

阿仑膦酸钠对 1 型糖尿病骨质疏松大鼠体外培养的破骨细胞作用

李玉坤 尚可 王燕 杨韧

摘要:目的 研究第三代二膦酸盐类药物阿仑膦酸钠(alendronate, 固邦)对体外培养的 1 型糖尿病骨质疏松大鼠的破骨细胞的作用。方法 建立 1 型糖尿病骨质疏松大鼠模型,于 0、2、4 和 8 周进行体外骨髓破骨细胞样细胞(OLC)培养,并进行阿仑膦酸钠干预,观察 OLC 数量变化。结果 1 型糖尿病组大鼠 OLC 高于正常对照组;1 型糖尿病骨质疏松组大鼠 OLC 高于 1 型糖尿病组;在所有干预组中,阿仑膦酸钠显著减少 OLC($P < 0.01$)。结论 破骨细胞形成增加可能是 1 型糖尿病骨质疏松的原因之一,阿仑膦酸钠抑制 1 型糖尿病骨质疏松大鼠体外培养的 OLC 的形成。

关键词: 1 型糖尿病骨质疏松大鼠;破骨细胞样细胞;体外骨髓细胞培养;阿仑膦酸钠

Effects of Alendronate on osteoclasts cultured with bone marrow cells *in vitro* in type 1 diabetic osteoporosis rats LI Yukun, SHANG Ke, WANG Yan et al, Department of Endocrinology, the Third Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of alendronate on osteoclasts cultured with bone marrow cells *in vitro* in rats with type 1 diabetes mellitus (T1DM). **Methods** Sixty 2.5 to 3-month-old female Wistar rats were divided into four groups. Rats model of T1DM were established by celioinjection of single dose of streptozotocin. Rats in group DOVX were subjected to ovariectomy. At the 0, 2, 4 and 8 weeks after ovariectomy, the femur bone marrow were cultured in the presence of macrophage colony stimulating factor (M-CSF) and receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL), and alendronate was added to the culture medium to the final concentrations of 10^{-7} mol/L. **Results** In the whole group of T1DM, the number of osteoclast-like cells (OLCs) was higher than that of the control. Compared with DC, DS, and the number of OLCs in DOVX were more ($P < 0.01$). There was no difference in the number of OLCs between group DC and group DS ($P > 0.05$). The number of OLCs in every group was greatly inhibited by alendronate ($P < 0.01$). **Conclusions** The increased number of osteoclast might be one of the reasons for the development of osteoporosis in rat with T1DM, while Alendronate can inhibit *in vitro* OLCs formation in these rats.

Key words: Type 1 diabetic osteoporosis; Bone marrow cell; *In vitro*; Osteoclast-like cell; Alendronate

糖尿病(diabetes mellitus, DM)的发病率逐年上升,由糖尿病引起的骨质疏松(OP)也随之增多,糖尿病状态下存在骨代谢异常,许多研究表明,1 型糖尿病与骨量减少有密切关系。因此如何防治 1 型糖尿病患者骨量的丢失逐渐受到重视。

骨质疏松时骨吸收大于骨形成,因而导致骨量减少。在骨质疏松的发病过程中破骨细胞(osteoclast, OC)起着极其重要的作用。这种多核细胞是骨吸收的主要细胞,其功能和行为也是目前研究骨质疏松的难点和焦点。由于目前尚无可利用的破骨细胞株,所以人们尝试用体外培养破骨细胞样细胞(osteoclast-like cell, OLC)的方法来研究破骨细胞的行为和影响因素。本研究在建立 1 型糖尿病骨质疏松大鼠模型的基础上,通过体外 OLC 培养,动态观察 1 型糖尿病骨质疏松大鼠与正常大鼠的 OLC 生长规律、特点以及 OLC 数量的变化,用第三代二膦酸盐类药物阿仑膦酸钠(alendronate, 固邦)在体外

基金项目 河北省自然科学基金资助项目(303496);河北省卫生厅基金资助项目(3166);河北省高等学校博士基金资助项目(B2004203)

作者单位:050051 石家庄,河北医科大学第三医院内分泌科(李玉坤、王燕);河北工程学院医学院(尚可);河北科技大学理学院(杨韧)

通讯作者:李玉坤,Email liyukun@medmail.com.cn

对 OLC 进行药物干预,从细胞水平探讨阿仑膦酸钠在体外对破骨细胞的作用。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)购自 Sigma 公司,细胞核因子 kB 受体活化因子配基(receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, RANKL)购自 Chemicon 公司,巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)购自 Sigma 公司,24 孔培养板购自 Costar 公司, α -MEM 培养基购自 Sigma 公司,抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)试剂盒购自 Sigma 公司,胎牛血清(FBS)购自杭州四季青生物工程材料研究所,阿仑膦酸钠(固邦)由石家庄制药集团提供。

1.2 方法

1.2.1 动物分组:健康雌性 Wistar 大鼠 44 只(购自河北医科大学实验动物中心,清洁级,动物合格证书编号:DK 0312-0064,普通饲料饲养,自由摄食、饮水,12 h 日光交替照射),2.5~3 月龄,体重 180 g~220 g。大鼠适应性喂养 1 周后随机分为正常对照组(NC 组,8 只)、1 型糖尿病对照组(DC 组,12 只)、1 型糖尿病假手术组(DS 组,12 只)、1 型糖尿病双侧卵巢切除组(DOVX 组,12 只)组间大鼠体重无统计学差异。

1.2.2 1 型糖尿病模型制备:对 DC 组、DS 组、DOVX 组共 36 只大鼠禁食 12h 后,进行单剂量链脲佐菌素(streptozotocin, STZ,柠檬酸钠缓冲液制成 2% 溶液)60 mg/kg 腹腔注射,正常对照组注射等量柠檬酸钠缓冲液(0.1 mmol/L, pH=4.5)。48 h 后测尾静脉血糖(乐康全 α 血糖仪,德国宝灵曼公司产品) ≥ 16.7 mmol/L 且试纸法尿糖(+++~++++)确认为糖尿病大鼠模型。

1.2.3 双侧卵巢切除手术方法:在制备 1 型糖尿病大鼠模型 1 周后,DOVX 组大鼠用 1% 硫喷妥钠按 40 mg/kg 腹腔注射麻醉,约 15 min 后将大鼠俯卧位固定于手术台,无菌条件下在后背正中切开皮肤,切口长约 2.0 cm,分开背部肌肉,结扎输卵管,切除双侧卵巢,逐层缝合伤口。DS 组大鼠只作背部切口及缝合处理,不作卵巢切除。

1.2.4 骨髓体外 OLC 培养方法:于切除卵巢当天取 NC 组大鼠作为基值(0 周),于切除双侧卵巢后 2、4 及 8 周时各组测量体重、血糖,并各组随机选取大鼠 1 只,拉颈处死,均取左下肢,用 75% 乙醇浸泡 10~

15 min。无菌条件下取股骨,分离周围组织,切断股骨两端骨髓,用含 4 ml 无酚红 α -MEM 的 25G 针头冲洗骨髓腔 2 次,无菌离心管收集骨髓冲洗液,用吸管将其吹打均匀,在高速低温离心机上 4℃,3000 转 5 min 离心 2 次。细胞计数后,用含 10% FBS、30 ng/ml sRANKL、10 ng/ml M-CSF、100 U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素的无酚红 α -MEM 稀释细胞至 1.5×10^6 /ml 浓度,将此细胞悬液置于 24 孔培养板内培养,每孔 0.5 ml,每组各培养 10 孔。每 2~3 天更换培养液,取出 0.2 ml 培养液,再加入 0.2 ml 新培养液,培养板置于 5% CO₂ 和 37℃ 培养箱内培养。来自各组大鼠的细胞均分为无干预组和阿仑膦酸钠组(BP 组),阿仑膦酸钠组在培养基内加入 10^{-7} mol/L 的阿仑膦酸钠(固邦)。

1.2.5 细胞固定、染色:细胞培养 7 d 后,将贴壁细胞进行固定和染色。移去培养板各孔中的培养液、细胞悬液,用 0.9% NaCl 冲洗,贴壁细胞用 4% 多聚甲醛固定。细胞固定后,再取出 4% 多聚甲醛,并用 0.9% NaCl 冲洗各孔,再加入抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP 染剂 0.5 ml/孔)将培养板置于 37℃ 温箱中孵育 1 h,进行 TRAP 染色。

1.2.6 细胞计数方法:TRAP 细胞染色后,在 100~200 倍倒置显微镜下,计数每孔 OLC 数,每组计数 10 孔,取均值。TRAP 阳性且 ≥ 3 个核的多核细胞认定为 OLC。

1.2.7 统计学处理:所得数据用美国 SPSS 统计软件包进行相关分析,配对 *t* 检验及单因素方差分析,SNK(Student-Newman-Keuls Proudure)进行两两比较, $P < 0.05$ 被认为有统计学差异。所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 各组大鼠血糖和体重的变化

在制成 1 型糖尿病模型及切除卵巢后,1 型糖尿病各组大鼠均有死亡,正常对照组大鼠无死亡。如表 1 所示,切除卵巢 0、2、4 和 8 周时 DC 组、DS 组、DOVX 组之间大鼠血糖无明显差异($P > 0.05$),但均明显高于同期 NC 组($P < 0.01$),提示切除卵巢对大鼠的血糖无显著影响。

正常对照组大鼠体重呈进行性增加,糖尿病各组大鼠体重在各个时期均明显低于正常对照组,DOVX 组体重在 2、4 和 8 周均高于同期 DC 组和 DS 组 4 周($P < 0.05$)和 8 周时($P < 0.01$)差异有显著性。见表 1。

表1 各组体重和血糖比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	体重				血糖			
	0周	2周	4周	8周	0周	2周	4周	8周
NC	199.75 ± 10.25	202.57 ± 10.80	219.33 ± 13.25 [#]	239.60 ± 10.11 [#]	6.53 ± 0.02	6.20 ± 0.95	6.12 ± 0.65	6.04 ± 1.05
DC	150.40 ± 16.89	158.38 ± 8.28	154.57 ± 10.23	171.33 ± 10.44 [*]	26.05 ± 4.54	24.69 ± 2.79	24.44 ± 2.79	23.45 ± 3.08
DS	148.13 ± 14.93	157.71 ± 10.59	151.33 ± 7.71	170.40 ± 9.84 [*]	24.20 ± 3.83	23.77 ± 2.78	24.22 ± 3.38	24.00 ± 3.02
DOVX	153.64 ± 15.27	166.57 ± 12.43	164.50 ± 5.68 [△]	200.00 ± 10.32 ^{△#}	26.65 ± 3.88	24.33 ± 2.95	25.36 ± 4.76	23.36 ± 4.32

注:与同组0周时比较^{*} $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$;与同期DC组、DS组比较[△] $P < 0.01$ 糖尿病各组血糖、体重与同期NC组比较, $P < 0.01$

2.2 TRAP染色后 OLC 的形态

体外培养的 OLC 对 TRAP 有强阳性反应, TRAP 染色后倒置显微镜观察, OLC 形态各异, 多核, 有丝状或片状的伪足, 酶活性部位呈红色颗粒样沉淀, 分布于全部或大部分胞浆, 核呈阴性, 部分胞浆可见大小不一的空泡, 见图 1。



图1 TRAP染色阳性破骨细胞样细胞(x400)

2.3 切除卵巢后各组 OLC 形成的变化及阿仑膦酸钠体外干预后各组 OLC 形成的变化

正常对照和糖尿病组各组 OLC 数量随生长时间呈上升趋势;与 NC 组比较, DC 组、DS 组、DOVX 组 OLC 数量 2 周时即明显增加, 差异有显著性 ($P < 0.05$), 提示在 1 型糖尿病早期 OLC 的形成已有增加;DC 组与 DS 组之间无差异 ($P > 0.05$);DOVX 组细胞数又明显多于 DC 组与 DS 组 ($P < 0.01$), 表明在 1 型糖尿病和切除卵巢的共同作用下, 2 周时 OLC 数量即较其单一因素作用下增多。在所有组中, 阿仑膦酸钠在体外均能显著抑制 OLC 的形成 ($P < 0.01$), 见表 2。

表2 各组体外培养的破骨细胞(个/孔, $\bar{x} \pm s$)

组别	0周	2周	4周	8周
NC	76.10 ± 7.26	84.10 ± 10.30	92.50 ± 10.87 [#]	101.10 ± 10.50 [#]
NC + BP	41.80 ± 8.35	46.00 ± 8.33	54.10 ± 9.53	65.80 ± 9.83
DC	78.40 ± 8.91	97.70 ± 11.80 ^{#△}	107.00 ± 13.72 ^{#■}	116.70 ± 12.93 ^{△#}
DC + BP	40.30 ± 7.29	62.30 ± 9.23	68.90 ± 9.96	78.70 ± 9.43
DS		97.30 ± 12.91 ^{△#}	108.60 ± 14.60 ^{△#}	115.50 ± 12.60 ^{△#}
DS + BP		61.40 ± 8.42	70.30 ± 8.58	76.80 ± 8.84
DOVX		115.90 ± 14.58 ^{■▲#}	129.10 ± 18.32 ^{■▲#}	143.50 ± 18.03 ^{■▲#}
DOVX + BP		76.00 ± 8.74	81.50 ± 11.56	91.90 ± 9.73

注:与0周时NC组比较,^{*} $P < 0.01$, 与0周时DC组比较,[#] $P < 0.01$;与同期NC组比较,[△] $P < 0.05$, [■] $P < 0.01$;与同期DC组、DS组比较,[▲] $P < 0.01$;同期NC组与NC + BP组比较, DC组与DC + BP组比较, DS组与DS + BP组比较, 同期DOVX组与DOVX + BP组比较, $P < 0.01$

3 讨论

本实验对雌性 Wistar 大鼠一次性腹腔注射链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)造成 1 型糖尿病, 再切除双侧卵巢, 在 1 型糖尿病的基础上造成骨质疏松, 建立 1 型糖尿病骨质疏松大鼠模型。切除卵巢对大鼠的影响, 首先是体重增加, 这在许多类似研究中被观察到, 已证实动物因去卵巢所致的增重效应对骨丢失有一定防护作用, 但并不影响整个病程进展^[1]。

骨是一个不断进行重建的组织, 其重建的过程由破骨细胞介导的骨吸收和成骨细胞介导的骨形成组成。破骨细胞来源于造血干细胞中的粒-巨噬细胞集落(GM-CSF)形成单位, 在诱导因子作用下, 干细胞(stem cell)分化、融合为破骨细胞。破骨细胞样细胞(OLC)是指在实验中原代培养或诱导生成的具有破骨细胞性质的用于细胞学或分子生物学的细胞, 实际上破骨细胞和破骨细胞样细胞是同一种细胞。多核的破骨细胞表达 TRAP, 降钙素受体(calcitonin receptor, CTR), 整合素 $\alpha\beta 3$ (integrin, $\alpha\beta 3$), 基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)^[2]。多核破骨细胞接触骨质后形成皱褶膜(ruffled membrane)和质子泵。特异性的皱褶膜内有泡状质子 ATP 酶, 其作用在于将质子高速泵入密封带(sealing zone)整合素(integrin), 尤其是 $\alpha\beta 3$, 可能在密封带形成过程中起重要作用, 在这个密封环境里形成高浓度盐酸, 后者进而激活酸性蛋白酶, 其中包括破骨细胞分泌的组织蛋白酶 K(Cath K), 使骨质分解, 目前认为被分解的骨基质和钙通过密封带转入破骨细胞内然后再排出细胞外。因此, 破骨细胞在维持骨量的相对稳定方面起着重要作用, 其数量或活性的改变可导致骨质疏松或骨硬化的发生。我们已经建立了存在 RANKL 和 M-CSF 的条件下, 骨髓体外破骨细胞的培养体系, 该体系使我们能够分析在骨质疏松时破骨细胞所起的作用。

许多研究已证实, 1 型糖尿病与骨量减少有密切关系。Kemink 等^[3]对 35 名无并发症的 1 型糖尿病患者研究发现, 67% 的男性糖尿病患者和 57% 的

女性糖尿病患者的股骨颈和/或腰椎存在骨量减少,14%的男性患者符合 WHO 关于骨质疏松的诊断标准。

有研究表明,在1型糖尿病中,长期的高血糖状态与骨量丢失有密切关系^[4]。长期高血糖可产生过多的糖基化终末产物(Advanced Glycosylate End Products, AGE),Takagi 等^[5]证实,AGE 能刺激白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)的形成,使破骨细胞形成增加。

本研究中应用大量 STZ 破坏大鼠胰岛 β 细胞,造成1型糖尿病大鼠模型,大鼠的胰岛素分泌不足,血糖明显升高,而且没有明显的自然恢复,即出现持续高血糖状态。本实验结果显示,正常对照组和1型糖尿病组大鼠体外培养的 OLC 随时间延长而增加,1型糖尿病组大鼠体外培养的 OLC 数量在不同时间均多于正常对照组,表明1型糖尿病时胰岛素缺乏和持续的高血糖状态可促进破骨细胞的形成,使骨吸收大于骨形成,继而造成骨量减少甚至骨质疏松,进一步表明破骨细胞与糖尿病骨代谢有关,在细胞水平上部分解释了1型糖尿病骨吸收增强的机制。同时,DC 组和 DS 组与 DOVX 组相比 OLC 数量有显著差异,因此,骨髓干细胞向破骨细胞分化的增多可能是1型糖尿病发生骨质疏松的原因之一。

破骨细胞生存时间短,转换率高,它的消失不是由于细胞继续分化、迁移或再循环,而是凋亡。二磷酸盐是人工合成的、稳定的、活性的焦磷酸盐类似物,Reszka 等^[6]的研究证实,双羟磷酸盐可促进破骨细胞凋亡从而抑制骨吸收,表明诱导破骨细胞凋亡是二磷酸盐防治骨质疏松的机制之一。阿仑膦酸钠为二磷酸盐的第三代产品。阿仑膦酸钠通过减少破骨细胞的数量、抑制破骨细胞纹状缘的形成降低破骨细胞的功能,临床上广泛用于治疗骨吸收增加类疾病。有研究表明,阿仑膦酸钠能减少绝经后妇女椎体、椎体外及髌部骨折发生的危险性^[7]。阿仑膦酸钠已被美国食品和药品管理委员会(FDA)批准用于防治绝经后妇女的骨质疏松症。

二磷酸盐直接或间接的诱导破骨细胞凋亡,在二磷酸盐抑制骨吸收中起重要作用。阿仑膦酸钠诱导破骨细胞凋亡的作用机制不十分明确,目前已知阿仑膦酸钠沉积于骨矿物质,然后被破骨细胞吸收。阿仑膦酸钠能抑制3种破骨细胞酶^[8]:①氢离子 ATP 酶,破骨细胞发挥破骨作用时需要骨吸收部位呈酸性;阿仑膦酸钠抑制破骨细胞氢离子 ATP 酶,使氢离子不能逆浓度梯度泵到破骨部位,骨吸收功

能降低。②鲨烯合成酶,该酶控制胆固醇的合成,在其受到抑制后,引起 GTP 结合蛋白减少,而 GTP 与细胞骨架的形成和细胞凋亡有关。③磷酸化酶,CSRC 基因敲除小鼠的破骨细胞无活力,也缺少细胞皱褶缘。因此,阿仑膦酸钠可能通过以上几种途径在体内和体外促进破骨细胞的凋亡并减少破骨细胞的骨吸收活性。

本实验在建立了正常和1型糖尿病骨质疏松大鼠体外骨髓 OLC 培养的基础上,进一步研究了阿仑膦酸钠在体外对破骨细胞的影响,探讨阿仑膦酸钠对破骨细胞的作用。除原发性骨质疏松外,已有报道,阿仑膦酸钠可用于糖皮质激素引起的骨质疏松症^[9]。本实验显示,在体外培养中阿仑膦酸钠干预组 OLC 数量显著低于对照组,表明阿仑膦酸钠在体外对1型糖尿病大鼠及1型糖尿病骨质疏松大鼠的 OLC 的形成有抑制作用,为1型糖尿病骨质疏松的防治提供了理论和实验基础。

【参 考 文 献】

- [1] Wronski TJ, Schenck PA, Cintron M, et al. Effect of body weight on osteopenia in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int*, 1987, 40(3): 155-159.
- [2] Miyamoto T, Suda T. Differentiation and function of osteoclasts. *Keio J Med*, 2003, 52(1): 1-7.
- [3] Kemink SA, Hemus AR, Swinkels LM, et al. Osteopenia in insulin-dependent diabetes mellitus: prevalence and aspects of pathophysiology. *Endocrinol Invest*, 2000, 23(5): 295-303.
- [4] Krakauer JC, McKenna MJ, Buderer NF, et al. Bone loss and bone turnover in diabetes. *Diabetes*, 1995, 44(7): 775-782.
- [5] Takagi M, Kasayama S, Yamamoto T, et al. Advanced glycation endproducts stimulate interleukin-6 production by human bone-derived cell. *Bone Miner Res*, 1997, 12(3): 439-446.
- [6] Reszka AA, Halasy NJ, Masarachia PJ, et al. Bisphosphonates act directly on the osteoclast to induce caspase cleavage of mst1 kinase during apoptosis. A link between inhibition of the mevalonate pathway and regulation of an apoptosis-promoting kinesis. *Biol Chem*, 1999, 274(49): 34967-34973.
- [7] Granney A, Wells G, Willan A, et al. Meta-analyses of alendronate for the treatment of postmenopausal women. *Endocr Rev*, 2002, 23(4): 508-516.
- [8] Russell R, Roger MJ. Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. *Bone*, 1999, 25(1): 97-106.
- [9] Saag KG, Emkey R, Schnitzer TJ, et al. Alendronate for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis Intervention Study Group. *N Engl J Med*, 1998, 339(5): 292-299.