

# 去势大鼠骨髓体外培养破骨细胞变化观察及骨髓组织液 IL-6 和 TNF- $\alpha$ 测定分析

白孟海 葛宝丰 陈克明 周胜虎

**摘要：**目的 观察去势大鼠骨髓源性破骨细胞形成的动态变化和骨髓细胞白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )含量变化。方法 健康 Wistar 雌性大白鼠 60 只,分为实验组(去卵巢组)和对照组(假手术组),每组 30 只。分别于术后 2、4、6、8、12 周取去卵巢组和对照组各只大鼠骨髓细胞进行细胞培养,作瑞氏-吉姆萨染色和抗酒石酸酸性磷酸酶( TRAP )染色,观察破骨细胞并计数。提取骨髓组织上清液。用放射免疫方法,测定 IL-6 的 TNF- $\alpha$  含量。结果 术后 2、4 周去卵巢组破骨细胞形成数多于同期对照组,6 周去卵巢组破骨细胞形成达到高峰,显著多于同期对照组 ( $P < 0.01$ )。8 周去卵巢组破骨细胞数较 6 周有所下降,但仍明显高于对照组。与破骨细胞变化相对应的实验组术后 4 周骨髓提取液 IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量明显高于对照组(分别为  $19.12 \pm 4.08$ ,  $0.98 \pm 0.56$ )。6~8 周实验组骨髓组织提取液 IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量显著高于对照组( IL-6 测定值分别为  $25.78 \pm 4.24$ ,  $26.87 \pm 6.34$ , TNF- $\alpha$  测定值为  $1.12 \pm 0.31$ ,  $1.14 \pm 0.4$ )。第 12 周 IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平明显下降,但仍高于对照组。结论 大鼠去卵巢后骨髓细胞分化破骨细胞明显增加,呈时间相关动态过程,第 6 周达高峰。骨髓提取液 IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量 6~8 周达高峰。提示去卵巢后骨髓组织提取液 IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量升高,增强骨髓微环境中 IL-6 和 TNF- $\alpha$  介导的生物信号,进而使骨髓源性破骨细胞形成增多是可能导致骨吸引亢进的重要原因。

**关键词：**去卵巢大鼠；破骨细胞；白细胞介素-6；肿瘤坏死因子- $\alpha$

**Changes of bone marrow cells in ovariectomized rats and determination of IL-6 and TNF- $\alpha$  in bone marrow tissue fluid** BAI Menghai , GE Baofeng , CHEN Keming , et al . The Institute of Orthopedics of Lanzhou General Hospital , Lanzhou 730050 , China

**Abstract : Objective** To observe the changes of bone marrow osteoclast formation and the contents of IL-6 and TNF- $\alpha$  in bone marrow cells. **Methods** 60 Wistar female rats were divided into experimental group ( ovariectomized group ) and control group ( sham operating group ). At the end of weeks 2 , 4 , 6 , 8 and 12 after ovariectomy , the rat femur bone marrow cells were collected and cultured and the number of osteoclasts with positive TRAP staining and more than 3 nuclei were counted , and IL-6 and TNF- $\alpha$  were determined by radioimmunoassay. **Results** Two and four weeks after the surgery , the number of the osteoclast formation was significantly higher than that in the ovariectomized group. At the sixth and eighth week , the number of the osteoclast formation reached the peak and it was significantly higher than that in the control group (  $P < 0.01$  ). At the end of the fourth week , the contents of IL-6 and TNF- $\alpha$  in bone marrow cells extraction fluid were significantly higher than those in the control group (  $19.12 \pm 4.08$  and  $0.98 \pm 0.56$  respectively ) ; at the end of weeks 6-8 , the contents of IL-6 and TNF- $\alpha$  in bone marrow cells extraction fluid were significantly higher than those in the control group ( the contents of IL-6 were  $25.78 \pm 7.24$  and  $26.87 \pm 6.34$  respectively ; the contents of TNF- $\alpha$  were  $1.12 \pm 0.31$  and  $1.14 \pm 0.40$  respectively ). **Conclusions** Bone marrow-derived osteoclast formation increased dynamically in ovariectomized rats and the change was consistent with the changes of IL-6 and TNF- $\alpha$  level in bone marrow extraction fluid. The results suggested that increased formation of bone marrow-derived osteoclast was an important cause of bone absorption , and IL-6 induced signal was correlated with the increased formation of bone

基金项目：全军科研基金课题项目( 01Z008 )

作者单位：730050 兰州,兰州军区兰州总医院骨科研究所

通讯作者：陈克明, Email: chkeming@yahoo.com.cn

marrow derived osteoclast. And this effect was induced by higher expression of IL-6 and TNF- $\alpha$ .

**Key words :** Ovariectomized rats ; Osteoclast ; Interleukin-6 ; TNF- $\alpha$

绝经后骨质疏松症是严重危害妇女健康的严重疾病,以高骨转换为特征,表现为骨吸收大于骨形成,小梁骨大量丢失,其最终结果是骨量减少、骨密度减低以及骨组织微结构破坏,从而导致骨质疏松性增加,易发生骨折。雌激素缺乏是导致骨吸收亢进的主要原因<sup>[1]</sup>。本研究观察成年大鼠去卵巢后不同时期骨髓源性破骨细胞增殖分化能力的动态变化,及其骨髓液 IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量改变之间的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 大鼠去卵巢模型的建立

健康 3 月龄雌性 Wistar 大白鼠 60 只,体重 220 ~ 240 g,由本院动物实验科提供,随机分为实验组(切除双侧卵巢组)和对照组(假手术组),每组 30 只。实验组均行双侧卵巢切除术。术时均予 3% 戊巴比妥钠溶液按 0.1 ml/100 g 体重腹腔麻醉。手术腹侧入路完整切除双侧卵巢,止血缝合。对照组采用腹侧入路,仅切除皮下组织即关闭。分别于去卵巢后 2、4、6、8、12 周每组各 6 只大鼠,每只两侧股骨少量骨髓细胞作细胞培养,余全部提取骨髓液。

### 1.2 主要试剂和仪器

$\alpha$ -MEM,胎牛血清(FCS,兰州民海),抗酒石酸酸性磷酸酶染色( TRAP )试剂盒购自中国医科院血液病研究所;IL-6 和 TNF- $\alpha$  试剂盒采用液相竞争法,购于解放军总医院科技开发中心放免所,仪器为中科院上海原子核日环仪器厂生产的 SN-682 型放射免疫  $\gamma$  计数器。

### 1.3 细胞培养

破骨细胞培养,参考夏文芳等<sup>[2]</sup>方法,主要步骤包括:无菌操作下完整取下一侧股骨,剪断两侧骨髓端,用 5 ml  $\alpha$ -MEM(含 10% FCS,100 U/ml 青霉素,100 mg/L 链霉素)反复冲洗骨髓腔 3 次,收集骨髓细胞悬液,将细胞调节成浓度为  $1 \times 10^7$ /ml,加入预先配好的培养体系,其内含有 20% FCS、VitD3 ( $10^{-8}$  M, sigma)混匀后加入预置盖玻片的 24 孔板内,置 CO<sub>2</sub> 培养箱,在 5% CO<sub>2</sub>,37 °C 条件下培养,3 d 换液 1 次,7 d 后,取出玻片进行固定染色。

### 1.4 破骨细胞染色和鉴定

在培养的盖玻片上分别作瑞士-吉姆萨染色和

抗酒石酸酸性磷酸酶( TRAP )染色:以 TRAP 染色( + )细胞核  $\geq 3$  个核的细胞为破骨细胞标志。对每个随机视野中的破骨细胞进行计数。每组大鼠计数 10 张玻片,取均值,结果以细胞数/玻片表示。

### 1.5 骨髓组织液 IL-6 和 TNF- $\alpha$ 的测定

采用放射免疫法测定骨髓组织液内的 IL-6 和 TNF- $\alpha$  含量。对其结果值进行统计分析。

### 1.6 统计学处理

各数值均采用 SPSS 10.0 版本对结果进行  $t$  检验,结果用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。

## 2 结果

### 2.1 术后不同时期破骨细胞变化见表 1。

术后 2、4 周去卵巢组骨髓源性破骨细胞形成数多于同时期对照组,6 周,去卵巢组破骨细胞显著多于对照组  $P < 0.01$ (图 1);8 周,去卵巢组破骨细胞形成数较 6 周下降,但仍明显高于对照组  $P < 0.05$ 。对照组全程骨髓源性破骨细胞数量无明显改变。术后不同时期 IL-6 变化见表 2。实验组术后 2、4 周骨髓提取液 IL-6 含量明显高于对照组,6、8 周实验组骨髓组织提取液 IL-6 含量显著高于对照组  $P < 0.01$ ,第 12 周 IL-6 水平明显下降,但仍高于对照组。术后不同时期 TNF- $\alpha$  变化见表 3。实验组术后 2、4 周 TNF- $\alpha$  含量明显高于对照组,6、8 周显著高于对照组  $P < 0.01$ ,12 周 TNF- $\alpha$  含量明显下降稍高于正常组。

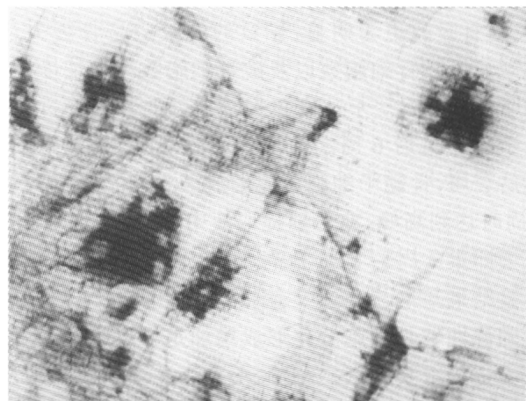


图 1 诱导培养出的破骨细胞。TRAP 染色,细胞内见多个细胞核( $\times 200$ )

表 1 去势大鼠体外培养不同时间骨髓源性破骨细胞形成数

分组	2 周( 个/玻片 )	4 周( 个/玻片 )	6 周( 个/玻片 )	8 周( 个/玻片 )	12 周( 个/玻片 )
实验组	12.48 ± 1.70	18.12 ± 4.32 *	25.56 ± 2.18 **	19.23 ± 3.75 *	13.37 ± 2.43
对照组	8.21 ± 1.00	12.17 ± 5.14	13.54 ± 1.85	13.12 ± 1.32	12.12 ± 1.34

注 :与对照组比较 \*  $P < 0.05$  , \*\*  $P < 0.01$

表 2 去势大鼠骨髓提取液不同时期 IL-6 测定结果(  $\bar{x} \pm s$  pg/ml )

分组	n	2 周	4 周	6 周	8 周	12 周
实验组	6	17.52 ± 3.21 *	19.12 ± 4.08 *	25.78 ± 4.24 **	26.87 ± 6.34 **	16.78 ± 4.35
对照组	6	13.23 ± 4.56	14.32 ± 4.51	14.30 ± 5.19	14.54 ± 3.12	14.21 ± 1.32

注 :与对照组比较 \*  $P < 0.05$  , \*\*  $P < 0.01$

表 3 去势大鼠骨髓提取液不同时期 TNF- $\alpha$  结果(  $\bar{x} \pm s$  ng/ml )

分组	n	2 周	4 周	6 周	8 周	12 周
实验组	6	1.15 ± 0.15 *	1.98 ± 0.56 *	2.12 ± 0.31 **	2.89 ± 0.40 **	1.13 ± 0.43
实验组	6	1.02 ± 0.68	1.06 ± 0.21	1.01 ± 0.54	1.06 ± 0.31	1.05 ± 0.34

注 :与对照组比较 \*  $P < 0.05$  , \*\*  $P < 0.01$

3 讨论

近年来 ,随着社会人口的老龄化 ,骨质疏松症 ,尤其是绝经后骨质疏松症严重危害着老年人的健康。绝经后骨质疏松又称为 I 型原发性骨质疏松症 ,由破骨细胞介导。最常发生于绝经后的妇女 ,年龄在 50 ~ 65 岁 ,女性的发生率为男性的 6 倍 ,为高转换型的快速骨丢失。其发病机制主要是由于绝经后雌激素分泌不足<sup>[3]</sup>。雌激素具有促进降钙素分泌和抑制破骨细胞刺激成骨细胞的作用 ,雌激素分泌不足 ,一方面使破骨细胞过于活跃 ,骨转换增加 ,即骨形成与骨吸收均增加 ,骨吸收大于骨形成 ,骨生成跟不上骨吸收的速度 ,影响骨胶原的成熟和骨矿化。

研究表明 ,绝经后引起的雌激素水平下降可导致一系列细胞因子 IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  等在体内分泌增多<sup>[4]</sup> ,大鼠去卵巢后 ,早期骨形成与骨吸收均有增强 ,但骨吸收更为明显 ,导致的净效应是骨丢失 ,形态学显示破骨细胞数以及破骨细胞数与骨长度之比均明显增加<sup>[5]</sup>。上述现象提示增强的骨吸收过程开始于去卵巢后 6 周之前。本实验观察到 ,大鼠去卵巢后 2 周 ,骨髓干细胞分化形成破骨细胞明显增加 ,6 周时达到高峰 ,在骨髓提取液中发现 IL-6 和 TNF- $\alpha$  在去卵巢 4 周后含量升高 ,6 ~ 8 周时达到高峰 ,本实验结果基本与上述文献报道的相吻合 ,同时说明骨髓源性破骨细胞分化形成增加是导致绝经后骨吸收亢进的重要原因之一。

破骨细胞是骨吸收的直接参与者 ,破骨前体细胞的不断分化成熟和成熟破骨细胞的活化是骨吸收的前提。本实验参考夏文芳等<sup>[2]</sup>方法 ,在培养中加入 VitD3 诱导培养 ,对去势大鼠骨髓源性破骨细胞进行体外诱导培养。成功的诱导培养出大鼠骨髓源

性破骨细胞 ,1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 作为钙、磷代谢的重要调节激素 ,已被证实是破骨细胞分化成熟的主要激活因子 ,可诱导破骨前体细胞的形成及融合为成熟的破骨细胞。Takahashi 等<sup>[6]</sup>对大鼠的破骨细胞培养研究表明 ,1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 的效应呈剂量依赖性 ,10<sup>-8</sup> mol/L 的 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 具有最强的生物效应。同时指出 ,以往所用的破骨细胞培养体系亦证明培养中加入 VitD3 可明显促进破骨细胞的形成与分化。

破骨细胞的分化、增殖受到多种激素和细胞因子的调节。骨髓微环境中多种细胞因子对破骨细胞的分化、增殖发挥重要的调节作用<sup>[7]</sup>。其中 ,IL-6 和 TNF- $\alpha$  受到雌激素的调节 ,是导致绝经后骨质疏松最主要的细胞因子。IL-6 主要来源于巨噬细胞、纤维母细胞、软骨细胞。成骨细胞在 IL-1、TNF、甲状旁腺素(PTH)和 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> 刺激下也可产生 IL-6<sup>[8]</sup> ,是骨吸收的诱导剂 ,与绝经后骨转化的不平衡有着密切的关系。IL-6 可以增加破骨细胞形成 ,还刺激正常成熟的破骨细胞形成骨吸收陷窝从而刺激骨吸收。本实验观察到 ,与骨髓源性破骨细胞分化形成增加相一致 ,实验组骨髓提取液 IL-6 含量从第 2 周开始增加 ,去势后 8 周达到高峰。因此可以推测此时 IL-6 信号系统介导的生物表达效应达到最高水平。

TNF- $\alpha$  主要由活化的单核吞噬细胞产生 ,但抗原活化的 T 细胞、B 细胞、NK 细胞等也产生。近年来大量研究表明 TNF- $\alpha$  在体内、外都有很强的骨吸收诱导作用 ,Zheng 等<sup>[9]</sup>发现绝经后 10 年内骨质疏松妇女外周血单个细胞释放 TNF 明显高于非绝经妇女或用雌激素替代治疗妇女。有关 TNF- $\alpha$  在绝经后妇女骨质疏松症中的作用目前尚不清楚。有研究

报道,绝经后妇女血液循环中  $\text{TNF-}\alpha$  水平升高<sup>[10]</sup>。也有研究报道,在雌激素缺乏状态下, $\text{TNF-}\alpha$  引起骨质疏松<sup>[11]</sup>。用雌激素处理成骨样细胞、单核巨噬细胞、培养的全血细胞可抑制  $\text{TNF-}\alpha$  的释放和表达;当撤除雌激素后, $\text{TNF-}\alpha$  的表达和释放又增加。 $\text{TNF-}\alpha$  是一种强有力的骨吸收诱导剂,可使破骨细胞活性增强, $\text{TNF-}\alpha$  可刺激类破骨细胞的前体增殖并分化为破骨细胞。本实验观察到去势大鼠骨髓液  $\text{TNF-}\alpha$  含量与 IL-6 一致,从第 2 周开始升高,第 8 周达到高峰。

本研究表明,大鼠去势后骨髓体外培养骨髓干细胞分化形成破骨细胞增加和骨髓提取液 IL-6、 $\text{TNF-}\alpha$  含量升高。且骨髓干细胞分化形成的破骨细胞和骨髓提取液 IL-6、 $\text{TNF-}\alpha$  含量变化相一致。说明绝经后雌激素水平下降是导致骨质疏松的主要因素。

### 【参 考 文 献】

- [ 1 ] 曾天舒,陈璐璐,夏文芳,等. 大鼠去卵巢后骨髓源性破骨细胞形成的动态变化及其与骨髓 IL-6、IL-6 受体表达的关系. 中国骨质疏松杂志, 2003, 9(4):291-294.
- [ 2 ] 夏文芳,陈璐璐,曾天舒. 改良的成年大鼠骨髓源性破骨细胞诱导培养体系. 华中科技大学学报(医学版),2002, 31(5):534-536.

- [ 3 ] 薛延. 主编. 骨质疏松症诊断与治疗指南. 科学出版社,1999. 34-43.
- [ 4 ] Papanicolaou DA, Wilder RL, Manolagas SC, et al. The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease. Ann Intern Med, 1998, 128:127-137.
- [ 5 ] Chen LL, Zeng TS, Xia Wenfang, et al. The effect of estrogen on the restoration of bone mass and bone quality in ovariectomized rats. J Tongji Med Uni, 2000, 20:283-286.
- [ 6 ] Takahashi N, Yoshikis. Osteoclastlike cell formation and its reterotropic hormones in mouse bone marrow culture. Endocrinology, 1998, 122:1373.
- [ 7 ] Martini G, Valenti R, Giovani S et al. Influence of insulin-like growth factor 1 and leptin on bone mass in healthy postmenopausal women. Bone, 2001, 28:113-117.
- [ 8 ] Haden ST, Glowacki J, Huiwitz S, et al. Effect of age on serum dehydroepiandrosterone sulfate, IGF-1, and IL-6 levels in women. Calcif Tissue Int, 2000, 66:414-418.
- [ 9 ] Zheng SX, Vitoldts Y, Lopez M, et al. Increase in cytokine production (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF but not IFN- $\gamma$ , GM-CSF or LIF) by stimulated whole blood cells. Maturitas, 1997, 26:63-71.
- [ 10 ] 向光大,廖二元,王运林,等. 肿瘤坏死因子- $\alpha$  对小鼠骨髓基质细胞护骨素表达的影响. 中国骨质疏松杂志, 2005, 11(1):1-4.
- [ 11 ] Pfeilschifter J, Koditz R, Pfohl M et al. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. Endocr Rew, 2002, 23:90-119.

(收稿日期:2006-08-25)