

铁饱和乳铁蛋白对大鼠成骨细胞增殖与分化的影响

曹阳阳 张楠楠 李丹丹 刘宁

中图分类号: R151.2 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2009)10-0752-04

摘要:目的 探讨铁饱和乳铁蛋白对体外培养的大鼠成骨细胞增殖和分化的影响。方法 用酶消化法分离大鼠颅盖骨成骨细胞进行原代培养,乳铁蛋白螯合 Fe^{2+} 获得铁饱和乳铁蛋白,将其稀释到不同浓度作用于成骨细胞,四唑盐比色法(MTT)测定细胞增殖,碱性磷酸酶法(ALP)测定细胞碱性磷酸酶活性。结果 随着时间的增加,各浓度组均可促进成骨细胞增殖及增强碱性磷酸酶活性。其中 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度组在 72 h 时细胞增殖数目最大、碱性磷酸酶活性最高,较对照组有统计学意义($P < 0.01$)。结论 铁饱和乳铁蛋白能促进大鼠成骨细胞的增殖和分化。

关键词:牛源乳铁蛋白;金属离子结合;成骨细胞;增殖;分化

doi: 10.3969/j.issn.1006-7108.2009.10.009

Effects of iron-saturated bovine lactoferrin on the proliferation and differentiation of osteoblasts CAO Yangyang, ZHANG Nannan, LI Dandan, LIU Ning. Key Lab of Dairy Science, Ministry of Education; College of Food Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

Abstract: **Objective** To study the effects of iron-saturated bovine lactoferrin on the proliferation and differentiation of osteoblasts *in vitro*. **Methods** Enzyme digestion were used to isolate osteoblasts from cranium of Wister. After chelating Fe^{2+} , Lactoferrin changed into iron-saturated bovine lactoferrin. Different concentrations of iron-saturated bovine lactoferrin were used to act on osteoblasts. 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium tes (MTT) was used to determine the proliferation of osteoblasts, and the Alkaline Phospase Tas (ALP) activity was also determined. **Results** As the time increased, every concentration group showed proliferation of osteoblasts and enhanced ALP activity. The concentration group of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ at 72 h showed the maximum number of cells and highest ALP activity. **Conclusion** Iron-saturated bovine lactoferrin can promote the proliferation and differentiation of rat osteoblasts.

Key words: Bovine lactoferrin; Metal ion complexes; Osteoblasts; Proliferation; Differentiation

乳铁蛋白(LF)是一种铁结合性糖蛋白,主要存在于哺乳动物的各种外分泌物中,如乳汁、泪液或唾液等。LF 是人乳中一种主要的乳清蛋白。初乳 LF 含量约 6~8 mg/mL,正常乳为 2~4 mg/mL。该浓度较普通牛乳高 20 倍。

LF 作为一种铁强化剂调控铁的生物利用率,具有多种生物功能,抗菌、抗病毒和抗氧化作用;参与机体免疫调节,刺激溶菌酶活性再生和肠黏膜细胞

再生。除具有以上功能外,在骨生理方面的作用近来也引起关注。研究表明^[1],乳铁蛋白能促进骨骼生长,在生理浓度下能有效刺激成骨细胞的增殖和分化,抑制破骨细胞形成,在骨生长和代谢中起到一定的生理作用。本研究将 LF 与铁离子结合,作用于体外培养的成骨细胞观察其细胞增殖和碱性磷酸酶活性的变化,初步探讨铁饱和乳铁蛋白对成骨细胞的作用及其机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1 d 龄 Wistar 大鼠(哈尔滨医科大学肿瘤研究所提供),DMEM 培养液(美国 Gibico 公司),胎牛血清

基金项目:东北农业大学创新团队基金资助项目(CXT007-3-1)

作者单位:150030 哈尔滨,东北农业大学食品学院乳品科学教育部重点实验室

通讯作者:刘宁,Email:ningliu6666@yahoo.com.cn

(杭州四季青),青霉素(80 万 U,哈药集团制药总厂),链霉素(100 万 U,大连美罗大药厂),胰蛋白酶(Sigma),II 型胶原酶(Sigma),ALP 染色试剂盒、ALP 活性检测试剂盒(南京建成生物研究所),噻唑蓝(MTT,美国 Gibco 公司),二甲基亚砷(DMSO, Solarbio 公司),聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-100, Amreso 公司),牛源乳铁蛋白(Westland,纯度 > 90%),分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 铁饱和和乳铁蛋白的制备 将 LF 溶于 pH 7.5、5 mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(含 0.15 mol/L NaCl)中,配制成 2%(W/W)的 LF 溶液。取 0.9 mL 该溶液,加至 0.1 mL 现配的 0.1 mol/L NaHCO_3 溶液中,加入 1.0 mL 的 0.6 mmol/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 溶液,反应 1 h,5000 g 离心 15 min,去除沉淀,经去离子水透析 48 h,冷冻干燥备用^[2]。

1.2.2 铁饱和度的测定 理论上,1 个 LF 分子可以结合 2 个 Fe^{3+} 。自制 LF 的相对分子质量为 80400。100% 饱和度的 LF 中铁的含量为 1.40 $\mu\text{g}/\text{mg}$ LF ($55.85 \times 2/80000$)。用原子吸收分光光度法测定待测样品中铁的含量 C_{Fe} ($\mu\text{g}/\text{mg}$ 样品)铁饱和度根据下式计算:

$$\text{铁饱和度} = (C_{\text{Fe}} \div 1.40) \times 100\%$$

1.2.3 成骨细胞的原代培养 取新生 1 d 的健康 Wistar 大鼠 6 只,引颈处死,75%乙醇浸泡 10 min,取出置于消毒培养皿中,剪开头顶皮肤取出颅盖骨放入 PBS 中去除骨膜及周围结缔组织,PBS 冲洗 2 次后,剪成 0.1 mm^3 的骨片,加入 0.25% 胰蛋白酶(5 mL),在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下消化 20 min,2000 g 离心 5 min,弃上清,骨片移入 5~10 mL 的 II 型胶原酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡消化 90 min,2000 g 离心 5 min,弃去消化液。加 DMEM 培养液反复吹打冲洗 3 次,重复离心过程;加入 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养液制成细胞悬液,调节细胞密度为 1×10^5 个细胞的密度,接种于培养瓶中,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度条件下培养 24 h 后换液,以后每 2 d 换液 1 次,待细胞铺满培养瓶时,用 0.25% 胰蛋白酶消化,并传代培养。

1.2.4 成骨细胞的鉴定 采用碱性磷酸酶染色法进行细胞鉴定,具体步骤按照试剂盒的说明操作。将底物、显色剂和缓冲液按体积比 1:1:50 的比例混合即为细胞的培养液。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 40 min,观察细胞染成蓝色即可,蒸馏水冲洗,晾干,倒置显微镜观察细胞形态。

1.2.5 细胞增殖测定 无血清培养 24 h 后吸去培养基,以每孔 5×10^4 个细胞的密度接种于 96 孔培养板中,每孔分别加含铁饱和乳铁蛋白浓度为 1、10、100 和 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的无血清 DMEM 培养液 100 μL (含双抗),并设正常对照孔。加已过滤除菌、浓度为 5 mg/mL 的 MTT 溶液 20 $\mu\text{L}/\text{孔}$,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度条件下孵育 4 h 后吸去培养液,然后每孔加入 100 μL 二甲基亚砷,37 $^{\circ}\text{C}$ 下置摇床上低速振荡 10 min,使紫色结晶物(甲 formazan)充分溶解。分别于培养 24、48 和 72 h 后测定成骨细胞的增殖能力。酶联免疫检测仪 490 nm 处测量各孔的吸光度(A 值)。

1.2.6 碱性磷酸酶(ALP)测定 无血清培养 24 h 后吸去培养基,经 0.25% 胰蛋白酶消化后的传代细胞,细胞密度和加药浓度同上。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度条件下培养 24、48 和 72 h 后,吸去每个孔中的培养液,加入 100 μL 的 0.1% Triton X-100,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12 h 裂解细胞后反复吹打制成悬液,每孔取 50 μL 转入新的 96 孔培养板中进行孵育,孵育的具体操作按说明书进行。

1.2.7 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析,对各组数据进行单因素方差分析,分析差异显著性。

2 结果

2.1 铁饱和和乳铁蛋白饱和度测定

经测定原料 LF 的铁饱和度为 10.29%(即含铁量为 14.41 mg Fe/100 g LF)。制备的铁饱和乳铁蛋白的饱和度为 94.46%(132.24 mg Fe/100 g LF),图 1 为测定铁离子的标准曲线。

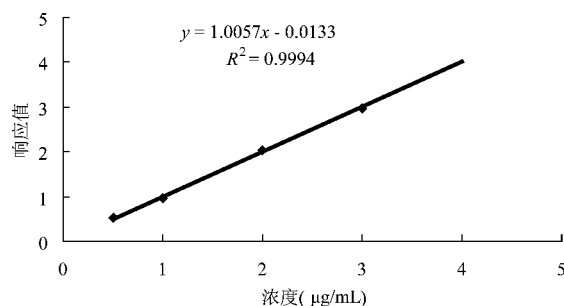


图 1 铁饱和和乳铁蛋白中铁含量测定标准曲线

2.2 成骨细胞的鉴定

成骨细胞活体观察 细胞刚分离出来为圆形,贴壁生长后变为星形,具有胞浆突起,数日后胞突连成网状使星形细胞相互连接,见图 2。细胞铺满培养

瓶底部时近似方形呈铺路石状 ,见图 3。

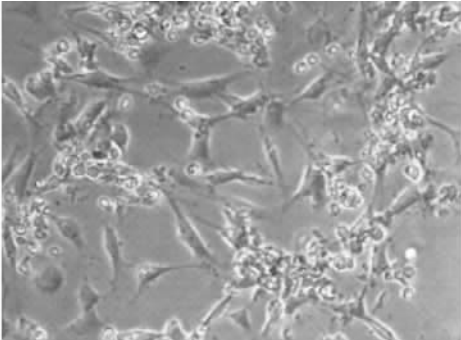


图 2 大鼠成骨细胞形态
碱性磷酸酶染色 × 100

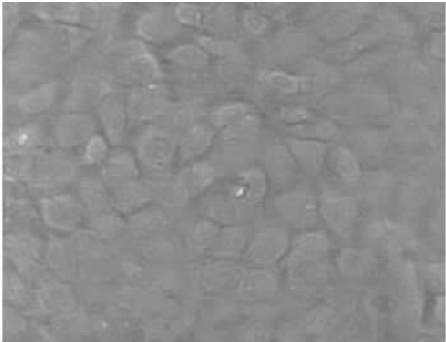


图 3 大鼠成骨细胞形态
碱性磷酸酶染色 × 100

ALP 染色 :按照试剂盒染色后 ,倒置显微镜下观察到的细胞多为梭形或是星形 ,见图 4。细胞质内有少量黑色物质 ,见图 5。

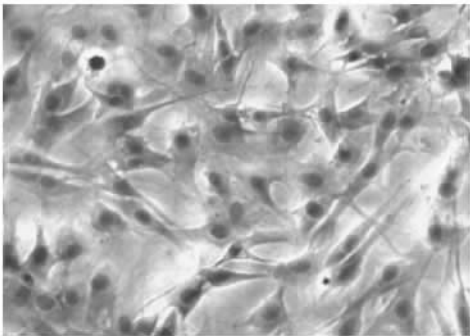


图 4 碱性磷酸酶染色后的大鼠
成骨细胞形态 × 100

2.3 成骨细胞的增殖

如表 1 所示 ,随着培养时间的增加 ,不同浓度的铁饱和和乳铁蛋白组均可促进大鼠成骨细胞的细胞增殖 ,72 h 达到最强。各组间比较 ,24 h 和 72 h 的细胞增殖作用明显。其中 ,100 μg/mL 浓度组在 24 h

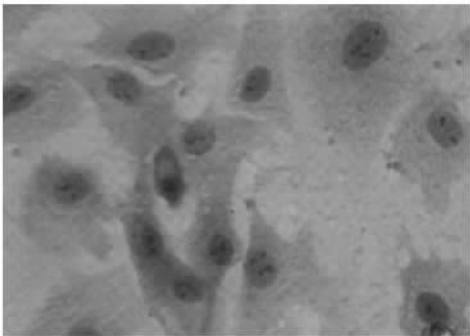


图 5 碱性磷酸酶染色后的大鼠
成骨细胞形态 × 200

较对照组差异有统计学意义($P < 0.05$) ;100 μg/mL 浓度组在 72 h 较对照组差异有统计学意义($P < 0.01$) ;48 h 的各浓度组较对照组差异无统计学意义。当浓度达到 1000 μg/mL 时 ,细胞增殖减少。各浓度组在 24 ~ 72 h 的增殖情况见图 6。

表 1 不同浓度铁饱和和乳铁蛋白对大鼠成骨细胞增殖的影响

浓度(μg/mL)	24 h	48 h	72 h
对照组	0.196 ± 0.013	0.268 ± 0.025	0.446 ± 0.043
1	0.190 ± 0.010	0.279 ± 0.012	0.476 ± 0.033
10	0.203 ± 0.006	0.277 ± 0.017	0.503 ± 0.024
100	0.235 ± 0.013 *	0.289 ± 0.008	0.689 ± 0.015**
1000	0.208 ± 0.011	0.279 ± 0.012	0.494 ± 0.065

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

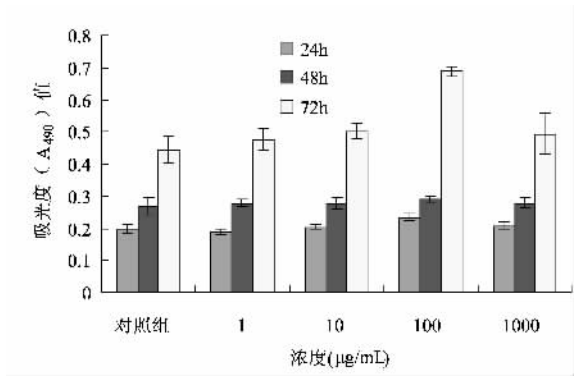


图 6 不同浓度铁饱和和乳铁蛋白作用于成骨细胞
24 ~ 72 h 的增殖情况

2.4 成骨细胞的碱性磷酸酶活性

如表 2 所示 ,随着培养时间的增加 ,不同浓度的铁饱和和乳铁蛋白组均能使大鼠成骨细胞的碱性磷酸酶活性增强 ,72 h 达到最高。各组间比较 ,24 h 的各浓度组较对照组差异不显著。48 和 72 h 的 10 μg/mL 浓度组较对照组差异有统计学意义($P < 0.05$) ;100 μg/mL 浓度组较对照组差异有统计学意义($P < 0.01$)。48 h 和 72 h 的 1 ~ 100 μg/mL 浓度区间 ,随着

浓度的增加碱性磷酸酶活性逐渐增强。当浓度达到 1000 $\mu\text{g/mL}$ 时 ,碱性磷酸酶活性下降。各浓度组在 24 ~ 72 h 的碱性磷酸酶活性见图 7。

表 2 不同浓度铁饱和乳铁蛋白对大鼠成骨细胞碱性磷酸酶活性的影响

浓度($\mu\text{g/mL}$)	24 h	48 h	72 h
对照组	2.896 $\pm$ 0.52	4.822 $\pm$ 0.52	7.912 $\pm$ 0.60
1	3.007 $\pm$ 0.12	5.668 $\pm$ 1.06	8.112 $\pm$ 0.19
10	3.187 $\pm$ 0.27	6.560 $\pm$ 0.56 *	10.591 $\pm$ 0.65 *
100	3.222 $\pm$ 0.13	9.063 $\pm$ 0.58 **	14.002 $\pm$ 0.50 **
1000	3.478 $\pm$ 0.23	5.147 $\pm$ 0.24	8.991 $\pm$ 0.39

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

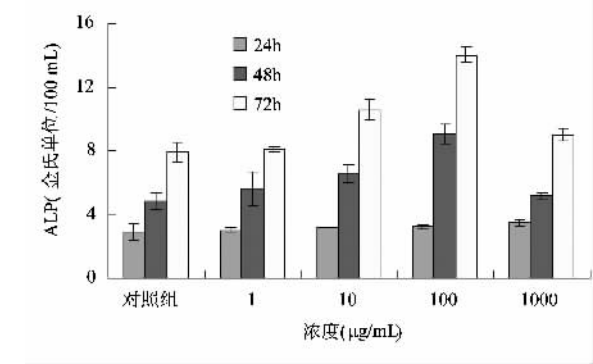


图 7 不同浓度铁饱和乳铁蛋白作用于成骨细胞 24 ~ 72 h ALP 变化情况

3 讨论

成骨细胞是指能促进骨形成的细胞 ,它可以分泌大量的骨胶原和其他骨基质 ,此外还可以分泌许多细胞因子和酶类 ,从而启动骨的形成 ,并抑制破骨细胞活性。因而对骨组织的生长发育、损伤修复、骨代谢平衡与骨量维持都起着关键作用。成骨细胞减退或损伤 ,新骨形成量少 ,将会影响骨构型与骨重建 ,造成骨小梁变细、变薄 ,以致穿孔断裂。乳铁蛋白可以促进成骨细胞的生长、抑制破骨基因的生成。它还可以增加体内局部的骨形成。LF 对成骨细胞增殖和分化的影响要强于其他细胞因子(TGF- β 、甲状旁腺激素、支链淀粉和胰岛素)。在体内 ,局部注射 LF 引起的骨生长效果强于注射胰岛素、支链淀粉、肾上腺素受体、C 端 PTH 相关肽、降钙素和降钙素相关因子等的效果^[3]。Cornish 等^[4]的研究证实 ,LF 具有促进成骨样细胞中胸苷量相应增加。类似的增殖作用在人的 2 种成骨样细胞系中也已观察到 SaOS-2 和基质细胞系 ST2。正常生理浓度范围内 ,LF 能刺激细胞增殖。Takayama 等^[5]经低密度脂蛋白受体相关基因(LRP1)证实 ,LF 能够强化胶原酶的沉积 ,从而增强骨密度。Naot 等^[6]研究 LF 对成骨细

胞有丝分裂作用的信号传导途径 ,发现 LF 能诱导 P42/44MAP 蛋白激酶磷酸化。而培养基中添加 39kD 联合蛋白受体(RAP)后能抑制磷酸化 ,表明细胞有丝分裂的信号传导是由 LRP1 和 LRP2 介导的。

MTT 可间接反映活细胞数量 ,本研究的 MTT 结果为 :1 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围 ,铁饱和乳铁蛋白呈剂量依赖型促进细胞增殖 ,且 100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度时细胞增殖最大。1000 $\mu\text{g/mL}$ 浓度组作用于成骨细胞时 ,增殖开始下降。Cornish 等^[4]的研究证实 ,LF 具有促进成骨样细胞增殖的作用。由此可见 ,LF 可通过刺激成骨样细胞增殖的方式 ,增加具有合成新类质骨能力的成骨细胞数量。并能加强成骨细胞的骨基质合成能力。

ALP 是成骨细胞分化成熟的重要标志之一。成熟的成骨细胞能产生大量的碱性磷酸酶 ,参与骨组织形成、代谢和再生。ALP 也是反映骨形成的指标之一^[7]。本研究的 ALP 结果为 :24 h 时 ,铁饱和乳铁蛋白呈剂量依赖型增强 ALP 活性 ,说明有新骨形成 ;48 和 72 h 时浓度增加到 1000 $\mu\text{g/mL}$,ALP 活性反而降低 ,这与 MTT 实验结果相一致。

由以上研究表明 ,铁饱和乳铁蛋白对大鼠成骨细胞也有一定的增殖和分化作用。可作为一种潜在的治疗剂用于治疗骨质疏松 ,也可以作为骨修复因子促进骨修复。但是对于 1000 $\mu\text{g/mL}$ 浓度组所表现的 MTT 和 ALP 结果与其他浓度组变化趋势不一致的原因还需进一步摸索和探讨。

【 参 考 文 献 】

[1] Cornish J. Lactoferrin promotes bone growth. *BioMetals* , 2004 , 17 (3) : 331-335.

[2] Foley AA , Bates GW. The purification of lactoferrin from human whey by batch extraction. *Anal Biochem* , 1987 , 163 (1) : 296-300.

[3] Cornish J , Callon KE , Lin CQ , et al. Comparison of the effects of calcitonin gene-related peptide and amylin on osteoblast. *J Bone Miner Res* , 1999 , 14 (8) : 1302-1309.

[4] Cornish J , Callon KE , Naot D , et al. Lactoferrin is a potent regulator of bone cell activity and increases bone formation *in vivo*. *Endocrinology* , 2004 , 145 (9) : 4366-4374.

[5] Takayama Y , Takezawa T. Lactoferrin promotes collagen gel contractile activity of fibroblasts mediated by lipoprotein receptors. *Biochem Cell Biol* , 2006 , 84 (3) : 268-274.

[6] Naot D , Grey A , Reid IR , et al. Lactoferrin : a novel bone growth factor. *Clin Med Res* , 2005 , 3 (2) : 93-101.

[7] Conconi MT , Tommasini M , Muratori E , et al. Essential amino acids increase the growth and alkaline phosphatase activity in osteoblasts cultured *in vitro*. *IL Farmaco* , 2001 , 56 (11) : 755.

(收稿日期 2009-04-01)