殖分化的作用呈剂量依赖性双向调节,  $10^{-5}mol/L$   $ZnSO_4$  能够部分对抗大剂量 NaF 抑制增殖分化的作用,  $ZnSO_4$  这种在细胞水平与氟相互影响是否仅存在于化学反应水平,抑或有不同的

生物效应,有待进一步的研究。

#### 参 考 文 献

- 1 陈璐璐, Scholler J, Foged NT. 孕酮对离胎鼠头盖骨成骨细胞增殖与分化的影响. 中华妇产科杂志, 1997, 32: 538.
- 2 Riggs BL, Seeman E, Hodgson SF, et al. Effect of the fluoride/calcium regime on vertebral fracture occurrence in postmenopausal osteoporosis. N Eng J Med. 1987; 306: 211.
- 3 Khokher MA, Dandona P. Fluoride stimulates  $^3H$  thymidine incorporation and alkaline phosphatase production by human osteoblasts. Metabolism, 1990, 39: 1118.
- 4 Kau KH, Farley JR, Freeman TK, et al. A proposed mechanism of the mitogenic action of fluoride on bone cells: inhibition of the activity of an osteoblastic acid phosphatase. Metabolism, 1989, 38: 858.
- 5 Wergedal JE, Lau KHW, Baylink. Fluoride and bovine bone extract influence cell proliferation and phosphatase activities in human bone cell culture. Clin Orthop Relat Res, 1988, 233: 274.
- 6 蒋明, 朱立平, 林孝义, 主编. 风湿病学. 北京: 科学出版社, 1998: 54.
- 7 Lau KHW, Wu LW, Yoon HK, et al. Inhibition of phosphotyrosine dephosphorylation (p-tyr leads to increase p-tyr phosphorylation of MAP kinase (MAPK) activity, and human bone cell proliferation. Bone, 1995, 16 (Suppl): 96S.
- 8 Burgener D, Bonjour JP, Caverzasio J. Fluoride increases tyrosine activity in osteoblast-like cell; regulatory role on the stimulation of cell proliferation and  $Pi$  transport across the plasma membrane. J Bone Miner Res, 1995, 10: 164.
- 9 Singh M. Effects of fluoride on copper, manganese and zinc in bone and kidney. Fluoride, 1983, 16(3): 187.
- 10 马丽英, 王瑞淑. 锌与骨代谢的研究进展. 国外医学卫生学分册, 1998, 25: 271.
- 11 刘秀明, 王淑云, 李锐, 等. 微量元素对大鼠颅盖骨成骨细胞样细胞体外培养增殖分化的影响. 中华骨科杂志, 1995, 15: 177.

欢迎订阅中国骨质疏松杂志  
本刊邮发代号 82—198  
全国各地邮局均可订阅