·论著·

睾酮对离体胎鼠头盖骨成骨细胞影响的研究

陈璐璐 曾天舒 夏文芳 柯俐

摘要 目的 探讨雄激素对成骨细胞代谢的影响。**方法** 胎鼠头盖骨成骨细胞培养于含不同浓度睾酮的培养基中，观察细胞胸腺嘧啶核苷掺入、碱性磷酸酶(ALP)活性、骨钙素基因表达及骨钙素合成等细胞增殖及分化等指标的变化情况。**结果** 胎鼠头盖骨成骨细胞的增殖不受睾酮影响，但ALP活性、骨钙素基因表达及其合成在不同程度上受睾酮的调节。**结论** 雄激素对成骨细胞的分化具有促进作用，但对其增殖无影响。

关键词 睾酮 胎鼠头盖骨成骨细胞 增殖 分化

Effects of testosterone on fetal rat calvarial osteoblastic cells *in vitro*

Chen Lulu, Zeng Tianshu, Xia Wenfang, et al

Department of Endocrinology, Union Hospital, Tongji Medical University, Wuhan 430022, China

Abstract Objective To investigate the effect of testosterone on bone cell metabolism. **Methods** Fetal rat calvarial osteoblastic cells were cultured in the medium containing different concentrations of testosterone. ^{3}H-thymidine incorporation, alkaline phosphatase (ALP) activity, osteocalcin gene expression and production were detected to determine the condition of cell proliferation and differentiation. **Results** The proliferation of fetal rat calvarial osteoblastic cells was independent of the presence of testosterone. However, ALP activity, osteocalcin gene expression and production were regulated in different extent by testosterone. **Conclusion** Testosterone stimulates the differentiation of rat calvarial osteoblastic cells *in vitro*.

Key words Testosterone Fetus rats Osteoblastic cells Proliferation Differentiation

早在40年前，Albright 等已观察到睾酮对老年男性骨质疏松有效[1]。大量的临床观察也表明雄激素在维持骨量上起着重要的作用。切除睾丸的男性往往较早地出现骨质疏松[2]。给予骨质疏松患者服用合成的雄激素可明显提高血清碱性磷酸酶(ALP)的水平[3]，提示雄激素促进骨的生成。本研究通过体外培养的胎鼠成骨细胞，观察睾酮是否对成骨细胞具有直接的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

作者单位：430022 武汉，同济医科大学协和医院内分泌科

作者简介：陈璐璐，女，1982年毕业于中山医科大学，1993～1995年在丹麦临床与基础研究中心进行博士后研究工作，现为同济医科大学副教授，副主任医师，内分泌科副主任，国家自然科学基金及卫生部基金等课题负责人，在国、内外杂志上发表有关骨质疏松研究论文数十篇。

胎鼠头盖骨成骨细胞通过酶消化法从21天龄的SD胎鼠头盖骨分离得到[4]。剪碎的头盖骨经过胶原酶(2mg/ml)及透明质酸酶(1mg/ml)混合液的阶段性消化，每20分钟收集细胞一次，共得5批细胞。第一及第二批细胞弃之(主要含有成纤维细胞)。后三批细胞混合后接种于含有F-12培养液的培养瓶中。培养瓶中同时加入抗生素及10%的小牛血清(FCS)。培养瓶被置于37℃含有5%CO_2的培养箱中。24小时后，存活细胞经胰蛋白酶从培养瓶中分离出来，然后按10^4个细胞/cm^2的密度接种于培养瓶或培养板中。培养液为不含苯酚，加有10%的经炭预处理过的胎牛血清(CS-FCS)及抗生素的α-MEM。细胞在37℃、饱和湿度、5%CO_2的条件下培养24小时，然后加入50μg/ml 抗坏血酸。加入培养瓶及培养板中的细胞均被分为实验组及对照组。实验组分别加入10^{-11}～10^{-9}mol/L 睾酮，对照组不含有睾酮。其后各组每周换培养液3次直到实验终止。

所用培养液、抗生素、胎牛血清购于 Gibco 公司，药品购于 Sigma 公司。

1.2 ^{3}H-胸腺嘧啶核苷(^{3}H-TdR)掺入实验

接种在96孔培养板的细胞生长24小时后，将培养液换为含0.1%小牛血清白蛋白的无血清α-MEM，24小时后，激素加入相应培养液中并孵育48小时。^{3}H-胸腺嘧啶核苷在最后的24小时内被加入培养液中。^{3}H-TdR 结合率的测定方法同参考文献[4]。

1.3 细胞直接计数

用于直接计数的细胞种植于6孔培养板中，实验组中激素在培养的第一天加入。细胞在5%的 CS-FCS 中培养至第4天。移去培养液，用 PBS 洗涤细胞3次，然后加入0.25%胰蛋白酶，37℃消化1分钟，收集细胞入20 ml 离心管中，加入10 ml 培养液，轻柔吹打细胞至游离状，用细胞计数器低倍镜下计数细胞。每一标本取样3次，计数后取平均值。

1.4 碱性磷酸酶(ALP)活性测定

接种于96孔板的细胞被培养4天，ALP 活性经比色法直接在培养孔中测定[5]。加入对硝基苯磷酸二钠的培养板被置于37℃温育60分钟。对硝基酚的吸收光度用酶联免疫分析测定仪测定(波长405 nm)。酶活性最后经用亚甲基蓝染色法测定的平行培养板中的细胞数多少进行校正。

1.5 Northern 印迹杂交

细胞被培养至11天，总 RNA 的提取采用 Chomczynski 等所提出的方法[6]。RNA 分离及杂交见文献[4]。样本中的骨钙素 mRNA 用一特异的编码完整的鼠类骨钙素 cDNA 序列的寡核苷酸探针(5'-TGC CCT CCT GCT TGG ACA TGA AGG C-3')所测定。探针用 γ^{32}-ATP做末端标记。样本上样差异的校正经用28S RNA 寡核苷酸探针再杂交而完成。mRNA 的含量用 Molecular dynamics phosphor imager SF 测定。

1.6 骨钙素含量的测定

细胞培养至13天(预实验提示骨钙素分泌在培养的第11～14天时达高峰)，收集培养液，骨钙素的含量经鼠骨钙素 RIA 药盒测定(美国生物医学技术公司)。

2 结果

2.1 细胞增殖

^{3}H-TdR 及细胞直接计数结果显示睾酮对细胞增殖无明显影响。各组数值与对照组相比不具有统计学差异。

2.2 细胞分化

2.2.1 ALP 活性

ALP 活性测定表明，睾酮明显提高该酶活性。实验各组平均每细胞的酶活性均高于对照组(增加范围为13%～17%)，其中10^{-9}mol/L 睾酮对酶活性的影响略高于另外两浓度组，但组间比较差异无显著性($P>0.05$)，见图1。

2.2.2 骨钙素含量

分析培养第13天培养液中骨钙素含量发现，在睾酮作用下，胎鼠成骨细胞分泌的骨钙素增加。当激素浓度为10^{-10}和10^{-9}mol/L 时，骨

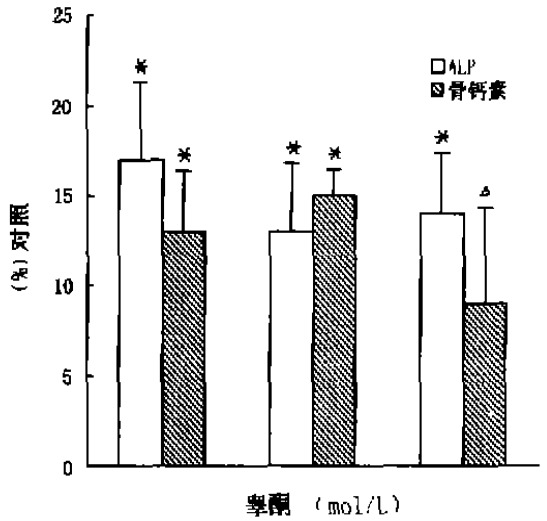

图1 睾酮对成骨细胞 ALP 活性及骨钙素生成的影响

注：每一柱形图代表 $\bar{x}\pm s$，$n=3$，其中 ALP 各实验 $n=6$，骨钙素各实验 $n=3$，结果以各测定值表示、对照组设定为100%；与对照组比较，$*P<0.01$，$\triangle P<0.05$

钙素分泌量较对照组分别增加13%及15%，差异有非常显著性（$P<0.01$）。10^{-11}mol/L 睾酮增加骨钙素分泌为9%（$P<0.05$），见图1。

2.2.3 骨钙素 mRNA 表达

放射自显影杂交带显示睾酮增加 mRNA 表达。实验各组骨钙素 mRNA 杂交带密度均较对照组增高（图2）。但定量分析发现实验各组 mRNA 表达的增加与对照组比较差异无显著性（$P>0.05$），各组间无明显差异。

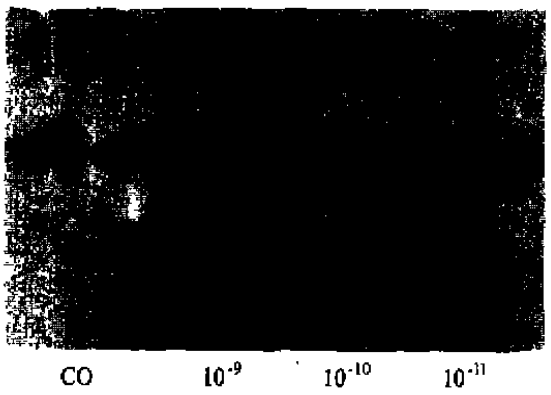

图2 骨钙素 mRNA 杂交带

CO：对照组

3 讨论

普遍认为雄激素通过蛋白同化作用促进骨的形成。雄激素减少被认为是老年性骨质疏松症的发病因素之一[7]。有研究认为雄激素对靶组织的作用是通过细胞因子介导的[8]。通过观察雄激素对成骨细胞胰岛素样生长因子（IGF-Ⅱ）受体的调节发现，雄激素对成骨细胞的作用很可能是通过 IGF-Ⅱ所介导[9]。至于雄激素对骨细胞的直接作用，至今报道不多。

本研究通过观察离体胎鼠成骨细胞增殖及分化的变化、发现睾酮对成骨细胞增殖的影响不显著，但促进细胞分化，表现为增加 ALP 活性及骨钙素的生成。ALP 是成骨细胞分化的早期指标，其表达随着细胞分化的发展而增强。其作用是水解有机磷酸释放出无机磷而用于羟磷灰石的形成。因此、是骨形成所必需的酶。它的表达代表着骨形成的状况。值得注意的是，ALP 的表达紧接着细胞增殖的下调、代表着细胞分化的开始[10]。本研究中睾酮不作用于细胞增殖，而刺激增殖下调后细胞分化的第一表征，推测该激素可能具有启动细胞分化某一环节的作用。

骨钙素作为成骨细胞分化的中期指标、其具体功能至今仍不甚清楚。有研究认为骨钙素是成骨细胞与破骨细胞间信息传递的物质，它的缺乏可使破骨细胞形成受阻[11]。本研究结果显示、睾酮虽促进骨钙素分泌，但对骨钙素 mRNA 的诱导不显著。对骨钙素生成的影响是否主要作用于转录后水平或抑制骨钙素降解、有待进一步的研究。

参 考 文 献

1 Albright F, Reifenstein C. The parathyroid glands and metabolic bone disease. Baltimone: Williams and Wilkins Company, 1948. 78.

2 Finkelstein JS, Klibanski A, Neer RM, et al. Osteoporosis in men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. Ann Int Med, 1987, 106: 354.

3 Dequeker J, Geusens P. Anaholic steroids and osteoporosis. Acta Endocrinol Supple, 1985, 271: 45.

（下转第4页）

1. 建立中国人群的峰值骨量。诊断骨质疏松主要以骨量减少为依据，骨量减少是以峰值骨量为基础。因而，建立不同性别的峰值骨量是当务之急。

2. 骨质疏松诊断应结合骨组织结构改变指标，如 X 线片、影像、组织形态计量等和临床症状、生化指标。

3. 实施骨质疏松测量仪的质量控制。近几年骨密度测定仪发展很快，目前国内已有 DEXA100 多台。广大基层医院仍以 SPA 机为主，约有1000台。不同厂家和不同型号仪器的精确度和准确度不同，降低了骨密度测定结果的可信度和可比性。各地应利用现有仪器设备，建立本实验室的正常值标准，参考这次制定的诊断标准进行诊断，特别应注意提高操作者水平，在此基础上，组织全国质量比对，确定不同机型的比对系数，通过实施质量控制，确保骨密度测定的准确性和可比性。

4. 不同种族、性别、遗传、环境、营养状况及地区差异造成骨密度值不同，深入研究这些影响因素与骨密度的关系，将会给骨质疏松诊断标准提供新的依据。

5. 骨形态计量学应结合动物实验及病理学，将这一方法的检测和研究引向深入，为制定诊断标准提供详细的资料。

6. 目前，积累了大量前臂中远端1/3处的骨密度数据，进一步测量并比较前臂1/6处、1/10处的数据，找出一定的规律，很有价值。

大会最后选举并通过了骨质疏松诊断标准学科组成员：组长刘忠厚，副组长杨定焯，成员朱汉民、王洪复、张柳。由刘忠厚提名并通过了张柳(兼任)、唐海、赵燕玲为学科组的秘书。大会并通过了个人会员的资格和权利的议案。

我们相信，在骨质疏松诊断标准学科组的带领下，经过同行们的共同努力，我国骨质疏松诊断标准一定会更加完善，为我国骨质疏松事业的发展发挥更大的作用。

（李扶刚　郭亦超）

(上接第7页)

4 陈璐璐，Jorgen S，Foged NT. β-磷酸甘油诱导离体成骨细胞非矿化阶段的碱性磷酸酶表达. 中国骨质疏松杂志，1996，2(2)：1.

5 Gray TK，Flynn TC，Gray KM，et al. 17 β-estradiol acts directly on the clonal osteoblastic cell line UMR 106. Proc Natl Acad Sci USA，1978，84：6267.

6 Chomczynski P，Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem，1987，162：156.

7 刘忠厚主编. 骨质疏松症. 北京：化学工业出版社，1992. 220.

8 Ishii DH，Shooter，EM. Regulation of nerve growth factor synthesis in mouse submaxillary glands by testosterone. J Neurochem，1975，25：843.

9 Kasperk CH，Wergedal J，Farley TA，et al. Androgens directly stimulate proliferation of bone cells *in vitro*. Endocrinology，1989，124：1576.

10 Owen TA，Aronow M，Shalhoub V，et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype *in vitro*：reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. J Cell Physiol，1990，143：420.

11 Glowacki J，Lian JB. Impaired recruitment of osteoclast progenitors by osteocalcin-deficient bone implants. Cell Diff，1987，21：247.