

• 论著 •

福莫特罗和 ICI118551 对大鼠成熟破骨细胞骨吸收功能的影响

杨向东 余利鹏 韦永中 胡安全

中图分类号: R336 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2010)04-0274-05

摘要: 目的 研究选择性 β_2 肾上腺素能激动剂福莫特罗(Formoterol)和阻滞剂 ICI118551 对体外培养大鼠成熟破骨细胞(osteoclast, OC)功能的影响,探讨 β_2 肾上腺素能受体信号对骨代谢的影响。方法 取清洁级出生 24 h 内的 SD 乳大鼠,长骨干骨髓腔内壁机械分离成熟 OC 后分别加入不同浓度(10^{-5} mol/L ~ 10^{-9} mol/L)的 Formoterol 和 ICI118551,以抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色观察破骨细胞形态,甲苯胺蓝染色计数骨片上的骨吸收陷窝数目,Image-Pro Plus 6.0 图像软件分析骨片上骨吸收陷窝面积。结果 破骨细胞与骨片共培养 6 天,不同浓度的 Formoterol 与对照组相比均可增加骨片上 OC 的骨吸收陷窝数目和面积;随着 ICI118551 浓度的提高骨片上骨吸收陷窝的数目和面积逐渐减少。结论 β_2 肾上腺素能受体激动剂可促进体外培养 OC 的骨吸收功能,阻滞剂对 OC 的骨吸收功能有抑制作用,且呈剂量依赖性。

关键词: β_2 肾上腺素能受体激动剂; β_2 肾上腺素能受体阻滞剂; 破骨细胞; 骨吸收陷窝

The effects of Formoterol and ICI118551 on rat osteoclast *in vitro* YANG Xiangdong, YU Lipeng, WEI Yongzhong, et al. Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Abstract: Objective To evaluate the effects of Formoterol (β_2 -adrenergic receptor-specific agonist) and ICI118551 (β_2 -adrenergic receptor-specific antagonist) on rat matured osteoclast cells *in vitro*. **Methods** Mature OC was isolated directly from neonatal 24-hour-SD rat long bones. The OC was treated with different concentrations of Formoterol and ICI118551 from 10^{-5} mol/L ~ 10^{-9} mol/L respectively. Then the OC was stained with tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) to observe cellular morphology. The bone slices were stained with toluidine blue to count the number of the bone resorption pits and analyse the bone resorption pits by Image-Pro Plus 6.0. **Results** The number and area of the bone resorption pits increased in different concentrations of Formoterol treatment compared that in control treatment after osteoclasts and bone slices co-cultured for 6 days. Furthermore, the number and area of the bone resorption pits decreased with the dose of ICI118551 increased gradually. **Conclusion** The β_2 -adrenergic receptor-specific agonist could promote the bone absorption of OC *in vitro*. The β_2 -adrenergic receptor-specific antagonist inhibits the bone resorption of OC in a dose-dependent manner.

Key words: β_2 -adrenergic receptor-specific agonist; β_2 -adrenergic receptor-specific antagonist; Osteoclast; Bone resorption

随着社会老龄化的到来,骨质疏松的发病率日

趋增高,严重威胁着人类的生活质量。骨质疏松时骨吸收大于骨形成,因而导致骨量减少。在骨质疏松的发病过程中破骨细胞起着极其重要的作用。瘦素-交感神经系统对骨代谢的影响是近年来研究的热点,瘦素可通过激活中枢下丘脑神经元,继而激活外周交感神经系统,再通过激活骨组织细胞表面的 β_2 肾上腺素能受体而抑制骨形成^[1,2]。本实验采用

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30600626)

作者单位: 210029 南京,南京医科大学第一附属医院江苏省人民医院骨科

通讯作者: 余利鹏, Email: lipeng_yu@yahoo.com.cn; 韦永中, Email: wyy1996202@yahoo.com.cn

骨髓腔内壁机械分离培养法获得的大鼠成熟破骨细胞作为靶细胞,观察不同浓度的选择性 β_2 肾上腺素能激动剂福莫特罗 (Formoterol) 和阻滞剂 ICI118551 对其功能的影响,探讨 β_2 肾上腺素能受体信号对骨代谢的影响,为骨质疏松的治疗提供新的可能途径。

1 材料和方法

1.1 动物

出生 24 h 内 SD 乳大鼠 (南京医科大学实验动物中心),新鲜牛股骨 (购于屠宰场, -20°C 低温冰箱保存)。

1.2 药品与试剂

α -MEM 培养基 (美国 Gibco 公司),胎牛血清 (杭州四季青公司),Formoterol, ICI118551 (美国 Sigma 公司),抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 染色试剂盒 (美国 Sigma 公司, 387-A),青霉素,链霉素 (山东鲁抗制药厂)。

1.3 主要仪器

300CP 点式切片机 (德国 EXAKT 公司),400C 磨片机 (德国 EXAKT 公司),电热恒温水槽 DK-8D 型 (上海精宏实验设备有限公司), CO_2 恒温细胞培养箱 (德国 Heraeus 公司),SW-CJ-IFD 型超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司),精密 PH 仪 (上海电磁仪器厂),OLYMPUS-CK2 光学倒置显微镜 (日本 Olympus 公司)。

1.4 方法

1.4.1 培养液的配制:基础培养液: α -MEM (含 15% 胎牛血清), 10×10^4 U/L 青霉素, 10×10^4 U/L 链霉素, 2.2 g/L NaHCO_3 , 3.6 g/L HEPES, pH (7.2 ~ 7.4); 加药培养液: 上述培养液配制, 药物 (分别含 Formoterol 和 ICI118551) 浓度梯度为 10^{-5} mol/L, 10^{-6} mol/L, 10^{-7} mol/L, 10^{-8} mol/L, 10^{-9} mol/L。

1.4.2 盖玻片处理与骨片制备:圆形盖玻片 (直径为 6 mm) 泡酸过夜, 自来水、蒸馏水冲洗后晾干无水酒精浸泡 2 h 脱脂, 自然晾干, 用前高压灭菌。牛股骨以点式切片机切成 $5 \text{ cm} \times 3 \text{ cm} \times 100 \mu\text{m}$ 大小, 再用磨片机磨成 $30 \mu\text{m}$ 后抛光, 在三蒸水中超声清洗 10 min, 共三次, -80°C 保存。用前用含 10 倍双抗 (1000 U/ml 青霉素, 1 g/ml 链霉素) 的 D-Hanks 液浸泡骨片 20 min, 共 3 次, 紫外线照射 2 h (两面) 后切成 $5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$ 大小。

1.4.3 成熟破骨细胞的体外分离和培养:采用 Chambers 等^[3,4]的方法, 取出生 24 h 内的新生 SD 乳大鼠 10 只, 75% 酒精浸泡消毒 10 min。在无菌条

件下分离股骨、胫骨和肱骨, 在无菌 PBS 液中去附着在骨表面的软组织和骨髓。在完全 α -MEM 培养基 [含 15% (体积分数) 胎牛血清, 10×10^4 U/L 青霉素和 10×10^4 U/L 链霉素, 3.6 g/L HEPES] 中用眼科剪刀和镊子将骨干和干骺端纵向剖开, 尖手术刀轻刮骨髓腔内表面, 尖吸管吸取上述培养液反复吹打骨髓腔和骨的内表面至发白, 调整细胞悬液数目为 2×10^6 /L 备用。取 24 孔细胞培养板 1 块, 每孔加入 1 ml 完全 α -MEM 培养基, 再加入 1 块处理好的骨片或玻片, 二氧化碳培养箱中预培养 1 h 后, 加入上述分离的破骨细胞悬液, 每孔 1 ml, 置二氧化碳培养箱中继续培养 2 h。另取一 24 孔培养板, 分 6 组每组 4 孔, 第一组加入 2 ml α -MEM 培养基作为对照组, 其余 5 组分别加入 10^{-5} mol/L, 10^{-6} mol/L, 10^{-7} mol/L, 10^{-8} mol/L, 10^{-9} mol/L 的 Formoterol 或 ICI118551 培养基 2 ml 作为加药组, 将前分离培养的生长有 OC 的骨片或玻片取出, 用尖吸管吸取培养液冲掉骨片或玻片上的未附着细胞, 放入新的培养板中, 置二氧化碳培养箱内继续培养, 隔日更换新鲜培养液 1 次, 观察玻片上破骨细胞的形态及骨片上吸收陷窝数量和大小的变化。

1.4.4 骨吸收陷窝的测定:骨片吸收陷窝计数: 培养 6 天的骨片 2.5% 戊二醛 4°C 固定 7 min, 在 0.25 mol/L 氢氧化铵中以 42 kHz 超声清洗 10 min 去除骨片上的细胞。再经系列乙醇 (40%、75%、80%、95% 和无水乙醇) 脱水后自然晾干, 1% 甲苯胺蓝室温染色 5 min 用蒸馏水冲洗后在 100 倍倒置相差显微镜下观察计数并拍照, 用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统计算吸收陷窝面积。

1.5 统计学方法

数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 将所得数据用 SPSS 13.0 软件进行方差分析。检验标准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 破骨细胞观察

体外培养的破骨细胞体积明显较其他骨髓内细胞大, 培养 30 min 即开始贴壁, 培养 24 h 后将盖玻片取出按说明书进行 TRAP 染色, 阳性细胞的胞体较大, 胞质呈酒红色颗粒状, 均匀分布, 伪足清晰, 细胞核可见多个不染色 (如图 1)。

2.2 骨吸收陷窝观察

破骨细胞与骨片共培养 24 h, 骨片上即出现少量的吸收陷窝, 开始多为单个圆形或椭圆形, 随着培

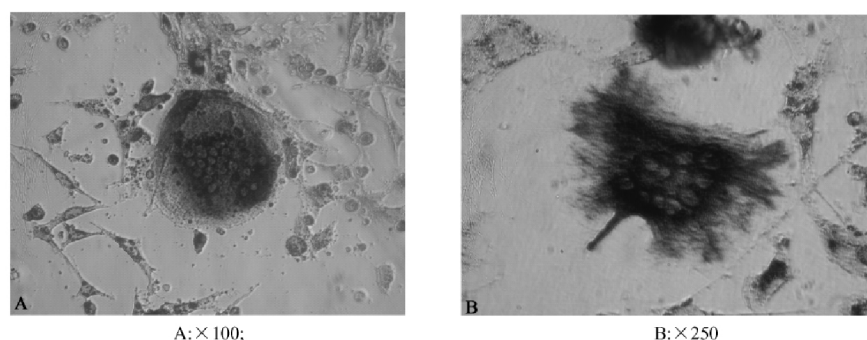


图1 破骨细胞培养 24 h 后倒置相差显微镜下观察

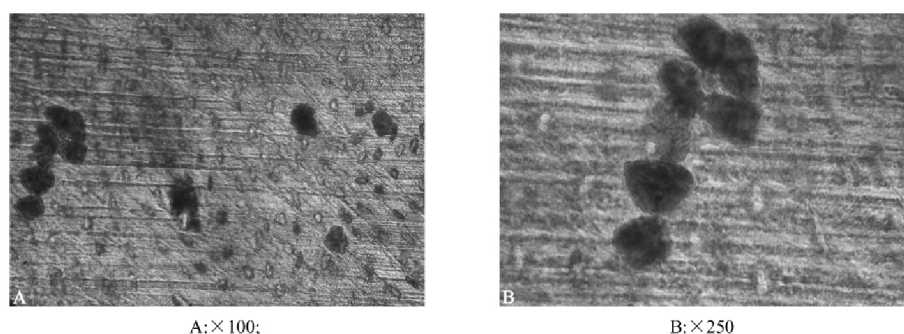


图2 培养 6 天后骨片吸收陷窝形态(甲苯胺蓝染色)

养时间的延长陷窝面积逐渐增大,数量增多连成串珠状或不规则形(如图2)。

2.3 ICI118551 对破骨细胞骨吸收功能的抑制作用

加入不同浓度 ICI118551 作用于破骨细胞 6 天后,加药组与对照组比,加药组的骨吸收陷窝数目和吸收陷窝面积均小于对照组,差异均有极显著意义 ($P < 0.01$),表明 ICI118551 对破骨细胞的功能具有抑制作用。I1 与 I2 相比,I1 的吸收陷窝数目和面积小于 I2,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$),表明 ICI118551 的浓度在 1×10^{-6} mol/L 时对破骨细胞功能的抑制作用达到了最强;I1 和 I2 与 I3、I4 和 I5 相比,I1 和 I2 的吸收陷窝数目及面积均小于 I3、I4 和 I5 ($P < 0.01$),差异有统计学意义;I3、I4 与 I5 吸收陷窝数目及面积之间比较 ($P < 0.05$),差异有统计学意义,表明随着 ICI118551 浓度的增高骨吸收陷窝数目和吸收陷窝面积均减少,作用呈浓度依赖性(表1)。

2.4 福莫特罗对破骨细胞的骨吸收功能的增强作用

加入不同浓度的 Formoterol 作用于破骨细胞 6 天后,加药组与对照组相比,加药组的骨吸收陷窝数目和吸收陷窝面积均大于对照组 ($P < 0.01$),差异具有极显著意义,表明 Formoterol 对破骨细胞的功

能具有增强作用。Formoterol 各加药组之间相比较无统计学意义 ($P > 0.05$),表明在 10^{-5} mol/L ~ 10^{-9} mol/L 浓度范围内,Formoterol 可能对破骨细胞的促进作用无明显的剂量依赖关系(表2)。

表1 ICI118551 作用后破骨细胞骨吸收陷窝面积和数目的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	吸收陷窝数目(个/片)	吸收陷窝面积(μm^2)
I1 (10^{-5})	$13.57 \pm 2.07^{\Delta}$	$69106.29 \pm 12970.45^{\Delta}$
I2 (10^{-6})	$17.14 \pm 4.14^{\Delta}$	$82884.00 \pm 9172.71^{\Delta}$
I3 (10^{-7})	$24.29 \pm 5.15^{*\Delta}$	$109148.57 \pm 11964.93^{*\Delta}$
I4 (10^{-8})	$29.57 \pm 4.04^{**\Delta}$	$127182.86 \pm 16748.57^{**\Delta}$
I5 (10^{-9})	$35.43 \pm 3.51^{**\Delta\blacktriangle}$	$141996.00 \pm 8710.85^{**\Delta\blacktriangle}$
对照组	41.14 ± 3.13	157866.29 ± 18878.36

注:与对照组相比: $^{\Delta}P < 0.01$;与 I1 或 I2 相比: $^{*}P < 0.01$;与 I3 相比: $^{**}P < 0.05$;与 I4 相比: $^{\blacktriangle}P < 0.05$

3 讨论

在骨的微环境中,骨吸收和骨形成之间的动态平衡维持骨骼系统的稳态^[5]。骨质疏松症是由于骨吸收和骨丢失增加而骨形成相对减少所致^[6]。目前关于 β_2 肾上腺素能受体 ($\beta_2\text{AdR}$) 对骨代谢的影响已有一些研究,成熟的破骨细胞和成骨细胞均表达 $\beta_2\text{AdR}$ ^[2,7],且 $\beta_2\text{AdR}$ 高表达于骨髓细胞和巨

噬细胞集落刺激因子 (M-CSF) 依赖的骨髓巨噬细胞, 但 β_1 和 β_3 肾上腺素能受体在骨细胞表达水平非常低, 在骨细胞高表达单胺氧化酶 mRNA, 所以有能力代谢儿茶酚胺类^[7]。 β_2 肾上腺素对破骨细胞骨吸收功能的研究以往已有报道, 但多是通过诱导分化而来的破骨样细胞进行研究^[5,7,8], 对直接分离的成熟破骨细胞进行 β_2 肾上腺素干预的尚未见报道过。诱导分化形成的破骨样细胞虽然数量较多, 但其适用于对 OC 分化过程的研究, 骨髓腔内壁机械分离培养的方法可获得骨吸收功能较活跃的 OC, 适用于对其功能的研究^[4]。本实验通过用不同浓度的选择性 β_2 肾上腺素能激动剂 Formoterol (10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} mol/L) 和阻滞剂 ICI118551 (10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} mol/L) 对直接机械分离法获得的成熟破骨细胞进行干预, 且以往对 β 受体阻滞剂对骨代谢的影响多是在动物体内实验或临床回顾性研究中得出的结论^[9,10], 而至于其对细胞的独立作用尚缺乏研究。

表 2 福莫特罗作用后破骨细胞骨吸收陷窝面积和数目的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	吸收陷窝数目 (个/片)	吸收陷窝面积 (μm^{-2})
F1 (10^{-5})	49.71 $\pm$ 2.29 [△]	151137.71 $\pm$ 11763.51 [△]
F2 (10^{-6})	47.86 $\pm$ 3.34 [△]	130228.29 $\pm$ 19304.40 ^{*△}
F3 (10^{-7})	46.71 $\pm$ 2.63 ^{*△}	133118.71 $\pm$ 22533.01 [△]
F4 (10^{-8})	47.71 $\pm$ 2.43 [△]	127417.71 $\pm$ 23152.07 ^{*△}
F5 (10^{-9})	44.00 $\pm$ 2.71 ^{*△▲}	123289.14 $\pm$ 17468.76 ^{*△}
对照组	40.00 $\pm$ 2.94	87275.43 $\pm$ 7770.26

注: 与对照组相比: [△] $P < 0.01$; 与 F1 相比: ^{*} $P < 0.05$; 与 F2 相比: ^{**} $P < 0.05$, 与 F4 相比: [▲] $P < 0.05$

目前关于肾上腺素能对破骨细胞的影响报道不一, 主要存在两种观点: 一是 β 受体信号通过对成骨细胞分泌破骨细胞分化因子 (ODF, 也叫做 RANK-L/OPGL/TRANCE) 的调节来间接影响破骨细胞的骨吸收功能; 二是 β 受体信号直接影响破骨细胞的骨吸收功能。 β_2 AdR 信号可通过 cAMP/PKA 信号传导, 促进成骨细胞及成骨祖细胞 RANK-L 的表达, 激活破骨细胞^[1]。异丙肾上腺素和去甲肾上腺素可以通过提高骨肉瘤成骨细胞 cAMP 水平, 促进小鼠颅骨器官培养的骨吸收, β_2 AdR 信号激活 cAMP/PKA 信号途径和甲状旁腺素 (PTH) 对成骨细胞的信号途径相似^[11]。Takeuchi T 等^[5]对小鼠成骨细胞株 MC3T3-E1 使用异丙肾上腺素和肾上腺素, 发现这两种药都能促进成骨细胞表达 ODF, 诱导小鼠骨髓细胞向破骨样细胞的转化, 提示

β 受体激动剂可以通过成骨细胞促进破骨细胞的骨吸收作用。随后, Arai M 等^[8]又报导了异丙肾上腺素和肾上腺素在缺乏成骨细胞的条件下可直接作用于成熟的破骨细胞, 促进其骨吸收功能, 而 phenylephrine (α_1 受体阻断剂) 则无此功能。本实验研究证明选择性 β_2 AdR 激动剂 Formoterol 在 1×10^{-5} mol/L $\sim 1 \times 10^{-9}$ mol/L 时对破骨细胞的骨吸收功能具有直接的促进作用, 这与以往的报道是一致的。本实验在 1×10^{-5} mol/L $\sim 1 \times 10^{-9}$ mol/L 的浓度范围并没有观察到药物剂量与 OC 的骨吸收功能之间的关系, 可能在此浓度范围超出了 Formoterol 对破骨细胞作用的最佳浓度。但是也有研究发现, β_2 AdR 激动剂通过 cAMP/PKA 途径, 促进原癌 c-fos 基因表达, 对骨组织同时具有促成代谢作用^[12]。

动物体内研究发现, β 受体阻滞剂普萘洛尔可以增加卵巢切除大鼠骨形成^[2]。Bonnet N 等对去卵巢 Wistar 大鼠模型使用普萘洛尔, 发现普萘洛尔对大鼠骨具有保护作用降低骨表面破骨细胞和皮质孔的数量, 且呈剂量依赖性^[9], 随后他们又进行了一项临床研究发现, β 受体阻滞剂能够降低绝经后骨质疏松妇女的骨折率和提高骨密度^[10]。另一项对临床患者的回顾性研究发现, β 受体阻滞剂的长期应用可以提高 50 岁以上妇女的髋部和前臂的骨密度, 降低骨折的发生率^[13]。另外一些对照研究也肯定了 β 受体阻滞剂可以有效降低成人骨折发生率 30%^[14,15]。本实验研究发现选择性 β_2 AdR 阻滞剂 ICI118551 在 1×10^{-5} mol/L $\sim 1 \times 10^{-9}$ mol/L 时对破骨细胞骨吸收功能具有抑制作用, 这与以往研究也是一致的。本实验还发现随着 ICI118551 浓度的提高抑制作用逐渐增强, 当浓度为 1×10^{-6} mol/L 时抑制作用达到顶峰。但也有些临床研究不能肯定这种作用^[16]。

通过本实验研究, 我们证实了肾上腺素能对破骨细胞骨吸收功能的影响, 选择性 β_2 肾上腺素能激动剂 Formoterol 对破骨细胞的骨吸收功能具有促进作用, 而阻滞剂 ICI118551 对破骨细胞的骨吸收功能具有抑制作用, 但对于他们的作用机制仍然不清楚, 需进一步研究。

【参 考 文 献】

- [1] Eleftheriou F, Ahn JD, Takeda S, et al. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. Nature, 2005, 434 (7032): 514-520.
- [2] Takeda S, Eleftheriou F, Levasseur R, et al. Leptin regulates

- bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell*, 2002, 111 (3) :305-317.
- [3] Chambers TJ, Magnus CJ. Calcitonin alters behavior of isolated osteoclasts. *J Pathol*, 1982, 136 (1) :27-39.
- [4] 李斌斌,于世凤,庞淑珍. 两种破骨细胞培养方法的比较及其吸收骨质的动态观察. *北京大学学报(医学版)*, 2005, 37 (5) :536-541.
- [5] Takeuchi T, Tsuboi T, Arai M, et al. Adrenergic stimulation of osteoclastogenesis mediated by expression of osteoclast differentiation factor in MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Biochemical Pharmacology*, 2001, 61 (5) :579-586.
- [6] Bab I, Zimmer A. Cannabinoid receptors and the regulation of bone mass. *Br J Pharmacol*, 2008, 153 (2) :182-188.
- [7] Aitken SJ, Landao-Bassonga E, Ralston SH, et al. β_2 -Adrenoreceptor ligands regulate osteoclast differentiation *in vitro* by direct and indirect mechanisms. *Arch Biochem Biophys*, 2009, 482 (1-2) :96-103.
- [8] Arai M, Nagasawa T, Koshihara Y, et al. Effects of β -adrenergic agonists on bone-resorbing activity in human osteoclast-like cells. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1640 (2-3) :137-142.
- [9] Bonnet N, Laroche N, Vico L, et al. Dose effects of propranolol on cancellous and cortical bone in ovariectomized adult rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 318 (3) :1118-1127.
- [10] Bonnet N, Gadois C, McCloskey E, et al. Protective effect of beta blockers in postmenopausal women: influence on fractures, bone density, micro and macroarchitecture. *Bone*, 2007, 40 (5) :1209-1216.
- [11] Moore RE, Smith CK, Bailey CS, et al. Characterization of beta-adrenergic receptors on rat and human osteoblast-like cells and demonstration that beta-receptor agonists can stimulate bone resorption in organ culture. *Bone Miner*, 1993, 23 (3) :301-315.
- [12] Kellenberger S, Muller K, Richener H, et al. Formoterol and isoproterenol induce c-fos gene expression in osteoblast-like cells by activating beta2-adrenergic receptors. *Bone*, 1998, 22 (5) :471-478.
- [13] Pasco JA, Henry MJ, Sanders KM, et al. Beta-adrenergic blockers reduce the risk of fracture partly by increasing bone mineral density. *J Bone Miner Res*, 2004, 19 (1) :19-24.
- [14] Rejnmark L, Vestergaard P, Mosekilde L. Treatment with beta-blockers, ACE inhibitors, and calcium-channel blockers is associated with a reduced fracture risk: a nationwide case-control study. *J Hypertens*, 2006, 24 (3) :581-189.
- [15] Schlienger RG, Kraenzlin ME, Jick SS, et al. Use of beta-blockers and risk of fractures. *JAMA*, 2004, 292 (11) :1326-1332.
- [16] Reid IR, Gamble GD, Grey AB, et al. Beta-blocker use, BMD, and fractures in the study of osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res*, 2005, 20 (4) :613-618.

(收稿日期: 2009-11-13)