

抗坏血酸拮抗 $\text{TNF-}\alpha$ 对成骨细胞的作用

李知玻 李子锋 杨启友 吴承龙

中图分类号: R 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2008)06-0405-05

摘要:目的 通过观察不同浓度的抗坏血酸对 $\text{TNF-}\alpha$ 诱导的成骨细胞凋亡的影响。方法 用 $\text{TNF-}\alpha$ 培养液诱导体外培养成骨细胞凋亡后, 分别加入不同浓度的抗坏血酸, 用流式细胞仪检测其对成骨细胞的凋亡率。结果 相对于模型组, 加入抗坏血酸的各组凋亡率显著降低, 尤以 10 ng/mL 组最为明显。结论 抗坏血酸能抑制 $\text{TNF-}\alpha$ 诱导的成骨细胞凋亡, 以浓度 10 ng/mL 抑制作用最明显。

关键词: 抗坏血酸; 成骨细胞; $\text{TNF-}\alpha$

Ascorbic acid reverses the effect of $\text{TNF-}\alpha$ on osteoblast LI Zhibo, LI Zifeng, YANG Qiyu, et al. The Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China

Abstract: **Objective** To test the capability of the ascorbic acid in different concentrations to inhibit osteoblast apoptosis induced by tumor necrosis factor- α ($\text{TNF-}\alpha$). **Methods** After induction of apoptosis of osteoblasts cultured *in vitro*, the ascorbic acid in different concentrations was added to the culture medium, the rate of osteoblast apoptosis was tested by flow cytometry. **Results** Compared with the model group, the apoptosis of each group joining the ascorbic acid was significantly lower, particularly the concentration of 10 ng/mL is most obvious.

Conclusions The ascorbic acid can inhibit osteoblast apoptosis induced by $\text{TNF-}\alpha$ and has best effect on concentration 10 ng/mL.

Key words: Ascorbic acid; Osteoblast; $\text{TNF-}\alpha$

随着老年人性激素水平的降低, 肿瘤坏死因子 ($\text{TNF-}\alpha$) 等细胞因子在体内分泌增多。其中 $\text{TNF-}\alpha$ 与骨质疏松和细胞凋亡的关系更密切^[1]。本实验通过观察不同浓度的抗坏血酸对 $\text{TNF-}\alpha$ 诱导的成骨细胞凋亡的影响, 探讨抗坏血酸对成骨细胞生长影响的机制, 为骨质疏松的治疗提供研究帮助。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物: 出生 2~3 d 的小鼠乳鼠(清洁级), 贵阳医学院实验动物中心提供。

主要试剂: DMEM(Gibco 公司), 胎牛血清(四季清), 谷氨酰氨、II 型胶原酶和胰蛋白酶(Stigma 公司), 抗坏血酸(Lvshengyuan), 肿瘤坏死因子($\text{TNF-}\alpha$)(Peprotech Asia)

1.2 方法

1.2.1 成骨细胞的分离培养: 将新生的小鼠乳鼠放入 75% 酒精中浸泡消毒 15 min, 无菌操作取下颅盖骨, 除去附着的血管及结缔组织, 用 D-Hank's 溶液清洗 3 次, 剪成 1 mm³ 大小的碎块, 用 D-Hank's 溶液清洗 3 次, 加入 8 倍于骨碎块体积的 0.25% 胰蛋白酶, 于 37℃ 恒温中预消化 10 min(其间不时摇动), 用 D-Hank's 溶液清洗干净后, 弃去上清, 再加入 8 倍于骨块体积的 0.1% II 型胶原酶, 于 37℃ 恒温中消化 90 min, 离心 10 min(1000 r/min), 弃去上清液, 所得自色沉淀物即为制得的成骨细胞样细胞团, 用含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养液重悬细胞, 吹打均匀, 将细胞悬液调成 2×10^5 /mL 浓度, 吹打均匀后, 接种到培养瓶中, 置于 37℃, 含 5% CO_2 饱和湿度的培养箱内进行培养, 48 h 换液, 弃去悬浮细胞, 每隔 2 d 换液 1 次。第 8 天 80% 细胞融合成单层即可。

1.2.2 传代培养: 原代细胞长满瓶壁后, 于无菌条件下进行传代。弃去原培养液, 加入 0.25% 胰蛋白酶溶液 3~5 min, 显微镜下观察见细胞收缩变圆, 则

基金项目: 贵阳市科技局大学生创业资金计划项目(T2007-9)

作者单位: 550004 贵阳, 贵阳医学院附属医院骨科(李知玻、杨启友、吴承龙); 深圳市平乐骨科医院手外科(李子锋)

通讯作者: 李知玻, Email: lizibo82@sina.com

加入适量培养液并用弯吸管吹打细胞,使之脱落并分散成单细胞悬液。以1:2分瓶接种培养。

1.2.3 抗坏血酸对TNF-α的拮抗作用:选用致成骨细胞凋亡率均值较高的TNF-α浓度30 ng/mL为模型组浓度^[2]。

选用第三代成骨细胞,在96孔板中将所培养的细胞分为4组,每组样本为5个。①空白对照组:仅加含10%胎牛血清的DMEM培养液;②TNF-α诱导组:加浓度为30 ng/mL TNF-α培养液;③治疗组:加浓度为30 ng/mL TNF-α。同时分3组分别加入浓度为5、10、15 ng/mL的抗坏血酸,然后置于5% CO₂, 37℃细胞培养箱中培养72 h。上流式细胞仪检测。实验重复3次。

表1 不同浓度抗坏血酸对TNF-α的影响(̄x ± s)

组别	n	凋亡率(%)	G ₀ -G ₁ 期(%)	S期(%)	G ₂ -M期(%)
空白对照组	5	4.006 ± 1.815	78.028 ± 2.352	10.020 ± 1.680	11.954 ± 1.021
模型组(30 ng/mL TNF-α)	5	20.024 ± 4.433**	70.532 ± 6.862*	15.978 ± 11.415	13.490 ± 5.899
模型+5 ng/mL	5	9.348 ± 1.729**▲▲	71.432 ± 4.149*	12.840 ± 5.602	15.728 ± 1.703
模型+10 ng/mL	5	2.998 ± 1.824▲▲●●	74.904 ± 2.097	12.196 ± 2.490	12.898 ± 1.507
模型+15 ng/mL	5	6.728 ± 1.300▲▲■	74.588 ± 5.452	12.962 ± 1.845	12.450 ± 4.311

注:与空白对照组比较:* P < 0.05, ** P < 0.01;与模型组比较:▲▲ P < 0.01;与模型+5 ng/mL组比较:●● P < 0.01;与模型+10 ng/mL组比较:■ P < 0.05

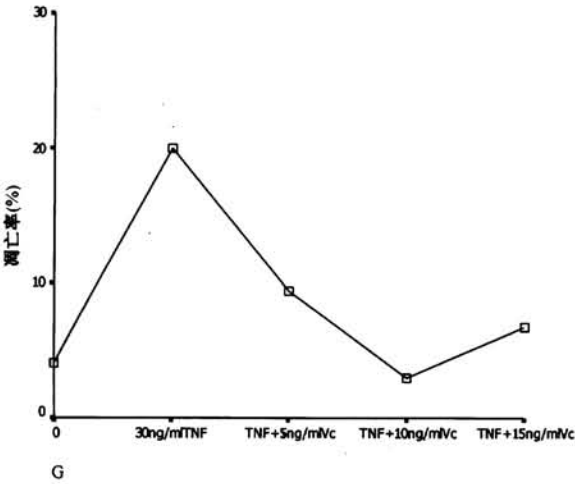


图1 不同浓度抗坏血酸对TNF-α的影响

3 讨论

既往研究表明,雌激素缺乏和钙摄入不足是绝经期骨量丢失、骨质疏松(Osteoporosis, OP)产生的主要原因。近年来研究发现^[3],随着妇女更年期雌激素水平的下降,刺激骨吸收的细胞因子产生过多,使骨吸收活动增强。肿瘤坏死因子-α是重要的骨吸收因子之一,其作用表现为刺激破骨前体细胞的增殖和分化,促进骨吸收,同时抑制成骨细胞碱性磷酸酶

2 结果

从表1中可以看出,相对于空白对照组,加入TNF-α的模型组凋亡率明显提高,差异有非常显著性。而相对于模型组,加入抗坏血酸的各组凋亡率显著下降,其中又以浓度10 ng/mL凋亡率下降最明显,这从图1亦可以看出。图2至图6是成骨细胞各个组于细胞周期的不同阶段的组方图。从图中可以看出,图3的凋亡峰明显高于其他组,而图4、5、6的凋亡峰均比图3的小,其中又以图5最明显。与空白对照组比较,模型组和模型+5 ng/mL组的成骨细胞在G₀-G₁期有所减少,差异有显著性(P < 0.05)。

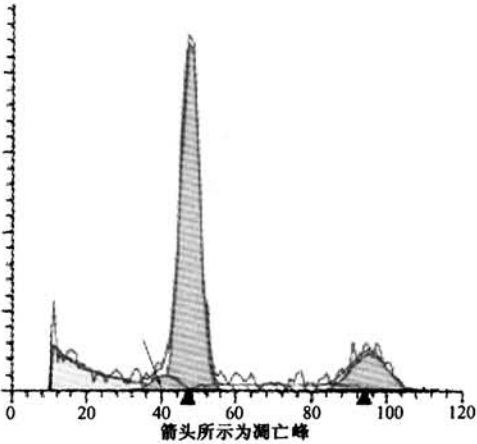


图2 空白对照组成骨细胞凋亡率

的生成,减少骨矿含量,抑制骨胶原合成,抑制骨形成和钙化。有学者甚至认为,雌激素抗骨吸收效应即通过抑制TNF-α等骨吸收细胞因子的分泌实现^[4]。

肿瘤坏死因子是一种具有广泛生物学活性的细胞因子。1985年Shalaby^[1]把巨噬细胞产生的肿瘤坏死因子命名为肿瘤坏死因子α,而将T细胞产生的肿瘤坏死因子命名为肿瘤坏死因子β。研究表明肿瘤坏死因子α与细胞凋亡的关系更为密切。肿瘤坏死因子α通过旁分泌作用,在组织损伤局部可产

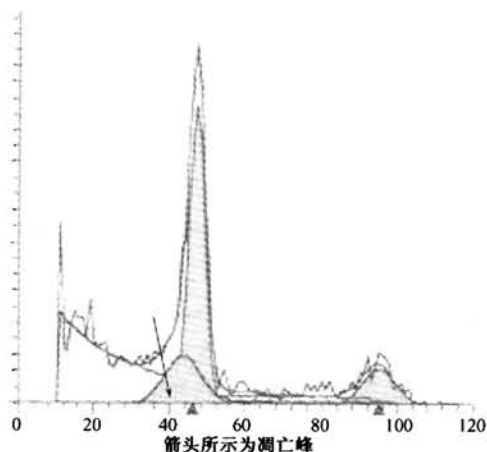


图3 30 ng/mL TNF- α 组成骨细胞凋亡率

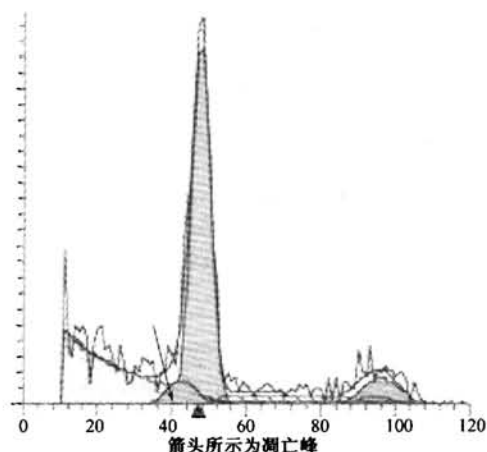


图6 30 ng/mL TNF- α + 15 ng/mL Vc
组成骨细胞凋亡率

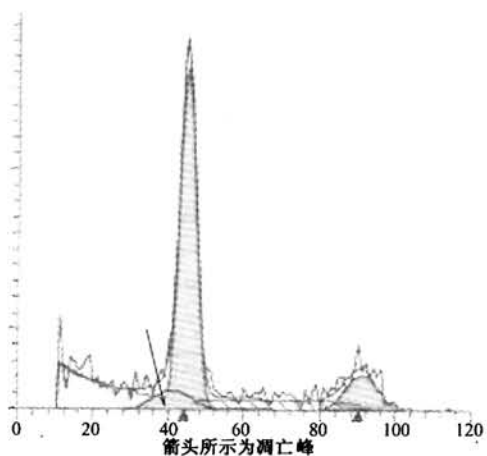


图4 30 ng/mL TNF- α + 5 ng/mL Vc
组成骨细胞凋亡率

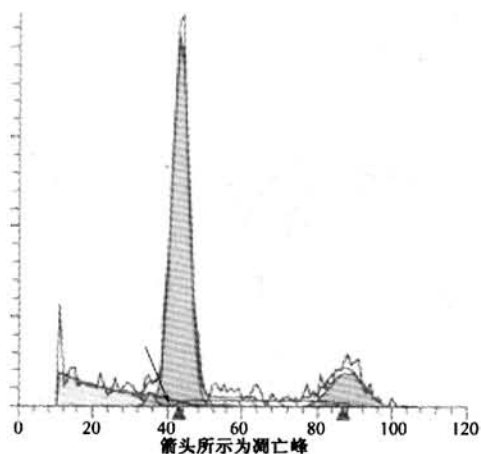


图5 30 ng/mL TNF- α + 10 ng/mL Vc
组成骨细胞凋亡率

前人的研究已经牵涉到抗坏血酸在骨代谢中的控制。妇女的健康调查最近发现,在回顾分析中,相对于单独使用雌激素,在雌激素中增加抗坏血酸的妇女的所有部位的骨矿物质密度都明显地增加^[5]。饮食中摄入低的抗坏血酸会伴随着骨量的减少,尽管在矿化面有更多的骨形成和增加^[6]。在绝经后的妇女中,高的抗坏血酸可以降低骨标志的C端肽^[7],但是低水平的抗坏血酸摄入增加了骨损失的比率^[8]。有研究表明,缺乏一种抗坏血酸产生的必需酶的老鼠会在早期经历自发性骨折。因此,我们推测补充给药抗坏血酸会对绝经后骨质疏松的治疗有作用。

骨的形成需要抗坏血酸,无论是试管实验或动物实验都表明了抗坏血酸是成骨细胞分化的重要辅助因子^[9,10],是成骨细胞表现型表达的必要因素。有报道显示抗坏血酸可诱导胚胎干细胞分化为成骨细胞^[11]。抗坏血酸增加成骨细胞的分化是通过增加胶原的累积,然后增加碱性磷酸酶在成骨细胞中的表达^[12,13]。当人成骨细胞系 Huo-3N1 在 Asa-2-P 中培养时,碱性磷酸酶的增加是在没有 Asa-2-P 时的大约 3 倍^[14]。抗坏血酸能增殖成骨细胞 MC3T3-E1,刺激胶原的合成和增加包含 MC3T3-E1 细胞培养物的羟脯氨酸^[15]。动态的研究表明,在细胞内的溶胶原池里,第 1 小时抗坏血酸增加了脯氨酸的羟化,在 2.5 h 开始刺激胶原前肽 1 型的卵裂^[16]。抗坏血酸的衍生物脱氢抗坏血酸非竞争性地抑制 IkB 激酶从而阻止了下游的转录因子 NF- κ B 的激活,当 NF- κ B 激活被阻止, TNF- α 信号将会凋亡或衰老^[17,18]。Iqbal 等^[19]对加了大量 TNF- α 的整个骨髓培养的 CD11b⁺ 细胞用流式细胞仪进行了分析,发现

生高浓度引起成骨细胞凋亡,进而影响骨代谢(骨平衡)。

了 TNF- α 的应用增加了 CD11b⁺ 细胞的数量,但是加了抗坏血酸的培养基大部分地阻止了这种增加。同样的, TNF- α 诱导分化的标志物 CD38 表达的细胞百分数被增加的抗坏血酸所减少。Iqbal 等实验结果发现包含抗坏血酸的培养基引起 TNF- α 抑制破骨细胞的形成。同时证明了在体外培养中,加入抗坏血酸衍生物可以颠覆 TNF- α 对成骨细胞形成的调节作用。

从本实验结果数据可以看出, TNF- α 对成骨细胞的成长有明显的抑制作用,而抗坏血酸对 TNF- α 又有明显的拮抗作用。在前期的促增殖实验中,成骨细胞分为 6 组分别加入 0、5、10、15、20 和 25 ng/mL 的抗坏血酸,与空白组比较 10、15 ng/mL 组对成骨细胞的生长有显著的促进作用,尤以 10 ng/mL 组差异有显著性,25 ng/mL 组对成骨细胞的生长有抑制作用。而抗坏血酸能抑制 TNF- α 诱导的成骨细胞凋亡,以浓度 10 ng/mL 抑制作用最明显,这与增殖实验是相符的。5、10、15 ng/mL 浓度组的抗坏血酸与模型组比较具有统计学意义,这说明了它们均对 TNF- α 有明显抑制作用,这与 Iqbal 等的研究结果抗坏血酸对 TNF- α 的拮抗是相同的,但是在临床应用中抗坏血酸的最佳浓度依然需要更深入的实践检验。我们还可以看出:抗坏血酸抑制成骨细胞凋亡,因所用的浓度不同而影响的细胞周期是相同的。在空白对照组、模型组和模型加药组中,各组中横向比较都明显可以发现,细胞的凋亡主要是积聚在细胞分化的周期 G₀-G₁ 期阶段,这可能是在该细胞分化周期中存在某种特定的细胞因子或某种特定的发生机制,更有利于细胞凋亡的发生,而在各组间的纵向比较中可以发现, TNF- α 对成骨细胞的凋亡作用和抗坏血酸对 TNF- α 的抑制作用,在 G₀-G₁ 期、S 期、G₂-M 期都有所表现,并没有明显作用于哪个细胞周期中,这说明了 TNF- α 对成骨细胞的凋亡作用和抗坏血酸对 TNF- α 的抑制作用是在细胞分化的各个周期的共同表现。因此推测抗坏血酸可能是减弱了 TNF- α 对成骨细胞周期某个调控点的作用而在凋亡过程起到抑制作用,影响了细胞的不同周期,也可能刺激释放或激活某些细胞因子,间接抑制破骨细胞作用,具体机制如何?有待于进一步研究^[20]。

抗坏血酸又称维生素 C,是一种水溶性维生素,在体内参与多种反应,如参与氧化还原过程,在生物氧化和还原作用以及细胞呼吸中起重要作用等。从组织水平看,抗坏血酸的主要作用是

合成有关。包括胶原、牙和骨的基质,以及毛细血管内皮细胞间的接合物。本实验结果表明了抗坏血酸能抑制 TNF- α 诱导的成骨细胞的凋亡,说明了抗坏血酸增强成骨细胞的功能机制可能与抑制成骨细胞凋亡有关。总之,由于凋亡参与了骨质疏松症的发病及病理过程,所以调控成骨细胞凋亡,增强细胞对凋亡的耐受性,为开发新型防治骨质疏松症的药物提示了新思路。在未来设定的临床试验中,迫切地需要更深入的研究去评定抗坏血酸的对治疗和预防性腺机能减退骨损失的有效作用。

【参 考 文 献】

- [1] Horowitz SM, Purdon MA. Mechanisms of cellular recruitment in aseptic loosening of prosthetic joint implants. *Calcif Tissue Int*, 1995, 57(4): 301-305.
- [2] Zhou Lizhen, Wang Shuli, Xu Henan, et al. Inhibition of osteoblast apoptosis using Compound Xian Zhen Decoction. *Chin J Osteoporos*, 2004, 10(4): 451-455 (in Chinese).
- [3] Pacifici R. Estragen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res*, 1996, 11(8): 1043-1051.
- [4] Kimble RB, Bain S, Pacifici R. The functional block of TNF but not of IL-6 prevents bone loss in ovariectomized mice. *J Bone Miner Res*, 1997, 12(6): 935-941.
- [5] Morton DJ, Barrett-Connor EL, Schneider DL. *J Bone Miner Res*, 2001, 16: 135-140.
- [6] Kipp DE, Grey CE, McElvain ME, et al. Long-term low ascorbic acid intake reduces bone mass in quinea pigs. *J Nutr*, 1996, 126(8): 2044-2049.
- [7] Pasco JA, Henry MJ, Wilkinson LK, et al. Antioxidant vitamin supplements and markers of bone turnover in a community sample of nonsmoking women. *J Women's Health*, 2006, 15(3): 295-300.
- [8] Kaptoge S, Welch A, McTaggart A, et al. Effects of dietary nutrients and food groups on bone loss from the proximal femur in men and women in the 7th and 8th decades of age. *Osteoporos Int*, 2003, 14(5): 418-428.
- [9] Dixon SJ, Kulaga A, Jaworski EM, et al. Ascorbate uptake by ROS 17/2.8 osteoblast-like cells: substrate specificity and sensitivity to transport inhibitors. *J Bone Miner Res*, 1991, 6(6): 623-629.
- [10] Pandipati S, Driscoll JE, Franceschi RT. Glucocorticoid stimulation of Na⁺-dependent ascorbic acid transport in osteoblast-like cells. *J Cell Physiol*, 1998, 176(1): 85-91.
- [11] Carinci F, Pezzetti F, Spina AM, et al. Effect of Vitamin C on pre-osteoblast gene expression. *Arch Oral Biol*, 2005, 50(5): 481-496.
- [12] Takamizawa S, Maehata Y, Imai K, et al. Effects of ascorbic acid and ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative, on the proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells. *Cell Biol Int*, 2004, 28(4): 255-265.

(下转第 401 页)

(上接第 408 页)

- [13] Shiga M , Kapila YL , Zhang Q , et al. Ascorbic acid induces collagenase-1 in human periodontal ligament cells but not in MC3T3-E1 osteoblast-like cells : potential association between collagenase expression and changes in alkaline phosphatase phenotype. J Bone Miner Res , 2003 , 18 (1) : 67-77 .
- [14] Hitomi K , Torii Y , Tsukagoshi N. Increase in the activity of alkaline phosphatase by L-ascorbic acid 2-phosphate in a human osteoblast cell line , HuO-3N1. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) , 1992 , 38 (6) : 535-544 .
- [15] Harada S , Matsumoto T , Ogata E. Role of ascorbic acid in the regulation of proliferation in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. J Bone Miner Res , 1991 , 6 (9) : 903-908 .
- [16] Franceschi RT , Iyer BS , Cui Y. Effects of ascorbic acid on collagen

matrix formation and osteoblast differentiation in murine MC3T3-E1 cells. J Bone Miner Res , 1994 , 9 (6) : 843-854 .

- [17] Beg AA , Baltimore D. An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. Science , 1996 , 274 (5288) : 782-784 .
- [18] Ponnappan U. Regulation of transcription factor NF-kappa B in immune senescence. Front Biosci , 1998 , 3 : 152-168 .
- [19] Iqbal J , Sun L , Kumar TR , et al. Follicle-stimulating hormone stimulates TNF production from immune cells to enhance osteoblast and osteoclast formation. Proc Natl Acad Sci USA. United States , 2006 , 14925-14930 .
- [20] Deng yaozu , Qu shen. Medical Molecular Cell Biology. Beijing : Science Press 2002 : 449-453 (in Chinese) .

(收稿日期 : 2007-12-26)