

两种不同降钙素对体外培养破骨细胞影响的实验研究

崔维顶 李翔 刘志祥

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)02-0131-04

摘要:目的 观察不同浓度鳗鱼降钙素与鲑鱼降钙素对体外分离培养的破骨细胞数量和活力的影响。方法 从新生幼兔四肢长骨中机械分离出破骨细胞,分别接种于盖玻片及骨薄片上,加入两种不同种类的降钙素,抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色观察盖玻片上破骨细胞的数量和形态,JD801图像分析软件分析骨片上骨吸收陷窝的面积。结果 两种降钙素的各个浓度组(分别是 10^{-12} mol/L、 10^{-10} mol/L、 10^{-8} mol/L)均对贴壁生长的破骨细胞数量有明显抑制作用,并呈剂量相关性。骨吸收陷窝面积分析结果显示,两类降钙素均对破骨细胞吸收功能有明显抑制作用,呈剂量相关性。无论是盖玻片培养还是骨薄片培养,益钙宁和密盖息各相同浓度组间两两对照比较差异均无显著性($P > 0.05$)。结论 两种不同种类降钙素对体外培养的破骨细胞数量和骨吸收活性的抑制能力相仿。

关键词: 降钙素; 益钙宁; 密盖息; 破骨细胞

The effects of two kinds of calcitonin on osteoclasts in vitro CUI Weiding, LI Xiang, LIU Zhixiang.

Department of Orthopedics, The First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China

Abstract: **Objective** To observe the effects of the different concentrations of eel calcitonin (eCT) and salmon calcitonin (sCT) on proliferation and activation of osteoclasts *in vitro*. **Methods** The osteoclasts isolated from the long bones of neonatal New Zealand's rabbits were cocultured in bone slices and cover slips with different concentrations of eCT and sCT in M199. Numbers of the osteoclasts were calculated and the conformation of osteoclasts was observed after being stained with tartrate-resistance acid phosphatase (TRAP). The resorptive areas on slices stained by toluidine blue were counted by Image-JD801 software. **Results** The number of osteoclasts decreased with the increase of eCT and sCT concentrations after incubation in cover slips for 2 days (10^{-12} mol/L, 10^{-10} mol/L and 10^{-8} mol/L) ($P < 0.01$). The resorptive areas were decreased in a dose-dependent manner with increasing eCT and sCT concentrations after incubation in bone slices for 3 days ($P < 0.01$). There is no significant difference between the Elcatonin group and the Miacalcic group in each concentration ($P > 0.05$). **Conclusions** There is no significant difference between Elcatonin and Miacalcic in inhibiting the osteoclastic proliferation and bone resorption of osteoclasts.

Key words: Calcitonin; Elcatonin; Miacalcic; Osteoclasts

降钙素(Calcitonin, CT)在治疗骨质疏松症、高血钙、甲状旁腺功能亢进、变形性关节炎及骨折愈合等方面都显示了良好的疗效,尤其在治疗骨质疏松方面能明显改善骨痛症状。降钙素按来源的不同分为:灵长类和啮齿类、偶蹄类及硬骨鱼类。目前临床应用的降钙素均为硬骨鱼类,依其来源又分为两类:鲑鱼降钙素(sCT)和鳗鱼降钙素(eCT)衍生物,其代表

药物为密盖息和益钙宁^[1]。

作为两种临床上广泛使用的药物,它们能有效降低血钙并可抑制骨吸收。本实验旨在观察不同浓度鳗鱼降钙素和鲑鱼降钙素对体外分离培养的破骨细胞数量和活力的影响,并对相同药物浓度下两者作用的结果进行比较。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物及生物材料: 出生 24 h 内的新西兰兔

(南京金陵种兔场),新鲜牛股骨(南京市屠宰场)。

1.1.2 培养试剂和药物: M199 培养基(美国 Gibco 公司),胎牛血清(杭州四季青),HEPES、谷氨酰胺(美国 Sigma 公司),TRAP 染色试剂盒(美国 Sigma 公司),益钙宁(日本旭化成制药株式会社),密盖息(瑞士诺华制药)。

1.1.3 实验仪器及器械: 锯式切片机(Leitz 1600,上海市瑞金医院骨伤科实验室),光学显微镜及照相系统(日本 Olympus),6 孔及 24 孔培养板(美国 Gibco 公司),JD801 图像分析软件系统(捷达 801)。

1.2 实验方法

1.2.1 骨薄片的制备: 新鲜牛股骨干皮质骨以锯式切片机切成 $70 \mu\text{m}$ 厚,并剪成 $4 \times 4 \text{ mm}^2$ 大小,超声波清洗仪内超声清洗 3 次,每次 10 min,洗净后紫外线照射 4 h(双面,每面各 2 h),浸泡于 M199 培养液中 4°C 保存备用。

1.2.2 盖玻片的处理: 盖玻片泡酸(硫酸-重铬酸钾溶液)过夜,自来水、蒸馏水充分冲洗后凉干,高压消毒备用。

1.2.3 不同浓度降钙素药液的配制: 采用日本旭化成制药株式会社生产的鳗鱼降钙素注射液(商品名:益钙宁(Elcitonin),20IU/mL 每支,生产批号 ELB11MM),以 M199 培养液配制成 10^{-12} mol/L 、 10^{-10} mol/L 、 10^{-8} mol/L 3 种不同浓度的药液(4°C 冰箱中保存);诺华制药公司生产的鲑鱼降钙素注射液(商品名:密钙息(Miacalcic),50 IU/mL 每支,生产批号 S0045),以培养液配制成相同浓度的药液(4°C 冰箱中保存)。

1.2.4 分离培养破骨细胞: 参考 Chambers 等^[21]的方法,从 24 h 内出生的新生兔四肢长骨中机械分离出破骨细胞,分别接种到盖玻片培养组和骨薄片培养组中。盖玻片组贴壁培养($5\% \text{ CO}_2$, $95\% \text{ 空气}$, 37°C 湿热)1 h,骨片组贴壁培养 3 h,用 M199 培养液洗去未贴壁细胞,洗 2 次,继续培养。

1.2.5 抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色: 光镜下观察染色后大于 3 个细胞核的多核细胞计为破骨细胞,而单核细胞计为前破骨细胞。

1.2.6 实验分组: 在第 1 次换液洗去未贴壁的破骨细胞后,TRAP 染色鉴定证实细胞生长。将两种药物按 3 种浓度分别加入盖玻片和骨片上。

1.2.6.1 盖玻片培养组: 益钙宁组:分别加 10^{-12} mol/L 、 10^{-10} mol/L 、 10^{-8} mol/L 浓度的药液培养;密盖息组:分别加 10^{-12} mol/L 、 10^{-10} mol/L 、 10^{-8} mol/L 浓度的药液培养;对照组:仅加入 M199 培养液作对照

组。

1.2.6.2 骨片培养组: 益钙宁组:分别加 10^{-12} mol/L 、 10^{-10} mol/L 、 10^{-8} mol/L 浓度的药液培养;密盖息组:分别加 10^{-12} mol/L 、 10^{-10} mol/L 、 10^{-8} mol/L 浓度的药液培养;对照组:仅加入 M199 培养液作对照组。

1.2.7 TRAP 染色阳性细胞记数: 于加药培养 2 d 后取出各个浓度培养的盖玻片,分别进行 TRAP 染色,光镜下($\times 100$)观察作 TRAP(+)细胞记数。

1.2.8 骨片吸收陷窝分析: 培养 3 d 后取出骨片,2.5% 戊二醛 4°C 固定 7 min。超声清洗 5 min,系列乙醇(体积比分别为:40%、75%、80%、95%及无水酒精)脱水,自然晾干。1% 甲苯胺蓝室温染色 5 min。蒸馏水冲洗后在 100 倍光镜下以 JD801 图像分析软件系统计算吸收陷窝面积。(结果用单位面积骨片内吸收陷窝的面积表示,单位: $\mu\text{m}^2/\text{视野}$)。

1.3 统计学处理

实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 13.0 软件对实验结果进行一维方差分析及 q 检验,检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 破骨细胞的鉴定

盖玻片上贴壁培养的破骨细胞为体积较大、有多个核的巨细胞,TRAP 染色胞浆呈棕红色颗粒状,细胞核不染色,核仁清楚(图 1)。

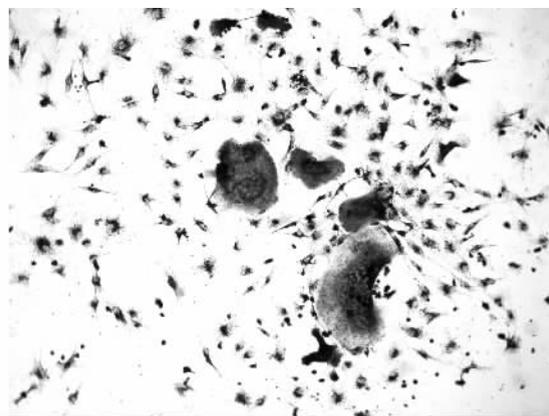


图 1 培养 2 d 破骨细胞 TRAP 染色($\times 100$)

2.2 盖玻片组 TRAP 染色形态观察及 TRAP(+)细胞计数

益钙宁组和密盖息组盖玻片上破骨细胞数量均较对照组明显减少,并呈剂量相关性(表 2)。两种药的各个浓度组和对照组比较差异均有显著性($P < 0.01$)。益钙宁和密盖息各相同浓度组间两两比

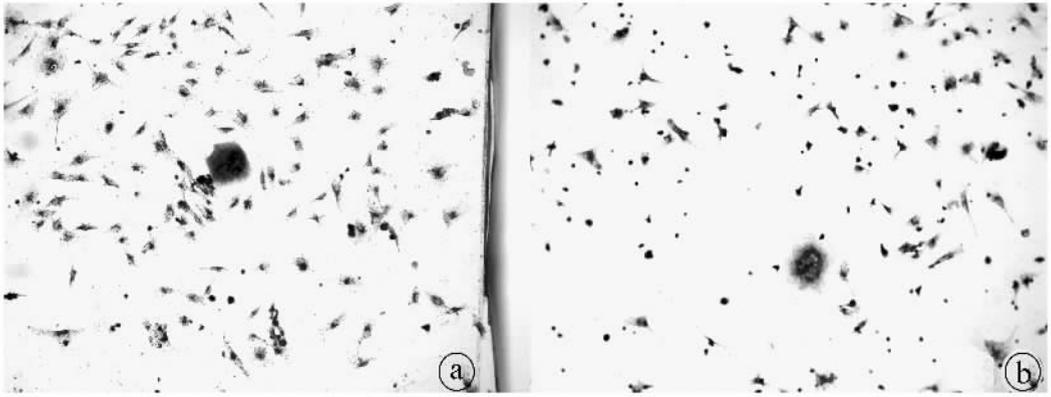


图2 a: 10^{-8} mol/L 密盖息培养 2 d; b: 10^{-8} mol/L 益钙宁培养 2 d (100 ×)

较差异均无显著性 ($P > 0.05$) (表 1)。

表 1 培养 2 d 盖玻片上的破骨细胞数目 ($\bar{x} \pm s$)

组别	对照组	10^{-12} mol/L	10^{-10} mol/L	10^{-8} mol/L
益钙宁组	156.0 ± 17.1	103.0 ± 16.5*	73.3 ± 14.8*	62.7 ± 13.6*
密盖息组	156.0 ± 17.1	96 ± 17.4*	78.3 ± 21.6*	61.7 ± 4.7*

注: 与对照组比较, * $P < 0.01$

2.3 骨片组骨吸收陷窝形态学观察及陷窝面积分析

骨片培养 3 d 甲苯胺蓝染色后 100 倍光镜下观察, 吸收陷窝呈蓝紫色, 圆形、椭圆形和不规则形, 大小不一, 部分区域吸收陷窝比较密集, 甚至融合在一起, 边缘反光性强 (图 3)。降钙素组吸收陷窝明显少, 且单个陷窝的面积也小。

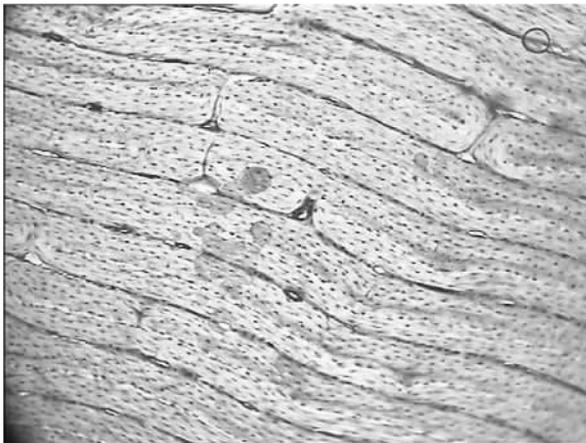


图 3 对照组培养 3 d 吸收陷窝甲苯胺蓝染色 (× 100)

骨吸收陷窝面积分析结果显示, 两类降钙素均对破骨细胞吸收功能有明显抑制作用 ($P < 0.01$), 呈剂量相关。益钙宁和密盖息各相同浓度组间两两对照比较均无显著性差异 ($P > 0.05$) (表 2)。

3 讨论

被称为“无声无息的流行病”的骨质疏松症已被

WHO 列为仅次于心血管病的第二大影响公众健康的疾病^[3]。骨质疏松的治疗和预防越来越多地受到了人们重视, 降钙素^[4]是由甲状腺 C 细胞合成分泌的多肽, 是目前临床缓解骨痛、治疗骨质疏松症经典药物之一。降钙素通过抑制破骨细胞发挥作用, 包括对破骨细胞骨吸收活性的急性抑制作用和对破骨细胞分化成熟的抑制作用。

表 2 培养 3 d 骨薄片上的吸收陷窝面积

组别	对照组	10^{-12} mol/L	10^{-10} mol/L	10^{-8} mol/L
益钙宁组	149352.1 ± 3926.18	70928.0 ± 23961.4*	53816.7 ± 11757.3*	26073.8 ± 6330.0*
密盖息组	149352.1 ± 3926.18	78576.7 ± 21625.2*	41659.5 ± 17809.7*	27959.2 ± 8667.0*

注: 与对照组比较, * $P < 0.01$

降钙素之所以能够对破骨细胞产生直接作用是因为靶细胞上有大量降钙素受体 (CTR), 每个破骨细胞大约有 100 万个 CTR, 这使得破骨细胞对降钙素极为敏感。更为奇特的是, 鱼类降钙素和哺乳动物的降钙素受体的结合能力超过了哺乳动物自身的降钙素和其受体的结合能力。鱼类降钙素与人受体的亲和力高于人降钙素, 因而作用更强, 这也是鱼类降钙素中的两个典型代表: 益钙宁 (鳗鱼降钙素衍生物) 和密盖息 (鲑鱼降钙素) 能够在临床上得到广泛应用与认可的最根本原因。

降钙素之间活性的差别是由其化学结构差异所造成的。降钙素均为 32 个氨基酸构成的单链多肽, 但不同种属之间存在氨基酸序列的明显差异。这种差异主要存在于多肽的中段氨基酸, 而 N 端和 C 端变化小。侧链氨基酸拥挤性小的多肽链中段结构形态的可塑程度大。因为侧链氨基酸少, 形成僵硬的螺旋结构的机会就少, 降钙素在受体上变形适应能力就大, 活性就强, 鲑鱼降钙素是一个典型的例子^[4]。益钙宁是乙烯键替代鳗鱼降钙素二硫键的衍生物, 它不仅使多肽分子更稳定, 也同时保证了其鱼

类降钙素高效的特点。

对这两种临床应用广泛并具高效性的降钙素的活性对比研究显得很有意义。本研究显示:无论是对体外贴壁培养的破骨细胞的数量还是对破骨细胞在骨片上的吸收活性,这两类降钙素都有强烈的抑制作用,并且呈浓度依赖性,各个浓度组与对照组相比均有显著差异($P < 0.01$),此结果与 Cornish 等^[5]的报道一致。但相同浓度的益钙宁和密盖息对体外分离培养的破骨细胞在数目和吸收活性上的影响都没有显著差异($P > 0.05$),说明两者体外活性相仿。

上世纪80年代 Chambers 等^[6]首次成功地体外培养出 OC,并证明了 CT 直接作用于 OC 并调节其活性。现已明确 CT 通过与 OC 上的 CTR 结合,发生两部分作用:①静止期或 Q 部分,此作用发生比较快,以细胞运动过程逐渐停止为特征;②伪足或边缘回缩期或 R 部分,以伪足经长时间的回缩为特征^[7]。Zaidi 等^[8]报道益钙宁可引起胞浆游离钙升高,继而促发级联反应,引起微丝、微管等细胞骨架蛋白的重新排列,从而导致 OC 细胞体积缩小、皱褶消失,使得 OC 活性明显下降^[9]。另一些作者发现,鲑鱼降钙素不引起 OC 胞浆游离钙增加,但能明显抑制骨吸收。这也在本实验中得到了证实:相同药物浓度下,益钙宁组破骨细胞比密盖息组破骨细胞在形态上普遍缩小。近来学者们进一步研究降钙素作用的分子机制,Granhholm 等^[10]发现降钙素通过 cAMP/PKA/Epac 级联机制抑制鼠破骨细胞的形成, Yamamoto 等^[11]发现降钙素受体与 PKA 和 PKC 耦联,降钙素与受体结合后通过 PKA 或 PKC 的激活发挥作用。

总之,我们认为:临床常用的两种鱼类降钙素益钙宁和密盖息对体外分离培养的破骨细胞的数目和活性均有明显抑制作用,并且这种抑制作用与药物浓度呈相关性。但相同浓度下两者对体外培养的破

骨细胞的抑制作用效果相当,没有显著差别。两者在人体内的作用途径和机制可能有所差别,需进一步深入研究。

【参 考 文 献】

- [1] 赵伟业,董碧蓉,欧雪梅,等.骨质疏松药物治疗的新进展及循证证据.中国骨质疏松杂志,2003,1(1):80-83.
- [2] Chambers TJ, Revell PA, Fuller K, et al. Resorption of bone by isolated osteoclasts. J Cell Sci, 1984, 66(1):383-399.
- [3] 任莉,陈阳生,翟翠云.骨质疏松症的药物治疗.中国骨质疏松杂志,2005,11(1):126-129.
- [4] 金世鑫.降钙素的生物合成和生理作用.中国骨质疏松杂志,2003,1(4):381-383.
- [5] Cornish J, Callon KE, Bava U, et al. Effects of calcitonin, amylin, and calcitonin gene-related peptide on osteoclast development. Bone, 2001, 29(2):162-168.
- [6] Chambers TJ, Magnus CJ. Calcitonin alters behaviour of isolated osteoclasts. J Pathol, 1982, 136(1):27-39.
- [7] Mone Zaidi, Baljit S, Moonga BS, et al. Calcitonin and bone formation: a knockout full of surprises. J Clin Invest, 2002, 110(12):1769-1771.
- [8] Zaidi M, Datta HK, Moonga BS, et al. Evidence that the action of calcitonin on rat osteoclasts is mediated by two G proteins acting via separate post-receptor pathways. J Endocrinol, 1990, 126(3):473-481.
- [9] Moonga BS, Alam AS, Bevis PJ, et al. Regulation of cytosolic free calcium in isolated rat osteoclasts by calcitonin. J Endocrinol, 1992, 133(3):241-249.
- [10] Granhholm S, Lundberg P, Lerner UH. Calcitonin inhibits osteoclast formation in mouse haematopoietic cells independently of transcriptional regulation by receptor activator of NF- κ B and c-Fms. J Endocrinol, 2007, 193(3):415-427.
- [11] Yamamoto Y, Yamamoto Y, Udagawa N, et al. Effects of calcitonin on the function of human osteoclast-like cells formed from CD14-positive monocytes. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2006, 52(3):25-31.

(收稿日期:2008-09-23)