

不同方法检测成骨细胞中碱性磷酸酶的比较

李晓新 林琴 包振英

【摘要】 目的 探讨不同缓冲液和不同裂解方法对体外培养成骨细胞内碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALPase)活性的影响,建立较为理想的检测方法和条件,为研究骨代谢异常及骨质疏松症等骨病提供简便可靠的检测手段。方法 采取经体外培养 72 h 的成骨细胞,制备上清液、细胞裂解液和细胞反复冻融液样本,分别用二乙醇胺(DEA)、碳酸盐(CO_3^-)、2-氨基-2-甲基-1-内醇(AMP)等 3 种不同缓冲液种类的试剂,测定上述液体中的 ALPase 活性。结果 使用 DEA 缓冲液的 3 种样本的测量值都为最高,且不精密度(CV)较其他两种缓冲液小,各组比较分析,差异均有显著性($P < 0.01$)。使用 3 种缓冲液试剂,均以裂解液中 ALP 活性最高,而冻融液次之,上清液最低,分析结果,差异均有显著性($P < 0.01$)。结论 用 DEA 缓冲液测量细胞裂解液体外培养成骨 ALPase 活性的效果较理想。

【关键词】 成骨细胞; 碱性磷酸酶; 检测

Comparative analysis of several assays for detecting the activities of alkaline phosphatase in osteoblasts LI Xiaoxin, LIN Qin, BAO Zhenying. *Peking University, School of Stomatology, Beijing 100081, China*

【Abstract】 Objective Studying the effects of different buffers and lytic methods in detecting the activities of alkaline phosphatase(ALPase) in cultured osteoblasts *in vitro*, and finding an ideal assay to research metabolic disorders of bone and osteoporosis simply and reliably. **Methods** Osteoblasts cultured *in vitro* for 72 h were collected and made to different samples of supernate, cell lysis buffer and cell freezing-melting sample. Using three different buffers, diethanolamine(DEA), carbonate and 2-amino-2-methyl-1-propanol (AMP) respectively, to detect the activities of ALPase in solution mentioned above. **Results** The highest detected values in all three samples were with DEA, then were with AMP the lowest values were with carbonate. Analytic results showed significant differences among all of these groups ($P < 0.01$). Detected with DEA, carbonate and AMP respectively, the activities of ALPase in cell lysis buffer were the highest, then were in cell freezing-melting buffer, the lowest activities were in supernate. Significant differences were also seen among all these groups ($P < 0.01$). **Conclusion** For cultured osteoblasts, detecting the activities of ALPase in lysis buffer with DEA is recommended.

【Key words】 Osteoblast; Alkaline phosphatase; Assay

碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALPase)是一种普遍存在的细胞内酶。ALPase 活性做为成骨细胞功能及分化的指标,在骨代谢异常和骨病的研究中被广泛应用,定量检测细胞内 ALPase 的活性具有重要的临床意义。目前,血清中 ALPase 活性的检测方法多采用国际临床化学协会(IFCC)推荐的方法,并且在临床实验室实施了酶测定的标准化,从而提高了酶测定的准确性^[1,2]。对于体外培养的细胞内 ALPase 活性的检测,由于其方法的复杂性而不同于血清如:受到细胞培养液成分、细胞接种密度、细胞破碎方法等多种因素的影响,可能引起检测结果差

异;同时在对缓冲液、底物的选择上及反应条件的设置上也可能对检测结果造成影响。本研究目的旨在探讨不同类型缓冲液和不同裂解方法,对体外培养成骨细胞内 ALPase 活性的检测结果的影响,确立较为理想的检测方法和条件,为临床应用提供依据。

材料和方法

1. 仪器:全自动生化分析仪,日本日立公司产品 7060 型;倒置显微镜,日本 Olympus 公司产品 CO_2 培养箱,国产。

2. 试剂:ALPase 检测试剂盒,利德曼公司产品(碳酸盐缓冲液、EDA 缓冲液、AMP 缓冲液 3 种试剂盒);校准品及质控血清:德国宝灵曼公司产品;DMEM 培养基(GIBC/BRL, USA);胎牛血清(天津生

物制品厂);胰蛋白酶(Sigma公司)。

3. 方法

(1) 成骨细胞分离培养

将出生 5 d 的乳鼠(购于北大医学部动物所)浸泡于 70% (体积分数)乙醇中 1 min, 在超净工作台中断颈处死, 剥开颅顶部皮肤, 分离出颅盖骨, 置于含 10 倍双抗(青霉素 1 000 U/ml, 硫酸链霉素 1 mg/ml) D-Hanks 液中, 去净附着于其表面的软组织和内外骨膜以及骨缝处的纤维结缔组织, 用无双抗的 D-Hanks 液洗 2 遍, 将颅盖骨剪为 2 mm × 2 mm 的碎块, 加入 0.25% (w/v) 的胰蛋白酶, 37℃ 消化 2 次, 每次 20 min, 然后用完全 DMEM 培养液(含体积分数为 10% 的 FBS, 100 U/ml 青霉素, 100 μg/ml 硫酸链霉素)终止消化。用弯吸管吸取碎骨片均匀接种于直径为 60 mm 的塑料平皿(Costar 公司, Denmark)中, 将平皿倒置于二氧化碳培养箱中, 预培养 2~3 h, 再缓缓加入足量的完全 DMEM 培养液, 继续培养。约第 5 天开始有细胞爬出。待细胞铺满平皿底部 70% 时, 去除碎骨片, 用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞, 在倒置相差显微镜下观察, 待细胞回缩细胞间隙增大后, 吸出消化液, 加入完全 DMEM 培养液, 用吸管反复轻轻吹打使细胞脱离平皿, 形成细胞悬液。

差减贴壁法纯化 OB: 将上述细胞悬液按 10^5 个/ml 接种于平皿中, 每 15 min 吸取培养液加入到另一新的培养皿中, 共 3 次。最后以 10^5 个/ml 接种于平皿中, 继续培养、传代。取第 3 代细胞进行实验。

(2) 样本处理

分别按如下方法取等量液体进行 ALPase 的测定。①第 3 代细胞培养 72 h 后取培养液上清。②第 3 代细胞培养 72 h 后, 倒掉培养液上清, PBS 清洗 2 遍, 加入 0.1% TritonX-100 作用 30 min 后收集裂解液备用。③第 3 代细胞培养 72 h 后, 倒掉培养液上清, 加入 PBS, 在 -20℃ 和 20℃ 之间反复冻融 3 次。

将收集的上述样本各 20 份, 置 4℃ 冰箱中备用, 并于 2 h 内测试完毕。

4. 仪器检测程序设置: 严格按照试剂盒说明书分别设置 3 种试剂盒的实验参数。

5. 仪器校准: 应用碳酸盐缓冲液、DEA 缓冲液、AMP 缓冲液等 3 种不同类型的缓冲液试剂, 分别以宝灵曼校准血清(c.f.a.s)进行仪器校准, 再进行室内质控血清测定, 质控结果在允许范围内, 则进行上述样本的测定。

6. 统计学分析

所有数据均采用 SPSS 软件的 one way ANOVA

方差分析, 组间 q 检验, $P < 0.01$ 为差异有显著性。

结 果

1. 不同缓冲液对 ALPase 活性测定的影响(表 1)

表 1 不同缓冲液和不同处理方法对 ALPase 活性测定的影响(U/L, $n = 20$)

样本	AMP			DEA			CO ₃ ²⁻		
	\bar{x}	<i>s</i>	CV(%)	\bar{x}	<i>s</i>	CV(%)	\bar{x}	<i>s</i>	CV(%)
上清液	20.96	2.14	10.21	38.27	2.72	7.11	16.95	0.93	5.49
冻融液	37.01	6.67	18.02	92.21	16.07	17.43	32.05	7.26	22.65
裂解液	69.13	5.20	7.52	174.44	12.113	6.95	58.21	5.64	9.69

由表 1 可以看出, 不论是上清液, 还是冻融液, 还是裂解液, 使用 DEA 缓冲液的测量值都为最高, 且不精密度(CV)小于其他两种缓冲液; AMP 缓冲液测量值较前者低, 碳酸盐缓冲液最低, 各组两两相比, 差异均有显著性($P < 0.01$)。

2. 不同处理方法对 ALPase 活性测定的影响

由表(1)显示, 不论是使用 DEA 缓冲液, 还是 AMP 缓冲液, 还是碳酸盐缓冲液, 裂解液中 ALPase 含量都为最高, 而冻融液次之, 上清液最低, 各组两两相比, 差异均有显著性($P < 0.01$)。其中冻融液 CV 较大。

讨 论

酶的催化活性只有在最佳缓冲系统内才能充分表达出来。目前测定血清 ALPase 常用的缓冲液有二乙醇胺(DEA)、碳酸盐(CO₃²⁻)、2-氨基-2-甲基-1-丙醇(AMP)3 种。由于 DEA 和 AMP 同时又是 ALPase 反应产物磷酸的受体, 从而可提高酶反应速度, 所以两者测定的 ALPase 活性高于在 NaCO₃-NaHCO₃ 缓冲液中测出的活性。以对-硝基酚磷酸盐(P-NPP)作底物, 在不同缓冲液中, 血清中 ALPase 的各型同功酶活性表达程度不一, 因此在进行的参考方法研究中 IFCC 充分注意这一点, 探讨了对骨、肝、胎盘等来源的同功酶均呈最适, 推荐使用 AMP 缓冲液。但此种方法是否适用于体外培养的细胞内 ALPase 活性的检测还有待探讨。据文献报道体外培养的细胞内 ALPase 活性测定尚缺乏统一方法^[3,4]。本研究对 3 种常用缓冲液测定体外培养的细胞内 ALPase 活性进行了观察, 检测结果显示: 不同的缓冲液对酶活性的表达不同, 以 DEA 缓冲液测定的 ALP 活性的敏感性最高, 且 CV 亦最小, 这提示 DEA 缓冲液可能更适宜体外培养的细胞内 ALPase 充分、准确地表达, 骨

(下转第 204 页)

到预防骨质疏松的作用的。我们过去的研究也证明了这一点^[5,6],我们曾经加大中药的剂量进行过研究,但中药的剂量再大,也不能使骨量达到对照组水平。主要原因就是中药壮骨肾宝对去卵巢后大鼠破骨细胞没有影响,不能阻止去卵巢后大鼠骨的高速吸收。用低剂量的雌激素抑制这种骨吸收,再用中药壮骨肾宝促进骨形成,是联合用药的主要思路。

4. 联合用药可完全地阻止去卵巢大鼠骨量的丢失,骨量与对照组接近

本实验结果表明,中药壮骨肾宝与低剂量雌激素联合用药组能明显增加去卵巢后大鼠的骨量和骨小梁数目,减少骨小梁分离度,其增加骨量的效应比单独应用高剂量雌激素的作用明显,与假手术对照组的骨量接近。联合用药对去卵巢后大鼠体重增加有抑制作用,对子宫仍有一定的刺激性。用骨组织形态计量学分析联合用药的骨药理作用发现,联合用药对去卵巢大鼠的破骨细胞活性有明显抑制作用。该作用比单用低剂量雌激素的作用还强,使破骨细胞的活性接近对照组。联合用药对去卵巢大鼠的骨小梁表面荧光周长百分率,单位骨小梁周长骨形成率,单位骨小梁面积骨形成率和单位骨小梁体积骨形成率也有明显的降低作用。这些作用可能与其抑制破骨细胞活性后,降低了由破骨细胞介导的骨形成的偶联作用,从而降低骨转换率,促进了骨量。

联合用药组骨小梁面积增加的效应超过了高剂量雌激素的作用,刚好是低剂量雌激素单独用药和壮骨肾宝单独用药的总和,骨小梁厚度,骨小梁数目,骨小梁间隙和破骨细胞周长百分率也刚好与对照组接近,提示了该组药方可有效地预防去卵巢大鼠的骨质疏松。由于观察到该复方制剂对大鼠子宫

还有一定的刺激性,在临床应用方面有缺陷。因此将雌激素的剂量再降低,或换一种雌激素再进行研究很有必要,争取找到更完善,更理想的预防和治疗骨质疏松的新配方。

参 考 文 献

- 1 Christiansen C. Treatment of osteoporosis. In: Lobo RA (ed). Treatment of postmenopausal woman, basic and clinical aspects. New York: Raven Press, 1994. 183-195.
- 2 Keating NL, Cleary PD, Rossi AS, et al. Use of hormone replacement therapy by postmenopausal women in United States. Ann Intern Med, 1999, 130: 545-553.
- 3 Richard LN, Mary T, Jane K, et al. Bone mineral density and the subsequent risk of cancer in the NHANES I follow-up cohort. BMC Cancer, 2002, 2: 22-31.
- 4 Simone D, Janine S, Diana MB, et al. Time-related effects of estrogen withdrawal on proliferation and cell death-related events in MCF-7 xenografts. Cancer, 1999, 81: 309-313.
- 5 吴铁, 李青南, 胡彬, 等. 壮骨胶囊防治类固醇大鼠肾阳虚的实验研究. 中国骨质疏松杂志, 1999, 5: 76-82.
- 6 李朝阳, 吴铁, 林柏云, 等. 芪藿肾宝与己烯雌酚对去卵巢大鼠骨代谢影响的定量研究. 中国骨质疏松杂志, 1997, 3: 68-71.
- 7 Baron R, Vignery A, Neff L, et al. Processing of undecalcified bone specimens for bone histomorphometry. In: Recker RR (ed.) Bone histomorphometry: techniques and interpretation. CRC, Boca Raton, Florida, 1983. 22-28.
- 8 Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Committee. J Bone Miner Res, 1987, 2: 595-610.
- 9 Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, et al. Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. Calcif Tissue Int, 1989, 45: 360-366.
- 10 Lobo A. Benefits and risks of estrogen replacement therapy. Am J Obstet Gynecol, 1995, 156: 1313-1322.