

1,25-二羟基维生素 D₃ 对小鼠骨髓细胞形成破骨细胞样细胞及其骨吸收效应的影响

李铁军 于世凤 王晓敏 庞淑珍

[摘要] 目的 动态观察 1,25-二羟基维生素 D₃[1,25-(OH)₂D₃]对 NH 小鼠骨髓细胞培养在体外形成破骨细胞及其骨吸收的剂量效应和作用时象。方法 收集 NH 小鼠骨髓细胞于含 10% 胎牛血清的 α -MEM 培养基中行体外培养,设置不同的 1,25-(OH)₂D₃ 浓度组和给药时间组,并于培养第 3、6、9、12 天观察记录抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)阳性多核巨细胞[或破骨细胞样细胞(osteoblast-like cell, OLC)]以及骨磨片上骨吸收陷窝的数目。结果 高于 10⁻⁸ mmol/L 的 1,25-(OH)₂D₃ 单一刺激可于培养第 6 天诱导 TRAP 阳性 OLC 形成,并且可在骨磨片上观察到骨吸收陷窝;随 1,25-(OH)₂D₃ 浓度的增高,OLC 和骨吸收陷窝数目均随之增加;各浓度组 OLC 数目于培养第 9 天达最高值,随后则趋于减少,而骨吸收陷窝数于培养第 9 和第 12 天均有所增加;采用单一 1,25-(OH)₂D₃ 浓度(10⁻⁸ mmol/L),TRAP 阳性 OLC 和骨吸收陷窝见于培养 3 d 后用药和全程用药组,而仅在培养前 3 d 用药则不能诱导 OLC 和骨吸收陷窝的形成。结论 1,25-(OH)₂D₃ 可在体外诱导骨髓单核细胞分化形成 OLC 并使其具有破骨活性,诱导作用的强弱与 1,25-(OH)₂D₃ 的浓度相关,而且其作用时象可能是在培养 3 d 以后。

[关键词] 骨吸收 1,25-二羟基维生素 D₃ NH 小鼠 骨髓细胞培养

Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on stimulation of osteoclast-like cell formation and bone resorption in primary murine marrow cell culture Li Tiejun, Yu Shifeng, Wang Xiaomin, et al. *Oral Pathology Laboratory, School of Stomatology, Beijing Medical University, Beijing 100081, China*

[Abstract] **Objective** To clarify the events involved in 1,25-(OH)₂D₃-induced osteoclast-like cell (OLC) formation and bone resorption, we have characterized the concentration effect and the timing of 1,25-(OH)₂D₃ stimulation in primary murine marrow cell culture. **Methods** Marrow cells from NH mouse were harvested and cultured in α -MEM with 10% fetal bovine serum. The appearance of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)-staining multinuclear cells (or OLCs) and formation of bone resorption pits were measured after 3, 6, 9 and 12 day exposure to various concentrations of 1,25-(OH)₂D₃ in culture. **Results** 1,25-(OH)₂D₃ (concentration higher than 10⁻⁸ mol/L) could induce recruitment of OLCs and their bone resorption activity in a dose-dependent manner. Formation of TRAP+ve OLCs was first observed on day 6, reached to its peak on day 9 and reduced in number after the day 9 time point. The number of bone resorption pits on the bone slices in culture showed a consistent increase on day 9 and day 12. In cultures to which 1,25-(OH)₂D₃ (10⁻⁸ mol/L) was added only for the first 3 days, TRAP+ve OLCs and bone resorption pits were not present on day 6, whereas continuous treatment with 1,25-(OH)₂D₃ starting from the beginning or from day 3 of the experiment invariably stimulated

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39330220),中华医学基金专项人才基金(ORF9809);卫生部优秀青年科技人才专项科研基金资助课题项目(9821)

作者单位:100081 北京医科大学口腔医院

OLC formation and bone resorption activity. **Conclusions** 1,25-(OH)₂D₃ can induce OLC formation and bone resorption in murine marrow cell culture. The induction effect is dose dependent and is likely to occur after 3 days of culture.

[**Key words**] bone resorption; 1,25-Dihydroxyvitamin D₃; NH mice; Bone marrow cell culture

骨组织的局部重建(remodeling)调控机制取决于多种因素的影响,其中甲状旁腺激素、前列腺素 E₂ 和 1,25-二羟基维生素 D₃[1,25-(OH)₂D₃]等是促进破骨细胞形成、增强骨吸收的主要刺激因子。研究证实 1,25-(OH)₂D₃ 可促使多种细胞类型沿巨噬细胞通路进一步分化,其中包括诱导骨髓干细胞分化形成破骨细胞样细胞(OLC)^[1-3]。我室首次在国内应用 1,25-(OH)₂D₃ 成功地在体外诱导 SD 大鼠骨髓细胞分化形成 OLC,并对其特性作了初步观察^[3]。本研究旨在动态观察 1,25-(OH)₂D₃ 对 NH 小鼠骨髓细胞培养的剂量效应和作用时象,明确其对 OLC 的分化和形成以及继而引起骨吸收作用的影响。

1 材料和方法

1.1 动物与试剂

本实验选用的 3~4 周 NH 雄性小鼠购自国家计生委动物室;1,25-(OH)₂D₃ 由北京协和医院内分泌科馈赠;α-MEM 培养基和胎牛血清分别购自 Sigma 和 Gibco 公司。

1.2 盖玻片和骨磨片的制备

用玻璃刀将盖玻片分切成 1cm·1cm,经高压灭菌后备用。收集新鲜牛股骨,以金钢砂片将皮质骨分切成 1cm·1cm、厚约 200μm 的小骨片,再用金钢磨石将其磨成厚约 30μm 的骨磨片;在去离子水中超声清洗 3 次,每次 5min,然后浸泡于含抗菌素(青霉素 1 000U/ml,链霉素 1 000U/ml)的 D-Hanks 液中过液,使用前再浸泡于新鲜配制的 α-MEM 培养液中 15min。

1.3 小鼠骨髓细胞的体外培养

在乙醚麻醉下,将小鼠断颈处死,于 75% 酒精中浸泡 3min,无菌条件下取四肢长骨,在

D-Hanks 液中去净附着在骨表面的软组织,并暴露髓腔,再以一次性注射器吸取 α-MEM 全培养液[10%胎牛血清,青霉素 100U/ml,链霉素 100U/ml,25mmol/L HEPES,1,25-(OH)₂D₃ 按不同浓度分组加入]冲洗髓腔,冲洗液经筛网过滤后注入培养皿内静置 1h,收集未附壁的细胞悬液以 1ml/孔分别加入 24 孔培养板(每孔细胞数约为 10⁶ 个),并按分组分别在培养板各孔内放置处理后的骨磨片和盖玻片,置于 37℃ CO₂ 孵箱内培养,每 3 天更换培养液 1 次。

1.4 分组设计

为检测 1,25-(OH)₂D₃ 对本培养系统的剂量效应和作用时相,我们设计了两组实验。实验一:依 1,25-(OH)₂D₃ 的不同浓度分设:0、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸、10⁻⁹ 和 10⁻¹¹mol/L 共 6 组,除空白对照外,其他 5 组在实验开始和每次换液时加入上述浓度的 1,25-(OH)₂D₃;实验二:采用单一维生素 D₃ 浓度(10⁻⁸mol/L),以实验第 3 天换液为界,分设前 3 d 用药组[即在第 3 天换液时不再加入 1,25-(OH)₂D₃],3 d 后用药组[即在第 3 天换液时才加入 1,25-(OH)₂D₃]以及全程用药组。上述两组实验均于培养第 3、6、9、12 d 取出盖玻片染色,并在倒置相差显微镜下观察,记录骨片上的骨吸收陷窝。

1.5 OLC 及骨陷窝的检测方法

各组盖玻片取出后,于 10% 中性福尔马林固定 15min,分别行 HE 和抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色,其中 TRAP 染色采用 Sigma 公司提供的试剂盒。光镜下观察,含 2 个胞核以上且呈 TRAP 染色阳性的多核巨细胞被判定为 OLC。OLC 的计数是在 200 倍光镜下进行的,每例玻片任选 5 个视野,记录其计数均值;对骨磨片上吸收陷窝的观察是在倒置相差显微

镜下进行的,依据上述实验设计,定期观察骨吸收陷窝的形成情况,并在150倍放大倍数下,每例骨片任选5个视野,记录其计数均值。采用Mann-Whitney *U* 检验(StatView-4.02软件)对各组计数资料作统计学处理。

2 结果

1,25-(OH)₂D₃ 浓度梯度实验表明:细胞悬液和玻片共同培养6d后,玻片上开始出现数目不等的TRAP阳性OLC,这些细胞为多核、胞浆丰富,TRAP染色呈颗粒状紫红色着色(图1),而未加入1,25-(OH)₂D₃的空白对照则未能在培养中形成TRAP阳性多核细胞;随1,25-(OH)₂D₃浓度的增加,TRAP阳性OLC计数值呈递增趋势(图2),其中10⁻⁶mol/L与10⁻⁴mol/L组之间以及10⁻⁶mol/L与10⁻³mol/L组



图1 体外培养6d后,小鼠骨髓细胞可在1,25-(OH)₂D₃的诱导下形成胞浆丰富的多核巨细胞(a,HE染色,×200);酶组化染色呈抗酒石酸酸性磷酸酶阳性的OLC(b,TRAP染色,×220)

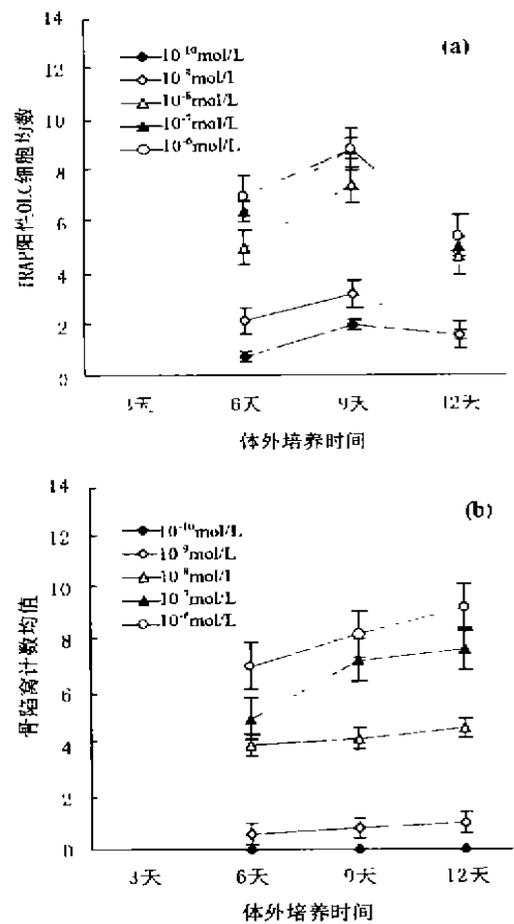


图2 不同1,25-(OH)₂D₃浓度组TRAP阳性细胞计数(a)和骨吸收陷窝形成(b)的动态变化

之间差异无显著性(*P*>0.05),但它们与其他浓度组间的差异均具有显著性(表1)。各浓度组随实验时间的推移,TRAP阳性OLC计数值也呈递增趋势(图2),于培养第9天达最高值,随后阳性细胞数则趋于减少。倒置显微镜观察细胞悬液和骨磨片的共同培养,在最低浓度组(10⁻¹⁰mol/L)培养的各时相均未能观察到骨吸收陷窝,但其他各浓度组分别于培养第6天骨磨片上形成骨吸收陷窝(图3),陷窝数于第9和第12天均有所增加(图2),且大多数浓度组间的骨吸收陷窝计数均值存在显著性差异(表2)。采用单一1,25-(OH)₂D₃浓度(10⁻⁸mol/L)培养,TRAP阳性OLC仅见于3d后用药组和

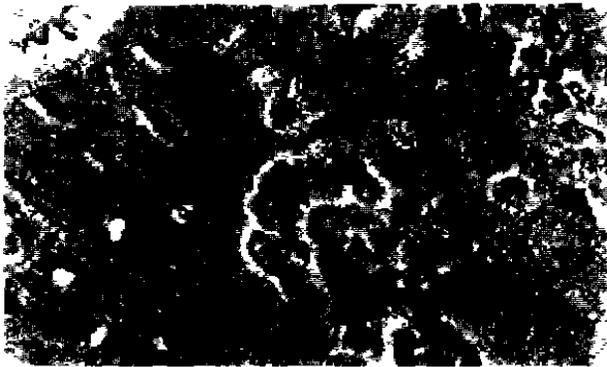


图3 体外培养第9天,OLC在骨磨片上形成的骨吸收陷窝(相差显微镜,150 \times)

全程用药组,且其阳性细胞计数、骨吸收陷窝计数及其各时相递增趋势之间无显著差异(表2);但在前3d用药组的培养中,未能观察到TRAP阳性OLC和骨磨片上的骨吸收陷窝。

3 讨论

以往研究证实1,25-(OH)₂D₃可以诱导骨髓单核细胞形成TRAP阳性多核细胞,并且使其具有骨吸收功能^[4,5]。骨髓基质细胞中的成骨细胞具有1,25-(OH)₂D₃受体,但破骨细胞自身却缺乏这种受体,因此1,25-(OH)₂D₃对破骨细胞分化成熟的诱导作用很可能是通过成骨

表1 各浓度组TRAP阳性OLC和骨吸收陷窝计数值间的统计学处理(P值)

浓度组 (mol/L)	TRAP阳性OLC计数			骨吸收陷窝计数		
	3d组	9d组	12d组	3d组	9d组	12d组
10 ⁻¹¹ /10 ⁻⁹	>0.05	>0.05	>0.0			
10 ⁻¹² /10 ⁻⁸	<0.01	<0.01	<0.01			
10 ⁻¹³ /10 ⁻⁷	<0.01	<0.01	<0.01			
10 ⁻¹⁴ /10 ⁻⁶	<0.01	<0.01	<0.01	-		
10 ⁻¹⁵ /10 ⁻⁵	<0.01	<0.01	<0.02	<0.01	<0.01	<0.01
10 ⁻¹⁶ /10 ⁻⁴	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
10 ⁻¹⁷ /10 ⁻³	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
10 ⁻¹⁸ /10 ⁻²	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
10 ⁻¹⁹ /10 ⁻¹	<0.03	<0.03	<0.6	<0.1	<0.01	<0.01
10 ⁻²⁰ /10 ⁰	<0.02	<0.03	<0.1	<0.01	<0.01	<0.01
10 ⁻²¹ /10 ¹	>0.0.1	>0.9	>0.6	>0.1	>0.6	<0.01

注:Mann-Whitney U 检验,10⁻¹⁰mol/L组各时象均未见骨吸收陷窝形成,故未与其他浓度组比较

表2 不同用药时间组的TRAP阳性OLC和骨吸收陷窝计数

培养时间 (d)	TRAP阳性OLC($\bar{x} \pm s$)			骨吸收陷窝($\bar{x} \pm s$)		
	第3天用药组	3天后用药组	全程用药组	第3天用药组	3天后用药组	全程用药组
3	0	0	0	0	0	0
6	0	4 \pm 0.71	3.8 \pm 0.84	0	3.6 \pm 1.14	3.30 \pm 0.32
9	0	5.6 \pm 0.55	5.8 \pm 0.54	0	4.8 \pm 0.81	5.8 \pm 0.45
12	0	4 \pm 1.0	5.8 \pm 1.30	0	5.8 \pm 0.55	5.8 \pm 0.55

注:3天后用药组和全程用药组间的各对应计数值之间差异无显著性(P>0.05)

细胞来实现的^[4,5]。本研究采用的NH小鼠骨髓细胞混合培养为观察1,25-(OH)₂D₃对TRAP阳性破骨细胞样细胞的形成及其骨吸收活性的影响提供了必要条件。

本研究结果表明:在高于10⁻⁹mol/L 1,25-(OH)₂D₃浓度的单一刺激下,骨髓细胞的混合

培养可于第6天分化形成TRAP阳性多核巨细胞,这些细胞具有破骨细胞的特征,即含多核、呈TRAP阳性反应以及可在骨磨片上形成骨吸收陷窝。低浓度1,25-(OH)₂D₃(10⁻¹¹mol/L)的培养中虽可诱导形成较少数量的TRAP

(下转第30页)

点,而糖尿病的病程、血糖控制情况、年龄等因素本身也影响着 BMD,值得进一步研究。

参 考 文 献

- 1 刘忠厚主编. 骨质疏松学. 北京: 科学出版社, 1998: 576-583.
- 2 Tuominen TJ, Impivaara O, Puukka P, et al. Bone mineral density in patients with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 1999, 22(7): 1196-1200.
- 3 Mazgowski T, Czekalski S. A 2 year follow-up study on bone mineral density and markers of bone turnover in patients with long-standing insulin dependent diabetes mellitus. *Osteoporosis Int*, 1998, 8(5): 399-403.
- 4 Lunt H, Florkowski CM, Cundy T, et al. A population based study of bone mineral density in women with long-standing type 1 (insulin dependent) diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*, 1998, 40(1): 31-38.
- 5 Kumeda Y, Inaba M, Nishizawa Y. Secondary osteoporosis and its treatment diabetes mellitus. *Nippon Rinsho*, 1998, 56(6): 1579-1586.
- 6 The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on development and progression of diabetes long term complications in insulin dependent diabetes. *N Engl J Med*, 1993, 329: 977-986.
- 7 Gregorio F, Cristallini S, Santusiano F, et al. Osteopenia associated with non insulin dependent diabetes mellitus; what are the causes? *Diabetes Res Clin Pract*, 1994, 25(1): 45.
- 8 王宁, 叶志明, 信中, 等. DEXA 在诊断糖尿病骨质疏松中的价值. *中国骨质疏松杂志*, 1998, 4: 28-31.
- 9 冯玉欣, 逢力男. 糖尿病与骨质疏松的研究进展. *国外医学内分泌学分册*, 1999, 19(11): 132-135.
- 10 Hauache JM, Lazaretti M, Andreoni S, et al. Vitamin D receptor gene polymorphism; correlation with bone mineral density in a Brazilian population with insulin dependent diabetes mellitus. *Osteoporosis Int*, 1998, 8(5): 207-210.
- 11 Hampson G, Evans C, Pettit RJ, et al. Bone mineral density, collagen type-alpha 1 genotypes and bone turnover in premenopausal women with diabetes mellitus. *Diabetologia*, 11(11): 1314-1320.
- 12 Wemtroub S, Hiscnerg D, Tardiman R, et al. Is diabetic osteoporosis due to microangiopathy? *Lancet*, 1981, 11: 983.
- 13 Krakauer JC, McKenna MJ, Buderer NF, et al. Bone loss and bone turnover in diabetes. *Diabetes*, 1995, 44: 775.