

· 论 著 ·

维生素 D₃ 及其代谢物对成骨细胞分化及生物矿化的实验研究

汪东 杨媛 张峥 田天 周家宁 谭荣 周雪峰 王蒙*

解放军战略支援部队特色医学中心骨科, 北京 100101

中图分类号: R329 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2021) 03-0341-07

摘要: **目的** 研究体外维生素 D₃ 及其代谢物在不同浓度下对成骨细胞分化和生物矿化的影响。**方法** 采用胶原酶消化法分离成骨细胞;设立对照组,不同浓度 VD₃、25(OH)VD₃ 和 1 α ,25(OH)₂VD₃ 药物处理组。采用 CCK-8 法检测细胞增殖,采用 PNPP 法测定 ALP 活性,采用钙含量测定、ELISA 法和实时定量聚合酶链反应来评估成骨细胞对 VD₃ 及其代谢物的反应,并对成骨标志物进行分析,评价 VD₃ 及其代谢物对成骨细胞分化和生物矿化能力的影响。**结果** VD₃ 及其代谢物对成骨细胞无细胞毒性,只有 200 nmol/L 的 VD₃ 能显著促进成骨细胞增殖,而 25(OH)VD₃ 和 1 α ,25(OH)₂VD₃ 对成骨细胞增殖的促进作用不明显。25(OH)VD₃ 和 1 α ,25(OH)₂VD₃ 可以上调成骨细胞 CYP24A1 基因的转录活性,但不能直接代谢 VD₃ 和 25(OH)VD₃。25(OH)VD₃ 和 1 α ,25(OH)₂VD₃ 以剂量依赖性增加的方式促进早期成骨标志物 (Runx2, ALP 等) 的表达。只有 25(OH)VD₃ 能促进成骨细胞 OCN 基因和蛋白的表达,提高成骨细胞的生物矿化水平。**结论** 体外 25(OH)VD₃ 可诱导成骨细胞的分化和生物矿化,为其在临床骨质疏松症和骨组织工程中的应用提供依据。

关键词: 维生素 D₃; 25-羟基维生素 D₃; 1 α ,25-二羟基维生素 D₃; 成骨细胞; 分化; 生物矿化

Experimental study on the effect of vitamin D3 and its metabolites on the differentiation and biomineralization of osteoblasts in vitro

WANG Dong, YANG Yuan, ZHANG Zheng, TIAN Tian, ZHOU Jianing, TAN Rong, ZHOU Xuefeng, WANG Meng*

Department of Orthopedics, PLA Strategic Support Force Characteristic Medical Center, Beijing 100101, China

* Corresponding author; WANG Meng, Email: wangmsq@21cn.com

Abstract: **Objective** To study the effect of VD₃ and its metabolites on the osteoblast differentiation and biomineralization in different concentrations. **Methods** Osteoblasts were isolated with collagenase digestion method. The control group, VD₃ treatment group, 25(OH)VD₃ treatment group, and 1 α ,25(OH)₂VD₃ treatment group were established, respectively. CCK-8 test was used to detect the proliferation rate of osteoblasts. PNPP method was used for the determination of alkaline phosphatase activity. Calcium content determination, ELISA, and real-time quantitative polymerase chain reaction were used to evaluate the response of osteoblasts to VD₃, 25(OH)VD₃, or 1 α ,25(OH)₂VD₃. The effects of VD₃ and its metabolites on the differentiation and biomineralization of osteoblasts were evaluated with osteoblast marker analysis. **Results** The experimental result confirmed that VD₃ and its metabolites had no cytotoxicity to osteoblasts. The proliferation of osteoblasts was promoted significantly with 200 nmol/L of VD₃ only. It was not promoted significantly with 25(OH)VD₃ and 1 α ,25(OH)₂VD₃. Moreover, 25(OH)VD₃ and 1 α ,25(OH)₂VD₃ up-regulated the transcription activity of CYP24A1 gene in osteoblasts, but did not metabolize VD₃ and 25(OH)VD₃ directly. The expression of osteogenic markers (Runx2, ALP, etc.) was promoted by 25(OH)VD₃ and 1 α ,25(OH)₂VD₃ in a dose-dependent manner. More importantly, the gene and protein expressions of osteocalcin and the biomineralization level of osteoblasts were promoted by 25(OH)VD₃ only. **Conclusion** In vitro, 25(OH)VD₃ induces osteoblast differentiation and biomineralization, which can provide evidence for its application in clinical osteoporosis and bone tissue engineering.

Key words: vitamin D₃; 25-Hydroxyvitamin D₃; 1 α ; 25-dihydroxyvitamin D₃; osteoblast; differentiation; biomineralization

人体骨骼的形成和重塑需要多种细胞的协作,其中成骨细胞发挥了至关重要的作用。成骨细胞可调节骨的矿化,其与破骨细胞的动态平衡直接影响骨的生物学特性^[1]。维生素D作为一种脂溶性维生素,在调节成骨细胞和骨形成中起着至关重要的作用^[2-3]。人体中的维生素D主要是维生素D₃(VD₃),其代谢产物25-羟基维生素D₃[25(OH)VD₃]在血清中的浓度是体内维生素D的最可靠指标,有研究证实骨质疏松和骨折与25(OH)VD₃的血清浓度不达标状态密切相关^[4],25(OH)VD₃在肾中通过1 α 羟基化作用产生活性形式的1 α ,25-二羟基维生素D₃[1 α ,25(OH)₂VD₃],作为VD₃最活跃的形式,它通过维生素D受体(VDR)发挥作用。许多研究报道,维生素D₃的代谢产物25(OH)VD₃和1 α ,25(OH)₂VD₃可以在体外和体内调节不同类型细胞的功能^[5-7]。例如,Lou等^[5]的研究表明25(OH)VD₃在较高的生理浓度下作为一种活性激素参与VD₃应答基因调控和抑制细胞增殖。亦有研究证实VD₃代谢物可诱导间充质干细胞(MSCs)的成骨分化^[7]。然而目前VD₃及其代谢物对成骨细胞分化的影响尚不清楚。基于推测VD₃及其代谢物可能对成骨细胞的分化和生物矿化起促进作用。本研究通过检测细胞增殖、成骨相关基因表达、蛋白分泌和生物矿化等研究VD₃、25(OH)VD₃和1 α ,25(OH)₂VD₃对成骨细胞的影响,以期进一步了解VD₃及其代谢物在促进成骨细胞分化和生物矿化中的作用和关系,为其在临床骨质疏松症和骨组织工程中的应用提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料及试剂

DMEM细胞培养液、胎牛血清(美国Gibco公司);碳酸氢钠、L-谷氨酰胺、胰蛋白酶、EDTA、PBS、VD₃、25(OH)VD₃、1 α ,25(OH)₂VD₃(美国Sigma公司);碱性磷酸酶测定试剂盒、总RNA提取试剂盒、RT-PCR试剂盒(中国Beyotime生物技术公司);CCK-8检测试剂盒(日本Takara公司);骨钙素ELISA检测试剂盒(美国Zymed公司)

1.2 仪器

CO₂细胞培养箱(美国Thermo公司);分光光度计(美国Beckman公司);凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司);定量PCR仪(美国Stratgenes公司);台式低温高速离心机(美国Thermo公司);Millipore纯水系统(美国Millipore公司)。

1.3 成骨细胞培养

采用胶原酶消化法分离成骨细胞,取1 d龄新生大鼠颅骨,制成1~3 mm³的骨粒,0.25%的胰蛋白酶消化清除纤维组织细胞,在0.1%胶原酶II、37℃环境下振荡消化50 min,收集消化液,室温下以1 200 r/min离心10 min,去除上清液,接种于培养瓶中,对静置后沉淀部分可再重复以胶原酶消化20 min、磁力搅拌消化15 min、离心10 min,添加含10%胎牛血清、0.1 mg/mL链霉素、100 U/mL青霉素、1.5 mg/mL碳酸氢钠和0.33 mg/mL L-谷氨酰胺的DMEM培养基。将获得的细胞放置于二氧化碳培养箱,在5% CO₂、95%空气、37℃温度下培养,24 h后可见细胞贴壁生长,胞质开始伸展,换新鲜培养液,以后每隔48 h换培养液。当细胞聚集度达到90%左右时,用0.25%胰蛋白酶消化传代。第三代细胞被用于体外研究。

1.4 实验分组

分为正常细胞对照组,VD₃药物处理组,25(OH)VD₃药物处理组和1 α ,25(OH)₂VD₃药物处理组,我们以50~200 nmol/L作为维生素D₃和25(OH)VD₃的实验浓度,1 α ,25(OH)₂VD₃的实验浓度为0.01~0.2 nmol/L。成骨细胞接种密度为3 000细胞/cm²,培养1 d,细胞贴壁后更换含VD₃、25(OH)VD₃或1 α ,25(OH)₂VD₃的药物处理培养基,每周换液3次,常规细胞培养。

1.5 CCK-8细胞增殖检测

成骨细胞接种于24孔板,初始密度为1 $\times$ 10⁴细胞/cm²,药物处理第7天用PBS冲洗3次,配置含10% CCK-8的培养基,以换液的形式加入,37℃孵育2 h,用分光光度法测定波长450 nm处的吸光值。

1.6 碱性磷酸酶活性测定

成骨细胞接种于24孔板,接种密度为1 $\times$ 10⁴细胞/cm²,药物处理7 d,收集细胞用1% TritonX-100进行3次冻融处理,经离心后,按ALP试剂盒说明,采用对硝基苯磷酸二钠基质动力学法(PNPP法)测定ALP活性,Bradford法测定细胞液蛋白浓度,ALP活性用细胞内总蛋白浓度校正。

1.7 钙含量测定

将成骨细胞接种于24孔板中,初始密度为1 $\times$ 10⁴细胞/cm²。培养21 d后,细胞用4%多聚甲醛固定并在室温下用茜素红S(ARS)(40 mmol/L,pH=4.1)染色,收集细胞,在85℃下加热10 min,离心15 min后,收集上清液,加入10%氢氧化铵中和酸,测量450 nm波长处吸光度值。

1.8 ELISA 测定骨钙素浓度

收集药物处理 21 d 的细胞, PBS 洗涤一次, 用含有蛋白酶抑制剂的放射免疫沉淀分析缓冲液进行裂解。使用 Gla 型骨钙素 EIA 试剂盒检测, 稀释细胞裂解物, 确保 ELISA 测定的样品读数在标准范围内 (0~16 ng/mL)。细胞裂解液中的蛋白质浓度用 BCA 蛋白分析试剂盒测定。450 nm 波长处测定吸光度。根据标准品吸光度曲线测定骨钙素浓度 (以 pg/mL 表示)。

1.9 成骨细胞标志基因表达

收集药物处理 7 d 的细胞, 用 EZNA™ 总 RNA 试剂盒 II 提取总 RNA。用 PrimeScript™ RT 试剂盒去除基因组 DNA 和 cDNA 合成。采用 real-time PCR 法检测 OCN、Runx2、CYP27B1、CYP24A1 表达, β -actin 为参照基因。 β -actin 引物序列为: 上游引物 5'-GGAGATCTCTGCTCTTA-3' 和下游引物 5'-ACTCATCGCTCCTCTTCTGCTG-3'。CYP24A1: 上游引物 5'-GCCGCCGGAAGTCA-3' 和下游引物 5'-AAATACCACC。CYP27 B1: 上游引物 5'-TTGCGAGCGCGACTGTAT-3' 和下游引物 5'-TGTGTGATAGCTGGCCACAA-3'; Runx 2: 上游引物 5'-GCCG TAGAGGGGAAGAC-3' 和下游引物 5'-CTGCTTG GATTAGGAGTCAC-3'; OCN: 上游引物 5'-GAGGGTAAGGGGGGAA-3' 和下游引物 5'-TCCTCGTGGAAGCCAATGTG-3'。

反应条件: 98 °C 3 min, 45 个循环的 98 °C 10 s, 58 °C 15 s 和 72 °C 30 s。real-time PCR 采用 Beyotime 生物工程有限公司的 SYBR 染料法试剂盒在美国 ABI 公司的 7500 型荧光定量 PCR 仪上进行, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算基因表达的倍数差异。

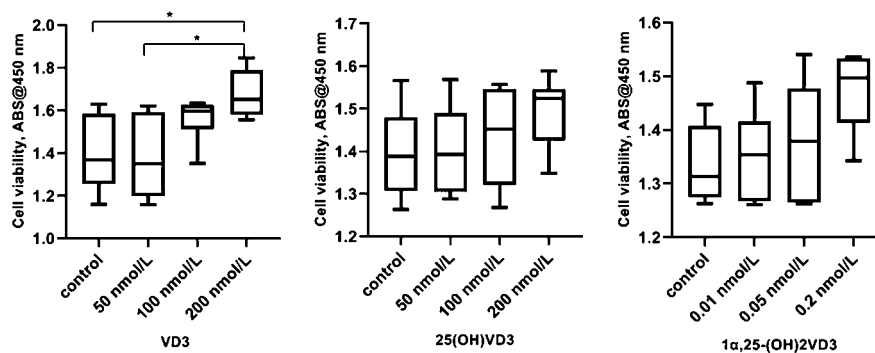
1.10 图像与统计分析

所有数据均以均值 $\pm$ 标准差表示。两组间差异显著性检验使用非配对 Student *t* 检验, 两组以上数据比较时使用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 检验显著性差异。使用 OriginPro 2016 进行单因素方差分析和 *t* 检验统计分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞增殖

采用 CCK-8 法定量评价 VD_3 、25(OH) VD_3 或 $1\alpha, 25(OH)_2VD_3$ 对成骨细胞增殖的影响。结果表明 200 nmol/L VD_3 处理组的细胞增殖显著高于 50 nmol/L VD_3 处理组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。随着 25(OH) VD_3 和 $1\alpha, 25(OH)_2VD_3$ 浓度的增加, 成骨细胞增殖活性有所增强, 但差异没有统计学意义 (图 1)。结果表明, VD_3 、25(OH) VD_3 或 $1\alpha, 25(OH)_2VD_3$ 对成骨细胞均无细胞毒性, 只有 200 nmol/L VD_3 对成骨细胞有显著的促进增殖作用。



注: * $P < 0.05$ 。

图 1 CCK-8 法检测 VD_3 、25(OH) VD_3 和 $1\alpha, 25(OH)_2VD_3$ 处理 7 d 的成骨细胞增殖情况

Fig.1 The proliferation of osteoblasts treated with VD_3 , 25(OH) VD_3 , or $1\alpha, 25(OH)_2VD_3$ for 7 days was detected with CCK-8 method

2.2 成骨细胞 24-羟化酶和 1α -羟化反应

在本研究中, 我们首先研究成骨细胞是否对 VD_3 、25(OH) VD_3 或 $1\alpha, 25(OH)_2VD_3$ 有反应。24-羟化酶由 CYP24A1 编码, 受配体结合 VDR 调节。既往研究表明, CYP24A1 是 $1\alpha, 25(OH)_2VD_3$ 上调

最多的基因, 是公认的 VDR 敏感靶基因^[8-9]。如图 2 所示, 随着 VD_3 浓度的增加, CYP24A1 的 mRNA 表达无明显变化。200 nmol/L 25(OH) VD_3 处理细胞后, CYP24A1 mRNA 水平明显升高, 与 100 nmol/L 和 50 nmol/L 相比, 差异具有统计学意义 ($P <$

0.001;图2)。0.2 nmol/L $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 与 0.01 nmol/L 和 0.05 nmol/L 相比,CYP24A1 的 mRNA 水平显著升高($P<0.001$)。低浓度 VD_3 、 $25(\text{OH})\text{VD}_3$

或 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 对成骨细胞 CYP24A1 mRNA 表达水平无明显影响。

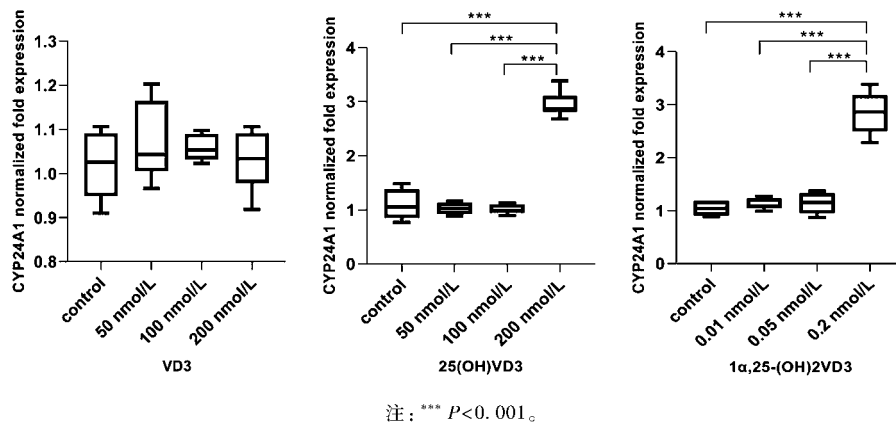


图2 qRT-PCR 法检测 CYP24A1 基因的表达

Fig.2 CYP24A1 mRNA expression was detected with qRT-PCR

在体内, $25(\text{OH})\text{VD}_3$ 经 25-羟基维生素 D-1 α -羟化酶(CYP27B1)转化为 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ ^[9]。因此,我们在培养第7天测定了 CYP27B1 的 mRNA 表达,以确定 $25(\text{OH})\text{VD}_3$ 是否在成骨细胞中代谢为 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 。如图3所示, VD_3 和 $25(\text{OH})\text{VD}_3$ 浓度的增加不影响成骨细胞 CYP27B1 mRNA 的表达。结合图2的结果,我们可以得出结论:成骨细胞对 $25(\text{OH})\text{VD}_3$ 和 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 有反应,但不能直接代谢 VD_3 和 $25(\text{OH})\text{VD}_3$ 。

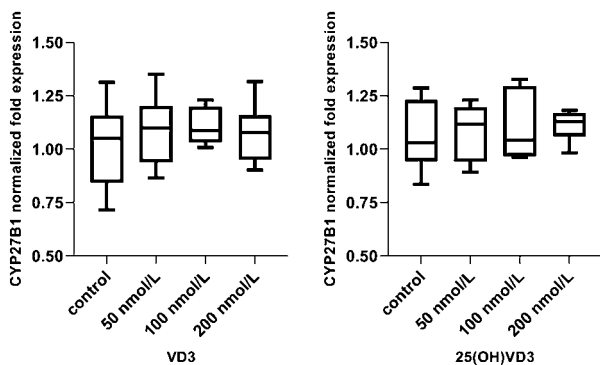


图3 qRT-PCR 法检测 CYP27B1 mRNA 表达

Fig.3 CYP27B1 mRNA expression was detected with qRT-PCR

2.3 碱性磷酸酶活性测定

ALP 的表达是成骨分化的标志^[2-3]。定量测定结果显示(图4),与对照组相比, VD_3 处理组 ALP 活性无明显提高。100 nmol/L $25(\text{OH})\text{VD}_3$ 处理组 ALP 活性显著高于 50 nmol/L 处理组($P<0.05$),200 nmol/L $25(\text{OH})\text{VD}_3$ 处理组 ALP 活性最高($P<$

0.05 或 $P<0.001$)。与第7天的其他浓度相比,0.2 nmol/L $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 处理组 ALP 活性显著升高($P<0.01$ 或 $P<0.001$)。结果表明,一定浓度的 $25(\text{OH})\text{VD}_3$ 或 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 能促进成骨细胞早期分化。

2.4 钙含量测定

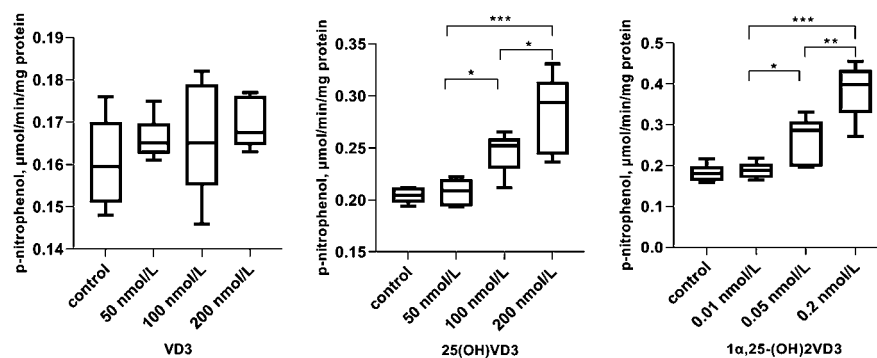
ARS 法检测细胞外钙沉积,是晚期成骨分化指标^[11]。定量测定结果(图5)表明, VD_3 和 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 在任何浓度下都不能显著促进成骨细胞的生物矿化。仅 $25(\text{OH})\text{VD}_3$ 可以促进成骨细胞的生物矿化,当 $25(\text{OH})\text{VD}_3$ 浓度增加到 200 nmol/L 时,细胞的生物矿化水平最高($P<0.01$ 或 $P<0.001$)。

2.5 成骨细胞标志基因表达

Runx2 是成骨细胞分化的关键转录因子,调节下游成骨基因的转录,如 ALP、OCN 等^[12-13]。OCN 是最丰富的骨特异性非胶原蛋白,也是反映成骨成熟和骨形成的标志物之一^[14-15]。所有实验组中 VD_3 对 Runx2 和 OCN 的表达无明显影响。与对照组相比, $25(\text{OH})\text{VD}_3$ 处理组可显著上调 Runx2 和 OCN 的表达水平($P<0.01$ 或 $P<0.001$)。 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 处理组对 Runx2 表达的影响趋势相似($P<0.05$ 或 $P<0.001$)。但是, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 处理组成骨细胞的 OCN 表达水平差异无统计学意义(图6)。

2.6 ELISA 测定骨钙素浓度

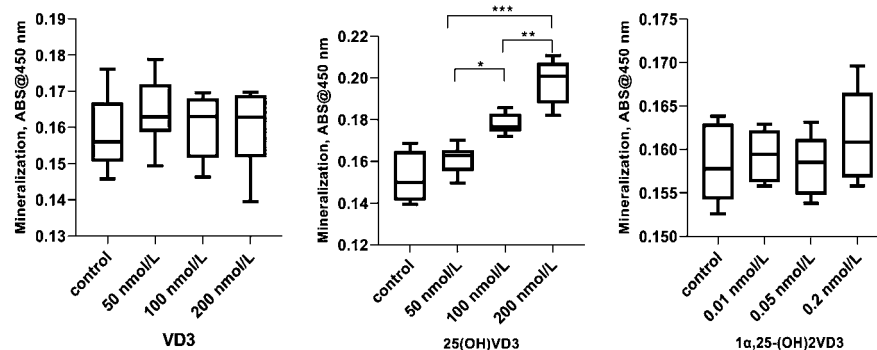
ELISA 检测结果显示, VD_3 和 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 在任何浓度下都不能显著促进 OCN 的分泌(图7)。



注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 4 VD_3 、 $25(OH)VD_3$ 和 $1\alpha,25(OH)_2VD_3$ 处理后,成骨细胞的碱性磷酸酶活性测定

Fig.4 ALP activity of osteoblasts after treatment with VD_3 , $25(OH)VD_3$ and $1\alpha,25(OH)_2VD_3$



注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 5 VD_3 、 $25(OH)VD_3$ 、 $1\alpha,25(OH)_2VD_3$ 处理成骨细胞 21 d 钙含量测定

Fig.5 Determination of calcium in osteoblasts treated with VD_3 , $25(OH)VD_3$, or $1\alpha,25(OH)_2VD_3$ for 21 days

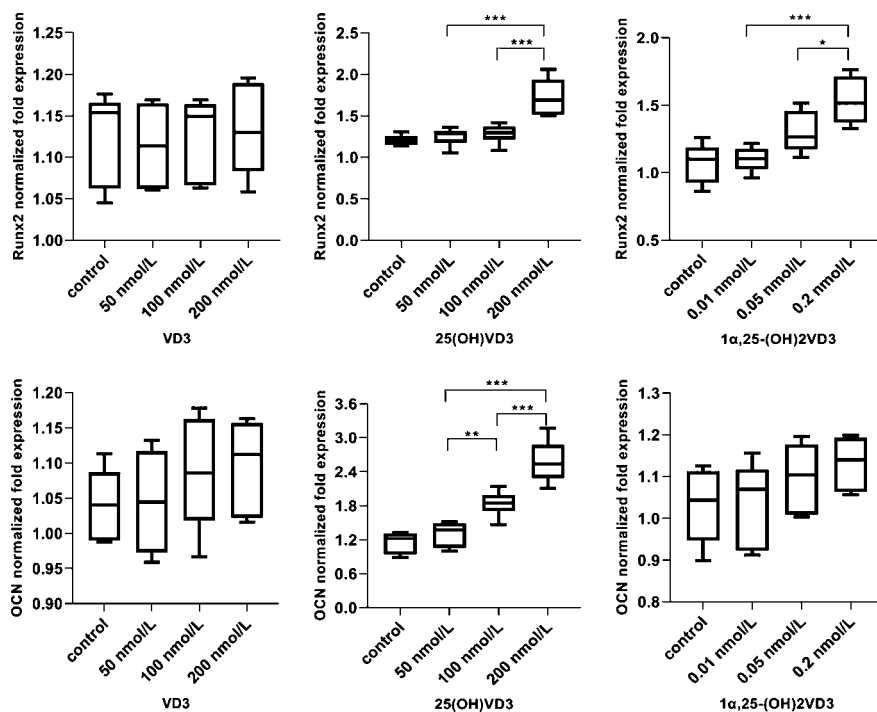
200 nmol/L $25(OH)VD_3$ 处理组 OCN 的分泌显著高于其他各组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。

3 讨论

骨的形成和重塑需要多种细胞的协作,其中成骨细胞在骨骼发育和骨损伤修复中起着至关重要的作用。成骨细胞不仅调节骨的矿化,还间接调节破骨细胞的骨吸收功能,它的数量和功能变化直接影响骨的生物学特性。长期以来,药物治疗被认为是最简单和可靠地促进成骨细胞分化和生物矿化的方式。维生素 D 作为在骨骼发育上起重要作用的营养物质^[2],除了可以通过饮食获得,更主要是依赖于紫外照射通过皮肤合成。人体中的维生素 D 主要是维生素 D_3 ,其作为一种脂溶性维生素,本身没有生物活性,维生素 D_3 的代谢产物是体内的主要活性形式,其在体内的作用是多种多样的,与钙平衡和骨骼发育密切相关^[1-2]。维生素 D 及其代谢物在血清中结合维生素 D 结合蛋白后转运至肝脏,在肝脏

中,维生素 D 的 C-25 端被羟化产生 25-羟基维生素 D_3 [$25(OH)VD_3$], $25(OH)VD_3$ 在血中的浓度是体内维生素 D 状态的最可靠指标, $25(OH)VD_3$ 在肾脏中进一步通过 1α 羟基化作用产生活性形式的 $1\alpha,25(OH)_2VD_3$, $1\alpha,25(OH)_2VD_3$ 通过与其高亲和力维生素 D 受体 (vitamin D receptor, VDR) 的相互作用调节基因转录来发挥其大部分的生物学效应。 $1\alpha,25(OH)_2VD_3$ 具有调节钙、磷代谢的活性,其机制已得到广泛研究^[10]。

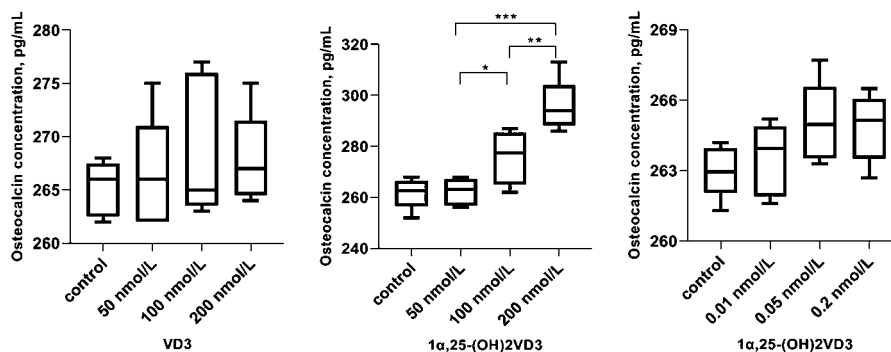
我们的研究证实 VD_3 对成骨细胞的分化和生物矿化几乎无帮助,与 VD_3 和 $1\alpha,25(OH)_2VD_3$ 相比,仅 $25(OH)VD_3$ 处理后的成骨细胞外基质钙沉积明显增加。 $25(OH)VD_3$ 作为一种活性激素,在一些类型的细胞^[5-6]中不转化为 $1\alpha,25(OH)_2VD_3$,二者具有不同的生物学作用。由此,我们推测, $25(OH)VD_3$ 对成骨细胞分化和生物矿化的积极影响不是由 $1\alpha,25(OH)_2VD_3$ 介导的,因为成骨细胞中 CYP27B1 的 mRNA 表达几乎不随 $25(OH)VD_3$ 浓



注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图6 qRT-PCR法检测Runx2和OCN相关mRNA的表达

Fig.6 Runx2 and OCN mRNA expressions were detected with qRT-PCR



注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图7 ELISA法测定骨钙素浓度

Fig.7 The concentration of osteocalcin was measured with ELISA method

度的增加而改变。同样地, VD_3 也不能使成骨细胞中 CYP24A1 的 mRNA 表达显著上调, 因此, 基于上述的研究结果推测 VD_3 不可被成骨细胞代谢, 不能对成骨细胞的分化和生物矿化产生明显的刺激作用。

尽管 $25(OH)VD_3$ 和 $1\alpha, 25(OH)_2VD_3$ 在诱导 hMSCs 成骨谱系标志物 (Runx2、ALP、OCN 等) 方面已被证实有效^[12-15], 但 VD_3 , $25(OH)VD_3$ 和 $1\alpha, 25(OH)_2VD_3$ 对成骨细胞分化的潜在作用仍不清楚。本研究中, 我们发现 $25(OH)VD_3$ 和 $1\alpha, 25$

$(OH)_2VD_3$ 可以剂量依赖性的方式促使早期成骨标志物 (Runx2、ALP 等) 的表达, 而只有 $25(OH)VD_3$ 能促进成骨细胞 OCN 基因和蛋白的表达, 提高成骨细胞的生物矿化水平。 $25(OH)VD_3$ 和 $1\alpha, 25(OH)_2VD_3$ 可以促进 Runx2 和 ALP 的表达, 这与已报道的部分研究略有不同^[16-17]。差异的产生可能是由于 $1\alpha, 25(OH)_2VD_3$ 对成骨细胞分化的影响是通过不同的信号途径进行的^[18]。

在本研究中, 我们根据 VD_3 、 $25(OH)VD_3$ 和 $1\alpha, 25(OH)_2VD_3$ 的血清生理浓度选择了药物处理

浓度。目前对于理想的 $25(\text{OH})\text{VD}_3$ 血清水平,国际、国内多数机构和专家认为, $25(\text{OH})\text{VD}_3$ 的血清浓度范围为 $75 \sim 150 \text{ nmol/L}$, 血清浓度低于 50 nmol/L 为维生素 D 缺乏,若血清 $25(\text{OH})\text{VD}_3$ 浓度超过 375 nmol/L 则可能出现维生素 D 中毒^[19-22]。美国国立卫生研究院 NIH 的 MedlinePlus 医学信息网和美国国家医学院 IOM 食品与营养委员会向公众推荐 $25(\text{OH})\text{VD}_3$ 的最佳浓度分别为 $75 \sim 185 \text{ nmol/L}$ 和 50 nmol/L ^[23]。因此,我们使用 $50 \sim 200 \text{ nmol/L}$ VD_3 和 $25(\text{OH})\text{VD}_3$ 作为研究浓度。我们的研究发现,只有 200 nmol/L VD_3 能显著促进成骨细胞增殖,而 $25(\text{OH})\text{VD}_3$ 和 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 不能显著促进成骨细胞增殖。体外在该浓度下 VD_3 、 $25(\text{OH})\text{VD}_3$ 和 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 对成骨细胞无细胞毒性,该结果与既往的相关研究结果是一致的,即血清中 $25(\text{OH})\text{VD}_3$ 低于 500 nmol/L 没有细胞毒性发生^[24-25]。此外,我们发现 $100 \sim 200 \text{ nmol/L}$ 的 $25(\text{OH})\text{VD}_3$ 是诱导成骨的最佳浓度,考虑到成骨是一个长期的生理过程,理化性质更稳定的 VD_3 代谢物更好。既往研究表明, $25(\text{OH})\text{VD}_3$ 和 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 的半衰期分别为 $2 \sim 3$ 周和 4 h ^[26],这说明 $25(\text{OH})\text{VD}_3$ 比 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 更稳定。另外, $25(\text{OH})\text{VD}_3$ 本身的疏水性高于 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$,更易被细胞摄取。

综上所述,与 VD_3 和 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ 相比, $25(\text{OH})\text{VD}_3$ 具有诸多优点,其在成骨分化和骨损伤修复中具有不可或缺的重要作用。进一步探索更精确的 $25(\text{OH})\text{VD}_3$ 使用浓度范围和促进成骨细胞分化的可能机制是十分必要的。我们的研究结果证实 $25(\text{OH})\text{VD}_3$ 在 $100 \sim 200 \text{ nmol/L}$ 范围内可诱导成骨细胞分化及生物矿化,为其在临床骨质疏松症和组织工程中的应用提供了依据。

【参 考 文 献】

- [1] Anna L Golob, Mary B Laya. Osteoporosis: screening, prevention, and management[J]. Med Clin North Am, 2015, 99(3): 587-606.
- [2] Xu K, Shen XK, Chen WZ, et al. Nanosheet-pore topographical titanium substrates: a biophysical regulator of the fate of mesenchymal stem cells [J]. J Mater Chem B, 2016, 4(10): 1797-1810.
- [3] Meyer MB, Benkusky NA, Sen B, et al. Epigenetic plasticity drives adipogenic and osteogenic differentiation of marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. J Biol Chem, 2016, 291(34): 17829-17847.
- [4] Holick MF. The vitamin D deficiency pandemic: Approaches for diagnosis, treatment and prevention [J]. Rev Endocr Metab Disord, 2017, 18(2): 153-165.
- [5] Lou YR, Molnár F, Peräkylä M, et al. 25-Hydroxyvitamin D(3) is an agonistic vitamin D receptor ligand [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2010, 118(3): 162-170.
- [6] Lee SM, Pike JW. The vitamin D receptor functions as a transcription regulator in the absence of 1,25-dihydroxyvitamin D3 [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2016, 164: 265-270.
- [7] Açıl Y, Ghoniem AA, Gülses A, et al. Suppression of osteoblast-related genes during osteogenic differentiation of adipose tissue derived stromal cells [J]. J Craniomaxillofac Surg, 2017, 45(1): 33-38.
- [8] Tashiro K, Abe T, Oue N, et al. Characterization of vitamin D-mediated induction of the CYP24 transcription [J]. Mol Cell Endocrinol, 2004, 226: 27-32.
- [9] DiFranco KM, Mulligan JK, Sumal AS, et al. Induction of CFTR gene expression by 1,25(OH)₂ vitamin D3, 25OH vitamin D3, and vitamin D3 in cultured human airway epithelial cells and in mouse airways [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2017, 173: 323-332.
- [10] Su EP, Justin DF, Pratt CR, et al. Effects of titanium nanotubes on the osseointegration, cell differentiation,

(收稿日期: 2020-04-23; 修回日期: 2020-07-08)