·论著·

番茄红素对氧化应激后成骨细胞的影响

张海光 陈晓亮 王德春 郑修军 陈占文

摘要：目的 研究具有强抗氧化作用的番茄红素对氧化应激后成骨细胞的影响。**方法** 制造氧化应激状态成骨细胞模型。将细胞随机分为 4 组：高、中、低浓度番茄红素组及对照组。然后用流式细胞术检测各组成骨细胞生长指数，用酶标仪检测各组成骨细胞内碱性磷酸酶的活性。在各组细胞中另加入矿化结节诱导液，观察各组成骨细胞矿化能力。**结果** 各实验组成骨细胞较对照组生长指数高，碱性磷酸酶表达增加，形成的矿化结节多。**结论** 番茄红素可以增加氧化应激状态成骨细胞的增殖、碱性磷酸酶的表达及矿化功能。

关键词：番茄红素；过氧化氢；成骨细胞

The effect of lycopene on osteoblasts which have incurred oxidative stress

ZHANG Haiguang, CHEN Xiaoliang, WANG Dechun, et al. Department of Orthopaedics, the Medical School Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China

Abstract: Objective To examine the effect of lycopene-a potent antioxidant on osteoblasts which have incurred oxidative stress. **Methods** The crania of 10 Sprague-Dawley rats which are born within 24 hours are obtained in aseptic condition. After enzyme digestion, isolation, purified osteoblasts of SD rats are cultured for further study. The cells of the third generation are exposed to the medium containing low carbohydrates, 10^{-4} mol/L H_2O_2, 10% (v/v) FBS for 24 hours. Then the cells are divided into 4 groups at random: the control group, the groups treated by 10^{-5} mol/L, 5×10^{-6} mol/L, 10^{-6} mol/L lycopene. After 72 hours of culture, the following study are continued: The proliferation index (PI) of osteoblasts in each group is determined by Flow CytoMeter; The expression of alkaline phosphatase in each group is measured by microplate reader; The cells are cultured in the medium containing 50 μg/mL vitamin C, 10^{-2} mol/L sodium glycerophosphate, 10% FBS and the medium is changed every 3 days. 4 weeks later, the mineral nodes of osteoblasts are dyed in alizarin red and improved Von kossa way, then counted. **Results** Lecopene at 10^{-6} mol/L, 5×10^{-6} mol/L, 10^{-5} mol/L can increase the proliferation index (PI) of osteoblasts. The absorbency at 405 nm in the experimental groups are higher than in the control group, the absorbency in 10^{-5} mol/L lycopene group is the highest. Each experimental group can produce more mineral nodes than the control group. **Conclusion** Lecopene has an effect on stimulating the proliferation, secretion and mineralization of osteoblasts which have incurred oxidative stress.

Key words: Lycopene; Hydrogen Peroxide; Osteoblast

原发性骨质疏松症的发病率较高，病因复杂。近年研究提示由活性氧造成的氧化应激也是其发病原因之一。番茄红素属于烃类胡萝卜素，具有不饱和性，在体内具有强有力的抗氧化作用。本实验在原代培养大鼠成骨细胞的培养基中加入过氧化氢造成氧化应激模型，以增殖、分化，碱性磷酸酶的表达及矿化功能为指标，观察番茄红素对氧化应激后成骨细胞的影响，旨在为骨质疏松的防治提供一定的依据。

1 材料和方法

1.1 动物

出生 24 h SD 大鼠，SPF 级，购自青岛市药检所。

1.2 主要试剂

低糖 DMEM，胎牛血清购自 Hyclone 公司。Ⅱ型胶原酶，番茄红素，β-甘油磷酸钠，对硝基苯磷酸二钠(pNPP)购自 SIGMA 公司。

1.3 成骨细胞的原代培养

取新生 24 h SD 大鼠 10 只，无菌条件下取头盖

作者单位：266003 青岛，青岛大学医学院附属医院脊柱外科
通讯作者：陈晓亮，Email：chenxlqd@yahoo.com.cn

骨,剪碎,在37℃水浴箱中用0.1%的Ⅱ型胶原酶消化20 min,弃去消化液,另加0.1%的Ⅱ型胶原酶消化90 min,所得消化液1000 r/min离心5 min收集细胞,用含10%胎牛血清的低糖DMEM培养基稀释,接种于直径10 cm培养皿中,静止10 min,弃去贴壁细胞,反复3次。将所得细胞以2×10^5个/mL接种于25 cm^2培养瓶中,置于37℃,5%的CO_2培养箱中培养,24 h后换液。传代后用第3代细胞进行实验。

1.4 培养细胞的鉴定

1.4.1 成骨细胞的形态学观察

在倒置显微镜下,每天观察成骨细胞的生长情况并用数码相机拍照。

1.4.2 成骨细胞碱性磷酸酶染色

采用改良的Gomori氏钙钴法[1],取培养皿中长满成骨细胞的盖玻片,95%的酒精固定10 min,蒸馏水冲洗3次。将盖玻片放入孵育液中37℃,5 h。滴加2%的硝酸钴5 min,流水冲净。滴加1%的硫化胺5 min,流水冲净,复染。孵育液配方:2%巴比妥钠5 mL;3%β甘油磷酸钠5 mL;2%无水氯化钙10 mL;2%硫酸镁1 mL;蒸馏水10 mL,调至pH 9.4。对照:以蒸馏水代替孵育液中β-甘油磷酸钠。

1.5 番茄红素的配制

参照文献[2],取1mg番茄红素,用1 mL二甲基亚砜溶解,移入低糖DMEM培养基中,0.2 μm滤膜抽滤后,分别配成含10^{-5} mol/L(高浓度),5×10^{-6} mol/L(中浓度),10^{-6} mol/L(低浓度)番茄红素,含10%胎牛血清的低糖DMEM培养基。上述操作均在暗室内进行。所配含番茄红素培养基避光密闭低温保存。对照组培养基含等浓度的二甲基亚砜及10%胎牛血清。

1.6 氧化应激细胞模型的建立及处理

将细胞消化计数,调节细胞浓度为1×10^4个/mL,接种于96孔板或25 cm^2培养瓶中。参照文献[3],待细胞贴壁后,分别用含10^{-4} mol/L H_2O_2,含10%胎牛血清的低糖DMEM培养基处理24 h。然后将细胞随机分为4组:高、中、低浓度番茄红素组及对照组。各实验组细胞分别用含高、中、低浓度番茄红素,含10%胎牛血清的低糖DMEM培养基处理72 h。

1.7 流式细胞仪测细胞生长周期

将细胞用H_2O_2和番茄红素处理后,用0.25%的胰酶消化,然后用含10%胎牛血清的低糖DMEM吹打,1000 r/min离心5 min,用PBS洗3次,计数,调节细胞浓度为1×10^6个/mL。用流式细胞仪检测各组成骨细胞生长周期中各期细胞比例,以增殖指数(proliferation index,PI)表示成骨细胞分裂增殖能力。PI=(S期细胞数+G_2期细胞数+M期细胞数)/(G_0期细胞数+G_1期细胞数+S期细胞数+G_2期细胞数+M期细胞数)×100%。

1.8 碱性磷酸酶活性测定

将细胞接种于96孔板,用H_2O_2和番茄红素处理后,将培养板中培养基吸出,PBS洗3遍,加入0.1%的Triton-X 100 100 μL,冻、溶3遍后,取细胞液50 μL,加入50 μL对硝基苯磷酸二钠。放于37℃培养箱中,15 min。用0.2 mol/L的NaOH 50 μL终止反应,酶标仪于405 nm波长检测吸光度值,在碱性磷酸酶标准曲线上读取酶活性值(U/L)。

1.9 矿化结节计数

将细胞以1×10^5个/mL接种于6孔板,用H_2O_2和番茄红素处理后,换为含50 μg/mL维生素C,含10^{-2} mol/L β-甘油磷酸钠,含10%的胎牛血清的低糖DMEM培养基。每3 d换液1次。培养4周后分别用茜素红法和改良Von kossa法对矿化结节染色。低倍镜下计数各组细胞的矿化结节数。

1.10 统计学处理

用SPSS 11.5软件对实验数据进行分析,实验结果以$\bar{x}\pm s$表示,组间比较采用t检验。

2 结果

2.1 成骨细胞的形态学观察

细胞贴壁后,呈多角形,有长短不等的伪足,胞浆丰富,细胞核较大而明显,呈圆形或椭圆形,有一或两个核仁。当细胞完全融合后,各个细胞的边界不清楚,仍可见明显的细胞核及核仁。用H_2O_2处理后,细胞伸出的伪足稍有收缩,使细胞的分界明显(图1、2)。加入含番茄红素的培养基72 h后,细胞收缩的伪足又重新铺展,融合,各实验组细胞生长无明显区别(图3~5)。对照组细胞活性差,部分细胞伪足收缩,形成无细胞的空白区(图6箭头)。

2.2 成骨细胞的碱性磷酸酶染色

细胞胞浆内有大量细小棕黑色沉淀并掩盖于细胞核上,染色强阳性者细胞呈棕黑色,弱阳性者呈棕黄色。对照组细胞内无棕黄色或棕黑色沉淀(图7、8)。

2.3 细胞生长周期结果

各实验组增殖指数(proliferation index,PI)均较对照组大,$P<0.01$。番茄红素5×10^{-6} mol/L组较

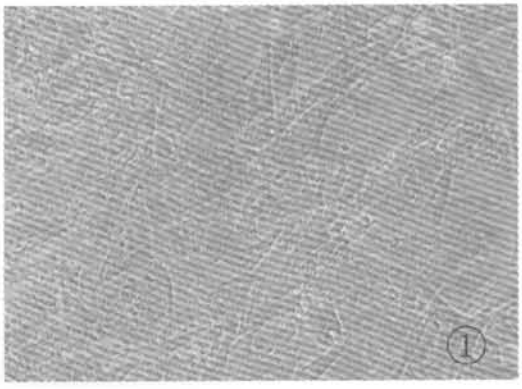

图1 加入 H_2O_2 之前，细胞生长旺盛，边界不清

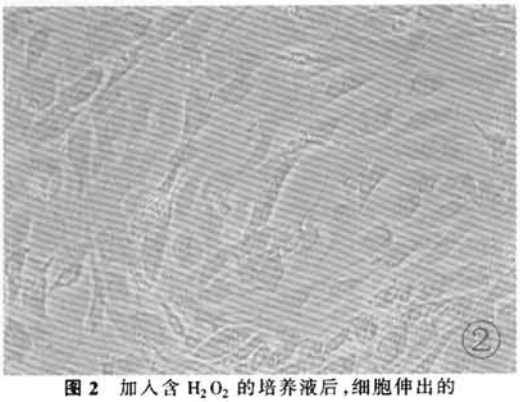

图2 加入含 H_2O_2 的培养液后，细胞伸出的伪足稍有收缩，使细胞的分界明显

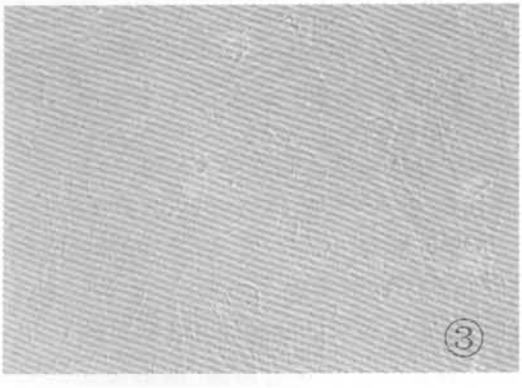

图3 番茄红素 10^{-5} mol/L 组

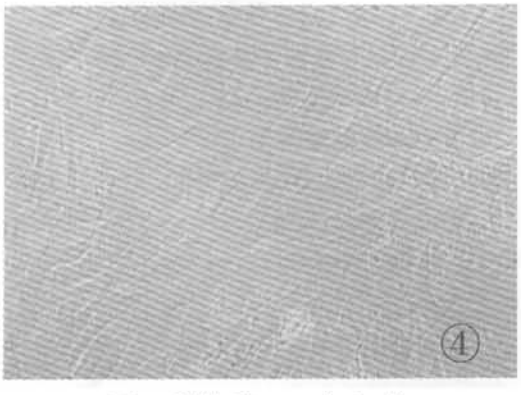

图4 番茄红素 5×10^{-6} mol/L 组

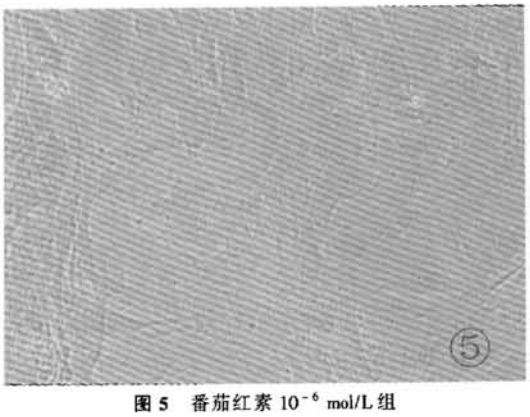

图5 番茄红素 10^{-6} mol/L 组

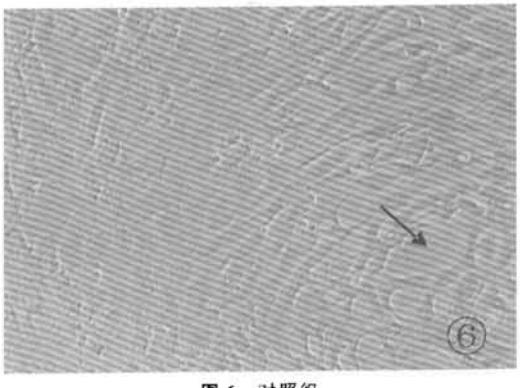

图6 对照组

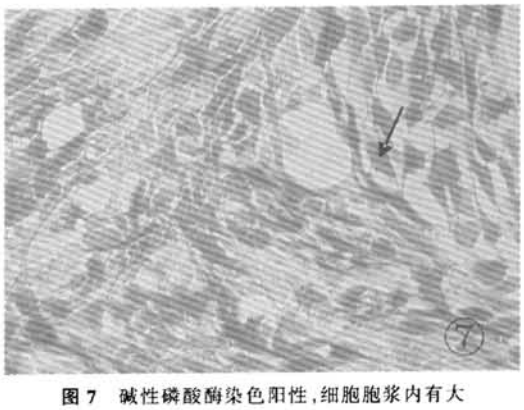

图7 碱性磷酸酶染色阳性，细胞胞浆内有大量细小棕黄色颗粒，掩盖于细胞核上（↗，200×）

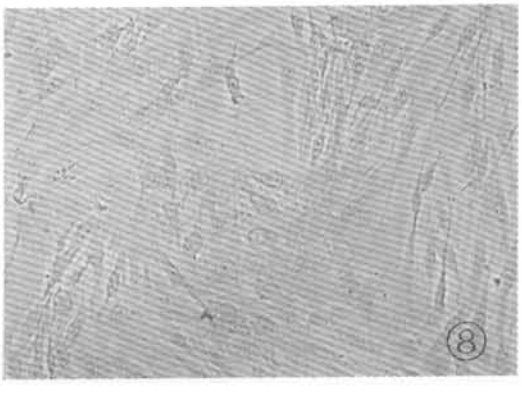

图8 碱性磷酸酶染色阴性对照，细胞胞浆内无细小棕黄色颗粒（200×）

10^{-6} mol/L 组 PI 大,$P<0.01$(表 1)。

表 1 各组细胞增殖指数($n=4$)

项目	组别	增殖指数(proliferation index,PI)
	对照组	0.358±0.009
番茄红素	10^{-6} mol/L 组	0.439±0.013*
	5×10^{-6} mol/L 组	0.561±0.012*△
	10^{-5} mol/L 组	0.576±0.022*

注:与对照组比较* $P<0.01$,与 10^{-6} mol/L 组比较△ $P<0.01$

2.4 碱性磷酸酶活性测定

各实验组均较对照组碱性磷酸酶含量增加,$P<0.01$,并且各实验组之间碱性磷酸酶含量的差别也有统计学意义,$P<0.01$(表 2)。

表 2 各组细胞碱性磷酸酶活性($n=10$)

项目	组别	碱性磷酸酶含量(U/L)
	对照组	6.41±0.58
番茄红素	10^{-6} mol/L 组	12.60±2.18*
	5×10^{-6} mol/L 组	15.16±2.13*△
	10^{-5} mol/L 组	18.46±3.45*△△

注:与对照组比较* $P<0.01$,与 5×10^{-6} mol/L 组比较△ $P<0.01$,与 10^{-6} mol/L 组比较△△ $P<0.01$

2.5 矿化结节计数

经过 4 w 的培养,成骨细胞呈细长梭形,重叠生长,形成细胞集落,集落中央形成圆形矿化结节,茜素红法染色后呈橘红色,改良 Von kossa 法染色后呈黑色(图 9、10)。各实验组形成矿化结节数高于对照组,其中番茄红素 10^{-6} mol/L 组 $P<0.05$,5×10^{-6} mol/L 组及 10^{-5} mol/L 组 $P<0.01$。但各实验组间的差异无统计学意义(表 3)。

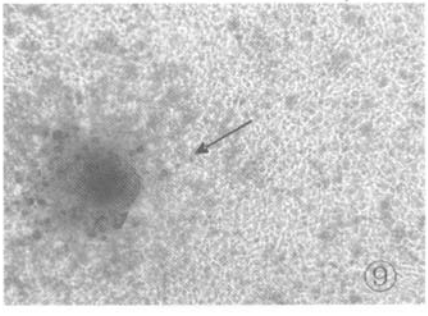

图 9 茜素红法染色矿化结节呈橘红色(↗,400×)

表 3 各组成骨细胞矿化结节数($n=4$,个)

项目	组别	矿化结节数
	对照组	53.0±5.9
番茄红素	10^{-6} mol/L 组	66.5±3.4*
	5×10^{-6} mol/L 组	70.0±2.9**
	10^{-5} mol/L 组	70.8±8.1**

注:与对照组比较* $P<0.05$,** $P<0.01$

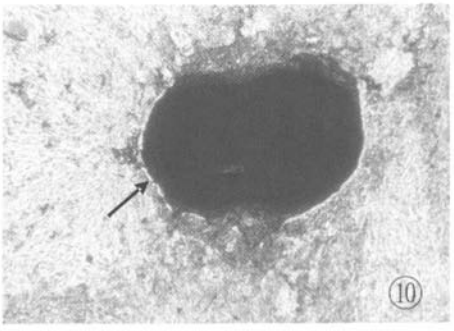

图 10 改良 Von kossa 法染色矿化结节呈黑色(↗,400×)

3 讨论

原发性骨质疏松症是人类最常见的慢性疾病之一。骨量受如下这些因素的影响:遗传、营养、运动、激素水平及生活方式等。氧化应激现在也被认为是影响骨健康的一个重要因子[4-6]。

番茄红素属于烃类胡萝卜素,含有 11 个共轭双键及 2 个非共轭双键,分子量为 536 道尔顿,它易溶于脂肪和油脂中并呈现红色。番茄红素分子中含有多个双键,在体内具有强有力的抗氧化作用及防癌抗癌作用[7]。

活性氧(reactive oxygen species,ROS)是生物体内有氧代谢产生的含氧自由基,主要包括超氧阴离子(O_2^-)、羟基(OH^-)和过氧化氢(H_2O_2)。当机体防御系统功能低下时,异常增多的 ROS 对生物机体造成一系列的氧化损伤[8]。众多的国内外研究提示活性氧抑制成骨细胞的生长、分化,甚至造成成骨细胞的凋亡[9-12]。本实验也观察到,用 H_2O_2 处理细胞后,细胞活性变差。

本实验流式细胞仪检测结果示各实验组增殖指数均较对照组大,提示了番茄红素对氧化应激后成骨细胞生长的促进作用。Kim 等[2]研究发现 10^{-6} mol/L 和 10^{-5} mol/L 番茄红素可以促进人类成骨细胞样骨肉瘤细胞的生长和分化,与本实验的结果相一致。碱性磷酸酶是细胞外基质成熟的早期标志,其活性可以反应成骨细胞功能的强弱。矿化结节的形成代表了成骨细胞分化成熟,是成骨功能的形态表现。本实验中各实验组成骨细胞形成的矿化结节数较对照组多证实了番茄红素可以增加氧化应激后成骨细胞的矿化能力。

关于番茄红素对氧化应激后成骨细胞的影响的

研究还未见报道。最近仅有 Cortizo 等[13] 证明在鼠成骨细胞 MC 3 T 3-E 1 和骨肉瘤细胞系 UMR 106，钒酸盐可以导致活性氧生成以及氧化应激标志物—硫巴比土酸反应物的生成，钒酸盐的这些作用可以部分被抗氧化剂维生素 E 抑制。

在此研究中，番茄红素可能通过以下机制发挥作用：活性氧造成的氧化应激会损伤蛋白质，脂肪和 DNA[11]，强抗氧化剂番茄红素可与成骨细胞内的活性氧作用，抑制这些损伤，刺激细胞增殖；番茄红素还可影响细胞周期基因[14]和缝隙连接通讯[15]。

总之，本实验结果表明，番茄红素的强抗氧化特性可能与其促进氧化应激状态成骨细胞的增殖、碱性磷酸酶的表达及矿化能力有关。

本实验中，高、中浓度番茄红素组成骨细胞 PI 差别无显著性，各实验组矿化结节之间的差别也无显著性，提示番茄红素对氧化应激后成骨细胞的分泌和成骨功能的影响可能不是浓度依赖性的。番茄红素对氧化应激后成骨细胞影响的浓度效应关系及其影响的具体机制还有待于进一步研究。

【参 考 文 献】

[1] Tang HT,Tang H,Luo XZ,et al. Effect of Gushukang on osteoblast *in vitro*. Chin J Osteoporos,2000,6:60-63(in Chinese).

[2] Kim L,Rao AV,Rao LG. Lycopene Ⅱ effect on osteoblasts: the carotenoid lycopene stimulates cell proliferation and alkaline phosphatase activity of SaOS-2 cells. J Medic Food,2003,6:79-86.

[3] Bai XL,Lu D,Bai J,et al. Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF-kappaB. Biochem Biophy Res Commun,2004,314:197-207.

[4] Zhang HG,Chen XL,Wang DC. Effect of oxidative stress on osteoporosis. Forei Med Sci (Section of Orthopaedics),2005,26:230-232(in Chinese).

[5] Morton DJ,Barrett-Connor EL,Schneider DL. VitaminC supplement and bone mineral density in postmenopausal women. J Bone Miner Res,2001,16:135-140.

[6] Basu S,Michaelsson K,Olofsson H,et al. Association between oxidative stress and bone mineral density. Biochem Biophys Res Commun,2001,288:275-279.

[7] Wang JC,Xiong L. Physicochemical property and extract technique of lycopene. Clin J Med Offic,2001,29:122(in Chinese).

[8] Breimer LH. Molecular mechanism of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: The role of DNA base damage. Mol Carcinog,1990,3:188-197.

[9] Mody N,Parhami F,Sarafian TA,et al. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. Free Radic Biol Med,2001,31:509-519.

[10] Nam SH,Jung SY,Yoo CM,et al. H_2O_2 Enhances Ca^{2+} Release from Osteoblast Internal Stores. Yonsei Medical Journal,2002,43:229-235.

[11] Mody N,Parhami F,Sarafian TA,et al. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. Free Radic Biol Med,2001,31:509-519.

[12] Bai XC,Lu D,Bai J,et al. Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF-kappaB. Biochem Biophys Res Commun,2004,314:197-207.

[13] Cortizo AM,Bruzzone L,Molinuevo S,et al. A possible role of oxidative stress in the vanadium induced cytotoxicity in the MC3T3E1 osteoblast and UMR106 osteosarcoma cell lines. Toxicology,2000,147:89-99.

[14] Levy J,Bosin E,Feldman B,et al. Lycopene is a more potent inhibitor of human cancer cell proliferation than either alpha-carotene or beta-carotene. Nutr Cancer,1995,24:257-266.

[15] Zhang LX,Cooney RV,Bertram JS. Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: Relationship to their cancer chemopreventive action. Carcinogenesis,1991,12:2109-2114.

(收稿日期：2006-04-20)