

氟化物对培养的破骨细胞基质金属蛋白酶-9 的影响

华坤 张秀云 李广生

【摘要】 目的 观察氟对培养的大鼠破骨细胞基质金属蛋白酶-9(Matrix metalloproteinase-9, MMP-9)的影响。**方法** 机械分离新生大鼠四肢长骨的破骨细胞,于分离后 2 h 加入不同浓度的氟化物,应用免疫组织化学技术和原位杂交技术检测氟化物干预下培养的破骨细胞 MMP-9 的蛋白质和 mRNA 的表达。**结果** 随着染氟剂量的增加,破骨细胞内 MMP-9 的蛋白质表达增高,以 2.0, 4.0 mg/L F 组最为显著,同时破骨细胞内 MMP-9 mRNA 表达亦增加,1.0, 2.0, 4.0 mg/L F 组与对照组比较差异有显著性。**结论** 氟通过提高 MMP-9 的蛋白质和 mRNA 表达,直接活化破骨细胞从而提高破骨细胞骨吸收活性。

【关键词】 氟化物; 破骨细胞; 细胞基质金属蛋白酶-9; 原位杂交

Effects of fluorides on matrix metalloproteinase-9 in cultivated osteoclasts *in vitro* HUA Kun, ZHANG Xiuyun, LI Guangsheng. Department of Pathology, Institute of Endemic Disease, Jilin University, Changchun 130021, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of fluorides on matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in cultivated osteoclasts (OCs) *in vitro*. **Methods** OCs were isolated mechanically from long bones of neonatal rats and cultured in 24-hole plate. Two hours later, fluorides were added into the plate, the expressions of MMP-9 were investigated by immunohistochemistry and *in situ* hybridization techniques. **Results** The expression of MMP-9 protein increased gradually with elevating fluoride concentration, and more significantly in the 2.0, 4.0 mg/L fluoride groups than in control group. In the mean time, an obvious rise of the expression of MMP-9 mRNA showed up in the 1.0, 2.0, 4.0 mg/L fluoride groups, which groups differed significantly from that in the control group. **Conclusion** The fluoride spurs OCs and then enhances the bone resorption activities by increasing the MMP-9 expression of OCs not only at protein level but also at mRNA level.

【Key words】 Fluoride; Osteoclast; MMP-9; *in situ* hybridization

低剂量氟可能为人体所必需,而大剂量对人体有潜在毒性的微量元素具有很强的亲骨性,对维持骨的正常结构有重要的作用。氟在体内长期过多蓄积可造成慢性氟中毒,使骨代谢紊乱引起全身性骨骼病变。破骨细胞(Osteoclast, OC)是体内唯一专职骨吸收的细胞,对其研究的历史虽然很长,但由于 OC 数量少,且依赖于成骨细胞生存,体外培养所获得的 OC 常与其他细胞混合存在,很难分离到纯的 OC,所以过量氟对 OC 作用的机理研究还很不充分。本研究在对 OC 培养的基础上,观察氟对 OC 的细胞基质金属蛋白酶-9(MMP-9)表达的影响。

材料和方法

1. 动物:Wistar 大鼠乳鼠,吉林大学实验动物部提供。

2. 主要试剂:M199 培养液(Gibco),胎牛血清(天津血液研究所制品),HEPES(Gibco),二性霉素 B(Gibco),氟化钠分析纯(上海生化试剂厂),基质金属蛋白酶-9 免疫组织化学试剂盒(福州迈新试剂公司),MMP-9 原位杂交试剂盒(武汉博士德公司)。

3. 分离破骨细胞:新生 24 h 以内的 Wistar 大鼠乳鼠,75%乙醇浸泡 5 min,无菌切取股骨、肱骨和胫骨,去净附着在其表面的软组织及软骨,骨干在 M199 培养液中洗 2 次,再将其放在装有 M199 的完全培养液(含 15%胎牛血清,25 mmol/L HEPES 缓冲

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39730390)

作者单位:130021 长春,吉林大学地方病研究所病理研究室

液, 100 U/ml 青霉素和链霉素, 300 $\mu\text{g/L}$ 二性霉素 B) 的玻璃平皿中。将骨干纵行剖开后, 用手术刀轻刮骨内表面, 并用尖吸管吸取上述培养液, 反复吹打骨髓腔和骨的内表面, 直至变白为止。最后用吸管吹打细胞悬液 2 min, 使附着在碎骨片上的破骨细胞进入培养液中, 再静止 1 min, 使碎骨片沉降, 细胞悬液备用。

4. 盖玻片处理: 将盖玻片 20 mm $\times$ 20 mm 用玻璃刀分切成 10 mm $\times$ 10 mm 大小, 无水乙醇浸泡 2 h, 晾干, 再浸入硫酸-重铬酸钾清洗液中过夜, 充分水洗, 蒸馏水洗, 自然晾干, 高压消毒, 备用。

5. 象牙薄片制备: 取直径 1.5 cm 的象牙毛胚, 用锯式切片机横向切成 50 μm 薄片, 置蒸馏水中超声清洗 10 min $\times$ 3 次, 自然晾干, 紫外线照射 1 h 后保存于 M199 培养基中 (含青、链霉素各 1 000 U/ml), 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境中备用。

6. 破骨细胞的鉴定: 将上述细胞悬液种植于象牙片上, 于 5 d 后取出, 用 2.5% 戊二醛固定 7 min, 进行甲苯胺蓝染色, 光镜下观察。

7. 氟化物对破骨细胞 MMP-9 的影响: 将上述细胞悬液种植于含有盖玻片的 24 孔板内, 置二氧化碳孵育箱中 (5% CO_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$) 培养。30 min 后用 M199 培养液冲洗掉未附着于盖玻片上的细胞, 继续培养。2 h 后加入含不同浓度的氟化物 (Fluoride, F $^-$) 的培养基, 使 F $^-$ 的最终浓度为 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/L。对照组用基础培养基, 每组 6 孔。加 F $^-$ 后 8 h, 用 0.1 mol/L PBS 冲洗 1 次, 用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 蒸馏水充分洗涤, 按免疫组织化学和原位杂交试剂盒操作步骤进行破骨细胞 MMP-9 的表达研究。

结 果

1. 倒置相差显微镜下观察: 分离的破骨细胞含有多个细胞核, 表面有微绒毛, 形态各异, 随着培养时间的延长, 细胞充分伸展, 体积变大, 核仁清晰可见。

2. 骨吸收陷窝结果: 骨片上有明显的骨吸收陷窝, 数量较多, 形态多样, 如圆形、椭圆形、腊肠形、不规则形等, 陷窝的深浅不一。

3. 免疫组织化学方法观察氟化物对体外培养的破骨细胞 MMP-9 蛋白表达的影响: 实验结果表明, MMP-9 在破骨细胞内呈阳性表达, 多呈弥散或颗粒状分布于破骨细胞胞浆中 (见图 1)。计数每张玻片上的阳性细胞数并进行比较, 如表 1 所示: 随着染

F $^-$ 的剂量增加, MMP-9 阳性细胞数逐渐增多, 其中 2.0, 4.0 mg/L 染氟组与对照组比较差异有显著性。



图1 染氟 2.0 mg/L 组破骨细胞 MMP-9 蛋白的表达 ($\times 400$)

表 1 氟对体外培养破骨细胞 MMP-9 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数 (n)	阳性细胞数 (个/片 *)
对照组	4	109.3 $\pm$ 26.0
0.05 mg/L F $^-$	4	110.5 $\pm$ 21.0
0.1 mg/L F $^-$	4	149.0 $\pm$ 27.9
0.5 mg/L F $^-$	5	173.0 $\pm$ 94.0
1.0 mg/L F $^-$	5	188.0 $\pm$ 79.9
2.0 mg/L F $^-$	5	188.0 $\pm$ 97.9 $^{\#}$
4.0 mg/L F $^-$	4	193.0 $\pm$ 98.7 $^{\#}$

注: 与对照组比较, $^{\#} P < 0.05$; * 每片相当于 1 cm 2

4. 氟对体外培养的破骨细胞 MMP-9 mRNA 表达的影响: 破骨细胞内可见 MMP-9 mRNA 的阳性表达 (见图 2)。通过图像分析仪对阳性细胞进行平均光密度的扫描, 结果如表 2 所示, 随着染氟剂量的增加, MMP-9 mRNA 的表达增强, 尤其以 1.0、2.0、4.0 mg/L 染氟组较显著。

表 2 氟对培养破骨细胞 MMP-9 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

分组	例数 (n)	MMP-9
对照组	5	58.075 $\pm$ 1.59
0.05 mg/L F $^-$	6	56.557 $\pm$ 2.26
0.1 mg/L F $^-$	5	60.794 $\pm$ 4.81
0.2 mg/L F $^-$	6	69.860 $\pm$ 6.30
0.5 mg/L F $^-$	6	73.169 $\pm$ 6.01
1.0 mg/L F $^-$	6	94.496 $\pm$ 11.98 **
2.0 mg/L F $^-$	6	94.640 $\pm$ 7.01 **
4.0 mg/L F $^-$	6	104.97 $\pm$ 7.73 ***

注: 与对照组比较, $^{**} P < 0.01$; 与 0.05 mg/L F $^-$ 组比较 $^{**} P < 0.01$; 与 0.05 mg/L F $^-$ 组比较 $^{\#} P < 0.05$

讨 论

MMP-9 是一种重要的反映骨吸收和骨重建的关键酶, 具有降解细胞外基质 (Extracellular matrix,

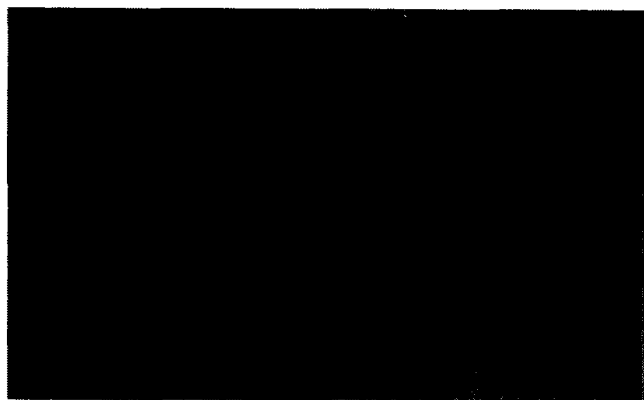


图2 染氟 2.0 mg/L 组破骨
细胞 MMP-9 mRNA 的表达 ($\times 400$)

ECM) 的功能,在破骨性骨吸收中发挥着重要作用^[1,2]。ECM 是一种以高度组织方式集中的多种功能蛋白和糖蛋白复合体,与器官内细胞和组织的结构完整性相关。ECM 的降解主要依赖蛋白水解酶,包括:丝氨酸蛋白酶类、半胱氨酸蛋白酶、天门冬氨酸蛋白酶、基质金属蛋白酶(MMPs)。在这 4 种蛋白水解酶中,MMPs 被认为是最重要的一种,因为①MMPs 直接以酶原的形式分泌到 ECM 中,并在正常生理条件下发挥作用;②MMPs 的活性均受到严格调控,且在 ECM 重组的部位易于诱导表达;③MMPs 中的一些酶是迄今为止已发现的唯一能分解纤维类胶原的酶。

MMP-9 是 MMPs 基因家族中的一员,亦称 92-KD IV 型胶原酶和明胶酶 B,在 OC 中呈高表达^[3]。沈霖等^[4]报道:MMP-9 mRNA 主要在 OC、骨髓单核细胞和一些骨基质表面衬细胞中表达。MMP-9 在一些衬细胞中的表达,可能与去除骨表面类骨质,便于 OC 与矿化基质黏附有关。而骨髓单核细胞(包括单核破骨前体细胞)中 MMP-9 的表达,可能反映该酶参与 OC 的发育和募集过程^[5]。MMP-9 通过降解 ECM,在 OC 的迁移、侵蚀和锚着过程中发挥作用^[6]。有学者报道:MMP-9 表达水平可随骨吸收活性的不同而改变^[7]。

作者曾应用 Western blot 技术发现氟中毒大鼠长骨干骺端 MMP-9 的蛋白质表达增高,与对照组比较差异显著,说明在整体内氟能通过提高 MMP-9 蛋白质表达而使破骨性骨吸收活动增强。氟对 OC 是否有直接的作用,为此我们进行了 OC 的体外培养及氟对其活性影响的研究。OC 是体积大的多核巨

细胞,直径可达 100 μm ,含 2 ~ 100 个细胞核不等,OC 最突出的特点为侵蚀骨片形成骨吸收陷窝。我们参照 Chambers^[8]和国内史凤芹等^[9]的方法进行大鼠乳鼠体外 OC 分离培养,2 h 后细胞形态清晰,含多个细胞核,胞浆内有时可见大小不等的空泡,表面有微绒毛。随着培养时间的延长,细胞充分伸展,体积变大,核仁清晰可见,与骨片共同培养有骨吸收陷窝形成等特点,符合 OC 的鉴定标准,实验证明分离培养 OC 的方法是可行的。应用免疫组织化学方法观察氟对培养的大鼠 OC MMP-9 的影响,结果表明:随染氟剂量的增加,MMP-9 阳性细胞数逐渐增多,以 2.0 mg/L F 组、4.0 mg/L F 组最为明显,与对照组比较差异显著。说明氟可通过提高 MMP-9 的蛋白质表达引起骨吸收活性的增加。我们同时还应用原位杂交的方法对培养的 OC 进行了 MMP-9 mRNA 表达的检测,发现在 1.0 mg/L F 组、2.0 mg/L F 组、4.0 mg/L F 组,MMP-9 mRNA 表达明显增高,与对照组比较差异有显著。说明氟不仅可以在 mRNA 水平上增加 MMP-9 的活性,同时还可以在蛋白质水平上提高 MMP-9 的表达,从而使破骨性骨吸收活性增加。

参 考 文 献

- 1 Reynolds JJ. Collagenases and tissue inhibitors of metalloproteinases: a functional balance in tissue degradation. *Oral Dis*, 1996, 2: 70-76.
- 2 Okada Y, Naka K, Kawamura K, et al. Localization of matrix metalloproteinase -9 in osteoclasts: implication for bone resorption. *Lab Invest*, 1995, 72: 311-315.
- 3 Wucherpfennig AL, Li YP, Stevenson WG, et al. Expression of 92kD type collagenase /gelatinase B in human osteoclasts. *J Bone Miner Res*, 1994, 9: 549-556.
- 4 沈霖,杜靖远,赵海波. 补肾法对实验性骨质疏松 MMP-9 及 I 型胶原 mRNA 表达的影响. *中国中医骨伤科杂志*, 1998, 6(4): 1-4.
- 5 赵海波,夏志道,蔡国平,等. 雌激素对实验性骨质疏松骨组织 I 型胶原和基质金属蛋白酶-9 表达影响. *中华老年医学杂志*, 1999, 18 (1): 42-44.
- 6 高建军,王洪复. 破骨细胞成熟和活化以及骨吸收机制. *国外医学内分泌学分册*, 1998, 18(2): 57-61.
- 7 Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG, et al. C-fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science*, 1994, 266: 443-448.
- 8 Chambers TJ, Magnus CJ. Calcitonin alters behaviour of isolated osteoclasts. *J Pathol*, 1982, 136(1): 27-30.
- 9 史凤芹,于世凤. 体外破骨细胞分离培养方法的建立. *中华骨科杂志*, 1994, 14: 43-45.

(收稿日期:2003-01-09)