

被动吸烟对大鼠骨代谢和血浆 TNF 水平的影响

雷光华 李康华 李晶 周江南

摘要: **目的** 探讨吸烟诱导骨吸收的可能机理。**方法** 将 32 只 Wister 大白鼠随机分成 4 组, 分别予以不吸烟、被动吸烟 2 个月、3 个月和 4 个月; 检测血清骨钙素、尿钙与尿肌酐以及血浆肿瘤坏死因子 (TNF) 水平。**结果** 4 组大鼠血清骨钙素水平差异无显著性; 吸烟 2 个月组与对照组尿 Ca/Cr 差异无显著性, 吸烟 3 个月和 4 个月组大鼠尿 Ca/Cr 分别为 0.787 ± 0.226 和 0.781 ± 0.217 , 显著低于对照组 ($P < 0.05$)。3 个实验组大鼠血浆 TNF 水平均显著高于空白对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$), 且随吸烟时间延长 TNF 水平升高, 二者呈正相关; 直线回归方程式为 $Y = 0.048X + 0.8902$, $r = 0.989$ ($P < 0.05$)。**结论** 被动吸烟可使大鼠骨吸收增强, 从而导致骨丢失、发生骨质疏松; 而吸烟升高血浆 TNF 水平可能是吸烟刺激骨吸收、导致骨质疏松的机理之一。

关键词: 骨质疏松; 被动吸烟; 肿瘤坏死因子; 骨钙素; 钙; 肌酐; 大鼠

Effects of passive smoking on bone metabolism and plasma TNF level in rats LEI Guanghua, LI Kanghua, Li Jing, et al. Department of Orthopaedics, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China

Abstract: **Objective** To investigate the pathogenesis of bone resorption induced by smoking. **Methods** Thirty-two Wister rats were distributed randomly into 4 groups: A, B, C and D. Group A was used as sham control. Group B, C and D were exposed to passive cigarette smoking daily for 2, 3 and 4 months, respectively. The level of plasma TNF was measured in the end. Correlation analysis was performed between TNF and the duration of smoking. The bone mineral density (BMD) *in vivo* of each group and the one of skeletons *in vitro* of group A and D was measured, and serum osteocalcin, urinary calcium, urinary creatinine were detected. **Results** The level of plasma TNF in group B, C and D were significantly greater than that of control and positively correlated to the duration of smoking ($Y = 0.048X + 0.8902$, $r = 0.989$, $P < 0.05$). No difference was observed in serum osteocalcin among all groups. The proportionate of urinary calcium/creatinine was significantly higher in group C and D (0.787 ± 0.226 and 0.781 ± 0.217) than that of control ($P < 0.05$). There was a negative correlation between BMD and the proportionate urinary calcium/creatinine in group D. **Conclusions** Passive smoking accelerates bone resorption, and increases bone loss leading to osteoporosis. This might due to the elevated serum TNF level caused by smoking.

Key words: Smoking, Passive; Osteocalcin; Calcium; Creatinine; Rat; Osteoporosis; Tumor necrosis factor

骨质疏松症的病因很多, 发病机理复杂。近年来, 吸烟与骨质疏松的关系已经开始引起人们的重视^[1], 但吸烟在骨质疏松发病中如何发挥作用尚不十分明确。笔者试图通过观察被动吸烟对大鼠生化代谢和血浆肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 水平的影响来进一步明确吸烟与骨质疏松的关系并

探讨其可能的作用机理。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组

6 月龄 Wister 大白鼠 32 只 (中南大学湘雅医学院实验动物学部提供), 雌雄各 16 只, 体重 (272 ± 25.4) g; 随机平均分成 4 组: A 组为空白对照组 (不吸烟), B、C、D 组为实验组, 每组雌雄各 4 只; 分别给予被动吸烟 2 个月、3 个月和 4 个月; 分笼饲养, 自来水加标准饲料 (含钙 1% 和磷 0.6%) 喂养, 每日光照 12 h, 适应 1 周后开始实验。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30300396)

作者单位: 410008 长沙, 中南大学湘雅医院骨科 (雷光华、周江南、李康华); 中南大学湘雅二医院脊柱外科 (李晶)

通讯作者: 雷光华, Email: lgh9640@tom.com

1.2 主要仪器与试剂

自动 γ 计数仪、自动生化检测仪、低温离心机、TNF 放免试剂盒(北京东亚免疫技术研究所)、骨钙素放免试剂盒(北京东亚免疫所),香烟(彩丽牌,烤烟型,含烟碱 1.0 mg,湖南桑植卷烟厂生产)。

1.3 实验方法

1.3.1 模型制作:采用“密室熏烟法”给予被动吸烟。将实验组(B、C、D 组)动物同时移至专供熏烟的实验室(面积 6 m²),关闭门窗,空调通风换气,控制室温 20 ℃;每天上、下午各熏烟 1 次,前 2 个月每次同时点燃香烟 120 支,第 3 个月同时点燃 80 支,第 4 个月同时点燃 40 支;每只大鼠合 5 支香烟,每次被动吸烟 1 h。

1.3.2 代谢生化指标测定:每组大鼠实验完毕当晚置代谢饲养笼饲养 12 h,次晨收集 12 h 空腹尿液,经自动生化仪测定尿钙(calcium, Ca)与尿肌酐(creatinine, Cr),计算出 Ca/Cr 比值;再经腹主动脉抽血 2 ml,采用放免法测定血清骨钙素(bone gla protein/osteocalcin, BGP)。

1.3.3 血浆 TNF 测定:每组大鼠处死前均经腹主动脉抽血 2 ml,肝素抗凝,4 ℃ 1500r/min 离心 5 min,取上层血浆于 EP 管中, -20 ℃ 保存,采用液相竞争放射免疫分析法,所有标本一次测定。

1.3.4 统计学处理:所有结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS for Windows10.0 软件进行统计学分析,两组样本均数间比较采用 *t* 检验,多组样本间比较采用成组设计多个均数比较的方差分析,当 $P < 0.05$ (即差异有显著性)时,继续做多个实验组与对照组间的两两比较。两变量间关系采用直线相关分析与直线回归分析, $P < 0.05$ 则具有统计学意义。

2 结果

2.1 被动吸烟对大鼠血清 BGP 与尿 Ca/Cr 的影响

4 组大鼠血清骨钙素水平差异无显著性;吸烟 2 个月组与对照组尿 Ca/Cr 差异无显著性,吸烟 3 个月组与 4 个月组大鼠尿 Ca/Cr 分别为 0.787 ± 0.226 和 0.781 ± 0.217 ,显著低于对照组 ($P < 0.05$),见表 1。

表 1 大鼠血清 BGP、尿 Ca/Cr 和血浆 TNF 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	BGP/(μ g/L)	Ca/Cr	TNF(ng/ml)
A	1.655 ± 0.763	0.530 ± 0.207	0.897 ± 0.182
B	1.414 ± 0.830	0.523 ± 0.187	$1.146 \pm 0.199^*$
C	1.475 ± 0.813	$0.787 \pm 0.226^*$	$1.354 \pm 0.198^{**}$
D	1.188 ± 0.529	$0.781 \pm 0.217^*$	$1.438 \pm 0.304^{**}$

注:与 A 组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 被动吸烟对大鼠血浆 TNF 水平的影响

B 组大鼠血浆 TNF 水平与对照组比较差异有显著性 ($P < 0.05$),C 组和 D 组大鼠血浆 TNF 水平与对照组比较差异也有显著性 ($P < 0.01$, $P < 0.01$),见表 1。随着吸烟时间的延长,血浆 TNF 水平逐渐升高,二者呈正相关,直线回归方程式为 $Y = 0.048X + 0.8902$, $r = 0.989$ ($P < 0.05$)。

3 讨论

人所共知吸烟有害健康,其对骨质疏松的影响近 10 年才引起重视;都认为吸烟可以导致男女性骨丢失、骨密度降低以及增加骨质疏松的发生率,吸烟已被认为是骨质疏松的主要危险因素之一;但目前的研究还仅限于流行病学调查,尚无实验性研究报告^[1-3]。我们通过给予大鼠不同的被动吸烟量后检测其血浆尼古丁浓度,发现每只大鼠每天被动吸烟 2 次、每次 5 支香烟时,其血浆尼古丁浓度基本相当于文献报道的人类每天吸 30 支香烟的血浆尼古丁浓度 42 ng/ml^[4]。故本研究选择该吸烟量对实验组大鼠进行干预。

骨骼一生都处在不停的代谢活动中,破骨细胞吸收旧骨,成骨细胞再形成新骨,正常状态下骨形成与骨吸收相互偶联达到动态平衡。一旦某种原因使其失去偶联,骨形成减少或(和)骨吸收增加,都将导致骨丢失而发生骨质疏松^[5],吸烟引起骨丢失的主要环节是骨形成减少,还是骨吸收增加,国内外尚未见有报道。骨钙素(BGP)是成骨细胞合成的一种肽类物质,血清 BGP 可直接反映成骨细胞的活性,当骨形成与骨吸收失偶联时是反映骨形成的特异指标,空腹尿 Ca/Cr,即每克尿 Cr 排出的尿 Ca 是常用的反映骨吸收的指标。本研究结果显示,3 个实验组大鼠血清 BGP 和对照组比较差异无显著性 ($P > 0.05$);这与文献报道一致,Ortego-Centeno 等^[6]也发现吸烟对绝经后妇女血清 BGP 没有影响。Cubriilo 等^[7]报道围绝经期吸烟妇女骨吸收生化指标显著升高。在本研究中,C、D 组大鼠尿 Ca/Cr 也显著高于对照组 ($P < 0.05$),而 B 组大鼠尿 Ca/Cr 没有明显升高。提示大鼠吸烟 3 个月后开始有骨吸收增加,吸烟导致骨丢失可能是以增加骨吸收为主,而对骨形成没有明显影响;提示反映骨吸收的骨代谢生化指标尿 Ca/Cr 较骨密度对骨吸收的增加更敏感,测定血尿骨代谢生化指标可以早期预测和诊断骨质疏松,同时也进一步证实吸烟所致骨密度变化与骨吸收有关。

近年来大量研究表明 TNF 在体内、体外都有很强的骨吸收诱导作用。Zheng 等^[8]发现绝经后 10 年内,骨质疏松妇女外周血单个核细胞释放 TNF 明显高于非绝经妇女或绝经后用雌激素替代治疗的妇女,且与腰椎骨密度负相关。还有研究发现在体外培养骨组织时,加入 TNF 可以明显促进破骨细胞骨吸收,表现为促进破骨细胞前体分化成熟、使破骨细胞活性增强^[9]。Kimble 等^[10]对去势大鼠用肿瘤坏死因子结合蛋白(TNFbp)治疗后,发现股骨干骺端骨小梁表面破骨细胞减少,同时骨吸收生化指标降低。Amman 等^[11]将转基因高水平表达可溶性 TNF 受体的小鼠与对照组切除卵巢,12 周后对照组骨量减少。这些研究都证明, TNF 在雌激素缺乏引起的骨质疏松中起关键作用, TNF 有促进骨吸收的功能, 雌激素缺乏时失去了对 TNF 的调控作用而发生骨质疏松, 当使用 TNF 拮抗剂(TNFbp、TNFR 等)阻滞 TNF 的作用时则可以减少骨吸收。本研究结果显示, 实验组大鼠被动吸烟后血浆 TNF 水平显著高于对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$); 提示吸烟可以促进体内单个核细胞分泌 TNF, 与国外相关报道一致。Tappia 等^[12]发现吸烟者较不吸烟者血液中 TNF 产物要高 38% ($P = 0.01$); Rylander^[13]也报道吸烟可以刺激 TNF 的分泌; Heimdal 等^[14]还发现吸烟者外周血单个核细胞用自体血清体外培养时分泌 TNF 较对照组显著升高。吸烟升高血浆 TNF 水平的机理尚不清楚。有文献报道吸烟可以降低雌激素水平和活性, 而雌激素降低则失去对 TNF 分泌的抑制而使其升高; 这可能是其机理之一, 其确切机制还有待进一步研究。

综上所述, 吸烟可以增加骨吸收, 使骨形成与骨吸收失偶联而导致骨丢失, 最终发生骨质疏松, 同时升高血浆 TNF 水平, 提示吸烟所致骨质疏松可能与 TNF 刺激骨吸收增加有关。因此非常有必要大力倡导戒烟, 防止吸烟与被动吸烟, 预防或延缓骨质疏松的发生。

【参 考 文 献】

[1] Melhus H, Michaelsson K, Holmberg L, et al. Smoking, antioxidant

vitamins, and the risk of hip fracture. *J Bone Miner Res*, 1999, 14: 129-135.

- [2] Krall EA, Dawson HB. Smoking increase bone loss and decrease intestinal calcium absorption. *J Bone Miner Res*, 1999, 14: 215-220.
- [3] Vogel JM, Davis JW, Nomura A, et al. The effects of smoking on bone mass and the rates of bone loss among elderly Japanese-American men. *J Bone Miner Res*, 1997, 12: 1495-1501.
- [4] Epping-Jordan MP, Watkins SS, Koob GF, et al. Dramatic decrease in brain reward function during nicotine withdrawal. *Nature*, 1998, 393: 76-79.
- [5] Siddiqui NA, Shetty KR, Dutte EH. Osteoporosis in old men: discovering when and how to treat it. *Geriatrics*, 1999, 54: 20-37.
- [6] Ortego-Centeno N, Munoz-Torres M, Jodar E, et al. Effect of tobacco consumption on bone mineral density in healthy young males. *Calcif Tissue Int*, 1997, 60: 450-496.
- [7] Cubrilo TM, Stavljencic RA, Turek S, et al. The usefulness of biochemical bone marker in predicting the response of hormone replacement therapy in perimenopausal cigarette smoking healthy women. *Coll Antropol*, 1999, 23: 195-201.
- [8] Zheng SX, Vrindts Y, Lopez M, et al. Increase in cytokine production (IL-1 β , IL-6, TNF but not IFN- γ , GM-CSF or LIF) by stimulated whole blood cells in postmenopausal osteoporosis. *Maturitas*, 1997, 26: 63-71.
- [9] Waki Y, Nomura M, Kasugai S, et al. Walker 256/s carcinosarcoma causes osteoporosis-like changes through ectopic secretion of hormone. *Cancer Res*, 1999, 59: 1219-1224.
- [10] Kimble RB, Matayoshi AB, Vannice JL, et al. Simultaneous block of IL-1 and TNF is required to completely prevent bone loss in the early postovariectomy period. *Endocrinology*, 1995, 136: 3054-3061.
- [11] Amman P, Rizzoli R, Bonjour JP, et al. Transgenic mice expressing soluble tumor necrosis factor-receptor are protected against bone loss caused by estrogen deficiency. *J Clin Invest*, 1997, 99: 1699-1703.
- [12] Tappia PS, Troughton KL, Langley-Evans SC, et al. Cigarette smoking influences cytokine production and oxidant defences. *Clin Sci*, 1995, 88: 485-489.
- [13] Rylander R. Environmental exposures with decreased risk for lung cancer? *Int J Epidemiol*, 1990, 19: s67-s72.
- [14] Heimdal JH, Aarstad HJ, Klemetsen B, et al. Ex-vivo IL-1 β , IL-6, IL-12 and TNF- α responsiveness with monocytes from patient with head and neck carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 1999, 256: 250-256.

(收稿日期: 2004-10-20)