

阿仑膦酸钠对破骨细胞分化中 c-fos 基因表达的影响

王 立 戚孟春 刘彩霞 董 伟

摘 要 **目的** 探讨阿仑膦酸钠对破骨细胞分化中 c-fos 基因的作用机制。**方法** 将不同浓度的阿仑膦酸钠作用于小鼠破骨细胞,采用 Western blot 检测小鼠破骨细胞分化中 c-fos 基因的表达情况。**结果** 阿仑膦酸钠组 TRAP 阳性破骨细胞数目和 c-fos 基因的表达显著低于空白对照组;且加入 10^{-4} mol/L、 10^{-6} mol/L、 10^{-8} mol/L 浓度阿仑膦酸钠后,c-fos 表达受抑制程度依次增强;而在 10^{-8} mol/L、 10^{-10} mol/L、 10^{-12} mol/L 浓度中,c-fos 表达受抑制程度依次减弱。**结论** 阿仑膦酸钠可使破骨细胞分化中的 c-fos 基因受到抑制,其抑制程度与阿仑膦酸钠的浓度有关, 10^{-8} mol/L 浓度时抑制作用最强。

关键词 阿仑膦酸钠 c-fos 破骨细胞 Western blot

Effect of Alendronate Sodium on c-fos Gene in Osteoclast Differentiation. Wang Li, Qi Mengchun, Liu Caixia, Dong Wei. School of Stomatology Hebei United University, Hebei 063000, China

Abstract Objective To study the probably mechanism of alendronate sodium to c-fos gene in osteoclast differentiation. **Methods** Different concentrations of alendronate sodium had effect on mice osteoclast. c-fos expression in mouse osteoclast differentiation was detected using Western blot. **Results** The number of TRAP⁺ osteoclasts and the expression of c-fos gene from alendronate group were significantly lower than those in control group ($P < 0.05$), and the expression of c-fos was enhanced with the concentration increase of alendronate in 10^{-4} mol/L, 10^{-6} mol/L, 10^{-8} mol/L, but the expression of c-fos was decreased with the concentration increase of alendronate in 10^{-8} mol/L, 10^{-10} mol/L, 10^{-12} mol/L. **Conclusion** Alendronate sodium can make osteoclast differentiation of c-fos gene to be restrained. Its inhibition degree was associated with alendronate sodium concentration. The strongest inhibition effect on c-fos expression was at concentration of 10^{-8} mol/L.

Key words Alendronate sodium; c-fos; Osteoclast; Western blot

破骨细胞是体内高度特异性的唯一具有骨质吸收功能的多核巨细胞,它主要受骨髓基质细胞或成骨细胞分泌的破骨细胞分化因子(RANKL)和巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)两种分子的调控。c-fos 基因是破骨细胞分化过程中的关键调节因子,其表达于巨噬细胞、破骨细胞、神经细胞、成牙本质细胞系等的细胞核^[1,2]。二磷酸盐作为一类重要的抗骨吸收药物,主要的作用机制是作用于破骨细胞,抑制骨吸收,降低骨转换率。本实验通过 Western blot 法检测破骨细胞分化过程中 c-fos 在阿仑膦酸钠作用下的表达情况,进一步研究不同浓度二磷酸盐对 c-fos 表达的影响情况,探讨应用二磷酸盐最佳浓度,为临床应用提供理论和实验依据。

材料与方法

1. 材料:(1)主要材料:出生 24h 内的新生 SPF 级 c57 小鼠(北京阜康生物)。(2)试剂及仪器: α -MEM 培养液(Sigma 公

司),阿仑膦酸钠(默沙东公司,批号:09221),胎牛血清(中国科学院血研所),抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase,TRAP),染色试剂盒(Sigma 公司),western Blotting Luminol Reagent(美国 Santa Cruz 公司),抗鼠 c-fos 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),生物安全柜(海尔),高速离心机(Sigma 公司),倒置相差显微镜(NIKON 公司),辣根过氧化物酶 HRP 标记的羊抗兔 IgG(北京中杉),化学发光试剂盒(北京中杉)。

2. 实验方法:(1)破骨细胞的分离培养:脱颈处死出生 24h 内的新生 c57 小鼠,无菌条件下取出并分离双侧股骨及胫骨,抽取 α -MEM 培养液,反复冲洗骨髓腔至其内面发白,吹打冲洗液制备细胞悬液,吸取悬液置离心管内,4℃ 1000r/min 离心 10min 弃上清,加适量 α -MEM 培养液吹打均匀,吸入放置预置牙本质片及盖玻片的 24 孔(含有 α -MEM 培养液,10% 胎牛血清,100 μ g/ml 青霉素,100 μ g/ml 链霉素和 10ng/ml M-CSF)的培养板中孵育 1 天,取未贴壁细胞即破骨细胞前体即破骨样细胞(Osteoclast-like cells,OLC)调整数目为 5×10^6 /ml 后使用,每 3 天半量换液,倒置相差显微镜下观察 OLC 分化及形态,并分别做 TRAP 染色及扫描电镜(SEM)观察。在诱导培养的第 5 天将实验组加入含有不同浓度的阿仑膦酸钠中继续培养 24h,于第 6 天收获各组细胞。(2)实验分组:本部分实验分为两组,即空白对照组和阿仑膦酸钠组,阿仑膦

基金项目:河北省科学技术研究与发展计划项目(08276101D-73)

作者单位:063000 唐山,河北联合大学口腔医学院(王立、戚孟春、董伟);河北省唐山市口腔医院(刘彩霞)

酸钠组再根据剂量不同分为 5 个亚组,即 10^{-4} mol/L, 10^{-6} mol/L, 10^{-8} mol/L, 10^{-10} mol/L, 10^{-12} mol/L 组,收获各组细胞前用 0.25% 胰蛋白酶,0.02% EDTA 进行消化,去除基质细胞,纯化破骨细胞。(3) Western blot 检测:在冰浴中以 RIPA 蛋白裂解液提取诱导培养 6 天破骨细胞总蛋白,采用微孔板法进行微量蛋白定量测定(Bradford 法)将所有蛋白含量调整为相同浓度。取 50 μ g 蛋白进行 10% 的 SDS-PAGE 电泳,电泳完毕后,电转移法将蛋白转移至经甲醛处理过的 PVDF 膜。5% 的脱脂奶粉封闭 2h,加入兔抗鼠 c-fos 多克隆抗体(1:500)4℃ 过夜,TBST 漂洗 45min,HRP 标记的二抗(稀释度 1:1500)室温孵育 1h,TBST 漂洗 45min。暗室中按照化学发光试剂盒进行化学发光显影、扫描图像,用图像分析仪对显影带进行分析处理。用 β -actin 作为内参。

3. 统计学分析:采用 SPSS 13.0 统计分析软件对数据进行单一因素方差分析,各组间用 SNK 法比较。

结 果

1. 破骨细胞的诱导及鉴定:倒置相差显微镜下观察采用 RANKL 和 M-CSF 诱导小鼠骨髓单核细胞,诱导 4 天后开始出现多核细胞细胞边缘不规则,有突起和伪足,细胞内有数个或数十个细胞核。细胞核大小数目不一,圆形或椭圆形,有的积聚在细胞中央,有的排列在细胞周边(图 1)。TRAP 染色结果显示,诱导培养 6 天后可见 TRAP(+)多核细胞形成(图 2),随着培养时间的延长,TRAP(+)多核细胞数量呈增

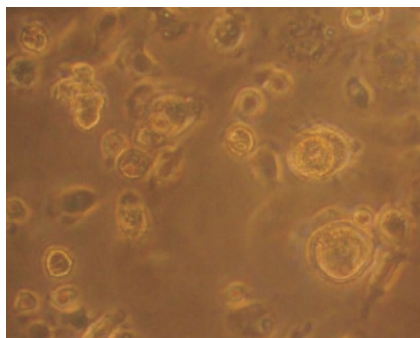


图 1 细胞培养 6 天,可见有多核细胞($\times 400$)

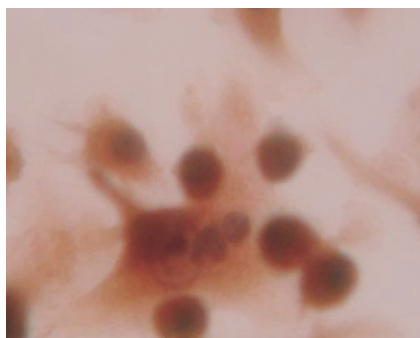


图 2 TRAP 染色 6 天,可见多核细胞有明确的伪足伸出($\times 1000$)

加趋势,培养 12 天时,TRAP(+)多核细胞数量开始减少。扫描电镜观察:未经培养破骨细胞的牙本质片未能产生牙本质吸收陷窝(图 3),而培养破骨细胞后可见牙本质吸收陷窝,其边界清晰,底面粗糙,基底纤维纹理清晰(图 4)。

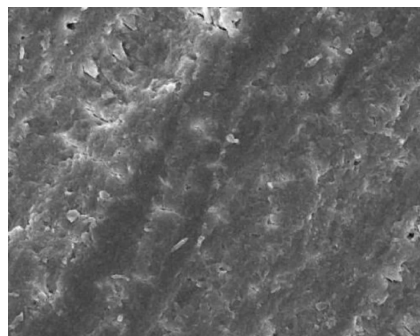


图 3 空白牙本质切片扫描电镜($\times 1000$)

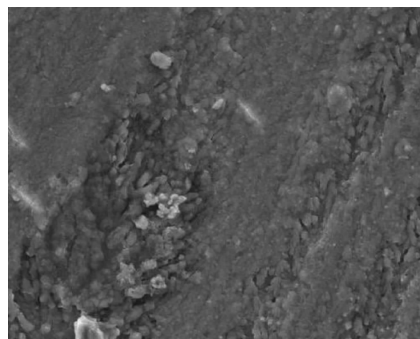


图 4 破骨细胞培养后,可见有牙本质吸收陷窝($\times 1000$)

2. 蛋白水平表达检测:提取经诱导 6 天的破骨细胞总蛋白进行 Western blot 检测(图 5),采用扫描图像分析系统测定各条带灰度值,将各样本 c-fos 的灰度值除以其对照组 β -actin 的灰度值得出相对灰度值并进行统计学分析。结果表明在不同浓度的阿仑膦酸钠的作用下,破骨细胞中 c-fos 蛋白的相对灰度值不同,添加不同浓度的阿仑膦酸钠后 c-fos 的相对灰度值发生变化,c-fos 的抑制作用由强到弱的排序为: 10^{-8} mol/L 组 $> 10^{-6}$ mol/L 组 $> 10^{-10}$ mol/L 组 $> 10^{-4}$ mol/L 组 $> 10^{-12}$ mol/L 组 $>$ 对照组。实验组的抑制作用均高于对照组($P < 0.05$)。各组间 c-fos 表达均有显著性差异。

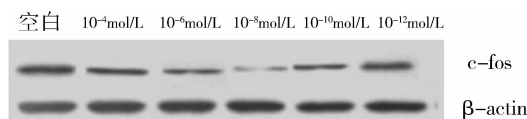


图 5 Western blot 检测不同浓度阿仑膦酸钠作用下 c-fos 在破骨细胞中表达

在对照组 10^{-4} mol/L、 10^{-6} mol/L、 10^{-8} mol/L、 10^{-10} mol/L、 10^{-12} mol/L 浓度阿仑膦酸钠作用下 c - fos 的相对灰度值为 0.613 ± 0.022 、 0.270 ± 0.003 、 0.071 ± 0.002 、 0.051 ± 0.002 、 0.202 ± 0.005 、 0.380 ± 0.006 。

讨 论

破骨细胞是骨重建过程中参与骨吸收的主要功能细胞,其分化和活性受多种激素和细胞因子的调节,其中巨噬细胞集落刺激因子(M - CSF)和核转录因子 NF - κ B 受体激动剂配体(RANKL)是对体外破骨样细胞分化起关键调控的两种细胞因子^[3]。c - fos 基因是即刻早期基因(IEGs)家族中的一个重要成员,该类基因能对激素、神经递质、外力等外界刺激引起的传入信息在数分钟内作出反应,进行表达^[4]。在破骨细胞分化过程中 c - fos 是一种不可缺少的 RANKL 的下游调控因子,通过启动下游因子 Frl1、NFATc1 促进破骨细胞分化成熟^[5]。

二膦酸盐是目前治疗骨质疏松的一线药物,具有较强的抑制 OC 骨吸收、降低骨转换率、增强骨强度的作用。它能特异性地与骨质中的羟磷灰石结合,对骨质有很强的亲和力,而对其他组织没有亲和力,因而使其成为骨质吸收的强力抑制剂,而对其他组织不良反应极小^[6]。Srisubut 等^[7]在人下颌骨缺损处种植事先浸泡过阿仑膦酸钠的生物溶性玻璃,与对照组相比,实验组骨形成明显好于对照组。Jensen 等^[8]发现给予种植假体的犬口服阿仑膦酸钠能促进固定良好假体周围的骨形成,说明阿仑膦酸钠具有促进局部骨形成的作用。

此外,添加不同浓度的阿仑膦酸钠后 c - fos 的相对表达量发生变化。严鹏霄等^[9]实验研究表明,在 10^{-6} mol/L、 10^{-7} mol/L、 10^{-8} mol/L、 10^{-9} mol/L 4 种浓度的阿仑膦酸钠中, 10^{-6} mol/L - 10^{-8} mol/L 浓度明显减少破骨细胞数目,而 10^{-9} mol/L 浓度对破骨细胞的数目无明显影响。这与本实验中加入 10^{-4} mol/L、 10^{-6} mol/L、 10^{-8} mol/L 浓度阿仑膦酸钠后,破骨细胞分化中 c - fos 表达受抑制程度依次增强;而在 10^{-8} mol/L、 10^{-10} mol/L、 10^{-12} mol/L 浓度中,c - fos 表达受抑制程度依次减弱相一致。Romenello 等^[10]也发现,二膦酸盐的刺激作用和浓度不成正比,当增高到一定浓度时,细胞分泌碱性磷酸酶的能力反而降低,这可能与高浓度药物的细胞毒性有关。但也有研究表明^[11],随着阿仑膦酸钠浓度增高,破骨细胞数目和 TRAP 的表达呈递减趋势,高浓度的阿仑膦酸钠可以

完全抑制由聚乙烯磨损微粒刺激的破骨细胞形成。

二膦酸盐作为一种有效的骨质吸收抑制剂,主要作用于破骨细胞,通过影响破骨细胞内某些酶或信号转导来发挥抗骨吸收作用。Roger^[12]实验证明,二膦酸盐能吸附于矿化物质的生理作用结合位点上,进而影响破骨细胞的吸附,导致破骨细胞内部超微结构发生改变。其机制可能是二膦酸盐在骨代谢活跃区域与羟磷灰石特异性结合,局部逐渐浓聚到一定水平,在一定的酸性条件下从骨质中释出,通过胞饮或钙络合作用进入破骨细胞,影响破骨细胞蛋白合成,抑制其细胞形成分化,改变细胞形态结构,降低细胞活性,并通过影响破骨细胞信号转导诱导细胞凋亡^[13]。近期研究表明,利赛膦酸钠抑制破骨细胞骨吸收是通过抑制 RANKL 途径中 c - fos 表达实现的^[14]。Nagae 等^[15]研究唑来膦酸对骨炎引起痛觉实验中发现,唑来膦酸降低 ASIC1a 和 c - fos 的表达。但 Grier 实验结果显示帕米膦酸盐对牙萌出时的 M - CSF 和 c - fos 基因表达未见阻碍作用,与上述报道不同^[16]。出现这些差异的具体原因尚不清楚,但可能与所用的细胞类型,药物种类,药物浓度及作用时间等因素有关。

本实验中,将不同浓度的阿仑膦酸钠作用于小鼠破骨细胞,采用 Western blot 检测小鼠破骨细胞分化中 c - fos 基因表达情况,发现 c - fos 基因不同程度的受到了阿仑膦酸钠的抑制,且阿仑膦酸钠在 10^{-8} mol/L 浓度时,对 c - fos 表达的抑制程度最强。揭示阿仑膦酸钠通过抑制破骨细胞分化中 c - fos 基因表达来抑制破骨细胞骨吸收作用,为临床应用提供了一定的理论依据。但由于本实验研究的局限性,没有对破骨细胞分化中其他相关因子进行检测,目前尚不能确定 c - fos 和其他因子的相互关系以及有否协同作用,相关机制仍有待进一步研究。

参考文献

- 1 Matsuo K, Ray N. Osteoclasts, mononuclear phagocytes, and c - Fos: new insight into osteoimmunology. *Keio J Med*, 2004, 53 (2): 78 - 84
- 2 Tulchinsky E. Fos family members: regulation, structure and role in oncogenic transformation. *Histol Histopathol*, 2000, 15 (3): 921 - 928
- 3 Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, *et al.* The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2004, 15 (6): 457 - 475
- 4 Macara IG. Oncogenes and cellular signal transduction. *Physiol Rev*, 1989, 69 (3): 797
- 5 Takayanaqi H, Kim S, Koqa T, *et al.* Induction and activation of the

- transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclast. *Dev Cell*, 2002, 3(6): 889-901
- 6 Kimmel DB. Mechanism of action, pharmacokinetic and pharmacodynamic profile, and clinical applications of nitrogen-containing bisphosphonates. *J Dent Res*, 2007, 86(11): 1022-1033
 - 7 Srisubut S, Teerakapong A, Vatrachod T, *et al.* Effect of local delivery of a lenidronate on bone formation in bioactive glass grafting in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2007, 104(4): e11-e16
 - 8 Jensen TB, Bechtold JE, Chen X, *et al.* Systemic alendronate treatment in proves fixation of press-fit implants: a canine study using nonloaded implants. *J Orthop Res*, 2007, 25(6): 772-778
 - 9 严鹏霄, 崔维顶, 胡继坤. 阿仑膦酸钠、辛伐他汀对体外成骨细胞和破骨细胞的作用. *南京医科大学学报(自然版)*, 2009, 29(12): 1690-1693
 - 10 Romanello M, Bivi N, Pines A, *et al.* Bisphosphonates activate nucleotide receptors signaling and induce the expression of Hsp90 in osteoblast-like cell lines. *Bone*, 2006, 39(4): 739-753
 - 11 吴瑞, 王青, 范卫民, 等. 阿仑膦酸钠对人工关节磨损微粒刺激的破骨细胞分化形成的影响. *南京医科大学学报(自然版)*, 2009, 29(5): 686-690
 - 12 Rogers M J, Gordon S, Benford H L, *et al.* Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates[J]. *Cancer*, 2000, 88(12 suppl): 2961-2978
 - 13 Frith J C, Monkkonen J, Auriola S, *et al.* The molecular mechanism of action of the antiresorptive and antiinflammatory drug clodronate: evidence for the formation in vivo of a metabolite that inhibits bone resorption and causes osteoclast and macrophage apoptosis. *Arthritis Rheum*, 2001, 44(9): 2201-2210
 - 14 Kwak HB, Kim JY, Kim KJ, *et al.* Risedronate directly inhibits osteoclast differentiation and inflammatory bone loss. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32(7): 1193-1198
 - 15 Nagae M, Hiraga T, Wakabayashi H, *et al.* Osteoclasts play a part in pain due to the inflammation adjacent to bone. *Bone*, 2006, 39(5): 1107-1115
 - 16 Grier RL, Wise GE. Inhibition of tooth eruption in the rat by a bisphosphonate. *J Dent Res*, 1998, 77(1): 8-15

(收稿: 2010-11-14)

(修回: 2011-05-13)

经内镜放置金属支架联合局部种植化疗药物治疗胃出口恶性梗阻的临床价值

王志勇 孙丽伟 付金龙 邱冰峰 吴建良 李 丽 马菊妹 胡娇娣

摘 要 **目的** 探讨经内镜放置金属支架联合局部种植化疗药物治疗胃出口恶性梗阻的有效性和临床价值。**方法** 将胃窦癌或幽门癌并有梗阻患者 42 例, 随机分成三组, 即单纯幽门支架置入组(支架组) 12 例; 经内镜直视下放置幽门支架; 幽门支架置入联合局部注射化疗药物组(联合组) 12 例; 先放置幽门支架, 患者休息片刻后再次插镜, 根据肿瘤大小和范围, 注射 5-氟尿嘧啶 500mg 和丝裂霉素 4mg, 深度 0.5~1.0cm; 另选择同期拒绝任何支架置入及放化疗的患者作为对照组 18 例; 只予静脉或口服药物对症支持治疗。分别与第 4、8、12 周分别复查胃镜及疗效判定。**结果** 本组 24 例支架放置皆 1 次成功, 术后 24~48h 摄片示支架膨胀约 90%, 2 例术后出血, 予保守治疗而愈。术后随访 3 个月, 无支架移位发生。支架组、联合组、对照组平均通畅期分别为 51.9 天、73.2 天、23.1 天; 支架组与对照组比较($t=117.1$, $P<0.001$)、联合组与支架组比较($t=48.9$, $P<0.001$), 通畅期均明显延长, 具有显著性差异。**结论** 单纯置入支架组与支架置入联合局部注射化疗药物组疗效均明显优于对照组, 而联合组与支架组比较, 联合组通畅期明显长于单纯支架组, 说明支架置入联合局部注射化疗药物缓解患者梗阻的时间更长, 临床价值更高。

关键词 金属支架置入 胃出口恶性梗阻 局部注射 化疗药物

Value of Endoscopic Placement of Metal Stent implantation Combined with Local Chemotherapy for Malignant Obstruction of Gastric Outlet. Wang Zhiyong, Sun Liwei, Fu Jinlong, Qiu Bingfeng, Wu Jianliang, Li Li, Ma Jumei, Hu Jiaodi. Department of Digestive Diseases, The Affiliated Hospital of Hangzhou Teacher University Medical College (the Second People's Hospital of Hangzhou city), Zhejiang 310015, China

Abstract Objective To evaluate the value of endoscopic placement of metal stent implantation combined with local chemotherapy

基金项目: 浙江省医药卫生科学研究基金计划(B类)(2007B176)

作者单位: 310015 杭州师范大学医学院附属医院/杭州市第二人民医院消化科