DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.05.023


论著

文章编号:1000-5404(2002)05-0550-03

# 体外培养成骨细胞合成分泌 TGF-$\beta_1$ 的研究

卢卫忠[1],杨 柳[1],吴梅英[1],唐康来[1],贺小兵[2],许建中[1],李起鸿[1] ([1]第三军医大学附属西南医院骨科,重庆 400038;[2]重庆市涪陵中心医院骨科,重庆 408000)

提 要:目的 研究体外培养成骨细胞合成分泌 TGF-$\beta_1$ 的功能。方法 利用胎兔颅骨成骨样细胞体外培养模型,应用免疫组化和酶联免疫吸附试验检测成骨细胞分泌 TGF-$\beta_1$ 的情况。结果 体外培养的成骨细胞能够分泌 TGF-$\beta_1$,随传代培养次数增加和培养时间延长,TGF-$\beta_1$ 浓度增加,在第3代和第7天时增加明显,以后逐渐下降。结论 体外培养的成骨细胞具有分泌 TGF-$\beta_1$ 的功能,呈一定的时效关系,并和传代次数有关。

关键词:转化生长因子$\beta_1$;成骨细胞;分泌;体外模型
中图法分类号:R329.24;R392.11 文献标识码:A

## Synthesis and secretion of TGF-$\beta_1$ by *in vitro* cultured osteoblasts

LU Wei-Zhong, YANG Liu, Wu Mei-ying, TANG Kang-Lai, HE Xiao-Bing, XU Jian-zhong, Li Qi-hong (Department of Orthopedics, Chongqing Southwest Hospital, Chongqing 400038, China)

**Abstract**: Objective To investigate the synthesis and secretion of transforming growth factor-beta1(TGF-$\beta_1$) by *in vitro* cultured osteoblasts. Methods Osteoblast-like cells were isolated from fetal rabbit calvarium and the model of *in vitro* culture was established. The synthesis and secretion of TGF-$\beta_1$ was examined in terms of immunohistochemical method and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Results Cultured osteoblast-like cells had the ability to secrete TGF-$\beta_1$. With increase of the passage times and prolongation of the cultured time, the obtained TGF-$\beta_1$ was increased in concentration. The most significant increase of TGF-$\beta_1$ concentration took place in the 3rd passage and on the 7th day, afterwards, the concentration was gradually decreased. Conclusion *In vitro* cultured osteoblast-like cells are able to synthesize and secrete TGF-$\beta_1$ in a time-dependent manner and in relation with the passage times.

**Key words**: transforming growth factor$\beta_1$; osteoblasts; synthesis; *in vitro* model

骨组织是一个庞大的生长因子库,是转化生长因子β(Transforming growth factor-beta, TGF-β)最丰富的组织来源和储存库。体内研究表明,骨组织中的 TGF-β 主要由成骨细胞产生,成骨细胞通过合成分泌 TGF-β,调节其自身增殖分化和代谢,从而调节骨代谢[1]。TGF-β 与成骨细胞相互作用的机制目前尚不清楚,而且,关于体外成骨细胞合成分泌 TGF-β 的研究较少。本研究利用胎兔颅骨成骨样细胞体外培养体系,应用免疫组化和酶联免疫吸附试验检测体外成骨细胞合成分泌 TGF-β 的情况,为进一步探讨 TGF-β 与成骨细胞的相互作用和组织工程中合理利用生长因子与成骨细胞复合提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

28 d 龄胎兔,3%戊巴比妥钠麻醉下从日本大耳母白兔剖腹所得。

### 1.2 主要试剂

0.25%胰蛋白酶(Gibco 公司);TGF-$\beta_1$ 单克隆抗体(1∶120)人 TGF-$\beta_1$ ELISA 试剂盒(美国 Genzyme 公司)。

### 1.3 胎兔颅骨成骨样细胞的分离培养及鉴定

原代培养参照我们以往的方法[2],妊娠 28 d 纯种日本大耳白兔,3%戊巴比妥钠麻醉下剖腹,无菌取出其 10 只胚胎颅盖骨,置入含有 Hanks 液的培养皿中,去净组织,搔刮骨面至粗糙,并轻轻漂洗 3 次。将洗净后的颅盖骨剪成 1 mm×1 mm×1 mm 大小的骨粒,再用 Hanks 液反复清洗直至肉眼见不到红色为止。在洗净后的骨粒中加入少许 0.25%胰蛋白酶,37 ℃消化 20 min,用 Hanks 液清洗 3 次,洗去消化的细胞和残留的消化液。加入少许 RPMI1640 培养液使骨粒湿润。用弯吸管吸取骨粒,均匀接种于培养瓶中,翻转培养瓶,置 37 ℃、4%$CO_2$ 及饱和湿度条件的孵箱中培养 2 h,转正培养瓶,并加入足量的内含 15%胎牛血清、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 μg/ml 的 RPMI1640 培养液,继续培养。3~5 d 进行换液,待瓶底长满细胞后,用 0.25%胰酶消化细胞进行传代培养。各代细胞培养到一定数量后,参照我们以往的方法[2]对成骨细胞进行鉴定,然后每代冻存一定数量的细胞备用。

### 1.4 TGF-$\beta_1$ 免疫组化染色

1.4.1 取第 1~6 代成骨细胞,用 0.25%胰蛋白酶消化,制成 $10^9$ 个细胞/孔的细胞悬液,按 200 μl/孔的密度接种于加有盖玻片的 24 孔培养板,加入等量培养液,培养 7 d,收集上清液分装,保存于-70 ℃低温冰箱备用。取出盖玻片,磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline, PBS)冲洗,95%乙醇固定 15 min,采用 ABC 法进行 TGF-$\beta_1$ 免疫组织化学染色,用 PBS 代替 TGF-$\beta_1$ 抗

基金项目:重庆市科委应用基础研究项目(2000177)和太极医学科技基金资助项目(2001-01)
作者简介:卢卫忠(1967-),男,重庆市垫江县人,副主任医师,主要从事生长因子对骨愈合作用方面的研究,发表论文 8 篇。现在重庆市涪陵中心医院骨科,电话:(023)72230714
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

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

体作为阴性对照, TGF-$\beta_1$ 抗体使用效价为: 1∶120。

1.4.2　取生长活跃的第 3 代成骨细胞, 制成 $10^9$ 个细胞/孔的细胞悬液, 按 200 μl/孔的密度接种在加有盖玻片的 24 孔培养板, 加入等量培养液继续培养, 分别于第 3、5、7、9、12、15 天收集上清液, 分装、保存于－70 ℃低温冰箱备用。取出盖玻片, 同 1.4.1 方法进行 TGF-$\beta_1$ 免疫组织化学染色。

### 1.5　TGF-$\beta_1$ 定量分析

取 1.4.1 和 1.4.2 各代次及各时相点收集的上清液, 在测定当天解冻标本, 立即进行测定。采用双抗体夹心 ELISA 法, 按试剂盒说明书步骤操作, 在 450 nm 处的酶标仪下, 测定各标本中 TGF-$\beta_1$ 的浓度(其方法是在 450 nm 处测 $A$ 值, TGF-$\beta_1$ 浓度与 $A_{450}$ 值之间呈正比, 通过绘制标准曲线求出标本中 TGF-$\beta_1$ 的浓度)。

### 1.6　图像分析

选择染色效果良好的盖玻片, 用 Mias-200 图像分析扫描仪对各组 TGF-$\beta_1$ 表达量进行分析。检测方法: 将 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, 所有玻片在同一光强度下测定, 每组随机抽取一张, 每张随机选择 20 个视野, 计算出其 $A$ 值, 并求出其平均光密度值进行两两比较。

### 1.7　统计学处理

计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 双侧 $t$ 检验分析。

## 2　结果

### 2.1　TGF-$\beta_1$ 免疫组织化学染色分析结果

TGF-$\beta_1$ 免疫组化染色显示, 胎兔颅骨中成骨样细胞呈阳性表达, 阳性细胞胞浆内分布着棕黄色颗粒, 见图 1。阳性细胞见于鳞片形、多角形、星形细胞、梭形及小圆形细胞。随着传代数增加, 其染色强度增加, 以第 3 代最多, 以后随代数增加而减少。在第 3 代, 随培养时间延长其染色强度也增加, 第 7 天时达高峰, 以后随时间延长而降低。见表 1 和表 2。

表 1　各代成骨细胞(7 d)TGF-$\beta_1$ 表达的定量分析($n$=20, $\bar{x}\pm s$)

**Tab 1　Quantitative analysis of TGF-$\beta_1$ in osteoblasts at varied passage cultured for 7 d($n$=20, $\bar{x}\pm s$)**

| Generation | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $A$ | 0.3917±0.0085 | 0.4529±0.0073 | 0.5876±0.0112 | 0.4831±0.0133 | 0.4219±0.0125 | 0.3175±0.0106 |
| $t$ | 59.186 | 45.058 | — | 26.878 | 44.152 | 78.331 |
| $P$ | $P$<0.01 | $P$<0.01 | — | $P$<0.01 | $P$<0.01 | $P$<0.01 |

In comparison with the 3rd generation

表 2　第 3 代成骨细胞 TGF-$\beta_1$ 表达的定量分析($n$=20, $\bar{x}\pm s$)

**Tab 2　Quantitative analysis of TGF-$\beta_1$ in the 3rd passage osteoblasts cultured for different time($n$=20, $\bar{x}\pm s$)**

| Time(d) | 3 | 5 | 7 | 9 | 12 | 15 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $A$ | 0.3518±0.0108 | 0.4775±0.0097 | 0.5826±0.0112 | 0.4113±0.0083 | 0.3715±0.0117 | 0.2943±0.0124 |
| $t$ | 66.339 | 31.542 | — | 54.954 | 58.288 | 77.162 |
| $P$ | $P$<0.01 | $P$<0.01 | — | $P$<0.01 | $P$<0.01 | $P$<0.01 |

In comparison with the 7th day

### 2.2　TGF-$\beta_1$ ELISA 测定结果

TGF-$\beta_1$ ELISA 测定表明, 培养细胞具有合成分泌 TGF-$\beta_1$ 的能力, 同样, 随着传代数增加及培养时间延长, 上清液中 TGF-$\beta_1$ 浓度逐渐增高, 以第 3 代和第 7 天时最高, 以后随传代数增加和时间延长反而降低。详见表 3 和表 4。

表 3　各代成骨细胞(7d)分泌 TGF-$\beta_1$ 浓度($n$=24, pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

**Tab 3　Concentrations of TGF-$\beta_1$ secreted by osteoblasts at varied passage cultured for 7 d($n$=24, pg/ml, $\bar{x}\pm s$)**

| Generation | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| TGF-$\beta_1$ Concentration | 170±22 | 404±38 | 516±46 | 396±41 | 306±28 | 274±23 |
| $t$ | 33.243 | 9.196 | — | 9.540 | 19.104 | 23.052 |
| $P$ | $P$<0.01 | $P$<0.01 | — | $P$<0.01 | $P$<0.01 | $P$<0.01 |

In comparison with the 3rd generation

表 4　第 3 代成骨细胞各时相点分泌的 TGF-$\beta_1$ 浓度($n$=24 pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

**Tab 4　Concentrations of TGF-$\beta_1$ secreted by the 3rd passage osteoblasts cultured for different time($n$=24, pg/ml, $\bar{x}\pm s$)**

| Time (d) | 3 | 5 | 7 | 9 | 12 | 15 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| TGF-$\beta_1$ Concentration | 230±16 | 362±35 | 518±43 | 384±39 | 267±29 | 235±21 |
| $t$ | 30.752 | 13.784 | — | 11.308 | 23.708 | 28.972 |
| $P$ | $P$<0.01 | $P$<0.01 | — | $P$<0.01 | $P$<0.01 | $P$<0.01 |

In comparison with the 7th day

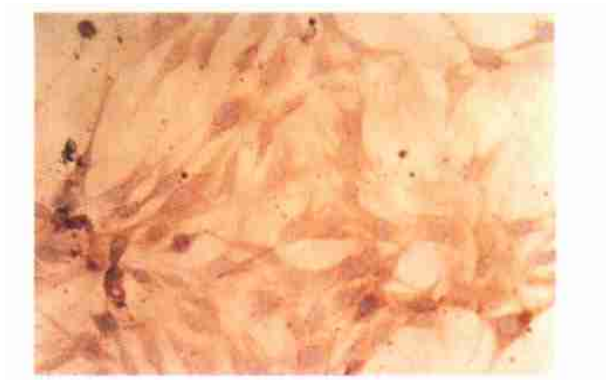


图 1　第 3 代成骨细胞中 TGF-$\beta_1$ 阳性表达　(ABC×200)

**Fig 1　Positive expression of TGF-$\beta_1$ in the 3rd passage osteoblasts　(ABC×200)**

## 3　讨论

生理状态下, 骨代谢包括吸收及形成两个过程, 两者互相协调, 维持机体骨代谢的平衡, 这种平衡受骨局部微环境内自分泌和(或)旁分泌的多种相关因子调节。许多研究表明[1-3], 大多数影响骨吸收的因子由成骨细胞产生, 并用于成骨细胞, 使之分泌破骨细胞刺激因子和抑制因子, 调节破骨细胞的活动从而调节骨吸收。体内研究表明[4], 成骨细胞本身可合成分泌 TGF-$\beta_1$, 并调节其活性; 另一方面, 在成骨细胞的细胞膜上有 TGF-$\beta_1$ 的特异性受体, TGF-$\beta_1$ 可作用于成骨细胞, 调节其增殖和分化, 它们之间相互作用, 从而调节骨形成。骨是体内 TGF-β 最丰富的来源[3], 骨组织中大约 75%的 TGF-β 是 TGF-$\beta_1$, 余下的 25%主要是 TGF-$\beta_2$。体内免疫组织化学和原位杂交研究表明[4,5], 成骨细胞主要合成分泌 TGF-$\beta_1$ 和少量的 TGF-$\beta_2$, 而 TGF-$\beta_2$ 主要由破骨细胞和软骨细胞合成。体内研究表明, 成骨细胞是骨组织中合成分泌 TGF-$\beta_1$ 的主要细胞。而体外试验如何呢? 本实验通过 TGF-$\beta_1$ 免疫组化染色和 ELISA 测定表明, 体外培养的胎兔颅骨成骨样细胞具有合成分泌 TGF-$\beta_1$ 的能力。TGF-$\beta_1$ 表达的阳性细胞

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

见于鳞片形、多角形、星形细胞、梭形及小圆形细胞。这些形态多样的细胞可能与体外培养成骨细胞的多种构成有关，前 3 种形态的细胞多为较成熟的成骨细胞，后 2 种形态的细胞多为较幼稚的成骨细胞和成骨前体细胞。本实验采用组织块移行生长和酶消化相结合的方法分离培养胎兔颅骨成骨样细胞，所分离的细胞受损伤程度轻且较纯，减少了其他细胞如破骨细胞、成纤维细胞的污染[2]，使成骨细胞增多，表达 TGF-$\beta_1$ 明显，因为成纤维细胞可分泌 TGF-$\beta_2$，破骨细胞也主要合成 TGF-$\beta_2$[6]。

随着传代数增加，成骨细胞表达 TGF-$\beta_1$ 的强度和分泌 TGF-$\beta_1$ 的量增加，以第 3 代最明显和最高，以后随传代数增加而减少。这可能是在早期几代的成骨样细胞群内仍含有一定数量的成骨前体细胞，合成分泌 TGF-$\beta_1$ 能力弱；随传代数增加，成熟的成骨细胞增多，合成分泌 TGF-$\beta_1$ 的能力增强，因而 TGF-$\beta_1$ 的总量增多；传代到一定代数后，成骨样细胞逐渐退化，细胞本身的代谢功能也下降，且细胞代谢产物使 TGF-$\beta_1$ 的合成分泌受到抑制，因而导致 TGF-$\beta_1$ 量下降。

随着培养时间的延长，成骨细胞表达 TGF-$\beta_1$ 的强度和分泌 TGF-$\beta_1$ 的量增加，以第 7 天最明显和达高峰；以后随培养时间延长反而下降。其原因可能是：早期，刚接种的细胞有一个从潜伏期到指数增生期的过程，细胞密度较低，增殖速度慢；随培养时间延长，细胞进入指数增生期，成骨细胞增多，功能活跃，分泌 TGF-$\beta_1$ 前体（无活性 TGF-$\beta_1$）量增加，被大量的成熟成骨细胞激活，另一方面，活化的 TGF-$\beta_1$ 本身也可调节 TGF-$\beta_1$ 前体的活性，使活化的 TGF-$\beta_1$ 量增多，活化后的 TGF-$\beta_1$ 反过来刺激成骨细胞的成熟、增殖和分化[1]，如此，相互作用，形成良性循环。达到一定极限后，随培养时间延长，细胞数达到饱和密度，停止增殖，成骨细胞随新陈代谢而衰老凋亡，因而合分泌 TGF-$\beta_1$ 的量下降。

结果表明，体外培养的成骨细胞具有分泌 TGF-$\beta_1$ 的功能，呈一定的时效关系，并和细胞传代数有关。因而，组织工程的种子细胞应尽量选择第 3 代前后的成骨细胞。

参考文献：

[1] 卢卫忠，唐康来，杨 柳，等. TGF-β 对成骨细胞的作用[J]. 第三军医大学学报，2000，22(1)：99－102.
[2] 卢卫忠，唐康来，贺小兵，等. 胎兔颅骨成骨样细胞体外培养模型的建立[J]. 中国矫形外科杂志，2001，7(9)：881－884.
[3] Linkhart T A, Mohan S, Baylink D J. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP[J]. Bone, 1996, 19(Suppl 1): S1－S12.
[4] Gao J, Gynons A L, Bartold P M. Expression of TGF-$\beta_1$ in the developing periodontium of rat[J]. J Dent Res, 1998, 77(9): 1 708－1 716.
[5] Andraw J G, Hoyland J, Andraw S M, *et al*. Demonstration of TGF-$\beta_1$ mRNA by situ hybridization in normal fracture healing [J]. Calcif Tissue Int, 1993, 52: 74－78.
[6] Oursler M J. Osteoclast synthesis and secretion and activation of latent transforming growth factor beta[J]. J Bone Miner Res, 1994, 9(4): 443－452.

（编辑 王 红）

# 个案与短篇

文章编号：1000-5404(2002)05-0552-01

## 晚期胃癌腹腔静脉双路化疗近期疗效观察

## Observation on short-term efficacy advanced gastric cancer with intraperitoneal and intravenounal chemotherapy

王红梅[1]，胡义德[2]，廖国清[1]，李虎城[1]，刘鹏辉[1]，解国清[1]，杨海丽[1]，戴海峰[1]（[1]解放军第 309 医院肿瘤科，北京 100091；[2]第三军医大学附属新桥医院全军肿瘤中心，重庆 400037）

我科对 56 例出现腹膜种植转移和腹腔淋巴结转移的晚期胃癌患者使用腹腔、静脉双路化疗，取得一定疗效，现报告如下。

### 1 资料与方法

临床资料：本组 56 例，男 34 例，女 22 例，平均年龄 54 岁，全部经胃镜活检或手术病理证实。所有患者均经 B 超或 CT 检查提示有腹腔转移。

作者简介：王红梅(1965－)，女，河北省玉田县人，主治医师，主要从事晚期消化道肿瘤综合治疗方面的研究，发表论文 8 篇。电话：(010) 62884286

收稿日期：2001-09-12；修回日期：2001-12-14

方法：患者平卧，取右下腹麦氏点或左下腹反麦氏点为穿刺点，常规消毒铺单，用 2% 普鲁卡因 2～4 ml 局部麻醉，将普通 7 号注射针穿入腹腔，连接输液器，先滴入生理盐水约 100 ml，如滴入通畅，局部无隆起，患者无明显不适，提示穿刺针在腹腔内，将化疗药物滴入腹腔，滴完后拔出腹穿针，消毒穿刺点，覆以无菌纱布。嘱患者反复改变体位，以使药物与腹腔各部位接触。

选择药物：采用 FAP 方案：第 1 天顺铂(DDP) 60 mg/m$^2$ 加入 1 000 ml 生理盐水中滴入腹腔，随后地塞米松 10 mg 滴入腹腔；第 2～5 天 5-氟脲嘧啶(5-Fu) 500 mg/m$^2$ 静脉滴注；第 2 天表阿霉素(EPI) 50 mg/m$^2$ 静脉注射。使用 DDP 后，静脉补液以水化并利尿，化疗过程中给予蒽丹西酮等止吐药物。用药后每周复查血象，肝肾功能

（下转 555 页）

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