

· 论 著 ·

氟化钠对骨组织主要细胞类型的影响

蒋宁宁¹ 郭奉杨¹ 史立群^{2*} 徐辉¹

1. 吉林大学药学院再生医学科学研究所, 吉林 长春 130021

2. 内蒙古自治区鄂伦春自治旗阿里河社区卫生服务中心, 内蒙古 鄂伦春 165450

中图分类号: R599.9 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2019) 10-1389-04

摘要: **目的** 明确氟化钠对骨组织 3 种细胞的活性作用特点。**方法** 探究暴露于不同氟化钠浓度下的 3 种骨组织主要细胞活性的变化。小鼠骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)作为成骨细胞祖细胞,通过含有地塞米松、抗坏血酸和 β -甘油磷酸钠的矿化培养基诱导为成骨细胞。RAW264.7 细胞利用 RANKL 诱导其成为破骨细胞,而 IDG-SW3 细胞经过矿化诱导成为骨细胞。收集对数生长期的成骨细胞、破骨细胞和骨细胞,传至 96 孔板,施加给 8 个氟浓度梯度进行处理,包括对照组、低氟浓度(0.1、0.5、1、2 mg/L)、中氟浓度(4、8 mg/L)、高氟浓度(16、32 mg/L)9 个实验组。3 种细胞分别经氟处理 1、2、4 d 后,采用噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)法检测细胞活性。**结果** 染氟 2 d 后,0.5 mg/L 和 1 mg/L 氟显著提高了骨细胞的活性,但 8~32 mg/L 氟均显著抑制了破骨细胞和成骨细胞的活性。染氟 4 d 后,骨细胞的活性在 0.1~2 mg/L 氟处理下显著增高,1~4 mg/L 氟处理下的破骨细胞的活性也明显比对照组高;高剂量氟 16 mg/L 处理下,骨细胞活性下降了 8.6%,而破骨细胞和成骨细胞活性则下降了 90.8% 和 97.2%。**结论** 氟对成骨细胞的刺激作用范围最窄,而抑制作用显著,破骨细胞对氟剂量的变化最敏感,而骨细胞对氟化物蓄积毒性的耐受性最强。

关键词: 破骨细胞;骨髓间充质干细胞;骨细胞;细胞活性;氟化钠;细胞类型;骨质疏松

The effect of sodium fluoride on the main bone cell types

JIANG Ningning¹, GUO Fengyang¹, SHI Liqun^{2*}, XU Hui¹

1. School of Pharmaceutical Sciences, Jilin University, Changchun 130021

2. Alihe Community Health Service Center, Orochun Banner, Inner Mongolia Autonomous Region, Orochun Banner 165450, China

* Corresponding author: SHI Liqun, Email: 957831686@qq.com

Abstract: **Objective** To clarify the viability trends of three types of bone cells exposed to sodium fluoride. **Methods** In order to explore the changes of cell viability on the three major bone cell types exposed to different concentrations of sodium fluoride, mouse bone mesenchymal stem cells (BMSCs), as osteoblast progenitors, were induced into osteoblasts by mineralization induction agents containing dexamethasone, ascorbic acid, and β -sodium glycerol phosphate. RAW264.7 cells were induced to become osteoclasts by RANKL induction, and IDG-SW3 cells were induced into osteocyte by mineralization induction. Osteoblasts, osteoclasts and osteocyte were seeded into 96-well plates and exposed to 8 fluoride concentration gradients, respectively. Fluoride gradient included control group, low fluoride concentration (0.1, 0.5, 1, 2 mg/L), medium fluoride concentration (4, 8 mg/L) and high fluoride concentration (16, 32 mg/L). Three types of cells were treated with fluorine for 1 day, 2 days and 4 days periods. In the end, the methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method was used to measure cell viability. **Results** After 2 days of fluoride exposure, 0.5 and 1 mg/L fluoride significantly increased the viability of osteocytes, but the 8-32 mg/L dose of fluorine significantly inhibited the viability of osteoclasts and osteoblasts. After 4 days of fluoride exposure, 0.1-2 mg/L fluoride treatment significantly increased the viability of osteocyte, the viability of osteoclasts treated with 1-4 mg/L fluoride was also significantly higher than that of the controls; Under treatment with 16 mg/L of fluoride, cell viability of osteocytes fell by 8.6%, while viability of osteoclast and osteoblast sharply fell by 90.8% and 97.2%. **Conclusion** By comparison among three types of bone cell, osteoblasts indicated the narrowest range of fluoride-stimulating action, and significant inhibitory effect. Osteoclasts were the most sensitive to the change of fluorine dose, and osteocytes had the strongest tolerance to toxicity of fluoride accumulation.

Key words: osteoclasts; bone mesenchymal stem cells; osteocyte; cellular activity; sodium fluoride; cell type; osteoporosis

基金项目: 国家自然科学基金项目(81673111)

* 通信作者: 史立群, Email: 957831686@qq.com

骨质疏松是一种以骨量低为特点的代谢性骨病变,而骨量的减少与骨重建过程联系紧密^[1]。在骨重建过程中,成骨细胞、破骨细胞分别负责骨形成和骨吸收,来稳定骨骼的结构^[2]。骨细胞通过响应机械应力发送的信号来调节骨吸收或骨形成,在骨重建的作用是其主要功能。众多研究发现,氟化物对成骨细胞、破骨细胞的分化起着重要作用^[3,4],成骨细胞的增殖速率决定着骨形成速率,破骨细胞的数量及活性决定了骨吸收速率,二者的动态平衡决定骨代谢的平衡^[5]。研究证明,氟化物过量可引起骨组织细胞和骨基质的矿化缺陷,导致骨代谢平衡失调,引发骨质疏松等全身性的骨骼疾病^[6,7]。迄今为止,不同剂量氟对骨细胞活性影响的研究报道很少,尤其是平行研究不同氟浓度下骨组织中 3 种主要细胞的活性变化还未见报道。因此,本研究探究不同氟浓度对 3 种细胞活性的影响,分析 3 种细胞染氟时间不同细胞活性的变化情况,进而为研究氟骨症中的骨代谢提供重要依据。

1 材料和方法

1.1 3 种细胞的来源及诱导培养

1.1.1 小鼠骨髓间充质干细胞系 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 分离和培养: 6~8 周龄的 ICR 小鼠购自吉林大学动物实验中心。将小鼠麻醉、脱颈处死后投入装有 75% 乙醇的烧杯内消毒 1~3 min。无菌条件下取出股骨和胫骨,去除骨髓及周围组织,用无菌 PBS 反复冲洗骨髓腔,直到骨髓腔发白为止,收集冲洗下的细胞悬液 1 200 r/min,离心 5 min。将沉淀的细胞重悬,种于培养瓶中,置于 37 ℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件的恒温培养箱内培养,48 h 后更换培养液,漂洗去除未贴壁细胞。将细胞传至第 3 代,经流式细胞仪鉴定细胞表面抗原 CD34 和 CD44 表达阳性的细胞数占 94.6%,确认培养的细胞为 BMSCs。BMSCs 用 10 mmol/L β-甘油磷酸钠、50 mg/L 维生素 C、40 ng/mL 地塞米松进行矿化诱导,使其成为成骨细胞。而成骨细胞需要经过 4 d 后才能进入分化状态,所以待细胞长至对数期以 2×10⁴ 个/mL 的密度接种于 3 个 96 孔板,待细胞均贴壁后,按照空白对照、低氟浓度 (0.1、0.5、1、2 mg/L)、中氟浓度 (4、8 mg/L)、高氟浓度 (16、32 mg/L) 8 个浓度染氟,在细胞培养 1、2、4 d 后在 570 nm 波长下使用赛默飞世尔 Multiskan FC 酶标仪检测。

1.1.2 小鼠单核巨噬细胞系 RAW264.7:

RAW264.7 细胞株购自中国医学科学院细胞库。将 RAW264.7 细胞接种于含 5% 胎牛血清及 1% 双抗的 α-MEM 培养液中,待细胞长至对数期以 2×10⁴ 个/mL 的密度接种于 3 个 96 孔板,待细胞均贴壁后用 25 ng/mL RANKL 诱导 3~5 d 使其成为破骨细胞。分别加入不同浓度 F⁻ 浓度 (与上同),置于 37 ℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件的恒温培养箱内培养。在细胞培养 1、2、4 d 后在 570 nm 波长使用赛默飞世尔 Multiskan FC 酶标仪检测。

1.1.3 骨细胞系 IDG-SW3: IDG-SW3 细胞由 Indiana 大学医学院的 Lynda F. Bonewald 教授赠与。将 IDG-SW3 细胞接种在铺有胶原基质的培养瓶里,并在含有 4 mmol/L β-甘油磷酸钠、50 μg/mL 维生素 C 的 α-MEM 培养液中进行矿化诱导,使其表达骨细胞标志硬化蛋白后,确认成为骨细胞。骨细胞作为成骨细胞的终末成熟细胞,在 1~4 d 观察该种细胞的代谢改变。将细胞以 2×10⁴ 个/mL 的密度接种于 3 个 96 孔板,待细胞均贴壁后,按实验分组分别加入 F⁻ 至终氟浓度 (与上同),置于 37 ℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件的恒温培养箱内培养。在细胞培养 1、2、4 d 后在 570 nm 波长下使用赛默飞世尔 Multiskan FC 酶标仪检测。

1.2 试剂与仪器

α-MEM、DMEM、PBS (Hyclone 公司,美国),胎牛血清 (天杭生物科技股份有限公司,中国),β-甘油磷酸钠、维生素 C、Collagen Type I Rat Tail、MTT、氟化钠 (Sigma-Aldrich, 美国),二甲基亚砜 DMSO (北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,中国),酶标仪 (赛默飞世尔上海仪器有限公司,型号 Multiskan FC)。

1.3 MTT 法检测不同氟浓度对 3 种不同的细胞活性

细胞培养结束后,PBS 洗 3 次去除细胞分化诱导液,待测孔每孔加入 180 μL 的 DMEM 和 20 μL 的 5 mg/mL 的 MTT 溶液,37 ℃ 孵育 4 h 后小心吸出培养上清液,每孔加入 150 μL DMSO,低速振荡 10 min,使用酶标仪测定各孔吸光度值,重复 3 次检测。

1.4 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 IBM SPSS Statistic 20.0 软件进行统计分析。用 ANOVA 下 Duncan's test 和 LSD 法进行显著性检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

如表 1 所示,3 种细胞给予不同氟化物浓度处理 1 d 后,与对照组相比,高氟浓度对 3 种细胞均有抑制作用,其中 32 mg/L 组较 16 mg/L 组抑制作用更为显著。当 3 种细胞暴露于 32 mg/L 时,与对照组相比,骨细胞活性下降了 22.6%,而破骨细胞和成骨细胞活性分别下降了 94.1% 和 94.6%,呈现出明显的抑制作用。由此可以看出,高氟浓度 16 mg/L、32 mg/L 对 3 种细胞有显著的毒性抑制作用。

表 1 氟暴露 1 d 对 3 种细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The effect of fluoride exposure for 1 day on the cell viability of three types of cells ($\bar{x} \pm s$)

组别	IDG-SW3 cells	RAW264.7 cells	BMSCs cells
空白对照	0.354±0.030	0.443±0.079	0.444±0.057
0.1 mg/L	0.371±0.018	0.410±0.093	0.385±0.072
0.5 mg/L	0.347±0.019	0.408±0.043	0.446±0.111
1 mg/L	0.327±0.030	0.431±0.099	0.426±0.029
2 mg/L	0.329±0.022	0.442±0.055	0.421±0.085
4 mg/L	0.341±0.022	0.423±0.082	0.477±0.178
8 mg/L	0.340±0.025	0.417±0.060	0.392±0.073 **
16 mg/L	0.338±0.022	0.224±0.052 **	0.171±0.059 **
32 mg/L	0.274±0.016 **	0.026±0.010 **	0.025±0.010 **

注:与对照组相比较, ** $P < 0.01$ 。

随着投氟时间增加到 2 d,如表 2 所示,低氟浓度提高骨细胞活性,尤其是 0.5 mg/L 和 1 mg/L 促进作用明显。与对照组相比,细胞活性均增加了 8%。中氟浓度 8 mg/L 抑制破骨细胞和成骨细胞的活性,细胞活性分别下降了 26.7% 和 29.7%。而高氟浓度 16 mg/L 和 32 mg/L 对破骨细胞和成骨细胞活性的抑制作用更加明显,就 16 mg/L 而言,两种细胞活性均下降了 91.7%,而骨细胞活性则下降了 5.3%。结果说明骨细胞对高剂量的氟耐受力明显比破骨细胞和成骨细胞强。

表 2 氟暴露 2 d 对 3 种细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The effect of fluoride exposure for 2 day on the viability of three types of cells ($\bar{x} \pm s$)

组别	IDG-SW3 cells	RAW264.7 cells	BMSCs cells
空白对照	0.547±0.038	0.833±0.095	0.496±0.059
0.1 mg/L	0.579±0.025	0.832±0.110	0.490±0.040
0.5 mg/L	0.591±0.037 *	0.776±0.117	0.531±0.062
1 mg/L	0.591±0.039 *	0.801±0.100	0.502±0.097
2 mg/L	0.528±0.034	0.772±0.068	0.492±0.083
4 mg/L	0.539±0.038	0.756±0.078	0.462±0.076
8 mg/L	0.560±0.021	0.611±0.111 **	0.299±0.073 **
16 mg/L	0.518±0.025	0.069±0.020 **	0.041±0.022 **
32 mg/L	0.240±0.030 **	0.017±0.002 **	0.011±0.003 **

注:与对照组相比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

投氟时间增加到 4 d 时,如表 3 所示,低氟浓度对骨细胞和破骨细胞活性促进作用较明显,当这两种细胞暴露于 0.1 mg/L 时,与对照组相比,骨细胞活性增加了 8.8%,破骨细胞活性增加了 16%。骨细胞的活性在 0.1~2 mg/L 氟处理下显著增高,1~4 mg/L 氟处理下的破骨细胞的活性也明显比对照组高。然而,成骨细胞只有在 0.1 mg/L 和 0.5 mg/L 作用下细胞活性轻度提高了,随着氟浓度增加成骨细胞活性也随之下降。当 3 种细胞暴露于 16 mg/L 4 d 后,与对照组相比,骨细胞活性下降了 8.6%,而破骨细胞和成骨细胞活性则分别下降了 90.8% 和 97.2%。3 种细胞染氟 4 d 的活性充分显示了低剂量氟对破骨细胞和骨细胞的刺激作用,而高剂量氟对破骨细胞和成骨细胞的显著抑制作用。

表 3 氟暴露 4 d 对 3 种细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 The effect of fluoride exposure for 4 day on the viability of three types of cells ($\bar{x} \pm s$)

组别	IDG-SW3 cells	RAW264.7 cells	BMSCs cells
空白对照	0.697±0.045	0.655±0.122	0.643±0.081
0.1 mg/L	0.758±0.036 *	0.760±0.142	0.693±0.084
0.5 mg/L	0.740±0.029 *	0.662±0.103	0.653±0.081
1 mg/L	0.700±0.046	0.845±0.085 *	0.552±0.092
2 mg/L	0.630±0.048 *	0.796±0.117 *	0.592±0.073
4 mg/L	0.649±0.063	0.807±0.121 *	0.591±0.100
8 mg/L	0.700±0.035	0.611±0.043	0.295±0.124 **
16 mg/L	0.637±0.054 *	0.060±0.009 **	0.018±0.005 **
32 mg/L	0.085±0.036 **	0.007±0.003 **	0.012±0.005 **

注:与对照组相比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

氟骨症是指长期摄入过量氟化物引起氟中毒的一种慢性侵袭的全身性骨病。在氟骨症发病过程中成骨细胞和破骨细胞表现出不同程度的活跃^[8],成骨细胞活性增强/破骨细胞活性减弱可能是骨硬化发生的原因。方瑶瑶等^[9]发现 BMSCs 向成骨细胞分化,可以增强成骨细胞活性,有利于骨形成。在本实验中,低浓度增强了成骨细胞的活性,成骨细胞在 0.1 mg/L 浓度下暴露 4 d 后,细胞活性提高了 7.8%,提示了长期小剂量的氟可以刺激成骨细胞活性^[10]。高氟浓度降低了 BMSCs 诱导的成骨细胞活性和破骨细胞活性,从而证明了大剂量的氟能够导致骨质疏松或骨硬化^[10]。通过成骨细胞和破骨细胞活性可以预测骨丢失情况,本研究旨在分析 3 种细胞染氟后的活性变化,实验结果表明,氟化物对所有类型的细胞都有负面影响,但破骨细胞对低剂量

和高剂量氟化物作用敏感。

近年来,越来越多的研究人员报告了氟化物对成骨细胞和破骨细胞的活性影响^[3],进而研究两种细胞在骨代谢过程中的作用,但骨细胞在氟中毒中的作用研究较少。本研究采用 IDG-SW3 细胞经矿化诱导使其分化为骨细胞,采用 MTT 法分析骨细胞的活性。研究数据表明,低剂量的氟提高骨细胞活性,氟暴露于 0.5 mg/L 浓度下 2 d 和 4 d 后细胞活性均有显著性。中剂量中 8 mg/L 氟化物处理仅提高了骨细胞的活性,对成骨细胞和破骨细胞活性表现出抑制作用,高剂量中 16 mg/L 的氟化物使骨细胞活性下降了不到 10%,但几乎抑制了 90% 以上的破骨细胞和成骨细胞,这表明骨细胞不仅可以对低量氟刺激作用敏感,而且累积氟毒性具有很强的耐受性。

综上所述,本研究通过骨组织中 3 种主要类型细胞染氟实验研究,验证了氟化物对 3 种细胞活性的双重作用,即低氟浓度对破骨细胞和骨细胞的促进作用,高浓度氟对破骨细胞和成骨细胞的抑制作用。综合 3 种细胞活性来看,氟对成骨细胞的刺激作用范围最窄,而抑制作用显著,破骨细胞对氟剂量的变化最敏感,而骨细胞对氟化物蓄积毒性的耐受性最强。本实验结果为进一步研究慢性氟骨症骨病变提供了重要线索和依据。

【参 考 文 献】

[1] Li X, Ominsky MS, Warmington KS, et al. Sclerostin antibody

treatment increases bone formation, bone mass, and bone strength in a rat model of postmenopausal osteoporosis[J]. J Bone Miner Res, 2010, 24(4):578-588.

[2] Canalis E. Management of endocrine disease: Novel anabolic treatments for osteoporosis[J]. Eur J Endocrinol, 2018, 178(2): R33-R44.

[3] Bhawal UK, Lee HJ, Arikawa K, et al. Micromolar sodium fluoride mediates anti-osteoclastogenesis in Porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone loss[J]. Int J Oral Sci, 2015, 7(4):242-249.

[4] Everett ET. Fluoride's effects on the formation of teeth and bones, and the influence of genetics[J]. J Dent Res, 2011, 90(5):552-560.

[5] 易东升, 林琳, 高峰. 大鼠乳鼠成骨细胞建立及其生物学活性的研究[J]. 大连医科大学学报, 2014, 36(5): 430-434.

[6] Simon MJK, Beil FT, Ruther W, et al. High fluoride and low calcium levels in drinking water is associated with low bone mass, reduced bone quality and fragility fractures in sheep[J]. Osteoporos Int, 2014, 25(7):1891-1903.

[7] 王小明, 高宇凤, 成小芳, 等. GSTO1 基因沉默对氟致成骨细胞自噬与凋亡的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2019, 50(1): 183-192.

[8] 吕鹏. 胰岛素及胰岛素受体信号通路在氟骨症发病机制中的作用[D]. 长春: 吉林大学, 2015.

[9] 方瑶瑶, 薛志远, 杨秀艳, 等. 红芪中 5 种黄酮类成分对大鼠骨髓间充质干细胞和成骨细胞成骨分化的影响[J]. 中草药, 2019(3): 632-638.

[10] 王丽娟, 孙殿军. 氟对骨转换影响的研究进展[J]. 中华地方病学杂志, 2009, 28(2):228-230.

(收稿日期: 2019-03-25;修回日期: 2019-05-31)