

文章编号: 1001-098X(2002)06-0285-03

几种物理因素对体外培养成骨细胞的影响

夏玉莲, 孙元明

摘要: 成骨细胞在骨的修复与重建中起着至关重要的作用。介绍了电离辐射、脉冲电磁场、热疗、制动等对成骨细胞的影响及其作用机制。

关键词: 成骨细胞; 电离辐射; 脉冲电磁场; 热疗; 制动

中图分类号: Q274 **文献标识码:** A

The effects of physical factors on osteoblast in vitro

XIA Yu-lian, SUN Yuan-ming

(Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tianjin, 300192, China)

Abstract: Osteoblast is key to remodeling and repairing of bone. This review recommends the effects of physical factors on osteoblast in vitro, including ionizing radiation, pulsed electromagnetic fields, heat treatment, immobilization which have been widely used in the clinic therapy.

Key words: osteoblast; ionizing radiation; pulsed electromagnetic fields; heat treatment; immobilization

成骨细胞作为骨发生细胞对于骨损伤的修复与重建至关重要。近年对于成骨细胞研究的热点主要集中于其分子调控机制及基因表达方面,但是关于物理因素对成骨细胞的影响及作用机制报道并不是很多。

1 电离辐射

医疗照射主要来源于X射线诊断检查、核医学诊断以及放射治疗。骨融合牙齿植入术后放射线诊断检查时,电离辐射对于骨愈合与重建具有破坏性的作用。为了评估电离辐射对于成骨细胞增殖和分化的影响, Dare A等^[1]将细胞分别于40、100、400和4 000 mGy X射线下连续照射3d,发现4 000 mGy可抑制成骨细胞的生长、碱性磷酸酶的活性及骨小结

的形成,但是40、100、400 mGy对于这三项指标却没有显著的影响,这表明电离辐射剂量小于400 mGy时在体外对于成骨细胞的生长和分化没有明显的影响,而大于4 000 mGy时则依细胞种属的不同对于成骨细胞的增殖和分化产生差别性的影响。因此,放射线诊断对于成骨细胞的影响是微不足道的。

电离辐射作用于骨折部位会减少骨细胞的数量,抑制成骨细胞的活动,减弱脉管的形成,但电离辐射在减弱成骨细胞增殖的同时又促进了其分化,诱使骨重建加速,电离辐射的这一作用机制还不太明了。Chae HJ等^[2]研究认为,为电离辐射刺激成骨细胞分化主要是由于辐射期间活性氧簇的产生。自由基的释放被认为是放射治疗最重要的机制。此外,辐射诱导JNK/SAPK (c-junNH₂末端激酶/应激活化蛋白激酶)和AP-1(转录因子)的激活是其发生的分子生物学基础。JNK和AP-1的激活与成骨细胞受辐射释放自由基相偶联。目前认为,电离辐射剂量小于5 cGy时通过释放自由基而影响JNK/SAPK的激活,最终导致成骨细胞分化。

电离辐射可用于关节成形术后异位骨化的治疗,但其对成骨细胞和骨原细胞的分化、基质矿化的影响并不清楚。Gaissmaier C等^[3]通过对幼年大鼠

收稿日期: 2002-09-06

作者简介: ①夏玉莲(1975-),女,山西大同人,中国医学科学院中国协和医科大学放射医学研究所(天津,300192)硕士研究生,主要从事细胞生物学研究。

②孙元明(1962-),男,辽宁鞍山人,中国医学科学院中国协和医科大学放射医学研究所副研究员,主要从事细胞生物学研究。

审校者: 中国医学科学院中国协和医科大学放射医学研究所 李雨民

颅盖骨成骨细胞、成纤维细胞、骨髓基质干细胞进行了多项指标的测定,研究了不同的辐射剂量对体外骨发生的影响,结果显示在所有有丝分裂细胞中,集落形成活力呈辐射剂量依赖性抑制,而细胞的新陈代谢和基质的合成并未受损害,碱性磷酸酶的表达和基质的矿化亦未受明显影响。该实验提示,由于细胞增殖抑制效应,电离辐射对体内骨发生的早期有抑制作用。因此,全髋关节成形术后电离辐射对异位骨化的防治须尽早进行。

电离辐射致放射性骨坏死的分子生物学机制仍然不甚明了。辐射改变了成骨细胞分泌的细胞因子的表达,继而影响了骨重建;骨重建反过来又影响成骨细胞的分化和细胞外基质形成。Dudziak ME等^[6]进行了这方面的研究,同时还研究了不同剂量的电离辐射对TGF- β (转化生长因子 β)、VEGF(血管内皮生长因子)及ALP(碱性磷酸酶)表达的影响。结果表明,随着辐射剂量的增加,成骨细胞的增殖减弱,TGF- β 和VEGF的分泌也减少,但是辐射却促进了成骨细胞的分化,主要表现在碱性磷酸酶的表达明显增加。TGF- β 总的减少是由于每个细胞分泌TGF- β 的减少而引起的,而VEGF的减少却是继发于细胞增殖的减弱,因为辐射所致成骨细胞VEGF的减少可由细胞数量的增加而得以纠正。所以,他们认为辐射诱导的成骨细胞分化和细胞因子的改变可能是放射性骨坏死和损伤性骨折的分子生物学机制。

2 脉冲电磁场

脉冲电磁场已成功地用于治疗多种骨科疾患,尤其是骨折的延迟愈合与不愈合,但关于其对骨发生的影响和机制了解甚少。Lohmann CH等^[7]将MG63人类成骨样细胞依时间分为1d、2d、4d三组,每日8h置于15 Hz 20脉冲的Helmholtz线圈中,实验结果表明,脉冲电磁信号引起了成骨细胞的增殖与³H-胸苷的减少,细胞碱性磷酸酶的活性明显增强,在照射的第1天就达到最大效应。在细胞裂解物中酶的活动包括富含碱性磷酸酶的细胞外基质囊泡,随着暴露时间的延长持续增加。与对照组相比,1~2d后胶原的合成和骨钙素的产生增加,而PGE₂(前列腺素E₂)的产生明显减少,TGF- β 也减少。4d后,局部细胞因子的水平与对照组相似。此实验结果表明,脉冲电磁场可增强成骨细胞的增殖能力及碱性磷酸酶的表达,这与骨钙素及胶原的增加相一致。

成骨细胞对脉冲电磁信号的刺激是相当敏感的,这种刺激是通过局部细胞因子的产生而介导的。Bodamyali T等^[8]观察了脉冲电磁场对大鼠颅盖骨成骨细胞的骨发生与BMP-2、BMP-4(骨形态发生蛋白2、4)mRNA表达的影响。与对照组相比,脉冲电磁场会使骨小结的数量增多、体积增大,同时会使BMP-2和BMP-4 mRNA水平增加,其增加量与脉冲电磁场暴露时间呈正相关。此实验表明,脉冲电磁场不但可促进体外骨发生,而且可诱导BMP-2和BMP-4 mRNA的转录,且两者具有相关性。

3 热疗

热疗在临床上广泛用于骨关节炎、骨刺、骨肿瘤等的治疗,并已显示出良好的疗效,然而热诱导骨发生的机制并不清楚。Shui C等^[9]研究表明,成骨细胞能耐受39℃~41℃持续1h和39℃持续96h的热环境,在这期间热疗刺激成骨细胞DNA的合成。此外还发现39℃持续培养可加速钙化骨小结的形成。HSP70(热休克蛋白70)在39℃时上调,促使1、25-(OH)₂D₃诱导的骨小结钙化加速及碱性磷酸酶含量增加。试验证明,成骨细胞前体细胞的增殖与分化是热依赖性的,热疗可加速骨的钙化。温度诱导成骨细胞分化这一特性对于临床治疗骨质疏松及骨折愈合等骨丢失疾病有着巨大的应用前景。Li S等^[10]将成骨细胞置于更高的温度培养,发现42℃连续培养10 min可破坏肌动蛋白,继而37℃再连续培养12 h则细胞骨架结构又恢复,但在45℃培养时则可造成细胞不可逆的损伤。他们的试验结果表明,在热刺激诱导的坏死中,活性氧簇的产生是非常重要的。在48℃的热刺激时还可见染色体P53的易位和c-jun NH₂末端激酶的激活,其有助于热休克诱导的凋亡。同时,HSP70的急剧增加也表明细胞的保护机制被激活了,这种保护能够阻止细胞的凋亡。

Inokuchi T等^[11]将截下的具有再生潜力的肿瘤浸润骨片立即异体植入,研究了体外热疗对细胞的生存能力和骨诱导特性的影响,发现65℃持续30~120 min的热疗可使细胞完全失活,但却保存了异体骨植入物的骨发生特性,为热疗在临床上治疗骨肿瘤等所致的大段骨缺损提供了理论依据。

4 制动

骨骼含钙量与其所承受的应力呈正相关,伤后

病人在制动的情况下,骨骼所承受的应力减少,导致骨骼脱钙,即废用性骨质疏松^[10],血钙将随之升高。同样在畸齿矫正术中,无应力侧进行骨吸收而应力侧则是骨形成。Mika I等^[11]在一系列观察的基础上发现,应力增加了成骨细胞前体细胞和成纤维细胞BMP-4(而不是BMP-6和BMP-7)的表达,其反过来又激活了cbfa-1的表达,最终诱导了成骨细胞的分化。BMP-4在骨发生中作为一个机械应力诱导的自分泌和旁分泌的细胞因子发挥着作用,在应力诱导的膜内化骨和软骨内化骨中也起着重要的作用,只有沿着骨缺损端或骨折面的BMP-4⁺的成纤维样细胞最终可分化为成骨细胞。BMP-4在应力的作用下6 h后分泌增多,48 h之内都保持着这样的趋势。制动的病人在损伤部位成骨细胞数量减少,碱性磷酸酶含量明显下降,骨干的细胞比干骺端的更易受到影响,成骨细胞将吡咯氨酸结合到骨基质的能力也明显降低,细胞内容酶体的活动反而加强。因此,在制动的情况下成骨细胞的形态及生物学功能都发生了很大的改变,这些都将影响到病人的预后。所以,很好地掌握制动解除时间及合理应用制动过程中的各种理化治疗方法就变得至关重要了。

Rantakokko J等^[12]利用单侧石膏制动建立小鼠骨质疏松模型,在制动10~21 d时发现股骨远端和胫骨近端骨质明显减少,3周时CT示骨密度降低,这些结构和几何学的改变表明了股骨远端的强度降低,其细胞和分子生物学机制是由于制动3 d内骨吸收的迅速加快。在制动期间组织蛋白酶K、基质金属蛋白酶9和耐酒石酸酸性磷酸酶的mRNA水平显著升高,这与破骨细胞数量的增加相一致。制动6 d时,I型胶原和骨钙素的mRNA水平含量降低,表明骨更新的平衡向骨丢失的方向发展。此试验结果说明,制动对于骨更新有双重的负面影响,即抑制骨形成的同时又增强了骨吸收。

综上所述,物理方法在进行疾病的诊断和治疗时,是通过改变细胞的微观结构及生化指标而达到目的的,了解其分子生物学方面的改变将有助于我们更好的应用这些技术。

参考文献:

- [1] Dare A, Hachisu R, Yamaguchi A, et al. Effects of ionizing radiation on proliferation and differentiation of osteoblast-like cells[J]. *J Dent Res*, 1997, 76(2): 658-664.
- [2] Chae HJ, Chae SW, Kang JS, et al. Effect of ionizing radiation on the differentiation of ROS 17/2.8 osteoblasts through free radicals[J]. *J Radiat Res (Tokyo)*, 1999, 40(4): 323-335.
- [3] Gaissmaier C, Sell S, Fritz J, et al. Osteogenesis in exposure to ionizing radiation in vitro[J]. *Z Orthop*, 1999, 137(6): 528-535.
- [4] Dudziak ME, Saadeh PB, Mehrara BJ, et al. The effects of ionizing radiation on osteoblast-like cells in vitro [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2000, 106(5): 1049-1061.
- [5] Lohmann CH, Schwartz Z, Liu Y, et al. Pulsed electromagnetic field stimulation of MG63 osteoblast-like cells affects differentiation and local factor production[J]. *J Orthop Res*, 2000, 18(4): 637-646.
- [6] Bodamyali T, Bhatt B, Hughes FJ, et al. Pulsed electromagnetic fields simultaneously induce osteogenesis and up-regulate transcription of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in rat osteoblasts in vitro[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 250(2): 458-461.
- [7] Shui C, Scutt A. Mild heat shock induces proliferation, alkaline phosphatase activity and mineralization in human bone marrow stromal cells and Mg-63 cells in vitro [J]. *J Bone Miner Res*, 2001, 16(4): 731-741.
- [8] Li S, Chien S, Branemark PI. Heat shock-induced necrosis and apoptosis in osteoblasts[J]. *J Orthop Res*, 1999, 17(6): 891-899.
- [9] Inokuchi T, Ninomiya H, Hironaka R, et al. Studies on heat treatment for immediate reimplantation of resected bone [J]. *J Craniomaxillofac Surg*, 1991, 19(1): 31-39.
- [10] Takata S, Yasui N. Disuse osteoporosis[J]. *J Med Invest*, 2001, 48(3-4): 147-156.
- [11] Mika I, Osamu I, Tatsuya Y, et al. Tensile stress induces bone morphogenetic protein 4 in preosteoblastic and fibroblastic cells, which later differentiate into osteoblasts leading to osteogenesis in the mouse calvariae in organ culture[J]. *J Bone Miner Res*, 2001, 16(1): 24-32.
- [12] Rantakokko J, Uusitalo H, Jamsa T, et al. Expression profiles of mRNAs for osteoblast and osteoclast proteins as indicators of bone loss in mouse immobilization osteopenia model[J]. *J Bone Miner Res*, 1999, 14(11): 1934-1942.