

TNF- α 对成骨细胞凋亡作用的探讨

李知玻 李子锋 章莹 夏虹

中图分类号: R36 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2012)10-0892-04

摘要: **目的** 探讨 TNF- α 诱导成骨细胞凋亡的作用,为绝经后妇女骨质疏松的发生机理和治疗方法的研究提供切实可行的依据。**方法** 在体外培养成骨细胞的过程中,分别加入不同浓度的 TNF- α ,用流式细胞仪检测其对成骨细胞的凋亡率。**结果** TNF- α 15 ng/mL 组、30 ng/mL 组对成骨细胞的生长均有显著的抑制作用,其中又以 30 ng/mL 组最明显。**结论** TNF- α 在一定浓度中对成骨细胞的生长有显著的抑制作用,尤以 30 ng/mL 组最明显。

关键词: 成骨细胞; TNF- α ; 凋亡

Study of the effect of tumor necrosis factor-alpha on osteoblast apoptosis LI Zhibo¹, LI Zifeng², ZHANG Ying¹, et al. ¹Orthopedic Hospital, General Hospital of Guangzhou Command, Guangzhou 510010; ²Department of Hand Surgery, Shenzhen Pingle Orthopedic Hospital, Shenzhen 518000, China
Corresponding author: LI Zhibo, Email: lizibo82@sina.com

Abstract: Objective To investigate the effect of tumor necrosis factor -alpha (TNF- α) on osteoblast apoptosis, and to provide practical basis for the study of the treatment and genesis mechanism of postmenopausal osteoporosis. **Methods** Osteoblasts were cultured in vitro and TNF- α was added to the culture medium in different concentrations. The apoptotic rate of the osteoblasts was tested using flow cytometry. **Results** The growth of osteoblasts was significantly inhibited in the presence of 15 ng/ml and 30 ng/ml TNF- α and the effect was more significant in the latter group. **Conclusion** TNF- α at a certain concentration has an obviously inhibitory function on the growth of osteoblasts, and the function of 30 ng/ml is most obvious.

Key words: Osteoblast; TNF- α ; Apoptosis

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、骨质疏松产生的主要原因。近年来研究^[1]发现,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 (Tumornecrosisfactor- α , TNF- 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的生成,减少骨矿含量,抑制骨胶原合成,抑制骨形成和钙化。Kimble 等^[2]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。因此,本实验通过观察不同浓度的 TNF- α 诱导成骨细胞凋亡的影响,探讨 TNF- α 对成骨细胞生长影响的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 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。

1.1.2 主要试剂: DMEM (Gibco 公司)、胎牛血清(四季清)、谷胺酰氨、II 型胶原酶和胰蛋白酶 (Stigma 公司)、肿瘤坏死因子 TNF- α (Peprotech Asia 公司)。

1.1.3 流式细胞仪。

1.2 方法

1.2.1 成骨细胞的分离培养: 利用胰蛋白酶和 II 型胶原酶的消化方法提取乳鼠颅骨成骨细胞。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 $^{\circ}$ C, 含 5% CO₂, 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。

作者单位: 510010 广州,广州军区广州总医院骨科医院(李知玻、章莹、夏虹);518000 深圳,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

1.2.2 成骨细胞的鉴定:通过细胞形态学,碱性磷酸酶细胞化学染色,骨钙化结节的形成三个方面对成骨细胞进行鉴定。

1.2.3 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。

1.2.4 TNF- α 对成骨细胞的凋亡作用:将第3代成骨细胞接种在96孔板中,成骨细胞分为5组分别加入0、15、30、45和60 ng/mL的TNF- α ,每组5个样本。第1组为对照组,其余为药物组。于37 $^{\circ}$ C,含5% CO₂,饱和湿度的培养箱内进行培养,72 h后待细胞数约为10⁶时上流式细胞仪检测。实验重复3次。

1.2.5 统计学处理:实验数据以均数 \pm 标准差表示,使用SPSS11.5软件对数据进行分析,组间比较用 t 检验, $P < 0.05$ 表示有统计学意义, $P > 0.05$ 表示没有统计学意义。

2 结果

从表1中可以看出,相对于空白对照组,加入TNF- α 的各组凋亡率均有提高,其中TNF- α 15 ng/mL组、30 ng/mL组对成骨细胞生长的抑制作用显著,尤以30 ng/mL组最明显($P < 0.01$)。图1是成骨细胞各个组在显微镜观察下的生长情况。从图中可以看出,15、30 ng/mL TNF- α 组的细胞数量明显少于其他组。各组间的凋亡率在各个期(G₀-G₁期、G₂-M期、S期)中并没有明显差异($P > 0.05$),但各个组的凋亡主要发生在G₀-G₁期。

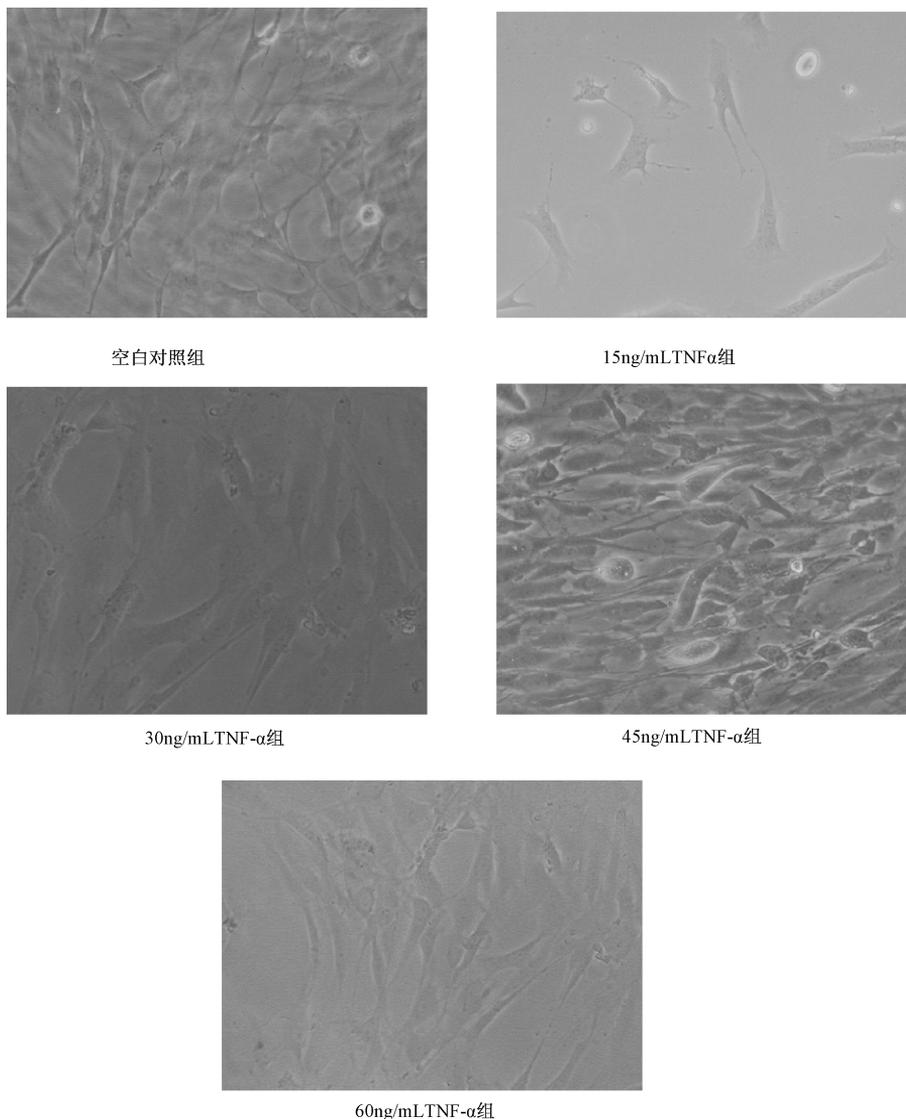


图1 不同浓度TNF- α 对成骨细胞的影响,倒置显微镜($\times 200$)

表 1 不同浓度 TNF- α 对成骨细胞的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	凋亡率(%)	G ₀ -G ₁ 期(%)	G ₂ -M 期(%)	S 期(%)
空白对照组	5	1.204 ± 0.476	86.122 ± 1.654	7.086 ± 1.299	6.992 ± 0.899
15 ng/mL TNF α	5	7.044 ± 1.512 ^{**}	83.450 ± 8.547	9.002 ± 3.285	5.546 ± 1.509
30 ng/mL TNF α	5	15.742 ± 4.480 ^{**##}	83.168 ± 8.564	7.660 ± 5.341	9.170 ± 4.021 [#]
45 ng/mL TNF α	5	2.090 ± 0.885 ^{#$\Delta\Delta$}	86.824 ± 1.033	6.628 ± 0.989	6.548 ± 1.458
60 ng/mL TNF α	5	2.424 ± 1.390 ^{$\Delta\Delta$}	84.960 ± 5.259	7.826 ± 1.438	7.094 ± 2.256

注:与空白对照组比较:^{**}P < 0.01;与 15 ng/mL TNF α 组比较:[#]P < 0.05,^{##}P < 0.01;与 30 ng/mL TNF α 组比较: ^{$\Delta\Delta$} P < 0.01

3 讨论

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 Shalalby 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^[3]。肿瘤坏死因子 α 通过旁分泌作用,在组织损伤局部可产生高浓度引起成骨细胞凋亡,进而影响骨代谢(骨平衡)。

TNF- α 主要由单核巨嗜细胞产生,活化的 T 细胞、自然杀伤细胞、肥大细胞、软骨细胞也能分泌此种细胞因子。其中 TNF- α 与骨质疏松关系密切。TNF 有两种不同的受体(P55, P75),它与受体结合后,通过核因子 kappa- κ B 或活化蛋白(AP-1)将信号传入细胞内^[4]。TNF- α 对骨代谢的影响是通过对破骨细胞的增殖、分化及成熟而介导的。TNF- α 刺激巨嗜细胞集落刺激因子(M-CSF),颗粒巨嗜细胞集落刺激因子(GM-CSF)、IL-6 的分泌,而 IL-6 促进破骨细胞祖细胞的增殖。

细胞凋亡(apoptosis)又叫程序性死亡(programme cell death PCD),是由基因控制的自主性的有序死亡,在骨组织的发生、演变、骨修复、骨重建等方面有重大意义^[5]。多种因素可参与诱导和抑制细胞凋亡。TNF- α 即是其中因素之一。TNF- α 是 17kDa 的细胞因子,由破骨细胞样细胞及成骨细胞合成。现已证明 TNF- α 可以直接作用于成骨细胞,对其增殖、分化产生影响^[5]。虽然 TNF- α 对成骨细胞的作用较复杂,但现在,学者们在 TNF- α 对成骨细胞分化作用的研究结果比较统一,均认为 TNF- α 抑制胶原合成、AKP 活性和骨钙素合成^[6-8]。Feter^[9]和 Jilka^[10]体外实验发现仅 TNF- α 可促进成骨细胞凋亡,我们的实验结果也证实了 TNF- α 确有促成骨细胞凋亡作用。Pacifci 等^[11]对绝经后骨质疏松患者末梢血的单核细胞进行培养,发现其还能产生 TNF- α 和 GM-CSF,切除卵巢的患者,体内的 TNF- α 和 GM-CSF 水平升高,接受雌激素治疗的患

者 TNF- α 和 GM-CSF 恢复到正常水平,这也说明 TNF- α 在人体内超量形成是促成骨细胞凋亡的因素之一。Klein 等^[5]发现在老年低骨密度的病人中,骨组织活检发现成骨细胞数目明显减少,并有凋亡小体出现。提示在绝经后妇女和老年人中,由凋亡引起的成骨细胞数量降低,成骨功能减退,也是引起骨重建失衡的重要原因。

从实验数据可以看出 TNF- α 15 ng/mL 组、30 ng/mL 组对成骨细胞的生长均有显著的抑制作用,其中又以 30 ng/mL 组最明显;但 45 ng/mL 组、60 ng/mL 组并没有显著表现出对成骨细胞的凋亡,只有个别样本有表现,这可能与样本数量少有关,也可能是 TNF- α 超过一定浓度后可能刺激释放或激活某些细胞因子,间接抑制了 TNF- α 的作用,这需要以后更深入的研究探讨,另一方面也说明了 TNF- α 诱导成骨细胞的凋亡是剂量依赖性的。在各组中横向比较都明显可以发现,细胞的凋亡主要是积聚并停滞在细胞分化的周期 G₀-G₁ 期阶段而诱导成骨细胞凋亡,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,与 TNF- α 结合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,各组并没有明显的差异,这说明了 TNF- α 的浓度并不能改变凋亡率在各个期的分布。

综上所述,TNF- α 促进了成骨细胞的凋亡,而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。

【参考文献】

- [1] Pacifci R. Estrogen, cytokines, and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *Journal of Bone & Mineral Research*, 1996, 11(8): 1043-1051.
- [2] Kimble RB, Bain S, Pacifci R. The functional block of TNF but not of IL-6 prevents bone loss in ovariectomized mice. *Journal of Bone & Mineral Research*, 1997, 12(6): 935-941.
- [3] Horowitz SM, Purdon MA. Mechanisms of cellular recruitment in aseptic loosening of prosthetic joint implants. *Calcif Tissue Int*, 1995, 57(4): 301-305.

(下转第 891 页)

度下降,左侧股骨颈、Ward三角和左侧股骨近端处骨密度明显上升,治疗效果与阿仑膦酸钠组相近,优于钙尔奇D组,可以认为补肾壮骨冲剂是治疗老年性骨量减少及骨质疏松、降低骨转换率、提高骨量安全有效的药物。

【参 考 文 献】

- [1] Recker RR, Marin F, Ish-Shalom S, et al. Comparative effects of teriparatide and strontium ranelate on bone biopsies and biochemical markers of bone turnover in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res*, 2009, 24(8):1358-1368.
- [2] Eastell R, Delmas PD, Hodgson SF, et al. Bone formation rate in older normal women: Concurrent assessment with bone histomorphometry, calcium kinetics and biochemical markers. *J Clin Endocrinol Metab*, 1988, 67(4):741-748.

- [3] Filip RS, Zagórski J. Age and BMD related differences in biochemical markers of bone metabolism in rural and urban women from Lublin Region, Poland. *Ann Agric Environ Med*, 2004, 11(2):255-259.
- [4] 韩丽萍,梁达,刘志刚. 补肾壮骨颗粒质量标准的研究. *解放军药学报*, 2009, 4(2):145-147.
- [5] 韩丽萍,陈行愉,邓伟民. HPLC法同时测定补肾壮骨颗粒中淫羊藿苷及柚皮苷含量. *中成药*, 2011, 1(1):184-186.
- [6] 邓伟民,邵玉,张金玉,等. 补肾壮骨冲剂治疗绝经后妇女骨质疏松疼痛的效果分析. *广州中医药大学学报*, 2007, 24(5):355-358.
- [7] 李晓昊,林宁,邓伟民,等. 补肾壮骨颗粒对雌性骨质疏松大鼠体重及骨组织计量学的影响. *广东医学*, 2011, 9(18):2357-2359.

(收稿日期:2012-04-19,修回日期:2012-06-17)

(上接第 894 页)

- [4] Papanicolaou DA, Wilder RC, Manolagas SC, et al. The pathophysiologic poles of interleukin-6 in human disease. *Am Intern Med*, 1998, 128:127-137.
- [5] 董玉峰,戴克戎. 细胞凋亡与骨重建. *中国矫形外科杂志*, 2000, (7):9.
- [6] Zheng MH, Wnod DJ, Papadimitrion JM. What's new in the role of cytokines on osteoblast proliferation and differentiation. *Pathol Res Pract*, 1992, 188:1104.
- [7] Roodman GD. Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocrine Reviews*, 1996, 17(4):308-332.
- [8] Frost A, Jonsson KB, Nission O, et al. Inflammatory cytokines

regulate proliferation of cultured human osteoblast. *Acta Orthop Scand*, 1997, 68:91.

- [9] Ferter A, Anthony T, Muruy CM. *Endocrinology*, 1997, 138:38-49.
- [10] Jilka RL, Weinstein T, Bellido AM, et al. Osteoblast programmed cell death; modulation by growth factors and cytokines. *J Bone Miner Res*, 1998, 13:793-802.
- [11] Pacifici R, Brown C, Pus CE, et al. The effect of surgical menopause and estrogen replacement on cytokine release from human blood monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88:5134.

(收稿日期:2012-04-19,修回日期:2012-05-21)