

依普拉芬对鸡胚成骨细胞的增殖和分化的影响

张皎 侯加法

【摘要】 目的 建立鸡胚额骨成骨细胞的培养方法,研究依普拉芬对其成骨细胞增殖和分化功能的影响。**方法** 采用混合胶原酶和胰酶、两次消化的方法,获取成骨细胞,经培养传代,取状态良好的第3代细胞在96孔板上进行增殖率和碱性磷酸酶活性的测定。**结果** 消化培养的细胞具有明显的成骨细胞的特点:属于成纤维细胞型、碱性磷酸酶黑染、基质前体红染,长期培养能形成矿化结节。应用依普拉芬后发现 10^{-4} mol/L IP 可抑制成骨细胞增殖,而 10^{-8} mol/L 对改善成骨细胞的增殖和分化有显著功效 ($P < 0.01$),小于 10^{-10} mol/L 浓度的 IP 则对成骨细胞与对照组无差异。**结论** 酶混合消化可以得到较纯的成骨细胞,应用依普拉芬研究表明,适宜浓度的 IP 可促进鸡胚额骨成骨细胞增殖和分化,提高其碱性磷酸酶活性,增强成骨细胞矿化,促使骨形成。

【关键词】 依普拉芬; 成骨细胞; MTT; PNPP

Effect of ipriflavone on osteoblastic cells from calvariae of embryonic chicken ZHANG Jiao, HOU Jiafa.

College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

【Abstract】 Objective To study the effect of different concentrations of ipriflavone on the proliferation and differentiation osteoblastic cells, based on the method of isolating the osteoblastic cells from calvariae of embryonic chicken. **Methods** The osteoblastic cells were harvested by sequential enzyme digestion (0.2% collagenase and 0.25% trypsin) from bone chips isolated from calvariae of embryonic chicken. A second or third passage culture was used, which was seeded in 96-well plates at the density of 1.5×10^4 , and cultured with 10^{-4} - 10^{-10} M ipriflavone for 72 h. Then MTT and PNPP methods were used to assay the proliferation rate and activity of AKP of osteoblastic cells. **Results** The cells were characteristic of osteoblast; they were of fibroblastic type, showed black deposits of AKP, red deposits of promatrix by cytochemical staining and formed mineralized nodes. With addition of ipriflavone, 10^{-4} M ipriflavone inhibited the osteoblastic function, but the 10^{-8} M ipriflavone significantly improved the proliferation and differentiation of osteoblasts, other concentration of ipriflavones had no obvious effect on the osteoblastic cells. **Conclusion** Pure chicken osteoblastic cells can be obtained by sequential digestion method. An appropriate concentration of ipriflavone promotes the proliferation and differentiation of chicken osteoblastic cell.

【Key words】 Osteoblastic cells; Ipriflavone; MTT; PNPP

依普拉芬(Ipriflavone),为人工合成的异黄酮类衍生物。研究表明依普拉芬可减少破骨细胞活性和骨吸收程度^[1],也能直接影响成骨细胞的生长和分化。本实验室试验证实,依普拉芬可以提高笼养蛋鸡骨转化、增加其骨量,防治骨质疏松^[2]。但对蛋鸡骨形成的细胞生物学基础性研究未见报道。本实验室在建立鸡胚额骨成骨细胞培养方法的基础上,观

察不同浓度的依普拉芬(武汉滨湖制药厂,批号:970304)对成骨细胞增殖和碱性磷酸酶表达的影响,从细胞学水平探讨依普拉芬促进蛋鸡骨形成的作用机制。

材料和方法

1. 鸡胚成骨细胞的培养:从16日龄鸡胚颅骨分离成骨细胞。颅骨沿矢状线和额缝线,分离腱缝组织和骨膜,并将其仔细剥离,清除附着在骨片上的血细胞和结缔组织直至骨片发白。颅骨在37℃ 0.25%胰酶液中消化20 min,在无二价离子的PBS

基金项目:国家自然科学基金(3977056),江苏省自然科学基金(Q990023)

作者单位:210095 南京农业大学动物医学院

液中剪成 1 mm^3 左右的小骨块经简单漩涡后取出,放入胰酶和胶原酶(GIBCO)的混合液(2.5 mg 胰酶和 2 mg 胶原酶/ml),消化两次,每次 40 min 。每次消化后,用金属滤网过滤,除去碎骨片,收集的消化液与等量的含新生牛血清的 MEM(Hyclone)培养液混合, 1000 r/min , 10 min 离心收集细胞。混合两次消化的细胞。用 10% 的新生牛血清 MEM 培养液重悬,接种在 25 ml 的培养瓶中,置于 37°C , $5\%\text{ CO}_2$ 培养箱 48 h 后换液。以后每 2 天换液 1 次。当细胞在培养瓶中贴壁生长完全汇合时,弃去培养液,用 0.25% 的胰蛋白酶消化传代。选第 3 代生长良好的细胞做细胞鉴定或药效试验。

2. 碱性磷酸酶染色(AKP):半汇合前将细胞用戊二醛固定,蒸馏水冲洗,加入孵育液 $1\sim 2\text{ ml}$, 37°C 孵育(按华美生物工程公司的 NBT/BCIP 染色试剂盒说明操作)。光镜观察。

3. 基质前体染色(PAS):半汇合前细胞用乙醇固定, 1% 醇性过碘酸溶液作用, Schiff 液染色。光镜观察。

4. 矿化结节染色(ARS):成骨细胞体外矿化可形成白色结节,用茜素红染色。光镜观察。

5. 依普拉芬对成骨细胞功能的影响

(1) 增殖率测定^[3](MTT 法):常用的细胞增殖检测方法。将第 3 代细胞 3×10^4 个/ml 接种于 96 孔板上,分别用含 $10^{-4}\sim 10^{-10}\text{ mol/L}$ 不同浓度的依普拉芬 MEM 培养 72 h ,用 PBS 冲洗后更换无血清培养液按常规 MTT 实验方法处理细胞,在酶标仪上(波长 570 nm)测定 OD 值。

(2) 碱性磷酸酶活性定量检测(PNPP 法):加药物方法及细胞培养方法同上。在细胞汇合前弃培养液,用 PBS 冲洗,加 50 mmol/L DEA 裂解细胞,后加 3 mmol/L PNPP, 37°C 孵育,用 0.2 mmol/L NaOH 终止反应。在酸标仪上(波长 405 nm)测定 OD 值,检测其相对活性。

6. 统计学处理:将所测得的各 OD 值用 SPSS 10.0 软件包进行统计处理。采用方差分析,结果用均数 $\pm$ 标准差表示。

结 果

1. 原代和传代细胞的形态观察:原代培养的细胞一般在 24 h 后开始贴壁,细胞形成短突起,小三角形。 48 h 后细胞铺开,变大,有多突起呈星形。细胞传代后生长快而稳定, 24 h 基本已呈星形铺开,形态较一致,多数为三角形、方形。

2. 碱性磷酸酶染色:成骨细胞具有合成分泌 AKP 功能。染色显示大部分细胞呈阳性,细胞浆为棕黑色,功能活跃细胞着色较深,细胞轮廓清晰,见图 1。

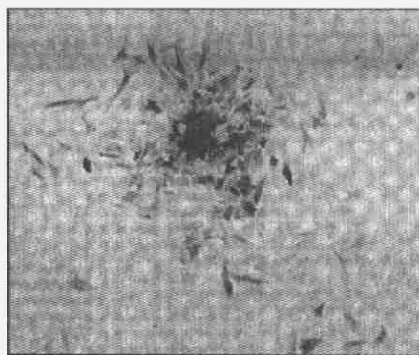


图 1 成骨细胞碱性磷酸酶染色(NBT/BCIP) $40\times$

3. 基质前体染色:成骨细胞胞浆含丰富的基质前体成分,染色显示在胞质呈红色阳性反应。

4. 矿化结节染色:成骨细胞在长期的体外培养过程中具有矿化特征,是成骨细胞的重要特征,染色显示团块状红色反应,见图 2。

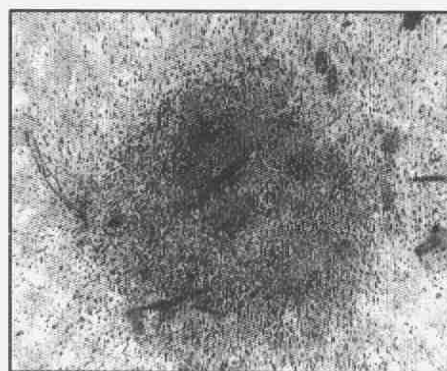


图 2 矿化结节茜素红染色显示红色钙化基质($100\times$)

5. 依普拉芬对成骨细胞药效评价

(1) MTT 法检测结果表明, 10^{-4} 、 10^{-5} mol/L 的依普拉芬明显抑制成骨细胞增殖($P < 0.01$);小于 $10^{-6}\sim 10^{-9}\text{ mol/L}$ 的依普拉芬可以促进成骨细胞的增殖,其中 10^{-8} mol/L 有显著作用($P < 0.01$);其他浓度差异不显著($P > 0.05$),见表 1。

(2) PNPP 法检测结果表明, 10^{-4} 、 10^{-5} mol/L 的依普拉芬明显抑制成骨细胞合成分泌碱性磷酸酶($P < 0.01$);小于 10^{-6} mol/L 的依普拉芬可以促进成骨细胞合成分泌碱性磷酸酶,其中 10^{-8} mol/L 有显著作用($P < 0.01$);其他浓度差异不显著($P > 0.05$),见表 2。

表 1 依普拉芬作用下成骨细胞增殖效应与碱性磷酸酶合成效应 OD 值变化

指标	对照组	10 ⁻⁴ mol/L	10 ⁻⁵ mol/L	10 ⁻⁶ mol/L	10 ⁻⁷ mol/L	10 ⁻⁸ mol/L	10 ⁻⁹ mol/L	10 ⁻¹⁰ mol/L
成骨细胞	0.2075 ± 0.0260	0.0775 ± 0.0071**	0.014 ± 0.0193**	0.2338 ± 0.0550	0.22 ± 0.0370	0.2425 ± 0.0523**	0.2263 ± 0.0230	0.2075 ± 0.0158
碱性磷酸酶	0.2076 ± 0.0211	0.1383 ± 0.0126**	0.1851 ± 0.0256**	0.2254 ± 0.0363	0.2431 ± 0.0495	0.2576 ± 0.0519**	0.2485 ± 0.0526	0.2073 ± 0.0237

注:与对照组比较** $P < 0.01$

讨 论

1. 鸡胚成骨细胞建立的意义:骨在生命过程中不断更新,是一种代谢活跃的组织,主要有两种细胞成骨细胞和破骨细胞发挥作用。成骨细胞是骨发生和骨形成的重要细胞,具有合成、分泌组成骨基质的胶原和糖蛋白的作用,并通过钙化基质形成骨组织。另外,成骨细胞在维持体内环境的稳定、生理机制调节和骨代谢性疾病中亦发挥重要作用。随着细胞试验技术和分子生物学技术的发展,笼养蛋鸡骨质疏松症病理发生机制及其药物防治作用机理必须在细胞和分子水平上进行研究。因此,建立鸡成骨细胞体外培养系统对笼养蛋鸡骨质疏松症研究具有重大意义。我们主要参考国内外学者的相关成骨细胞培养方法^[4,5],经反复摸索,改进,建立了比较成熟的成骨细胞培养系统。关键在于:(1)清除附着在颅骨片上的骨膜、反复用 PBS 冲净血细胞,直至骨片接近透明,减少成纤维细胞和红细胞的污染;(2)首次 20 min 消化下来的细胞悬液多是成纤维细胞,应丢弃;(3)两酶混合消化两次,保证尽可能多的获取成骨细胞。至此,基本可以得到较高纯度的成骨细胞。

2. 鸡胚成骨细胞的鉴定:体外培养的细胞属于贴壁生长的纤维母细胞型细胞,失去了体内正常时的形态和与其他细胞之间存在的空间结构关系,光镜活体及一般的电镜结构观察并不具有明显的形态学特征。需要进行成骨细胞的特异性鉴定^[6]:功能活跃的成骨细胞含有丰富的碱性磷酸酶,是成骨细胞的特异性标志酶,本研究采用碱性磷酸酶染色, NBT/BCIP 阳性反应检测,可见细胞胞浆有黑色颗粒密集或块状沉淀;成骨细胞是典型的蛋白分泌型细胞,可大量合成基质前成分,应用过碘酸-Schiff 氏法细胞化学染色,呈红色阳性反应;另外,能直接反映其功能的是在长期培养下的成骨细胞具有形成矿化结节的能力,碱性磷酸酶促进有机磷分解使钙盐沉积,形成肉眼可见的白色矿化结节,经 0.1% 茜素红细胞化学染色法呈现红色反应。

3. 不同浓度依普拉芬对成骨细胞的影响:依普拉芬在临床用于治疗绝经后骨质疏松,主要能抑制

骨吸收、促进骨形成,增强骨骼强度却不影响骨骼钙、磷、镁灰分^[7]。体外试验表明,依普拉芬具有促进成骨细胞增殖,抑制成熟破骨细胞募集,减少其前体增殖,促进 I 型胶原、骨唾液蛋白、decorin 表达和矿化基质沉积等作用^[8,9]。依普拉芬在人成骨细胞 (Saos-2) 和破骨细胞前体 (FLG 29.1) 共培养体系的研究中发现有一成骨细胞介导的对破骨细胞的复合作用,对其有适度的促增殖作用^[1]。培养第三代 72 h 的成骨细胞有较一致的形态,生长旺盛。从细胞增殖和碱性磷酸酶分化功能的研究结果来看,依普拉芬可剂量依赖性地影响该期成骨细胞的增殖和碱性磷酸酶的合成,且有相似浓度对两者共同促进的效应。即合适浓度下进一步增加细胞数目,并刺激细胞的碱性磷酸酶合成。一般认为成骨细胞表型发展顺序分为 3 个阶段:增殖阶段、细胞外骨基质成熟阶段及骨基质矿化阶段。10⁻⁸ mol/L 剂量的依普拉芬同时使成骨细胞较为活跃地增殖和分化的综合效应是能形成较多的骨细胞并促进基质钙化进程,加速其表型发展,是维持或增加骨密度的细胞水平基础之一。但高浓度的依普拉芬分别抑制其增殖和活化功能,浓度过低则培养的成骨细胞与对照组无差别,即无药效作用。我们建议该药在临床运用防治笼养蛋鸡骨质疏松时应注意给药剂量,过高浓度反而抑制体内成骨细胞功能,减少骨形成;浓度过低则无效应。

参 考 文 献

- Bonucci E, Silvestrini G. Cytological and ultrastructural investigation in osteoblastic and preosteoclastic cells grown *in vitro* in the presence of ipriflavone: preliminary results. Bone and Mineral, 1992, 19 (Suppl): s15-s25.
- 张皎,朱晓英,侯加法. 低普拉芬对产蛋后期笼养蛋鸡生产性能和骨代的影响. 中国兽医学报, 2003, 23: 613-615.
- 朱文菁,金慰芳. MTT 法分析培养成骨细胞的存活和增殖能力. 上海医科大学学报, 1995, 22: 254-257.
- Louis C Gerstenfeld, Stewart D. Expression of differentiated function by mineralizing cultures of chicken osteoblasts. Developmental Biology, 1987, (22): 49-59.
- 张菊英,饶寒敏. 鸡胚骨髓成骨样细胞¹⁴C-脯氨酸掺入动力学观察. 上海医科大学学报, 1996, 16: 420-423.
- 王洪复,金慰芳. 骨质疏松防治药物的体外细胞药效评价. 中国

(下转第 177 页)

量丢失的速度各不相同,女性较男性更明显。女性 50 岁以后,特别是绝经后,雌激素水平显著下降,因为雌激素可降低骨转换和抑制骨质吸收,当雌激素水平下降时,骨丢失增加^[1,2]。女性绝经后,骨质疏松症发病率增高,所以应及早做好预防和宣传工作,以减少骨质疏松症发生率。

腰椎各椎体 BMD 值各不相同,从 $L_1 \sim L_3$ BMD 值逐渐降低,而且与性别、年龄无关。在 50 岁以前,腰椎骨密度值女性略高于男性,与国内有关报道有差别^[3],可能与检查的设备有关。以前检查的设备多为双能 X 线骨密度仪(DEXA),测量是在腰椎的前后位上进行的,受椎体终板增生、椎间盘钙化、椎体骨质增生、骨桥形成等影响,而使其 BMD 值增大^[4]。QCT 骨密度测量时,取椎体中部,不受椎体终板增生、椎间盘钙化、椎体骨质增生、骨桥形成等影响,比

较准确。

QCT 骨密度测量方法简单,是一种非侵入性的测量方法,所测量的部位为椎体骨密度变化最敏感的部位,可作为诊断骨质疏松症、观察疗效的敏感手段,也可作为老年性骨质疏松的普查手段。

参 考 文 献

- 1 Diaz Curiel M, Carrasco dela Pena JL, Honotato Perez J, et al. Study of bone mineral density in lumbar spine and femoral neck in a Spanish population. *Osteoporos Int*, 1997,7:59.
- 2 Turner LW, Fu Q, Taylor JE, et al. Osteoporotic fracture among older U.S. women: risk factor quantified. *J Ageing Health*, 1998, 10:372.
- 3 吴青,刘建立,陶国枢,等.骨密度随年龄变化特点及某些有关因素分析. *中国老年医学杂志*, 1994,6:323-324.
- 4 朱继华,张卫国,张延军,等.大连地区 1112 名正常人群骨密度测定结果分析. *中国骨质疏松杂志*, 2002,8:75-77.

(收稿日期:2004-01-22)

(上接第 197 页)

的需求。类似结果还未见报道,除了体内激素浓度变化影响外,可能受孕次和产次不同者的生活习惯和生活条件的影响,另外本研究病例数量有限,还需进一步扩大样本量临床研究及动物实验研究证实。

参 考 文 献

- 1 陈金标,秦林林,张卫,等.体重、体成分与骨密度的关系. *中国骨质疏松杂志*, 1997,3(1):15-18.
- 2 Lees CJ, Jerome CP, Register TC, et al. Changes in bone mass and bone biomarkers of cynomolgus monkeys during pregnancy and lactation. *J Clin Endocrinol metab*, 1998,83:4298-4302.

- 3 Honda A, Kurabayashi T, Yahata T, et al. Lumbar bone mineral density changes during pregnancy and lactation. *Int J Gynaecol Obstet*, 1998,63:253-258.
- 4 Ulrich U, Miller PB, Eyre DR, et al. Bone remodeling and bone mineral density during pregnancy. *Arch Gynecol Obstet*, 2003,268:309-316.
- 5 Fiore CE, Pennisi P, Distefano A, et al. Pregnancy-associated changes in bone density and bone turnover in the physiological state: prospective data on sixteen women. *Horm Metab Res*, 2003,35:313-318.
- 6 Yoneyama K, Ikeda J. Recovery of bone mineral density following pregnancy and lactation a longitudinal study. *Nippon Koshu Eisei Zasshi*, 2002,49:507-515.
- 7 高兰兴,刘继鹏,主编.实用营养保健手册.北京:人民军医出版社,1997.86-87.

(收稿日期:2004-01-08)

(上接第 214 页)

年轻人今后发生骨质减少和骨折的危险增大。我们在临床实践中体会到,对于活动性幼年型强直性脊柱炎病人,既要有针对性地进行抗炎治疗,还应同时积极地进行抗骨质疏松治疗。本研究的病人中有 1 例经抗炎和抗骨质疏松的综合治疗 2 年后,病情稳定,多次重复测定骨密度也有所上升,尽管第 1 次骨密度测定结果为重度骨质疏松,2 年后转为正常。

参 考 文 献

(上接第 238 页)

骨质疏松杂志,1999,2:58-62.

- 7 Civitelli R. *In vitro* and *in vivo* effects of ipriflavone on bone formation and bone biomechanics. *Calcif tissue Int*, 1997,61(Suppl. 1):s12-14.

- 1 陈丽华.早期强直性脊柱炎病人的骨质疏松. *中国骨质疏松杂志*, 2001,7:326-328.
- 2 Baek HJ, Shin KC, Lee YJ, et al. Juvenile onset ankylosing spondylitis (JAS) has less severe spinal disease course than adult onset ankylosing spondylitis (AAS): clinical comparison between JAS and AAS in Korea. *The Journal of Rheumatology*, 2002,29:1780-1785.
- 3 Donnelly S, Doyle DV, Denton A, et al. Bone mineral density and vertebral compression fracture rate in ankylosing spondylitis. *Annals Rheumatic Disease*, 1994,53:117-121.

(收稿日期:2003-10-15)

- 8 Marja Luisa Brandi. Ipriflavone *in vitro* and *in vivo* effects on bone metabolism. *Osteoporosis Academic Press Inc*, 1996:1335-1342.
- 9 裴春改,赵燕玲,刘忠厚,等.依普拉芬治疗骨质疏松的基础研究. *中国骨质疏松杂志*, 1997,(4):86-88.

(收稿日期:2003-09-01)