

酒精对骨髓基质细胞增殖及分化的影响

李杰 王义生 李月白 高芳

【摘要】 目的 观察酒精对骨髓基质细胞增殖及分化的作用,探讨骨质疏松的病理学机理。**方法** 以 0.09 mol/L 酒精加入骨髓基质细胞培养物中,测定增殖的骨髓基质细胞数及培养液中骨钙素含量。通过苏丹Ⅲ脂肪细胞染色计数观察酒精作用时间对脂肪细胞分化的影响。**结果** 实验组骨髓基质细胞数及培养液中骨钙素含量明显低于对照组,脂肪细胞的数量随酒精作用时间延长而增多。**结论** 酒精抑制骨髓基质细胞增殖及向成骨方向分化,促进其向脂肪细胞分化,这可能与酒精中毒引起继发性骨质疏松时骨量减少、髓内脂肪组织增多有关。

【关键词】 酒精; 骨质疏松; 骨髓基质细胞

Effect of alcohol on marrow stromal cell proliferation and differentiation Li Jie, WANG Yisheng, LI Yuebai, et al. Department of Orthopedics Henan Provincial Hospital, Zhengzhou 450052, China

【Abstract】 Objective To study the effect of alcohol on proliferation and differentiation of marrow stromal cells, and on pathogenetic mechanism of osteoporosis. **Methods** Proliferation of marrow stromal cells treated with alcohol and contents of osteocalcin in the media were assessed. **Results** The number of the marrow stromal cells and the contents of osteocalcin in the media in the experimental groups were significantly lower than those in the control group. The adipocytes increased in number with increasing duration of exposure to alcohol. **Conclusion** Alcohol inhibits marrow stromal cell proliferation and osteoblastic differentiation and promotes its differentiation into adipocytes. This may be a major contributing factor of bone loss and increase in marrow fat volume in osteoporosis.

【Key words】 Alcohol; Osteoporosis; Marrow stromal cell

酒精中毒可以引起骨量减少,骨髓内脂肪组织增多,导致继发性骨质疏松症。但关于骨量减少和髓内脂肪组织增多的原因尚不清楚。笔者采用骨髓基质细胞体外培养方法,观察酒精对骨髓基质细胞增殖及分化的影响,探讨继发性骨质疏松症的发病机理。

材料和方法

1. 材料

DMEM 培养基(Gibco);优质纯酒精(95%,北京化工厂);骨钙素放免试剂盒(中国原子能科学研究院);牛血清白蛋白和考马斯亮蓝 G-250(华美生物工程公司)。

2. 方法

(1)细胞培养:参照 Beresford 等^[1]培养骨髓基质

细胞方法,取昆明小鼠双侧股骨骨髓细胞,按 1.5×10^6 个/cm² 密度种植于 DMEM 培养基,5% CO₂、37℃、饱和湿度环境中培养,实验组加入 0.09 mol/L 酒精,对照组不加酒精。

(2)脂肪细胞数测定:细胞种植于放有盖玻片的 24 孔培养板内,实验组于首次种植细胞时加入酒精后,分别于第 4、6、9、12、15、18 天更换培养液时,不再加入酒精,均持续培养 21 d。取出盖玻片行苏丹Ⅲ脂肪染色与计数。

(3)骨髓基质细胞增殖测定:细胞种植于 6 孔培养板内,10 d 终止培养,用 0.02% EDTA 及 0.25% 胰蛋白酶联合消化收集细胞,制成细胞悬液,用血细胞计数板测定实验组和对照组每孔内细胞数。

(4)骨钙素放免测定:细胞种植于 24 孔培养板内,14 d 终止培养,取培养基上清液,用放免法测定上清液中骨钙素含量。

(5)细胞内蛋白质含量测定:以牛血清白蛋白作为标准品,采用考马斯亮蓝方法^[2]测定骨髓基质细胞内蛋白质含量。

作者单位:450052 郑州,河南省人民医院骨科(李杰);郑州大学一附院骨科(王义生);郑州大学生化教研室(李月白);郑州市儿童医院(高芳)

作者简介:李杰,主治医师

3. 统计学处理:实验数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,实验组与对照组之间的差异用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为检验水准。

结 果

1. 酒精作用时间对脂肪细胞分化的影响:骨髓基质细胞分化为脂肪细胞的数量随酒精作用时间延长逐渐增多(图 1)。

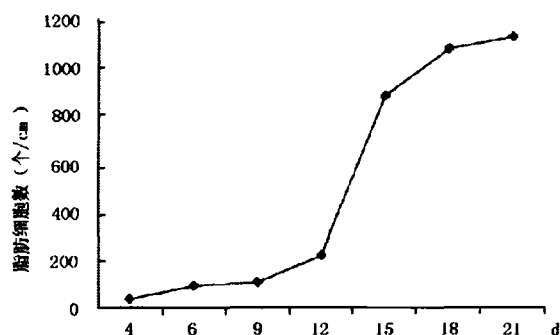


图 1 酒精作用时间对脂肪细胞分化的影响

2. 骨髓基质细胞增殖定量分析:细胞培养 10 d, 对照组与实验组培养孔内骨髓基质细胞数分别为 $(5.63 \pm 0.58) \times 10^5$ 个/孔, $(2.82 \pm 0.41) \times 10^5$ 个/孔, 两者差异有非常显著性 ($P < 0.001$)

3. 骨钙素定量分析:细胞培养 14 d, 对照组及实验组培养液中骨钙素含量分别为 $(12.93 \pm 1.28) \mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白质, $(4.41 \pm 1.56) \mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白质, 两者差异有非常显著性 ($P < 0.001$)。

讨 论

目前认为酒精中毒可引起继发性骨质疏松症。Aaron 等^[3]认为其主要病理改变是局部骨小梁结构消失或均匀变细变薄,骨量丢失的原因是骨吸收增强及骨形成减少,但具体病理机理尚不十分清楚,本研究结果证实酒精对骨髓基质细胞增殖及其向成骨细胞分化具有明显的抑制作用,并促进其向脂肪细胞分化,从而导致骨量减少,骨髓内脂肪增多。提示酒精中毒导致的骨质疏松可能与此密切相关。

通过骨髓细胞贴壁分离获取的基质细胞具有间

质干细胞的特征,可以分化为成骨细胞、脂肪细胞及其它基质细胞系^[4]。骨髓基质细胞在向成骨细胞及脂肪细胞分化之间呈反向变化,大剂量激素能够诱导其向脂肪细胞分化,减少其向成骨细胞分化^[5]。本研究证实酒精作用下存在此种变化。

骨钙素是成骨细胞分化的特征性表征。骨钙素数量多少反映了成骨细胞的数量及功能活跃程度。研究表明骨髓基质细胞合成的骨钙素几乎全分泌到培养液中,细胞内存留极少,说明培养液中骨钙素含量相当于细胞合成的骨钙素^[6]。因此我们用放免法测定培养液中骨钙素直接反映了对照组和实验组在成骨分化程度上的差异,实验结果表明酒精抑制骨髓基质细胞向成骨细胞分化。

本实验对照组中无或仅有极少脂肪细胞,脂肪细胞数量随酒精作用时间延长逐渐增多。因此酒精促进骨髓基质细胞向脂肪细胞分化,可能是骨质疏松时骨髓内脂肪组织增多的主要原因。综上所述我们认为酒精中毒导致的继发性骨质疏松的病理机理与以下因素有关:①酒精抑制骨髓基质细胞增殖,从而减少了向成骨细胞分化的骨髓基质细胞数量;②酒精促进骨髓基质细胞向脂肪细胞分化,导致其向成骨细胞分化减少。以上两者均可导致骨形成减少。

参 考 文 献

- 1 Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, et al. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Sci*, 1992, 102: 341-351.
- 2 周福德,周吕,丁谦,等,主编.现代医学实验技巧全书(上册).北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1995.561-562.
- 3 Aaron JE, Makins NB, Sagreiya K. The microanatomy of trabecular bone loss in normal aging men and women. *Clin Orthop*, 1987, 215: 260-265.
- 4 Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 1997, 276: 71-74.
- 5 Cui Q, Wang GJ, Balian G, et al. Steroid-induced adipogenesis in a pluripotent cell line from bone marrow. *J Bone Joint Surg (Am)*, 1997, 79: 361-367.
- 6 Cheng SL, Yang JW, Rifas L, et al. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells *in vitro*: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology*, 1994, 134: 277-286.

(收稿日期:2003-06-09)