

高度糖基化终产物对破骨细胞酸性磷酸酶和抗酒石酸酸性磷酸酶活性的影响

蔡德鸿 陈宏 张桦

【摘要】 目的 观察高度糖基化终产物(AGE)对破骨细胞酸性磷酸酶(ACP)和抗酒石酸酸性磷酸酶(TRACP)活性的影响。**方法** 用人血清白蛋白和葡萄糖恒温孵育制备人 AGE 蛋白,应用酶消化法从人髂骨松质骨分离培养破骨细胞。将 AGE 蛋白与培养的破骨细胞共同孵育,通过酶动力学法测定培养液 ACP 和 TRACP 活性。**结果** 低浓度 AGE 蛋白(50~200 $\mu\text{g/ml}$)对破骨细胞 ACP 和 TRACP 活性无显著影响,而高浓度(500~1 000 $\mu\text{g/ml}$)则使 ACP 和 TRACP 活性显著增高,且 ACP 活性的增高主要来自 TRACP 活性的增高。**结论** 上述结果提示 AGE 蛋白可能促进破骨细胞的破骨功能。

【关键词】 高度糖基化终产物; 破骨细胞; 酸性磷酸酶; 抗酒石酸酸性磷酸酶

Effects of advanced glycosylate end products on acid phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase activity of osteoclasts *in vitro* CAI Dehong, CHEN Hong, ZHANG Hua. Department of Endocrinology, Zhujiang Hospital, The First Military Medical University, Guangzhou 510282, China

【Abstract】 Objective To observe the effects of advanced glycosylate end products (AGE) on acid phosphatase (ACP), and tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP) activity of osteoclasts *in vitro*. **Methods** Human AGE proteins were prepared by incubating human serum albumin and glucose at constant temperature. The osteoclasts were isolated from human iliac spongy bone with collagenase II and purified on the basis of the difference in attachment velocity. The ACP and TRACP activities were assayed to evaluate the effects of AGE on osteoclasts. **Results** Lower dose of AGE induced little changes in ACP and TRACP activities, but higher dose of AGE significantly increased ACP and TRACP activities. The increment of ACP was mainly due to the increment of TRACP. **Conclusion** AGE may accelerate the bone resorption of osteoclasts *in vitro*.

【Key words】 Advanced glycosylate end products; Osteoclast; Acid phosphatase; Tartrate-resistant acid phosphatase

糖尿病骨质疏松症是糖尿病的慢性并发症之一,尤其在 1 型糖尿病中广泛存在。糖基化终产物(advanced glycosylate end products, AGE)是导致糖尿病并发症的主要因素。值得注意的是,AGE 亦被认为是一种衰老分子,参与衰老过程^[1]。由于糖尿病和衰老均可以导致骨质疏松,而 AGE 又同时参与这两种疾病的病理过程,据此推测 AGE 有可能是老年性和糖尿病骨质疏松的共同致病因素。新近的研究表明 AGE 蛋白及其受体可能参与了糖尿病骨质疏松的发生^[2-4]。但 AGE 形成后在糖尿病骨质疏松症中的作用以及对成骨与破骨动态平衡的影响鲜有报道。本课题通过建立体外骨吸收模型,观察 AGE 蛋白对破骨细胞酸性磷酸酶(ACP)和抗酒石酸酸性磷酸酶(TRACP)的影响,以寻求 AGE 蛋白参与骨代

谢导致骨质疏松症的直接证据。

材料和方法

1. 实验试剂

人血清白蛋白(上海莱士血制品有限公司); RPMI1640(Gibco BRL 公司); II 型胶原酶(Sigma 公司);胎牛血清(中国医学科学院);酸性磷酸酶检测试剂盒(BioMérieux 公司)。

2. AGE 蛋白的制备

按 Kazimierz 等^[5]的方法,无菌条件下,人血清白蛋白 50 mg/ml 与终浓度 0.5 mol/L 葡萄糖 0.5 mmol/L 的 EDTA,100 U/ml 的青霉素,100 $\mu\text{g/ml}$ 的链霉素,0.2 mol/L PBS(pH7.4),过滤除菌,37℃ 恒温培养箱孵育 8 周。0.1 mol/L PBS(pH7.4)中透析 48 h。分装后存于 -80℃ 冰箱。用 Hitachi F850 荧光分光光度计,于激发波长 370 nm,发射波长 440 nm 测定

其荧光度加以鉴定。

3. 破骨细胞的分离培养

按 Zhang ZM 等^[6]的方法略加改动。人髂骨松质骨取自拟行植骨融合的成年手术病例。将松质骨置入含有 100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 的链霉素的 0.01 mol/L PBS(pH7.2)中,取材后 1 h 内开始分离过程:以 0.01 mol/L PBS 清洗,剪成细碎的骨屑,1 mg/ml 的Ⅱ型胶原酶 37℃水浴中消化 90 min,用 1640 培养液反复吹打消化底物 3 min,使附于碎骨屑上的破骨细胞混入培养液中,再静置 1 min,使碎骨屑沉降。取细胞悬液,细胞用 PBS 洗 2 遍,用 1640 培养液重悬。调节细胞浓度为 1×10⁴/ml,将细胞种植于培养瓶中,在 37℃、5% CO₂、100%湿度的培养箱内孵育 60 min 后,用培养液轻轻冲洗,去除吸附能力较弱的未贴壁细胞。因酚红有弱的雌激素作用,贴壁细胞用橡皮擦剥离后悬于加有 10%胎牛血清的不含酚红的 RPMI1640 中,将细胞重新收集、培养,细胞浓度仍调节为 1×10⁴/ml。培养液每 24 h 更换 1 次。通过细胞活体观察、TRACP 免疫电镜测定、玻连蛋白受体表达等方法证实所分离培养的细胞为破骨细胞。

4. AGE 影响破骨细胞功能的试验

将上述分离培养的破骨细胞接种于细胞培养板,继续孵育。取制备好的 AGE 蛋白,加入孵育的细胞培养板内。根据 AGE 蛋白的不同浓度分为 5 组,AGE 蛋白的终浓度分别为 50、100、200、500、1 000 μg/ml;先后孵育 24、48、72 h。另设阴性对照组,分别加入与 AGE 蛋白相同终浓度的白蛋白,空白对照组加入 0.5 ml 的培养液。

5. ACP 和 TRACP 活性的测定

将细胞接种于细胞培养板内,孵育达所需时间后,将培养上清液 2 000 r/min 离心 5 min,加入含有底物 α-naphthyl phosphate 的醋酸缓冲液(pH5.4),孵育 10 min,其产物与坚固红 TR 反应,终产物偶氮盐被用来测定 ACP 的活性。孵育液中加入终浓度为 75 mmol/L 的 D-酒石酸,即可测得 TRACP 的活性^[6]。测定应用 Olympus Au800 生化自动分析仪完成。

6. 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS7.5^{*} 行 AN-VOA 分析。

结 果

破骨细胞培养的形态学观察:倒置显微镜下观

察可见破骨细胞形态多样,多核,胞浆有大小不等的空泡和丝状或片状的伪足。Giemsa 染色观察到破骨细胞多核,核呈蓝色,胞浆中可见大小不等的空泡,周围可见细长的伪足样突起。TRACP 染色光镜观察,破骨细胞形态各异,酶活性部位呈红色颗粒样沉淀,分布于全部或大部胞浆,核呈阴性。免疫电镜下,破骨细胞多核,呈不规则状,有丝状或片状伪足。可见破骨细胞溶酶体内胶体金颗粒大小均匀,说明所培养的多核细胞系具有合成 TRACP 的破骨细胞。在荧光显微镜下,可见阳性细胞发出荧光,说明培养的细胞膜上有玻连蛋白受体。

如表 1 所示,低浓度的 AGE 蛋白(50~200 μg/ml)对破骨细胞的 ACP 活性无显著影响;但高浓度的 AGE 蛋白(500~1 000 μg/ml)在孵育 48 h 后,则使 ACP 活性显著增高,孵育至 72 h,ACP 活性反又下降。

表 1 AGE 对破骨细胞酸性磷酸酶(ACP)活性的影响($\bar{x} \pm s$)

AGE 蛋白浓度 (μg/ml)	ACP 活性(U/L)		
	24h	48h	72h
0	1.76 ± 0.69	1.86 ± 0.55	1.69 ± 0.54
50	1.69 ± 0.51	1.78 ± 0.46	1.77 ± 0.62
100	1.83 ± 0.78	1.91 ± 0.53	1.93 ± 0.79
200	1.71 ± 0.66	2.05 ± 0.61	2.08 ± 0.66
500	1.80 ± 0.78	2.28 ± 0.47 [*]	2.09 ± 0.67
1000	1.94 ± 0.79	2.42 ± 0.71 ^{**}	2.33 ± 0.77 [*]

注:与 AGE 蛋白 0 浓度比较, * P < 0.05, ** P < 0.01

如表 2 所示,同样观察到高浓度的 AGE 蛋白使 TRACP 活性显著增高(P < 0.01)。在作用 72 h 后,TRACP 活性亦见下降。

比较细胞孵育上清液中两种酶活性的变化,ACP 活性增高时,有 80% 以上来自 TRACP(图 1)。而且,在 AGE 蛋白作用 72 h 时,酶活性的下降也主要反映了 TRACP 活性的改变。

表 2 AGE 对破骨细胞抗酒石酸酸性磷酸酶(TRACP)活性的影响($\bar{x} \pm s$)

AGE 蛋白浓度 (μg/ml)	TRACP 活性(U/L)		
	24h	48h	72h
0	1.57 ± 0.66	1.82 ± 0.63	1.73 ± 0.48
50	1.66 ± 0.73	1.62 ± 0.64	1.68 ± 0.44
100	1.80 ± 0.73	1.76 ± 0.75	1.84 ± 0.61
200	1.68 ± 0.45	1.94 ± 0.71	1.99 ± 0.89
500	1.66 ± 0.45	2.17 ± 0.57 [*]	2.06 ± 0.70
1000	1.82 ± 0.60	2.21 ± 0.66 ^{**}	2.04 ± 0.69

注:与 AGE 蛋白 0 浓度比较, * P < 0.05, ** P < 0.01

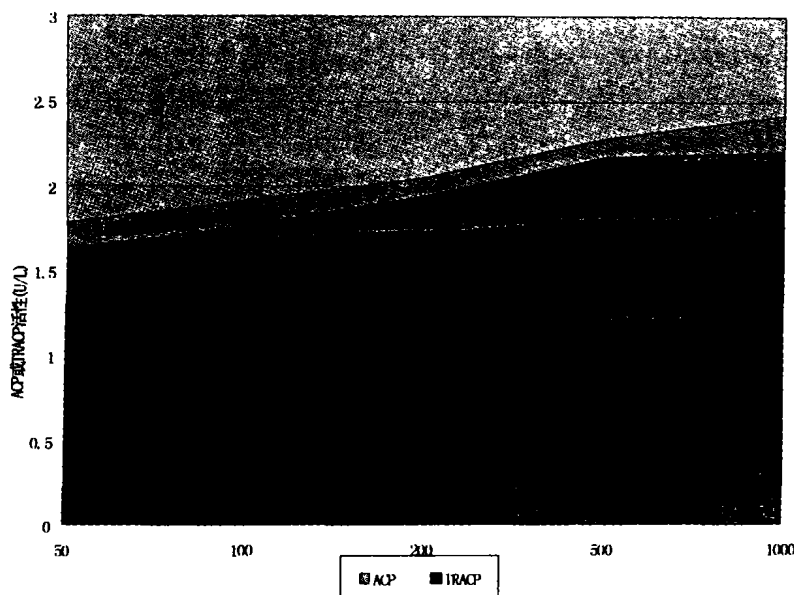


图 1 AGE 蛋白作用 48 h 对 ACP 和 TRACP 活性影响的比较

讨 论

骨质疏松的主要表现是低骨量和骨组织微结构退变,其发生的本质在于骨重建过程紊乱即骨吸收超过骨形成。骨吸收与骨形成分别与破骨细胞和成骨细胞直接相关。有研究表明 AGE 蛋白可以抑制小鼠成骨样细胞的活性,表现为碱性磷酸酶活性下降,并且骨钙素的分泌也受到抑制,提示 AGE 蛋白可能抑制了骨生成^[7,8]。也有研究则认为 AGE 蛋白是通过加速骨吸收而参与骨质疏松的发病。AGE 可以通过促进单核/巨噬细胞产生 IL-1、TNF- β 、IL-6 等细胞因子,提高破骨细胞活性,加速骨吸收^[3,9,10]。但迄今为止,AGE 蛋白是否作用于破骨细胞加速了骨吸收过程尚无明确的实验证据。

TRACP 是 ACP 同功酶的第 5 型,主要存在于破骨细胞、巨噬细胞等中,是公认的鉴别破骨细胞的标志之一。骨吸收时,它参与骨基质中固体钙磷矿化底物的降解。因此,TRACP 标志着破骨细胞的活性,并在一定程度上反映了骨吸收状况^[11]。我们的实验结果表明,低浓度的 AGE 蛋白对破骨细胞 ACP 活性的影响不显著,但 500 和 1 000 $\mu\text{g/ml}$ 的 AGE 蛋白则使破骨细胞 ACP 和 TRACP 活性显著升高。而 ACP 活性的增加,又主要来自于 TRACP。这提示一定浓度的 AGE 蛋白促进了破骨细胞的功能。破骨细胞是骨吸收的主要作用者,但破骨细胞激活因子的骨吸收作用依赖于成骨细胞的存在,此点已为学者所公认。由于破骨细胞分离技术的限制,在我们所分离培养的细胞群体中,仍然存在部分成骨细胞

和其他骨髓细胞。是否 AGE 促使成骨细胞产生 IL-1、TNF- β 等破骨活性因子,进而影响破骨细胞的活性;抑或直接对破骨细胞产生影响尚需进一步研究。改进破骨细胞分离培养方法乃是深入研究的关键。值得注意的是,当 AGE 作用时间延长至 72 h 时,ACP 和 TRACP 的活性反而下降,其原因可能与破骨细胞存活期较短有关。

参 考 文 献

- 1 Vlassara H. Recent progress in diabetic advanced glycation end products and complications. *Diabetes*, 1974, 46(Suppl 2): s19-25.
- 2 Miyata T, Notoya K, Yoshida K, et al. Advanced glycation end products enhance osteoclast-induced bone resorption in cultured mouse unfractionated bone cells and in rats implanted subcutaneously with devitalized bone particles. *J Am soc Nephrol*, 1997, 8(2): 260-270.
- 3 Miyata T, Kawai R, Taketomi S, et al. Possible involvement of advanced glycation end-products in bone resorption. *Nephrol Dial Transplant*, 1996, 11(Suppl 5): 54-57.
- 4 Tomasek JJ, Mevers SW, Basinger TB, et al. Diabetic and age-related enhancement of collagen-linked fluorescence in cortical bones of rats. *Life Sci*, 1994, 55: 855-861.
- 5 Kazimierz W, Katarzyna W, Garay-sevilla ME, et al. Novel analytical approach to monitoring advanced glycosylation end products in human serum with on-line spectrophotometric and spectrofluorometric detection in a flow system. *Clinl Chem*, 1997, 43(9): 1563-1569.
- 6 Zhang ZM, Chen JT, Jin DD. Platelet-derived growth factor (PDGF)-BB stimulates osteoclastic bone resorption directly: the role of receptor- β . *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 250: 190-194.

(下转第 345 页)

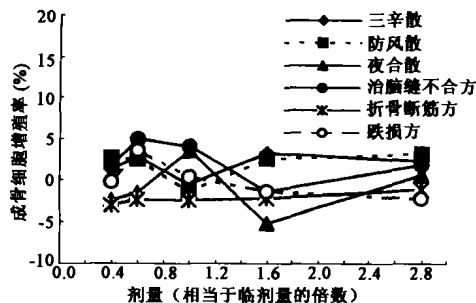


图 5 几种中医古方的含药血清对成骨细胞增殖的影响

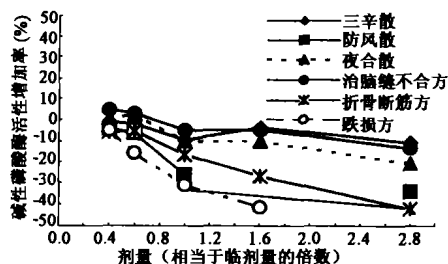


图 6 几种中医古方的含药血清对成骨细胞碱性磷酸酶活性的影响

外直接接触观察药效,会带来一定局限。我们试以药物口饲动物后一定时间获得的血清,即含药血清进行体外试验,可能在一定程度上更能真实地反映药效。

成骨细胞经历着增殖、分化、成熟、凋亡的过程。MTT 法 OD 值的上升,提示成骨细胞数量的增加;碱性磷酸酶活性的增加,反映了成骨细胞的分化成熟。我们所试的 15 种药物含药血清对成骨细胞增殖似均无明显作用;而所试的大部分西药和中成药能提高碱性磷酸酶活性,促进其分化成熟。在作用强度上,如将每个药物各剂量组的增强率相加,得出平均增强率的数值大小排序,西药依次为:安雄(平均增强率 33.1%,下同) > 特乐定(30.8%) > 福善美(23.6%) > 萌格旺(0.6%) > 倍美力(-3.4%);中

成药依次为:泰格(39.9%) > 骨疏康(20.9%) > 鹿茸健骨(18.8%) > 仙灵骨葆(7.0%)。6 种与骨代谢可能有关的中医古方,对碱性磷酸酶活性均无促进作用。

已知双磷酸盐(福善美)、萌格旺(阿法 D₃)主要作用于破骨细胞、抑制骨吸收,可能不直接影响成骨细胞增殖;氟制剂(如特乐定)是国内用于临床促骨形成的西药,虽未见能促进成骨细胞增殖,然促进分化成熟的作用较强。雌激素制剂(倍美力)既无促进成骨细胞增殖,也不显著促进其分化成熟,其防治骨质疏松作用主要在于破骨细胞。所试几种中成药有较强促进成骨细胞成熟的作用。有报道认为,骨疏康在体外能促进成骨细胞增殖^[5],但它是直接加入培养液中,正如有的实验报道的^[2],药物直接加入和用药血清的实验结果会有差异。究竟以何种实验方式所获结果更能反映实际药效,需进一步进行比较性研究的。至于所试的 6 种古方未能在我们的实验中呈现药效,是由于我们仅对成骨细胞的影响作了有限的探讨,不能排除它们对破骨细胞或骨代谢其他方面的作用。

参 考 文 献

- 1 阴赫宏,李兰芳,金亚宏,等.中药血清药理学研究现状.中国中医药信息杂志,1999,6(4):30-32.
- 2 李芳芳,李恩,宋士军,等.补肾方剂及不同组份对成骨细胞增殖分化的影响.中国骨质疏松杂志,1998,4(3):71-73.
- 3 李芳芳,宋士军,李建平,等.淫羊藿对成骨细胞增殖分化的影响.中国骨质疏松杂志,1999,5(2):55-70.
- 4 沈霖,杜靖远,胡光亮,等.骨密片对离体胎鼠颅骨成骨细胞增殖及幼鼠颅骨块钙释放量的影响.中医研究,2000,13(1):22-25.
- 5 唐海涛,唐海,罗先正,等.骨疏康对成骨细胞刺激作用的研究.中国骨质疏松杂志,2000,6(2):60-63.
- 6 陈奕,赵咏芳,张月林,等.昆山接骨片对体外培养大鼠成骨细胞的影响.中医正骨,2001,13(1):5-6.