

降钙素对体外培养成骨细胞的影响

朱建民 方浩 陈新刚 曾明 金蔚芳 王洪复

【摘要】 目的 观察破骨细胞抑制剂——降钙素(密钙息)对体外培养成骨细胞的作用。方法 在新生SD大鼠头颅骨第二继代成骨细胞(OB₂)培养液中分别加入不同浓度(10⁻⁴ ~ 10⁻¹² g/ml)的密钙息,分别观察OB₂的增殖功能(用波长570 nm处OD值表示),分化功能[用碱性磷酸酶(ALP)活性表示]和矿化功能(用矿化结节数量/视野表示)。结果 OD值(均值±标准差)为0.323±0.101 ~ 0.523±0.158;ALP活性(均数±标准差)为(0.104±0.012)U/mg蛋白质;矿化结节数量/视野(均数±标准差)为5.75±0.957个。结论 与对照组比较,适当浓度(10⁻⁸ ~ 10⁻¹²)的密钙息对OB₂的增殖、分化和矿化功能均具有促进作用,10⁻¹⁰ g/ml浓度密钙息作用尤其显著,它们的作用显著性差异为:促进OB₂增殖功能P<0.05;促进OB₂分化功能P<0.01和促进OB₂矿化功能P<0.001。

【关键词】 降钙素; 破骨细胞; 成骨细胞; 组织培养; 骨折愈合

Effects of calcitonin on osteoblasts *in vitro* ZHU Jianmin, FANG Hao, CHEN Xingang, et al. Department of Orthopaedics, 8th Shanghai People's Hospital, Shanghai 200233, China.

【Abstract】 **Objective** To observe the effects of calcitonin (Miacalcic), an inhibitor of osteoclasts, on osteoblasts *in vitro*. **Methods** The culture medium with different Miacalcic concentrations (10⁻⁴ ~ 10⁻¹² g/ml) and the second generation osteoblasts (OB₂) from the skull of newborn SD rats were mixed for the observation respectively on the proliferation (OD value at wavelength 570nm), the differentiation (ALP activity) and the mineralization (mineralized nodes/field of vision) of the OB₂. **Results** The OD values (mean and standard deviation) were 0.323±0.101 ~ 0.523±0.158; the ALP activity (mean and standard deviation) was 0.104±0.012 U/mg proteins, and the mineralized nodes (mean and standard deviation) were 5.75±0.957. **Conclusion** In comparison with control groups, the proliferation, differentiation and mineralization of the OB₂ were promoted by calcitonin concentration (10⁻⁸ ~ 10⁻¹² g/ml), in which the effect of 10⁻¹⁰ g/ml calcitonin concentration on OB₂ was the most significant for promoting proliferation (P<0.05), differentiation (P<0.01) and mineralization (P<0.001).

【Key words】 Calcitonin; Osteoclast; Osteoblast; Tissue culture; Fracture healing

降钙素是强有力的破骨细胞抑制剂,可直接、快速而广泛地抑制骨吸收。临床上常被用于治疗高血钙症、Paget's病、原发性甲状旁腺机能亢进症、Grave's病和骨质疏松症等^[1]。近年来,有人报告将降钙素用于治疗骨折,以减轻骨折后疼痛^[2],减轻骨折固定所致的废用性骨质疏松症,加速骨折愈合等^[3]。但其作用机理尚不清楚,且其对成骨细胞的作用及其对骨形成、骨发育和骨矿化的影响研究甚少。本文旨在探索降钙素对体外培养大鼠成骨细胞的影响,试图阐述降钙素在骨形成和骨折愈合中的作用。

材料和方法

1. 药物;选用瑞士Novartis制药公司生产的人工合成鲑鱼降钙素产品——密钙息(Miacalcic——salmo-calcitonin, synth, Novartis Pharma AG, Basle, Switzerland),批号:293MFD0498,规格:50 U/1ml/Amp×5支,用细胞培养液分别稀释至10⁻⁴ ~ 10⁻¹² g/ml不同浓度。

2. 细胞培养 取新生(出生24 h内)SD大鼠头颅骨,用0.25%胰蛋白酶预消化15~20 min,以清除纤维组织细胞。再用0.1% II型胶原酶,在37℃环境中振荡(每分钟50次左右)消化60 min,以1000 r·min⁻¹离心收集成骨细胞。将分离收集的成骨细胞以1×10⁴个/cm²的密度接种于培养瓶中,置5% CO₂、37℃培养箱培养。24 h可见细胞贴壁生长,胞浆开始伸展,换新鲜培养液,以后每隔48 h替换培

基金项目:上海市徐汇区卫生局科研基金资助项目(99015)

作者单位:200233,上海市第八人民医院(朱建民、方浩、陈新刚、曾明);上海医科大学骨代谢研究室(金蔚芳、王洪复)

养液。于接种后第4天(半汇合)取次代成骨细胞(OB₂)培养,先以0.25%胰蛋白酶使贴壁细胞消化松解、轻摇,细胞即脱壁。以 1×10^4 个/cm的密度移入含培养液的新培养瓶继续培养,加入不同浓度密钙息($10^{-4} \sim 10^{-12}$ g/ml)作药效试验。采用MEM(minimum Eagle medium)培养液,内含10%小牛血清、青霉素等,新鲜配置,冷冻保存^[4]。

3. 观察指标

(1)OB₂增殖功能测定:OB₂以 6×10^3 /孔密度接种于24孔培养板上,24 h后换入含不同浓度药物($10^{-4} \sim 10^{-12}$ g/ml)的培养液中,于加药后72 h用MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide]方法在酶标仪上进行测试。测试条件为:①测定时换成无血清培养液;②测定波长为570 nm;③37℃,5%CO₂,MTT孵育4 h;④MTT50 μl(5 g/L),检测细胞数 1×10^6 ,光密度(OD)值与活细胞数相关系数 $r = 0.9701$ 。以波长570 nm处的OD值表示OB₂增殖功能,结果与对照组比较^[4]。

(2)OB₂分化功能测定:OB₂以 2×10^4 /孔密度接种于24孔培养板上,24 h后换入含敏感浓度(10^{-10} g/ml)药物的培养液中,每48 h更换培养液1次,待汇合后用对硝基苯磷酸盐(PNPP)法和分光光度计测定细胞溶液中的ALP活性(条件为pH10.5,37℃,波长为405 nm);再用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量,以U/mg蛋白质表示ALP活性,结果与对照组比较。ALP活性是OB₂分化功能指标^[4]。

(3)OB₂矿化功能测定:OB₂以 2×10^4 /孔密度接种于6孔Costor培养板上,10 d后换入含敏感浓度(10^{-10} g/ml)药物的培养液中,14 d后加入β-磷酸甘油诱导成骨细胞分泌碱性磷酸酶,促进有机磷分解成磷酸盐,使钙盐沉积,形成矿化结节。再用90%酒精固定,0.1%茜素红染色。以橘红色结节,边界清晰,>200 μm为标准。在40倍光镜下作矿化结节计数,结果与对照组比较^[4]。

(4)对照组设计:采用去离子水设定药物空白对照组。

(5)统计学方法:数据处理采用均数±标准差表示,组间比较采用t检验。

结 果

1. 对OB₂增殖功能的作用:当密钙息浓度为 10^{-6} g/ml时,波长570 nm处的OD值(均数±标准差)为 0.323 ± 0.101 ;浓度为 10^{-8} g/ml时,OD值(均

数±标准差)为 0.438 ± 0.135 ;浓度为 10^{-10} g/ml时,OD值(均数±标准差)为 0.523 ± 0.158 ;浓度为 10^{-12} g/ml时,OD值(均数±标准差)为 0.409 ± 0.148 。对照组OD值(均数±标准差)为 0.347 ± 0.035 。与对照组比较,密钙息 $10^{-8} \sim 10^{-12}$ g/ml各浓度组均促进OB₂增殖功能,其中 10^{-10} g/ml浓度组的促进作用具有显著性意义($P < 0.05, n = 6$),而 10^{-6} g/ml浓度时具有抑制OB₂增殖功能的作用。

2. 对OB₂分化功能的作用:参考不同浓度密钙息对OB₂增殖功能的作用结果,选取一个敏感浓度作OB₂ ALP活性实验研究。结果显示,当取密钙息敏感浓度 10^{-10} g/ml时,ALP活性(均数±标准差)为 (0.104 ± 0.012) U/mg蛋白质。对照组ALP活性(均数±标准差)为 (0.081 ± 0.004) U/mg蛋白质。与对照组比较,敏感浓度的密钙息对OB₂以分化功能具有显著性促进作用($P < 0.01, n = 6$)。

3. 对OB₂矿化功能的作用:参考不同浓度密钙息对OB₂增殖功能的作用结果,选取一个敏感浓度作OB₂矿化功能实验研究。结果显示,当取密钙息敏感浓度 10^{-10} g/ml时,矿化结节数量/视野(均数±标准差)为 (5.75 ± 0.0957) 个。对照组矿化结节数量/视野(均数±标准差)为 (1.5 ± 1.0) 个。与对照组比较,敏感浓度的密钙息对OB₂矿化功能具有极显著促进作用($P < 0.001, n = 6$)。

讨 论

降钙素主要由哺乳动物甲状腺内的旁滤泡细胞(C细胞)和低等动物的终鳃体产生,来源于神经嵴,其他如胸腺、甲状腺、垂体、肺、肝、肠、膀胱和脑脊液也有少量产生。降钙素属多肽类激素,由32个氨基酸组成。降钙素分泌受血钙水平控制,血钙升高时分泌增加,血钙降低时分泌降低。降钙素直接作用于破骨细胞受体,使细胞内钙离子转入线粒体,抑制破骨细胞活性,还能抑制大单核细胞转变为破骨细胞,从而减少骨吸收。肾脏对降钙素具有特异受体,降钙素可抑制近端肾小管对钙、磷、镁的重吸收,并能短暂抑制钾、钠重吸收,降钙素通过刺激1,α-羟化酶,增加1,25-(OH)₂D₃的生成。小剂量降钙素可抑制小肠的钙吸收,大剂量则能增加小肠的钙吸收^[3]。

降钙素临床上常被用于治疗高血钙症、Paget氏病、Graves氏病、原发性甲状旁腺机能亢进症和骨质疏松症(包括骨折固定引起的废用性骨质疏松症在

(下转第122页)

中国女性骨强度平均都较日本女性低,但结果 $P > 0.05$,无统计差异。可能日本人生活水平高,奶制品、动物蛋白摄入多,健康保健意识强,所以骨量峰值也较国人为高。但其同属黄种人,饮食习惯、生活方式、文化传统又相近,因此骨量值的差距在统计学上并无表现出差异。最适宜作为参照种群,从检测结果也可看出。我们对中国女性的检测结果,20~29岁组骨强度值最大,以后每组依次下降。50岁以后下降明显,每10年丢失率为10%,与报道相近^[6],这时可出现骨质疏松的症状和表现。因此,中国女性的峰值骨量的测定应着重于20~29岁年龄段,可参考日本女性标准。但最高峰值应该比日本女性低3~5%左右。

参 考 文 献

- 1 朱力波,曹云.骨质疏松症的影像学诊断进展.中国矫形外科杂志,1999,31:547.
- 2 Hans D, Dargent-Molina P, Schott AM, et al. Ultrasonographic heel measurements to predict hip fracture in elderly women: the EPIDOS prospective study. *Lancet* 1996, 384:511-514.
- 3 Kroger H, Huopio J, Hnkanen R, et al. Prediction of fracture risk using axial bone mineral density in a menopausal population: a prospective study. *J Bone Miner Res*, 1995, 10:30-306.
- 4 Huang C, Ross P, Wasnich Short term and long term fracture prediction by bone mass measurements: a prospective study. *J Bone Miner Res*, 1998, 13:107-113.
- 5 Bauer D, Gluer C, Cauley J, et al. Broadband ultrasound attenuation predicts fractures strongly and independently of densitometry in older women. *Arch Intern Med*, 1997, 157:629-634
- 6 Mazess RB. On aging bone loss. *Clin orthop Rel Res*, 1982, 165:53.