DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.05.022
第24卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 5
2002年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2002


文章编号:1000-5404(2002)05-0547-03

论著

# TGF-β对胎兔颅骨成骨样细胞体外成骨作用及BMP蛋白表达影响的研究

唐康来,杨 柳,许建中,卢卫忠,吴梅英,李起鸿 (第三军医大学附属西南医院骨科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨TGF-β对胎兔颅骨成骨样细胞体外成骨作用及BMP蛋白表达的影响。方法 采用ALP活性测定及骨结节计数方法观察TGF-β对胎兔颅骨成骨样细胞体外的成骨作用,BMP-McAb免疫组化染色及其定量分析观察TGF-β对胎兔颅骨成骨样细胞BMP蛋白表达的影响。结果 TGF-β(3~7 d)对ALP活性有促进作用,并呈一定的时效和量效关系。TGF-β对骨结节形成低剂量时有促进作用,高剂量时有较强的抑制作用;TGF-β对成骨细胞BMP蛋白表达表现为抑制作用;二者均有显著性差异。结论 TGF-β对胎兔颅骨成骨样细胞体外成骨及BMP蛋白表达表现为双相作用。

关键词:胎兔;成骨样细胞;转化生长因子β;骨形态发生蛋白;骨形成
中图法分类号:R329.2;R392.11;R392.13 文献标识码:A

# Effects of TGF-β on osteogenosis and BMP expression of primary osteoblast-like cells derived from fetal rabbit calvarium *in vitro*

TANG Kang-lai, YANG Liu, XU Jian-zhong, LU Wei-zhong, WU Mei-ying, LI Qi-hong (Department of orthopedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the effects of TGF-β on the osteogenosis and the expression of bone morphogenetic protein (BMP) of primary osteoblast-like cells derived from fetal rabbit calvarium *in vitro*. **Methods** The effects of TGF-β on the osteogenosis of primary osteoblast-like cells were investigated with alkaline phosphatase activity assay and bone nodule counting. The effects of TGF-β on BMP expression were tested with immunohistochemical staining and quantitative analysis. **Results** TGF-β given for 3—7 d increased ALP activity in a dose- and time-dependent manner. It was found TGF-β enhanced the bone nodule formation at low concentration, but inhibited it at high concentration. TGF-βinhibited the BMP protein expression, which increased along with the dose. **Conclusion** TGF-β showed bi-directional effects on the osteogenesis and BMP protein expression of rabbit osteoblast-like cells derived from fetal calvarium *in vitro*.

**Key words:** transforming growth factor beta1; fetal rabbits; osteoblast-like cell; bone morphogenetic protein; osteogenosis

骨形成和修复是一个复杂的过程,受多因素的影响,骨生长因子的局部作用日益受到重视,参与骨形成和修复的生长因子中转化生长因子β(Transforming growth factor beta, TGF-β)和骨形态发生蛋白(Bone morphogenetic protein, BMP)非常引人注目,TGF-β和BMP同骨形成和修复密切相关,因此对这一关系的研究有助于揭示TGF-β在骨形成和修复中的作用,为加速骨愈合提供新手段。大量的体内试验发现,外源性TGF-β具有明显促进骨形成和修复的作用;而体外试验却存在着广泛的争议,不同的学者运用不同或相似的体外细胞模型,其结果是不同的,甚至是相互矛盾的;且实验的细胞种属仅限于鼠和人,与体内试验大多数采用兔作为活体模型不相匹配[1~4]。因此,选择合适的细胞模型来研究TGF-β的体外成骨作用显得非常必要,本实验选择胎兔颅骨成骨样细胞作为细胞模型来探讨TGF-β对胎兔颅骨成骨样细胞体外成骨作用及BMP蛋白表达的影响。

作者简介:唐康来(1969—),男,四川省营山县人,博士,主治医师,讲师,主要从事关节外科和骨组织工程相关研究,发表论文10余篇。电话:(023)68754000-73076
通信作者:杨 柳,(023)65317146,E-mail:jointsurgery@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2002-02-04;修回日期:2002-04-19

## 1 材料和方法

### 1.1 TGF-β从人血小板中提取纯化[5]

参照本实验室方法[6]分离培养及鉴定胎兔颅骨成骨样细胞。

### 1.2 实验分5组

按TGF-β浓度分为0.01 ng/ml组;0.1 ng/ml组;1 ng/ml组;10 ng/ml组和空白对照组。按不同指标,于不同的时相点进行观察。

### 1.3 碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)活性测定

24孔培养板中按每孔$2\times10^4$细胞接种培养至3、5、7 d各取4个样本,用0.05% SDS溶液充分吹打,4 ℃隔夜孵育;酶动力法用CK7全自动大型生化测试仪测ALP活性。

### 1.4 骨结节形成

按$2.0\times10^3$/孔接种细胞到96孔培养板,每个剂量组均培养至21 d,各取6孔行钙染色;将染色的培养板放在坐标纸上用40倍放大镜分别计算每孔中的钙结节总数。

### 1.5 BMP-McAb免疫细胞染色

本方法是利用BMP-McAb和成骨细胞内BMP特异结合,采用亲和细胞化学技术-ABC法显示细胞内BMP存在部位及表达量的多少,具体步骤如下:①取出第7天长满成骨细胞的盖玻片,用PBS(pH=7.4)冲洗4 min。②在盖玻片上滴加50 μl氧化酶阻断剂,室温下孵育10 min。③PBS(pH=7.4)冲洗3次,每次

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

5 min。④每张玻片上加 50μl 非免疫性动物血清，室温下孵育 10 min，吸去多余抗体。⑤每张玻片上加 BMP 单克隆抗体。⑥PBS(pH=7.4)冲洗 3 次，每次 5 min。⑦每张玻片上加 50μl 生物素标记的二抗，室温下孵育 10 min，酶溶液室温下孵育 10 min。⑧PBS 冲洗 3 次，每次5 min。⑨每张玻片上加 100μl 新鲜配制的 DAB 显色液。⑩镜下观察 3～5 min，自来水冲洗，根据需要进行苏木精染色，中性树脂封固。

### 1.6 BMP 蛋白表达定量

第 7 天，各组分别取玻片 3 张行免疫组化染色；随机抽取一张 DAB 显色玻片置于光学显微镜下，经物镜将图像输入摄像机显示在计算机监视的屏幕上，用鼠标划出被测区域，在同一光强度下随机选择 20 个视野，算出其 OD 值。

### 1.7 统计学分析

结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示并经 $t$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 TGF-β 对胎兔颅骨成骨样细胞 ALP 活性作用的结果，见表 1。

表 1 TGFβ 对胎兔颅骨成骨样细胞 ALP 活性作用结果($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effects of TGFβon the alkaline phosphatase activity of primary cultured osteoblast-like cells($\bar{x}\pm s$)

| Group(TGF-β) | ALP Activities(IU/L) | | |
|---|---|---|---|
| | 3d($n$=4) | 5d($n$=4) | 7d($n$=4) |
| 0.01 ng/ml | 14.75±0.96 * | 19.75±0.96 * | 17.25±1.26 * |
| 0.1 ng/ml | 20.25±0.96 * | 25.00±1.83 * | 20.50±1.29 |
| 1 ng/ml | 28.25±1.71 * | 30.25±1.71 * | 21.50±1.29 |
| 10 ng/ml | 18.00±0.82 * | 26.75±0.96 * | 21.75±3.10 * |
| Control | 14.00±0.81 | 18.25±0.96 | 19.25±0.96 |

*: $P<0.05$ *vs* group control

### 2.2 TGF-β 对胎兔颅骨成骨样细胞骨结节形成作用的结果，见表 2

表 2 TGFβ 对各组培养 21 d 的胎兔颅骨成骨样细胞骨结节形成的作用($n$=6 $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Effects of TGFβon the bone nodule formation of primary osteoblast-like cells cultured for 21 d($n$=6 $\bar{x}\pm s$)

| Group | Number of bone nodules in a well |
|---|---|
| 0.01 ng/ml | 29.5±3.08 * |
| 0.1 ng/ml | 23.0±2.19 |
| 1 ng/ml | 7±1.41 * |
| 10 ng/ml | 1±0.89 * |
| Control | 22.8±1.94 |

*: $P<0.05$ *vs* group control

### 2.3 TGF-β 对胎兔颅骨成骨样细胞 BMP 表达的影响，见表 3

表 3 TGFβ 对胎兔颅骨成骨样细胞 BMP 表达量的影响(OD 值，$n$=20，$\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Effects of TGFβon BMP expression of primary osteoblast-like cells(Optical density value，$n$=20，$\bar{x}\pm s$)

| Group | OD |
|---|---|
| 0.01 ng/ml | 0.4454±0.0136 |
| 0.1 ng/ml | 0.3792±0.0120 * |
| 1 ng/ml | 0.2966±0.0093 * |
| 10 ng/ml | 0.2265±0.0054 |
| Control | 0.4830±0.0179 |

*: $P<0.05$ *vs* group control

## 3 讨论

近年来研究表明，TGF-β 体内成骨及促进骨愈合的作用非常明显；其体外成骨作用却很复杂，不同或相似的细胞模型结论是不同的，甚至是相互冲突和矛盾的，因此，研究 TGF-β 体外成骨作用首先应选择合适的体外细胞模型。以往研究 TGF-β 体外成骨作用的细胞模型主要有四类：①原代分离及传代培养的成骨样细胞群，包括有从正常胚胎及成熟鼠颅骨、小鼠尾椎骨消化分离的成骨样细胞群，以及从正常人肋骨、胎儿颅骨组织分离培养的成骨样细胞群；该类细胞由于刚离体，生物学特性稳定，与体内成骨具有相似性。②正常组织细胞克隆传代的成骨样细胞株，生物学性状均一，可重复性强，但部分生物学性状发生了改变，与体内成骨存在一定差异。③肿瘤组织细胞中克隆筛选建立的细胞株，该类细胞增殖速度特别快，具有致瘤性，其体外成骨作用与体内存在较大差异。④利用转基因技术建立的永生细胞株，它具有永生化特点，生物学性状均一稳定，为非二倍体细胞，体外成骨与体内成骨作用存在一定差异。因此，原代分离培养的成骨样细胞群是分析 TGF-β 体外成骨作用的较好模型。利用原代分离培养的成骨样细胞研究 TGF-β 的体外成骨作用已有众多报道，但实验结果大多数是不一致的，甚至是相互矛盾的。另外，用于 TGF-β 体外成骨作用研究的细胞来源仅限于小鼠、大鼠及人；与体内试验大多数使用兔作为研究对象不相匹配。因此，利用胎兔颅骨组织分离培养的成骨样细胞群作为对象来研究 TGF-β 的体外成骨作用意义重大。

ALP 是成骨细胞分化成熟状态的标志酶，它的活性大小一定程度上反映了成骨细胞分化程度和功能状态[9～11]。TGF-β 对胎兔颅骨成骨样细胞表现为明显的促进作用，在 0.01～1 ng/ml 范围内随着剂量增加，ALP 活性逐渐升高，到 10 ng/ml 时则不再升高；细胞培养的早期(3 d 和 5 d)，TGF-β 对 ALP 活性具有促进作用，并形成一定的时间相关关系，到 7 d 时这种促进作用则不明显。结果表明，TGF-β 对胎兔颅骨成骨样细胞群 ALP 活性具有促进作用，且表现为一定的时效和量效关系。出现上述结果，我们认为主要与培养的细胞来源及组成有关。早期胎兔颅骨成骨样细胞群含有幼稚的间充质细胞、成骨前体细胞和未分化成熟的成骨细胞，其 ALP 活性表达很低，随着培养时间的延长这些细胞在 TGF-β 作用下进一步分化成熟为成骨细胞，从而表现为 ALP 活性相应增高，到后期这些细胞继续分化的比例减少则对 ALP 活性的促进作用就不明显。另一方面，随着 TGF-β 剂量的增加，TGF-β 促进了更多的成骨前细胞分化成熟为成骨细胞导致 ALP 活性相应增高，当 TGF-β 的浓度增加到一定程度时，成骨细胞受体亲和力相对受限，TGF-β 对成骨细胞 ALP 活性的促进作用就不再明显[13]。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

骨结节的形成是成骨细胞体外成骨的重要标志之一[8~12]。TGF-β 在 0.01 ng/ml 浓度条件下有促细胞聚集样生长及钙结节形成作用; 在 0.1 ng/ml 浓度时, 与对照组相比无显著性差异; 随着浓度的增加, TGF-β 对成骨细胞聚集样生长和钙结节形成则表现为明显的抑制作用, 当浓度达到 10 ng/ml 时, TGF-β 几乎完全抑制了成骨细胞钙结节的形成; 结果表明, TGF-β 在早期(3~7 d)无论是高剂量还是低剂量均促进了 ALP 活性, 而在晚期(21 d)除了低剂量对其骨结节形成有轻微的促进作用, 大多表现为抑制作用; 这一结果与以前的研究具有一定差异。Harris[12] 研究发现, TGF-β 持续地刺激原代分离的胎鼠颅骨成骨细胞引起骨结节的数目、大小及总面积减少。在 0.1 ng/ml 时作用即明显, 在 2 ng/ml 时则完全抑制了骨结节的形成, 同时研究还发现, 在 TGF-β 抑制其骨结节形成的过程中伴有 I 型胶原、ALP、骨桥素、骨钙素和 BMP 的 mRNA 水平降低, 并认为这些因素可能是 TGF-β 抑制成骨细胞骨形成的直接原因。近来, Iba[10] 在分析 Harris 研究结果的基础之上, 运用人的转化成骨细胞永生细胞株(SV-HFO)研究发现, TGF-β 抑制其矿化作用仅发生在早期(即 0~10 d)分化阶段, 它是通过对 ALP 和 TET(tetranectin)的负向调节来实现的, 并不影响其他成骨细胞表型如骨桥素、骨钙素、骨连接素及胶原蛋白等的表达。这些矛盾的结果, 我们认为可能与细胞种属、来源、构成、培养条件、TGF-β 的剂量及加入的时间等有关。

近年来研究发现, TGF-β 和 BMP 是骨形成过程的关键性生长因子[1~4]。体内试验发现: BMP 是骨生长的启动因子, 能诱导间充质细胞分化为成骨细胞和骨细胞, 促进钙化作用, 产生钙化的骨质; 而 TGF-β 刺激间充质细胞增殖和分化, 形成成骨细胞和软骨细胞, 从而诱导新骨形成; 二者在影响新骨发生或新骨形成的不同时期互为补充。而体外实验如何呢? 实验发现, TGF-β 抑制了胎兔颅骨成骨样细胞 BMP 蛋白的表达, 在 0.01~10 ng/ml 浓度范围内呈一定的剂量依赖关系。这与以往的研究具有相似性, Harris 等[12] 在胎鼠颅骨成骨细胞的实验发现: 2 ng/ml TGF-$\beta_1$ 明显抑制了 BMP-2 mRNA 的表达; 在第 7 天时, TGF-$\beta_1$ 治疗组 BMP mRNA 的表达量不到第 1 天的 50%, 而对照组 BMP-2 mRNA 的表达量为第 1 天的 2.7 倍以上。从我们和 Harris 等的实验表明 TGF-β 对成骨细胞 BMP 的基因和蛋白均表现为抑制作用, 与体内的结果存在着很大差距, 这可能与体内有多因子网络协调作用有关。

实验表明, TGF-β 对胎兔颅骨成骨样细胞体外成骨作用及 BMP 蛋白表达的影响是复杂和多样的。TGF-β 对胎兔颅骨成骨样细胞 ALP 活性具有促进作用, 并呈一定的时效及量效关系; 对胎兔颅骨成骨细胞群晚期骨结节形成表现为双向作用, 即低剂量有轻微的促骨结节生成作用; 高剂量表现为强力的抑制作用; 对胎兔颅骨成骨细胞内 BMP 表达表现为明显的抑制作用, 且呈一定的量效关系, 其具体机制尚不清楚。

参考文献:


[1] Ripamonti U, Ramoshebi L N, Matsaba T, *et al*. Bone induction by BMPs/OPs and related family members in primates[J]. J Bone Joint Surg Am, 2001, 83—A Suppl 1(Pt 2): S116—127.

[2] Lind M. Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation[J]. Acta Orthop Scand Supple, 1998, 283: 2—37.

[3] 唐康来, 杨　柳, 吴梅英, 等. TGF-β 对胎兔颅骨成骨样细胞体外成骨作用[J]. 中国矫形外科杂志, 2000, 7(10): 986—988.

[4] Erebacher A, Filvaroff E H, Ye J Q, *et al*. Osteoblastic responses to TGF-beta during bone remodeling[J]. Mol Biol Cell, 1998, 9(7): 1 903—1 918.

[5] 唐康来, 杨　柳, 卢卫忠, 等. 人血小板中 TGF-β 的提取纯化及鉴定[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(11): 800—804.

[6] 唐康来, 吴梅英, 杨　柳, 等. 胎兔颅骨成骨细胞克隆筛选及鉴定[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(8): 567—570.

[7] Ber R, Kubota T, Sodek J, *et al*. Effects of transforming growth factor-beta on normal clone bone cell population[J]. Biochem Cell Biol, 1991, 69(2-3): 132—140.

[8] Gosain A K. Effects of transforming growth factor-beta and mechanical strain on osteoblast cell counts: an *in vitro* model for distraction osteogenesis[J]. Plast Reconstr Surg, 2000, 105(1): 130—136.

[9] Yamada T. Effects of transforming growth factor-beta 1 on the gene expression of decorin, biglycan, and alkaline phosphatase in osteoblast precursor cells and more differentiated osteoblast cells[J]. Histochem J, 1999, 31(10): 687—694.

[10] Iba K, Sawada N, Nuka S, *et al*. Phase-Dependent effects of transforming growth factor beta1 on osteoblastic markers of human osteoblastic cell line sV-HFO during mineralization[J]. Bone, 1996, 19(4): 363—369.

[11] Liu F, Malaval L, Aubin J. The mature osteoblast phenotype is characterized by extensive plasticity[J]. Exp Cell Res, 1997, 232(1): 97—105.

[12] Harris H E, Bonewald L F, Harris H A, *et al*. Effects of transforming growth factor beta on bone nodule formation and expression of bone morphogenetic protein 2, osteocalcin, osteopontin, alkaline phosphatase, and type I collagen mRNA[J]. J Bone Miner Res, 1994, 9(6): 855—863.


(编辑　王　红)

(上接 546 页)

为憩室的化脓性炎症, 随后表现为憩室穿孔及肠梗阻的表现。在疾病的初期一般难以诊断[2], 所以我们开始是以阑尾炎伴穿孔行剖腹探查, 术中才得以明确诊断。这是值得警惕的。因此, 外科医生在剖腹术中需仔细检查有否美克尔憩室炎, 以防漏诊。

关键词: 美克尔憩室炎; 异位胰腺; 剖腹术
中图法分类号: R574.06　　文献标识码: B

参考文献:


[1] 马　勇, 毕　迅, 马　达, 等. 小儿美克尔憩室及其合并症[J]. 湖南医科大学学报, 1998, 23(6): 561—562.

[2] 刘世涛. 美克尔憩室严重合并症的诊治体会[J]. 中国肛肠病杂志, 1998. 18: 24—25.


(编辑　薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net