

叶黄素对破骨细胞分化的影响

裴凌鹏, 崔 箭

(中央民族大学少数民族传统医学中心, 北京 100081)

[摘要] 研究叶黄素对体外破骨细胞分化的影响. 建立由骨保护素配体 (RANKL) 和巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF) 共同细胞因子的小鼠破骨细胞骨髓诱导体系, 将不同浓度的叶黄素作用于破骨细胞. 受试细胞分为对照组、叶黄素低剂量组 (10^{-8} mol/L)、叶黄素中剂量组 (10^{-7} mol/L) 和叶黄素高剂量组 (10^{-6} mol/L), 并设立空白对照组. 7 d 后取细胞玻片进行抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 染色, 观察破骨细胞并计数; 取骨片进行甲苯胺蓝染色, 光镜下统计骨吸收陷窝面积; 测量抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 活性以及破骨细胞表面 NF- κ B 活化受体 (RANK) mRNA 表达量. 诱导培养的破骨细胞形态特征明显; 叶黄素中、高剂量组在细胞数量、TRAP 活性上与对照组相比有明显统计学差异 ($P < 0.05$); 叶黄素各剂量组在 (RANK) mRNA 表达量上与对照组相比有明显统计学差异 ($P < 0.05$), 且呈量效关系. 研究表明叶黄素可以抑制体外培养的破骨细胞分化.

[关键词] 叶黄素, 破骨细胞, 细胞分化

[中图分类号] R 965 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2008)03-0100-04

Effect of Lutein on the Differentiation of Osteoclast Induced From Bone Marrow in Mice

Pei Lingpeng Cui Jian

(Central University for Nationalities Research Center of Minority Traditional Medicine Beijing 100081, China)

Abstract Effect of lutein on the differentiation of osteoclast induced from bone marrow were studied in vitro. Mononuclear cells of mice bone marrow were incubated with DMEM containing macrophage colony stimulating factor (M-CSF) and receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL). The culture was treated with lutein of different concentrations (10^{-8} mol/L, 10^{-7} mol/L, 10^{-6} mol/L), respectively. The culture cells were fixed and were stained for tartate-resistant acidic phosphatase (TRAP) after 7d. The formation of osteoclasts was quantified by counting the number of TRAP⁺ multinuclear cells. The percentage of bone resorbed surface, TRAP activity and the expression of receptor activator of NF- κ B (RANK) mRNA were analysed. The appearance of reduced mice osteoclasts was typical. Compared with the control group, the number of TRAP⁺ multinuclear cells, TRAP activity and the percentage of bone surface in lutein middle-dose group and lutein high-dose group significantly decreased ($P < 0.05$). But the expression of RANK mRNA significantly increased ($P < 0.05$) by treated in different doses of lutein. Lutein can inhibit osteoclasts differentiation in vitro.

Key words lutein, osteoclast, differentiation

叶黄素是一种含氧类胡萝卜素, 分子式为 $C_{40}H_{56}O_2$, 相对分子质量为 568. 由于分子结构中多个烯键的存在, 叶黄素分子可以发生几何异构. 叶黄素可在人体内发挥多种重要的防治疾病功能, 其中尤以抗氧化、防止心血管疾病、预防老年性黄斑变性、提高免疫力、抗癌以及调控骨质代谢等作用突出^[1-3]. 本实验旨在观察此类化合物对破骨细胞分化的影响.

收稿日期: 2007-11-26

基金项目: 国家自然科学基金 (30171169) 资助项目.

通讯联系人: 裴凌鹏, 博士, 讲师, 研究方向: 天然药物化学与骨营养. E-mail: lpp@homa.com

1 材料与amp;方法

1.1 主要仪器和试剂

Labconco冰冻真空干燥仪, 752分光光度计, 960型荧光分光光度计, J2- SH 高速冰冻离心机, C30柱 (YM C Carotenoid S- 5 Waters), HPLC(Waters 600E溶剂输送系统, PDA- 2996二极管阵列检测器), 叶黄素乳化剂(罗氏制药公司), DMEM 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司)、RANKL, M- CSF、乙腈、甲醇、甲基叔丁基醚(MTBE)(迪马公司), TRAP检测试剂盒(南京建成), RT- PCR 试剂盒(Promega公司)、DNA M aster(大连 Takara生物技术公司)、无水乙醇(北京化学试剂公司), 大孔吸附树脂(天津农业股份公司).

1.2 乳化剂破乳制备叶黄素

1.2.1 叶黄素萃取

称取 10 g 乳化颗粒加入 300 mL 丙酮- 正己烷萃取. 静置 2 h 后, 将脂溶性相收集后进行提取液浓缩处理.

1.2.2 叶黄素提取液柱色谱纯化

(1)装柱: 将活化好的氧化铝装填于玻璃层析柱中, 用正己烷润湿. (2)洗脱: 分别取 2 mL 叶黄素提取液上柱, 用 50 mL 正己烷- 丙酮淋洗, 收集洗脱液. 将洗脱液用氮气吹干.

1.3 叶黄素鉴定

根据其色谱中保留时间和紫外可见吸收光谱的特征峰进行鉴定.

1.4 破骨细胞分离和动物培养

取 4 周龄雄性小鼠 5 只(均由中国医学科学院实验动物中心提供)体重 20~ 25 g 拉颈脱位处死, 75% 乙醇泡 5 min 无菌条件下, 分离股骨, 剪断两侧骨骺端, 用注射针头将 DMEM (100 U /mL 青霉素, 100 μg /mL 链霉素, 2 mmol/L L- 谷氨酰胺, 15% FCS)轻轻冲洗骨髓腔, 收集骨髓细胞混合液并接种于培养瓶中培养 (5% CO₂, 95% 空气, 37℃ 湿热) 45 min. 收集未贴壁细胞, 取上清液, 1000 r/min 离心 5 min 弃上清液, 用 DMEM 培养液重悬细胞, 计数并调整细胞浓度至 10⁵ 个 /mL 细胞混合液分成 4 组, 即对照组、叶黄素低剂量组 (10⁻⁸ mol/L)、叶黄素中剂量组 (10⁻⁷ mol/L) 和叶黄素高剂量组 (10⁻⁶ mol/L), 各组细胞培养液中均添加 M- CSF (50 ng/mL) 和 RANKL (50 ng/mL), 并设空白对照组. 将细胞混合液移入玻片及骨片的 24 孔培养板上, 放在 5% CO₂, 95% 空气、37℃ 湿热条件下培养, 并每隔 2 d 换液, 于第 7 d 进行细胞观察、计数及生化指标测定.

1.5 破骨细胞计数与生化测定

1.5.1 骨吸收陷窝染色、观察与统计

将骨片经 2.5% 戊二醛固定 7 min, 超声清洗 5 min, 系列乙醇脱水, 自然晾干, 1% 甲苯胺蓝染色 5 min, 蒸馏水清洗后 ×100 光镜下对吸收陷窝(圆形、椭圆形等典型形态, 边界清楚的蓝紫色异染区)观察, 并进行骨吸收陷窝面积百分比的统计.

1.5.2 破骨细胞抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 染色

将细胞玻片固定后, 按试剂盒说明进行操作, 中性树脂胶封片, 光镜下观察. 以 TRAP⁺ 多核细胞 (≥3) 为破骨细胞, 对每个玻片随机取 5~ 10 个视野 (×200) 中的破骨细胞数进行计数, 取平均值结果以细胞数 / 玻片表示.

1.5.3 破骨细胞抗酒石酸酸性磷酸酶 (TRAP) 活性测定

培养的贴壁细胞于第 7 d 时用 0.25% 胰酶消化后 PBS 清洗 2 次, 加入细胞裂解液 100 μL, 在超声波细胞粉碎上粉碎细胞, 取上清液 0.05 mL, 530 nm 比色测定, 并根据公式计算酶活性.

1.5.4 RT- PCR 测定破骨细胞表面 RANK 表达水平

各组于培养 3 天和 7 d 用 0.25% 胰酶消化后收集贴壁细胞, 提取总 RNA. 取 2 μL 总 RNA 合成 cDNA, 取 1 μL cDNA 进行 RT- PCR 扩增 RANK 及 GAPDH 基因, 反应总体积为 20 μL 引物序列及扩增条件如下: RANK 上游引物序列: 5- TTAAGCCAGTGCTTCACGGG- 3, 下游引物序列: 5- ACGTAGACCACGATGATGTCGC- 3 GAPDH 上游引物序列: 5- TCCACCAACCTGTTGCTGAG- 3 下游引物序列: 5- CCA-

CAGTCCATGCCATCACT - 3. PCR 循环 30 次, 制备 2% 琼脂糖凝胶, 取 PCR 反应产物 5 加适当溴酚蓝点样, 90 V 电压下电泳 20 min 凝胶成像分析系统进行光密度扫描, 半定量分析并电泳带的平均灰度值. 目的基因 RNA 表达量 = 每例标本电泳带的平均灰度值 / 同一标本 GAPDH 电泳带的平均灰度值.

1.6 统计分析

每组实验均重复 3 次, 各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 10.0 软件进行方差分析, 两组间进行 *t* 检验.

2 结果与分析

2.1 叶黄素提取与鉴定

有机试剂的反复提取后, 通过柱层析可以得到高纯度的叶黄素提取物, 经 HPLC 及其光谱特征峰进行定性.

2.2 破骨细胞活体观察

培养 1 h 后开始出现贴壁细胞, 大多为体积较小单核圆形细胞, 大小基本一致, 分布比较均匀; 培养第 2 d 细胞形态开始出现变化, 出现散在的大形细胞, 局部出现细胞聚集, 但各组细胞密度未见明显变化; 细胞培养第 3-4 d 各组不规则细胞数量增加, 体积增大, 形态演变为大圆形、花瓣形等, 有些细胞出现伪足, 胞浆内可见多核, 成为破骨细胞; 培养第 7 d 各组破骨细胞形成逐渐达到高峰, 细胞核大多有 3 个或 3 个以上.

2.3 骨片吸收陷窝光镜的观察与统计

骨片在培养 7 d 后经甲苯胺蓝染色后骨吸收陷窝呈蓝紫色, 形态不规则, 大小不一, 边界清楚. 其中对照组现窝数量多, 面积大, 多连接成串珠样, 而中、高剂量叶黄素组吸收陷窝数量和面积较小, 其骨吸收陷窝面积百分比与对照组相比, 差异呈统计学意义 (见图 1).

2.4 叶黄素对破骨细胞 TRAP 染色阳性细胞数的影响

表 2 结果表明, 中、高剂量叶黄素组相比对照组破骨细胞数量明显减少 ($P < 0.05$), 而低剂量叶黄素组与对照组无统计学意义.

表 1 叶黄素对骨吸收面积的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 1 Effect of lutein on percentage of bone resorbed surface

组别	骨吸收面积量 / %
对照组	47.17 ± 4.11
低剂量叶黄素组 (10 ⁻⁸ mol/L)	45.71 ± 4.10
中剂量叶黄素组 (10 ⁻⁷ mol/L)	35.33 ± 3.77
高剂量叶黄素组 (10 ⁻⁶ mol/L)	29.15 ± 3.82

注: 与对照组比较* $P < 0.05$.

表 2 叶黄素对破骨细胞 TRAP 染色阳性细胞数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 2 Effect of lutein on osteoclast number by TRAP⁺ stained

组别	TRAP 染色阳性细胞数 / (个/片)
对照组	34.16 ± 1.19
低剂量叶黄素组 (10 ⁻⁸ mol/L)	34.27 ± 1.07
中剂量叶黄素组 (10 ⁻⁷ mol/L)	32.71 ± 1.06*
高剂量叶黄素组 (10 ⁻⁶ mol/L)	31.88 ± 1.04*

注: 与对照组比较* $P < 0.05$.

2.5 叶黄素对 TRAP 活性的影响

表 3 结果表明, 各剂量叶黄素组相比对照组破骨细胞的 TRAP 活性明显降低 ($P < 0.05$). 而低剂量叶黄素组与对照组无统计学意义.

2.6 叶黄素对破骨细胞 RANK

mRNA 表达的影响 (表 4) RT-PCR 半定量分析结果表明叶黄素呈浓度依赖性上调 RANK 的表达, 其中不同剂量叶黄素组的各时间点与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$).

表 3 叶黄素对 TRAP 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 3 Effect of lutein on TRAP activity

组别	TRAP 活性 (μ/L)
对照组	7.05 ± 0.32
低剂量叶黄素组 (10 ⁻⁸ mol/L)	7.13 ± 0.28
中剂量叶黄素组 (10 ⁻⁷ mol/L)	6.33 ± 0.30*
高剂量叶黄素组 (10 ⁻⁶ mol/L)	6.05 ± 0.30*

注: 与对照组比较* $P < 0.05$.

表 4 叶黄素对破骨细胞 RANK mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 4 Effect of lutein on expression of RANK mRNA

组别	RANK / GAPDH		
	3 d	5 d	7 d
对照组	2.05 ± 0.10	2.19 ± 0.11	2.28 ± 0.11
低剂量叶黄素组 (10 ⁻⁸ mol/L)	2.87 ± 0.11*	3.04 ± 0.12*	3.07 ± 0.12*
中剂量叶黄素组 (10 ⁻⁷ mol/L)	3.11 ± 0.12*	3.18 ± 0.12*	3.20 ± 0.13*
高剂量叶黄素组 (10 ⁻⁶ mol/L)	3.34 ± 0.11*	3.38 ± 0.13*	3.47 ± 0.11*

注: 与对照组比较* $P < 0.05$.

3 讨论

正常骨代谢过程是一种骨吸收和骨形成的动态平衡过程, 在这一过程受到体内外许多因素的调控, 如年龄、性别、营养状况、生活习惯、疾病等。一旦这些方面出现问题, 均会导致骨代谢受阻, 引发骨质疏松。而究其发生的本质则在于骨重建过程紊乱即破骨细胞介导的骨吸收大于成骨细胞介导的骨形成^[4]。破骨细胞来源于骨髓造血干细胞单核巨噬细胞系, 其分化过程中涉及 NF- κ B 活化受体 (RANK) /骨保护素 (OPG) /RANK 配体 (RANKL) 系统的调节。RANKL 表达于成骨细胞表面与破骨细胞前体细胞表面的 RANK 结合, 与巨噬细胞克隆刺激因子 (M-CSF) 一起启动破骨细胞的分化^[56]。叶黄素是近几年来备受国内外营养界关注的一类化合物, 研究表明其在成骨细胞分化、OPG /RANKL 调控方面有一定的作用^[7-8]。就本实验而言, 结果表明中、高剂量叶黄素可以使破骨细胞数量和 TRAP 活性降低, 阻止破骨细胞的形成与分化。此外在破骨细胞分化过程中叶黄素各组细胞 RANK 基因表达水平均有所上调, 且与叶黄素剂量浓度呈现正相关性。综上所述, 叶黄素在体外可以有效地抑制破骨细胞的形成与分化, 延缓骨吸收过程。

[参考文献]

- [1] 惠伯棣, 裴凌鹏. 类胡萝卜素化学与生物化学 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005: 121-138
- [2] 李福枝, 刘飞. 天然类胡萝卜素研究进展 [J]. 食品工业科技, 2007, 20(9): 82-85.
- [3] 魏跃胜. 食物中天然色素物质生理保健功能研究 [J]. 武汉商业服务学报, 2007, 11(3): 47-49
- [4] 马静波. 骨质疏松症的治疗和预防概述 [J]. 医师进修杂志, 2005, 28(5): 9-11.
- [5] Yasuda H, Shima N. A novel molecule mechanism modulating osteoclast differentiation and function [J]. Bone, 1999, 25: 109-133.
- [6] 刘凤祥, 朱振宇. RANKL/RANK 通路在破骨细胞活性调节及骨溶解中的作用 [J]. 生物骨科材料与临床研究, 2007, 15(3): 70-73
- [7] Kim L. Lycopene II—effect on osteoblasts: the carotenoid lycopene stimulates cell proliferation and alkaline phosphatase activity of SaOS-2 cells [J]. J Med Food, 2003, 6(2): 79-86
- [8] 黄晓斌, 孙元明, 李雨民. 破骨细胞分化成熟因子及其信号转导通路 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2007, 23(11): 32-36

[责任编辑: 孙德泉]