

瘦素对小鼠破骨细胞分化及功能的影响

钱红波 赵建宁 姚静 曾晓峰 陆维举

摘要：目的 观察瘦素(leptin)对体外骨髓诱导培养的小鼠破骨细胞分化和功能的作用效应,探索 leptin 和骨吸收之间的关联。方法 建立由巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)和骨保护素配体(RANKL)为共同细胞因子的小鼠破骨细胞骨髓诱导培养体系,将不同浓度的 leptin 作用于破骨细胞。实验中根据培养液中是否加入 M-CSF 和 RANKL 并依据 leptin 浓度的不同分为:A 组,M-CSF 和 RANKL;B 组,M-CSF、RANKL 和 leptin(80 ng/ml);C 组,M-CSF、RANKL 和 leptin(160 ng/ml);D 组,M-CSF、RANKL 和 leptin(240 ng/ml);E 组,M-CSF、RANKL 和 leptin(320 ng/ml);F 组,M-CSF、RANKL 和 leptin(400 ng/ml);同时设立空白对照组 G 组。于作用后第 7 天取细胞玻片进行抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色,观察破骨细胞并计数,于第 10 天取出骨片进行甲苯胺蓝染液染色,在光镜和扫描电镜观察骨吸收陷窝形态。结果 诱导培养的小鼠破骨细胞形态特征明显:A 组在破骨细胞数量与 D、E、F 组相比较有明显的统计学差异($P < 0.05$);A 组骨吸收面积比与 B、C、D、E、F 组都有明显的统计学差异($P < 0.05$)。结论 leptin 抑制体外培养的破骨细胞的分化和骨吸收功能。

关键词：瘦素;破骨细胞;细胞因子;细胞培养

Effect of leptin on the differentiation and function of osteoclast induced from bone marrow in mice QIAN Hongbo, ZHAO Jianning, YAO Jing, et al. Department of Orthopaedics, Nanjing General Hospital of Nanjing Command, Nanjing 210002, China

Abstract : Objective More and more evidence suggest that leptin is not only an energy-regulating hormone but also has a role in bone metabolism. Leptin may both stimulate bone formation and decrease bone resorption via direct peripheral effects on stromal precursor cells. To observe the effect of leptin on the differentiation and function of osteoclasts and investigate the biologic effects of leptin on the bone resorption. **Methods** : Femurs and humerus from 4-week mice were dissected and bone marrow cells collected and cultured. The culture system was divided into 7 groups : group A containing M-CSF(50 ng/ml) and RANKL(50 ng/ml); group B containing not only M-CSF and RANKL but also different concentration leptin (The concentration of leptin of group from B to F was respectively 80 ng/ml , 160 ng/ml , 240 ng/ml , 320 ng/ml , 400 ng/ml .); group G , control group. On the seventh day , the cultural cells were fixed and were stained for tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP). The formation of osteoclasts was quantified by counting the number of TRAP⁺ multinuclear cells. On the tenth day , bone slices were stained toluidine blue and the percentage of the bone surface that was resorbed was quantified with scanning electron microscopy. **Results** : The appearance of reduced mice osteoclasts was typical. Compared with group A , the number of TRAP⁺ multinuclear cells of group B and group C did not significantly decrease ($P > 0.05$), but the ratio of bone resorption of all groups from B to F obviously decreased ($P < 0.05$). **Conclusions** : Leptin can inhibit osteoclasts formation and bone resorption.

Key words : Leptin ; Osteoclast ; Cytokine ; Cell culture

Leptin 是由脂肪组织分泌,其功能主要是抑制食欲和调节机体能量代谢。目前的研究表明它参与

了体内生殖、免疫、造血、血管生成等多种生理活动^[1,2],在骨代谢的调节方面也扮演了重要的角色。

目前有关 leptin 与成骨细胞的关系研究相对比较充分,而由于破骨细胞培养体系不够成熟稳定, leptin 与骨吸收之间的关联尚不完全清楚。为了观察 leptin 对体外培养破骨细胞作用效应,本实验在

基金项目:江苏省自然科学基金项目(BK2005085)

作者单位:210002 南京 南京军区南京总医院骨科中心(钱红波、赵建宁、曾晓峰、陆维举),南京农业大学医学院(姚静)

通讯作者:钱红波,Email:qianrenyang@vip.163.com.

M-CSF 和 RANKL 两种细胞因子共同存在的条件下,建立体外骨髓诱导破骨细胞培养体系,观察 leptin 对破骨细胞分化及功能的影响,进一步探索 leptin 与骨代谢间的关联。

1 材料和方法

1.1 动物

清洁级 4 周龄雌性小鼠 8 只,重(19±3)g,南京军区南京总医院实验动物学部提供。

1.2 主要试剂

达尔伯克氏必需基本培养基(DMEM)和胎牛血清(FCS):美国 Gibco 公司;LEPTIN:RnD 公司;M-CSF:RnD 公司;RANKL:Biovision 公司;抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色试剂盒:中国医科院血液病研究所产品;骨片:上海瑞金医院进行切割;扫描电镜:Philips 505,南京林业大学。

1.3 破骨细胞的分离和培养方法

用蒸馏水冲洗鼠体后拉颈脱臼处死,75%乙醇浸泡 5 min。无菌条件下,分离股骨及肱骨,剪断两侧骨骺端,用注射针头将 DMEM(含 100 U/ml 青霉素,100 μg/ml 链霉素,2 mmol/L L-谷氨酰胺,15% FCS)轻轻冲洗骨髓腔,收集骨髓细胞混合液并接种到塑料培养瓶中培养(5% CO₂,95% 空气,37℃ 湿热)45 min。收集未贴壁细胞(骨髓单核细胞),取上清液,离心(1000 r/min,4℃ 离心,共 5 min)。弃上清液,用 DMEM 培养液重悬细胞,计数并调整细胞浓度 >1×10⁶/ML,使细胞混合液达到 45 ml(每组 6 ml)。根据培养液中是否加入 M-CSF(50 ng/ml),RANKL(50 ng/ml)和 leptin 分为 7 组:A 组加入 M-CSF 和 RANKL,B-F 组在加入相同同浓度 M-CSF 和 RANKL 同时还加入不同浓度的 leptin(leptin 浓度依次为:B 组 80 ng/ml;C 组 160 ng/ml;D 组 240 ng/ml;E 组 320 ng/ml;F 组 400 ng/ml);G 组为空白对照组。将细胞混合液移入有玻片及骨片的 24 孔培养板中(玻片每组 4 块,骨片每组 2 孔,每孔 3 块骨片,培养液 1ml/孔),并放入培养箱(5% CO₂,95% 空气,37℃ 湿热)中培养。每隔 2 天换液 1 次,换液 50%。于第 7 天将玻片取出,第 10 天取出骨片进行处理观察。

2 破骨细胞的观察及处理

2.1 活体细胞生长观察

在倒置相差显微镜下动态观察细胞的形态和生长情况。

2.2 破骨细胞抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色

将细胞玻片固定后,按说明书进行 TRAP 染色操作,中性树胶封片,光镜下观察,以 TRAP(+)多核细胞(3 个或 3 个以上)为破骨细胞,对每个玻片上随机取 4~10 个视野(×200)中的破骨细胞数进行计数,取均值结果以细胞数/玻片表示。

2.3 骨吸收陷窝染色、观察和统计

将骨片经 2.5% 戊二醛固定液 4℃ 固定 7 min,超声清洗(50 kHz)5 min 后,系列乙醇脱水,自然晾干,1% 甲苯胺蓝染液室温染色 4 min,蒸馏水清洗后 100 倍光镜下对吸收陷窝(圆形、椭圆形和腊肠等典型形态,边界清楚的蓝紫色异染区)观察。并用扫描电镜进行观察,在 150 倍左右扫描电镜下进行骨吸收陷窝面积百分比的统计。

2.4 统计学处理

所有资料数据使用 SPSS 10.0 软件进行方差分析,两组间进行配对 *t* 检验。 $P \leq 0.05$ 认为有显著性统计学意义。

3 结果

3.1 破骨细胞活体观察

培养 1h 后开始出现贴壁细胞,大多为体积较小单核圆形细胞,大小基本一致,分布比较均匀;培养第 2 天细胞形态开始出现变化,出现散在的大形细胞(类似多个单核细胞融合,形态不一,以圆形为多),局部出现细胞聚集,但各组细胞密度未见明显变化;细胞培养第 3、4 天,A-F 组不规则细胞数量逐渐增多,体积不断增大,形态演变为大圆形、猫眼形、花瓣形等形状,有些细胞出现伪足,胞浆内可见多个核(以 3 个核为多),成为破骨细胞;G 组细胞仍以小圆形细胞为主,不规则细胞少见;各组细胞分布不均匀,细胞密度都有降低,但以 G 组明显;培养的第 7 天各组破骨细胞形成逐渐达到高峰,细胞核大多有 3 个及 3 个以上,但同时发现有些破骨细胞出现核染色质浓缩碎裂成块,破骨细胞凋亡,数量开始减少。A-F 组中以 D 组细胞浓度为低,破骨细胞数量相对较少,而 A 组破骨细胞细胞大并且不规则细胞多见,G 组与其他组相比破骨细胞数量最少而且细胞小。

3.2 TRAP 染色阳性多核细胞计数

TRAP 染色阳性的多核细胞在光镜下有多个核,胞质呈红色,细胞核如空泡样,复染后细胞核呈蓝色。各组破骨细胞均数及统计学比较见表 1。镜下观察发现:与 G 组相比其余各组破骨细胞数量明显多、体积大、形态多样而且破骨细胞细胞核更多;在

B-F 组中镜下观察发现以 D 组细胞数量最少 ,染色较淡 ,同时 A 组与 B-F 组相比 ,破骨细胞细胞数量和核都较多(图 1~3)。

表 1 各组破骨细胞数($\bar{x} \pm s$)

组别	破骨细胞数量(个/玻片)				$\bar{x} \pm s$
	1	2	3	4	
A	59.75	52.40	48.57	34.14	48.72 $\pm$ 10.77
B [△]	35.00	28.25	48.44	51.83	40.88 $\pm$ 11.12
C [△]	35.00	32.67	40.00	49.63	39.32 $\pm$ 7.52
D [*]	28.88	28.20	23.00	18.40	24.61 $\pm$ 4.91
E [*]	34.00	40.83	43.40	36.50	38.68 $\pm$ 4.30
F [*]	41.29	35.13	38.00	46.20	40.15 $\pm$ 4.75
G [*]	10.00	13.40	18.80	14.20	14.10 $\pm$ 3.62

注 :与 A 组相比[△] $P > 0.05$;^{*} $P < 0.05$;A~F 组间方差分析 $F = 14.84$, $F_{0.05}(6,21) = 2.57$, $P < 0.05$

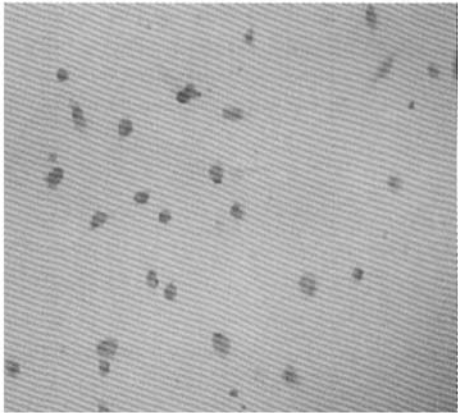


图 3 G 组,破骨细胞 TRAP 染色($\times 200$)

陷窝呈蓝紫色 ,形态不规则 ,大小不一 ,边界清楚。其中在 A-F 组中以 A 组陷窝数量多 ,面积大 ,多连接成串珠样 ,并且发现 B-F 组吸收陷窝多在骨片的边缘 ,而在 D、G 组中吸收陷窝数量和面积小(图 4、5)。扫描电镜下骨吸收陷窝形状不规则 ,底面粗糙 ,边界清楚 ,可见伸出伪足的破骨细胞(图 6~8)。各组骨吸收陷窝面积百分比的比较见表 2。

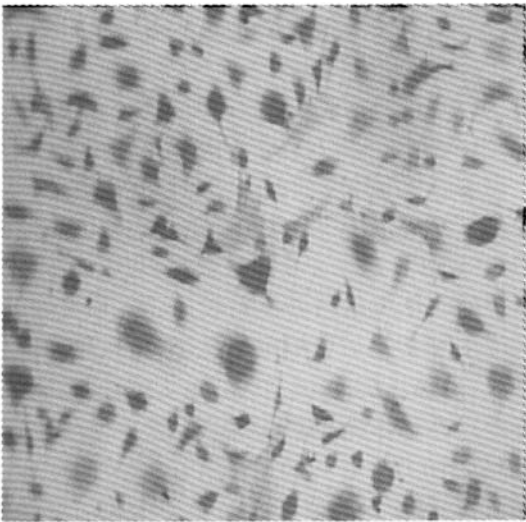


图 1 A 组,破骨细胞,TRAP 染色($\times 200$)

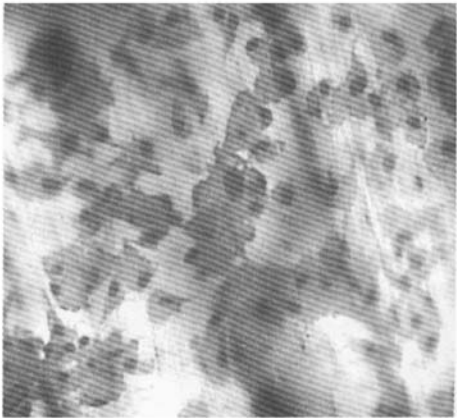


图 4 A 组,骨吸收陷窝 甲苯胺蓝染色($\times 400$)

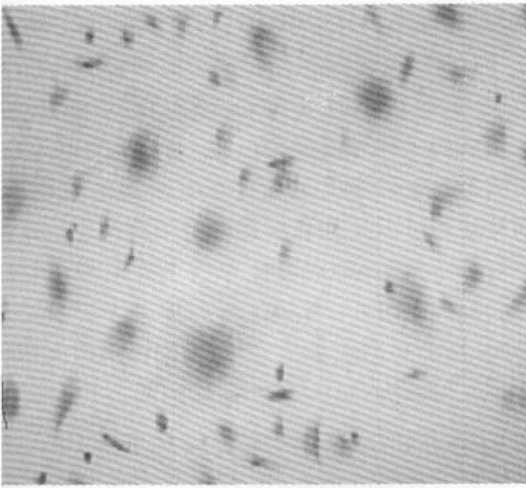


图 2 D 组,破骨细胞 TRAP 染色($\times 200$)

表 2 各组骨吸收面积百分比($\bar{x} \pm s$)

组别	骨吸收面积量(%)						$\bar{x} \pm s$
	1	2	3	4	5	6	
A	56	33	37	38	44	49	42.83 $\pm$ 8.57
B [*]	25	23	35	42	21	33	29.83 $\pm$ 8.15
C [*]	20	18	39	39	27	26	28.17 $\pm$ 9.06
D [*]	17	15	7	12	15	10	12.67 $\pm$ 3.72
E [*]	25	20	34	39	31	21	26.67 $\pm$ 7.96
F [*]	28	24	27	30	19	35	27.16 $\pm$ 5.41

3.3 骨片吸收陷窝光镜和扫描电镜的观察和统计
骨片在培养 10 天后经甲苯胺蓝染色后骨吸收

注 :与 A 组相比^{*} $P < 0.05$;A~F 组间方差分析 $F = 25.99$, $F_{0.05}(6,34) = 2.38$, $P < 0.05$

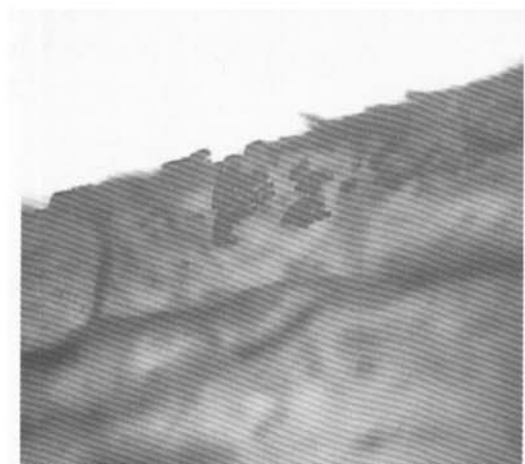


图 5 E 组,骨吸收陷窝 甲苯胺蓝染色 (× 400)

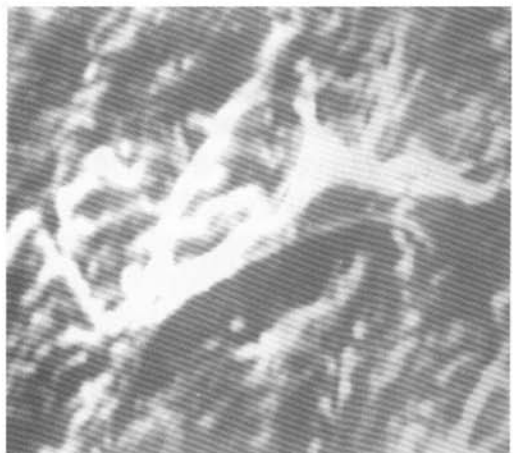


图 6 破骨细胞,甲苯胺蓝染色 扫描电镜

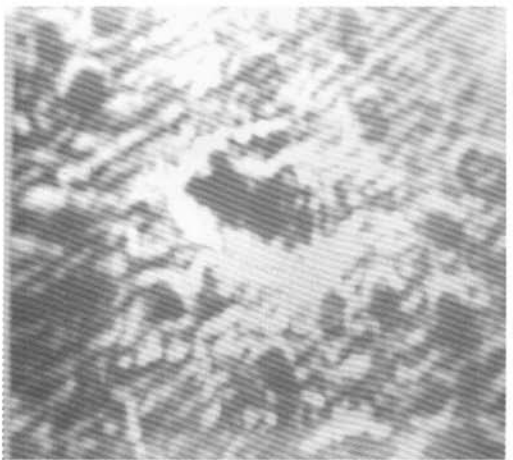


图 7 实验组 A,骨片吸收陷窝,甲苯胺蓝染色 扫描电镜

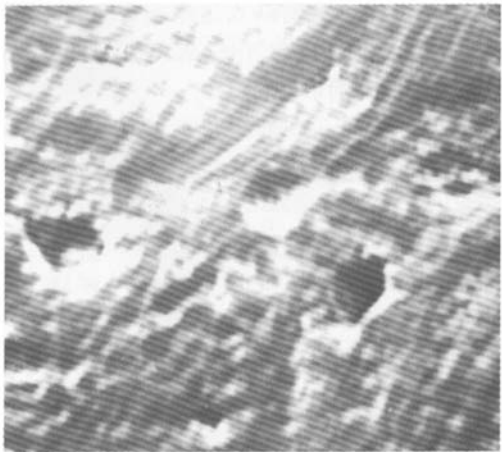


图 8 实验组 D,骨片吸收陷窝,甲苯胺蓝染色 扫描电镜

4 讨论

4.1 小鼠破骨细胞的培养和鉴定

由于破骨细胞数量少、体积大,含丰富的蛋白水解酶,紧贴骨基质生长,生存时间短、无法传代和纯化困难等原因,建立一个不仅数量多、纯度高而且功能活跃的破骨细胞培养体系较困难。研究表明 M-CSF 和 RANKL 是破骨细胞形成、分化和成熟过程中所必须有的两种细胞因子^[3]。本实验在原有破骨细胞骨髓诱导培养体系的基础上,成功建立了以 M-CSF 和 RANKL 为共同的诱导分化因子的破骨细胞培养体系,在这种培养体系中破骨细胞的形态和生长变化符合破骨细胞特点;经 TRAP 染色后阳性细胞不仅数量多、细胞大而且核多,骨片经甲苯胺蓝染色,扫描电镜发现骨吸收陷窝典型面积大。

4.2 leptin 对破骨细胞分化及功能的影响

Leptin 是在 1994 年由 Zhang 发现^[4],由 167 个氨基酸组成的一种分泌型蛋白质,分子量为 16 kD。研究表明 Leptin 和骨代谢也存在着密切的关联:一方面间接地通过下丘脑和交感神经系统产生抗成骨效应^[5,6];另一方面 leptin 直接作用于外周促进骨形成或抑制骨吸收。Leptin 可作用于人骨髓间质细胞,使其向成骨细胞分化,同时抑制该细胞向脂肪细胞分化^[7];研究表明人类成骨细胞的原代培养也可产生 leptin,同时 leptin 可促进细胞的矿化^[8];leptin 可直接调节骨细胞的生长,刺激从大鼠分离的成骨细胞增殖^[9];刺激人成骨细胞功能^[10]。目前 leptin 和成骨细胞及骨形成之间关联研究较多,而 leptin 和破骨细胞关联研究尚不够充分。

本实验以不同浓度的 leptin 与 M-CSF 和 RANKL

细胞因子共同诱导培养破骨细胞 ,经过 TRAP 染色、复染、镜下进行破骨细胞计数 ,结果表明 B-F 组与 A 组相比破骨细胞数量少 ,而且镜下观察破骨细胞不规则细胞少。这表明 leptin 抑制破骨细胞的分化 ,这可能与 leptin 通过提高在单核细胞中骨保护素 OPGmRNA 和蛋白质表达 ,增加 OPGmRNA 稳态水平 ,通过 RANKL/RANK/OPG 介导 ,降低 RANKLmRNA 表达水平而实现的^[11,12]。但 leptin 抑制破骨细胞的效应与浓度呈双向性 ,随着 leptin 浓度增高到一定值时 ,抑制效应达到最高 ,而当 leptin 浓度继续增加时 ,抑制效应在逐渐减少。

实验结果表明 ,leptin 能够抑制小鼠骨髓源性诱导培养的破骨细胞的分化及骨吸收功能 ,且该效应在 leptin 浓度控制一定范围内效果尤其显著。通过本实验也表明 M-CSF 和 RANKL 两种细胞因子对破骨细胞形成和功能调节的重要作用。关于 leptin 对破骨细胞分化及功能的抑制效应是否存在时间依赖性以及随着 leptin 浓度的增加 ,培养液中是否存在 RANKL 和 OPG 蛋白质水平的相应变化 ,尚有待进一步探讨。

【 参 考 文 献 】

- [1] Ferreira-Dias G , Claudino F , Carvalho H , et al. Seasonal reproduction in the mare :possible role of plasma leptin ,body weight and immune status. *Domest Anim Endocrinol* 2005 ,29(1) :203-213.
- [2] Mito N , Yoshino H , Hosoda T , et al. Analysis of the effect of leptin on immune function *in vivo* using diet-induced obese mice. *J*

Endocrinol ,2004 ,18(1) :167-173.

- [3] Niida S ,Kaku M ,Amano H , et al. Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. *J EXP MED* ,1999 ,190(2) :293-298.
- [4] Zhang Y , Proenca R , Maffei M. Positional cloning of the mouse bese gene and its human homologue. *Nature* ,1994 ,372 :425-432.
- [5] Ducy P , Amling M , Takeda S , et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay : a central control of bone mass. *Cell* ,2000 ,100 :197-207.
- [6] Régis Levasseur , Jean-Pierre Sabatier , Céline Potrel-Burgot , et al. Sympathetic nervous system as transmitter of mechanical loading in bone. *Joint Bone Spine* 2003 ,70 :515-519.
- [7] Thomas T ,Gori F ,Khosla S , et al. Leptin acts on human marrow cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology* ,1999 ,140 :1630-1638.
- [8] Gordeladze JO ,Drevon CA ,Syversen U , et al. Leptin stimulates human osteoblastic cell proliferation , de novo collagen synthesis , and mineralization : Impact on differentiation markers , apoptosis , and osteocalstic signaling. *J Cell Biochem* 2002 ,85(4) :825-836.
- [9] Cornish J , Callon KE , Bava U , et al. Leptin directly regulates bone cell function *in vitro* and reduces bone fragility *in vivo*. *J Endocrinol* ,2002 ,175(2) :405-415.
- [10] 李双庆 ,赵红莉 ,魏松全 ,等. Leptin 对人成骨细胞增殖和功能的影响. *华西医科大学报* ,2001 ,33(2) :240-242.
- [11] Burguera B , Hofbauer LC , Thomas T , et al. Leptin reduces ovariectomy-induced bone loss in rats. *Endocrinology* 2001 ,142(8) :3546-3553.
- [12] Holloway WR , Collier FM , Aitken CJ , et al. Leptin inhibits oseoclast generation. *J Bone Miner Res* ,2002 ,17(2) :200-209.

(收稿日期 2006-08-17)