

铅对大鼠成骨细胞标志物的影响

靳翠红, 刘秋芳, 蔡原*, 周平

(中国医科大学公共卫生学院毒理教研室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 目的 研究铅对成骨细胞的功能标志物的影响, 探讨铅对骨骼系统影响的可能机制。方法 分离并培养大鼠成骨细胞, 加入不同浓度的醋酸铅培养3 d, 对-硝基苯磷酸盐法检测碱性磷酸酶活性, 放射免疫法检测骨钙素水平。结果 铅浓度 $\geq 0.1 \mu\text{mol/L}$ 时即可影响骨钙素水平, $\geq 0.5 \mu\text{mol/L}$ 时可以抑制碱性磷酸酶 (ALP)。结论 铅对成骨细胞标志物有显著影响, 推测铅可能对成骨细胞有特异性损伤。

关键词: 铅; 成骨细胞; 碱性磷酸酶; 骨钙素

中图分类号: R994.6 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2006)02-0084-03

Effect of lead acetate on special markers of osteoblasts in rats

JIN Cui-hong, LIU Qiu-fang, CAI Yuan*, ZHOU Ping

(Department of Toxicology, School of Public Health, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract Objective To investigate the effect of lead acetate on the functional markers of osteoblasts in rats for exploring the mechanism of lead toxicity on skeleton. **Method** Osteoblasts were isolated from the calvaria of newborn rats and cultured in DMEM medium with different concentration of lead acetate for 3 days. Then, measured the activity of alkaline phosphatase (ALP), the levels of osteocalcin in both medium and osteoblasts with pNPP method and radiate immunochemistry method respectively. **Result** The ALP activity was significantly decreased when the concentration of lead acetate in medium was $\geq 0.5 \mu\text{mol/L}$; whereas the levels of lead in medium was $\geq 0.1 \mu\text{mol/L}$, the osteocalcin level showed some decrease. **Conclusion** There is some adverse effect of lead on the markers of osteoblasts, which suggested that lead may have some specific toxicity on osteoblasts.

Key words: Lead; Osteoblasts; Alkaline phosphatase (ALP); Osteocalcin

过去人们普遍认为铅对骨骼是没有毒性的。但越来越多的流行病学、临床和实验研究显示铅的贮存可能对骨有重要的损害效应, 提示铅对骨骼有直接的损害并最终导致骨骼病理学改变, 即骨骼也是铅毒性重要的靶器官。铅对骨的毒性影响机制尚不清楚, 骨内细胞在全身和局部因素的调节下, 对基质形成、矿化和骨吸收起重要作用, 其中成骨细胞起关键作用。有研究发现铅中毒儿童血清骨钙素水平下降, 在螯合治疗后骨钙素恢复正常^[1,2]。实验表明铅可引起动物成骨细胞功能的损害, 骨单位形成时间和激活频率抑制及整个骨形成率延迟^[3]。这些研究提示铅对成骨细胞可能有直接的毒作用。关于铅的骨毒性研究目前国外开展较多, 但对成骨细胞的研究绝大多数采用单克隆的成骨细胞瘤细胞系 (ROS17/2.8), 而未用原代成骨细胞者。国内研究只限于一些流行病学调查。为了阐明铅对成骨细胞的影响, 本研究采用原代细胞培养方法观察铅对成骨细胞碱性磷酸酶 (ALP) 活性、骨钙素水平等特异性指标 (即标志物) 的影响, 为进一步研究铅对骨骼系统的毒性作用及机制提供重要的理

论依据和线索。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选用出生2 d的Wistar大鼠5只, 由中国医科大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂及仪器

醋酸铅 (分析纯, 沈阳市试剂一厂), 四甲基偶氮唑盐 (MTT, Sigma公司), II型胶原酶 (Sigma公司), 对-硝基苯磷酸盐 (pNPP, Sigma公司), I型胶原免疫组化试剂盒 (武汉博士德生物工程公司), 骨钙素放射免疫分析试剂盒 (中国原子能同位素研究所), 倒置相差显微镜 (Olympus, 日本), CO₂恒温培养箱 (日本), 超声波粉碎仪 (上海超声波仪器厂), Multiskan Ascent 酶标仪 (日本), FJ 2003/50G型放射性免疫测定仪 (西安)。

1.3 成骨细胞的制备及鉴定

取出生2 d的Wistar乳鼠脱颈椎于75%乙醇中消毒3 min; 无菌取颅盖骨片, 去除骨膜和周围结缔组织; 用0.25%胰酶37℃消化15 min; 再用1 mg/ml II型胶原酶消化90 min, 将含分离细胞及骨片的消化液移入离心管1000 r/min离心5 min, 弃上清, 加含10%胎牛血清的DMEM培养液重复离心过程, 制成

收稿日期: 2005-06-16; 修回日期: 2005-08-20

作者简介: 靳翠红 (1973-), 讲师, 硕士, 研究方向: 重金属中毒。

细胞悬液。用差速黏附法纯化成骨细胞。调整细胞密度至 10^6 个/ml 接种于 25 ml 培养瓶内, 置 37°C 、 5% CO_2 恒温培养箱中, 隔天换培养液。用 I 型胶原免疫组化试剂盒法鉴定成骨细胞。

1.4 碱性磷酸酶活性的测定

细胞以 5×10^4 /ml 接种至 96 孔板, 细胞融合后换为无血清 DMEM 培养液, 次日加入不同浓度的醋酸铅 (0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$), 继续培养 3 d, 吸弃培养液, 加 0.1% TritonX-100 100 μl /孔, 4°C 过夜, 然后加入 pNPP, 37°C 孵 30 min, 3 mol/L NaOH 终止反应, 酶标仪 405 nm 测 OD 值。用考马斯亮蓝法测定蛋白含量。酶的一个活性单位 (U) 定义为: 37°C 反应 30 min, 水解 1 μmol 底物的酶活性。

1.5 骨钙素含量的测定

细胞以 5×10^4 /ml 接种于 25 ml 培养瓶内, 细胞融合后加入不同浓度 (0, 0.1, 1, 10, 100 $\mu\text{mol/L}$) 醋酸铅, 继续培养 3 d。收集培养液, 并将细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化离心后用 PBS 冲洗, 1 000 r/min 离心 5 min, 重复 2 次, 最后加 PBS 定容至 0.5 ml, 冰浴下用细胞超声粉碎仪超声, 用放射免疫法测定培养液及细胞骨钙素水平。

1.6 数据处理

采用 SPSS 11.5 统计软件进行统计学分析, 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各指标组间比较用单因素方差分析, 后采用 ISD 法进行两两比较。

2 结果

2.1 I 型胶原免疫组化染色鉴定

成骨细胞的胞浆内分布有棕黄色颗粒, 为成骨细胞所分泌的 I 型胶原, 胞核空染, 为阳性细胞。

2.2 醋酸铅对成骨细胞 ALP 活性的影响

由表 1 可见, 0.5 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$ 醋酸铅组 ALP 活性显著下降, 且 100 $\mu\text{mol/L}$ 与 50 $\mu\text{mol/L}$ 比, $P < 0.05$, 有一定的剂量-效应关系。

表 1 不同浓度醋酸铅对成骨细胞 ALP 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

醋酸铅 ($\mu\text{mol/L}$)	ALP 活性 (U/mg pro)
0	38.558 \pm 3.494
0.1	35.997 \pm 3.031
0.5	27.901 \pm 0.945 *
1	28.258 \pm 0.895 *
5	28.053 \pm 0.820 *
10	27.879 \pm 0.623 *
50	25.032 \pm 0.887 *
100	20.924 \pm 1.281 * #

与对照组相比, * $P < 0.05$; 与 50 $\mu\text{mol/L}$ 组比, # $P < 0.05$

2.3 醋酸铅对骨钙素含量的影响

表 2 可见, 不同浓度醋酸铅组细胞内骨钙素水平差异无显著性, 而成骨细胞分泌的骨钙素水平则不

同, 各染铅组比对照组均显著下降, $P < 0.05$, 且 100 $\mu\text{mol/L}$ 与 50 $\mu\text{mol/L}$ 组比, $P < 0.05$, 呈一定的剂量-效应关系。

表 2 不同浓度醋酸铅对骨钙素含量的影响 ($\bar{x} \pm s$) ng/mg pro

醋酸铅 ($\mu\text{mol/L}$)	细胞内骨钙素	上清中骨钙素
0	12 186 \pm 0.118	45.566 \pm 4.918
0.1	11 897 \pm 0.144	29.482 \pm 3.125 *
1	12 601 \pm 1.028	22.954 \pm 2.610 *
10	13 072 \pm 0.608	21.739 \pm 3.363 *
100	11 602 \pm 0.739	11.862 \pm 1.082 * #

与对照组相比, * $P < 0.05$; 与 10 $\mu\text{mol/L}$ 组比, # $P < 0.05$

3 讨论

成骨细胞是骨形成细胞, 其生成不足或功能降低将会直接影响骨骼的功能, 造成骨骼的病理学改变。铅对成骨细胞的影响可以通过两种过程发生, 首先铅诱导系统和局部调节因子的紊乱。有研究显示中度铅中毒的儿童血铅水平与血清中 1, 25-(OH) $_2$ VD $_3$ 呈负相关^[4]; 其次铅可能直接抑制成骨细胞功能^[5]。本研究即从直接毒性方面选择更能反映实际情况的原代成骨细胞及其特异性标志物进行的。

在体内反映成骨细胞功能的两个特异性标志物是碱性磷酸酶和骨钙素 (OC)。骨矿化时, 骨 ALP 分解有机磷化合物, 产生无机磷盐离子, 与钙离子形成羟磷灰石, 而 OC 羧化后可与羟磷灰石结晶特异性结合, 1 mg OC 可以结合 17 mg 羟磷灰石, 且 OC 可随着羟磷灰石的增加而增加, 随着羟磷灰石结晶沿胶原纤维长轴的结合及规则排列, 类骨质迅速转化为骨质, 成骨细胞也成熟为骨细胞^[5]。有许多研究证明铅对成骨细胞有不利影响。对 ROS17/2.8 细胞系研究显示铅对骨连接素的分泌 ALP 和 I 型胶原基因表达有抑制作用, 但对胶原的合成^[6], β -肌动蛋白及磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 的基因表达没有影响^[4]。提示铅对成骨细胞影响并不限于所有信号和蛋白合成的一般性下降, 而是首先引起其特异性指标的改变。

ALP 是一种胞内酶^[7], 存在于成骨细胞的细胞膜, 由其合成分泌释放入血, 是其分化的早期指标, 可以有效地监测骨矿化的速度。Hamilton 通过动物实验证明, 铅引起骨 ALP 活性下降, 软骨矿化障碍^[8,9]。另一研究报道铅暴露可导致 ROS17/2.8 细胞总 ALP 活性的剂量依赖性抑制, 在 2 $\mu\text{mol/L}$ 即可出现^[5]。在本研究中 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 铅剂量组与对照组比未见 ALP 活性的显著下降, 而当铅 $\geq 0.5 \mu\text{mol/L}$ 时 ALP 出现显著的下降且呈现出一定的剂量-反应关系。与上述研究结果稍有不同, 但均提示铅对 ALP 活性有显著的特异性影响。

OC是骨重要的非胶原蛋白成分, 占总骨蛋白的1%~2%, 是含有1个γ-羧基谷氨酰残基的钙结合蛋白, 只有成骨细胞能合成和分泌OC。在骨正常的矿化中起重要作用。OC被认为是比ALP更敏感、更特异的反映骨形成、骨更新的检测指标, 能反映瞬间的骨转换水平, 对评价骨代谢状态具有重要意义。铅可与OC的2个钙结合位点紧密结合, 抑制OC与羟磷灰石的结合, 导致OC失活, 影响骨矿化^[10]。在铅中毒儿童中血清OC水平下降, 治疗后恢复正常水平^[9]。说明铅对OC合成或分泌有直接的影响。ROS17/2.8细胞系的研究发现, 成骨细胞培养液OC水平在10、25、50 μmol/L染铅组均下降(P<0.05), 而细胞内OC水平没有变化^[11], 总OC水平的下降是由于分泌型(即培养液中)OC水平的降低。本研究显示, 在所有染铅组培养液内OC水平均有下降(P<0.05); 而细胞内OC水平基本相当。证明了铅抑制成骨细胞的OC合成(即总OC水平), 但不损害骨钙素的分泌过程, 即合成多则分泌多, 反之亦然。由于铅影响OC合成的剂量较之抑制ALP活性的剂量更低, 表明OC确是比ALP更为敏感的检测指标。

参考文献:

[1] 沈彤, 朱启星. 环境铅对女性生殖生育及子代健康影响的研究进展[J]. 安徽预防医学杂志, 2001, 7(2): 148-149.

[2] Markowitz ME, Gundberg CM, Rosen JF. Sequential osteocalcin (OC) sampling as a biochemical marker of the success of treatment in moderately lead (Pb) poisoned children [J]. *Pediatr Res*, 1988, 23: 393-402.

[3] Rosen JF, Chesney RW, Hamstra A, et al. Reduction in 1, 25-dihydroxyvitamin D in children with increased lead absorption [J]. *N Engl Med*, 1980, 302: 1128-1131.

[4] Robert FK, Kristine MW. Regulation of osteoblastic gene expression by lead [J]. *Endocrinology*, 1993, 132(6): 2531-2537.

[5] Slovick DM, Gundberg CM, Neer RM, et al. Clinical evaluation of bone turnover by serum osteocalcin measurements in a hospital setting [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1984, 58: 228-238.

[6] Sauk JJ, Smith T, Silbergeld EK, et al. Lead inhibits secretion of osteonectin/SPARC without significantly altering collagen or Hsp47 production in osteoblast-like ROS17/2.8 cells [J]. *Tox Appl Pharmacol*, 1992, 116: 240-247.

[7] 石凯丽, 王文英. 铅对儿童骨代谢的影响机制[J]. 国外医学儿科学分册, 2002, 29(6): 289-291.

[8] Hamilton JD, O'Flaherty EJ. Influence of lead on mineralization during bone growth [J]. *Fundam Appl Toxicol*, 1995, 26(2): 265-271.

[9] Jeol GP, Gregory JL, John FR. Cellular and molecular toxicity of lead in bone [J]. *Environ Health Perspect*, 1991, 91: 17-32.

[10] Dowd TL. The displacement of calcium from osteocalcin at sub-micromolar concentration of free lead [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1994, 1226(2): 131.

[11] Gergory JL, John FR, Joel GP. Lead impairs the production of osteocalcin by rat osteosarcoma (ROS17/2.8) cells [J]. *Tox Appl Pharmacol*, 1990, 106: 270-277.

药物性粉尘对职工健康的影响

张艳斌

(石家庄市职业病防治所, 河北 石家庄 050031)

2005年8月, 我所对某药厂接触药物粉尘的133名职工进行了职业性健康体检, 结果发现接触药尘职工的X线胸片异常率较高, 现将结果报告如下。

1 对象与方法

1.1 对象

某药厂生产阿莫西林胶囊的配药工、粉碎工、填充工共133人。年龄20~49岁, 平均年龄37.7岁; 接尘工龄2~28年, 平均接尘工龄18.6年。生产工艺流程主要为: 从其他公司购入原粉→配药→粉碎→制粒→填充→灯检打蜡→铝塑→包装。

1.2 方法

详细询问职业史及既往史, 进行内科、B超、心电图、肝功能、血常规、X线胸片检查。

2 结果

2.1 粉尘浓度及分散度监测结果

1997~2005年, 生产岗位粉尘浓度为1.0~8.0 mg/m³, 合格

率100%, 粉尘中游离SiO₂未检出。粉尘分散度:<2 μm占11%, 2~5 μm占43.5%, 5~10 μm占34.5%, ≥10 μm占11%。

2.2 体检结果

接尘工人呼吸系统症状主要表现为咳嗽(8.6%)、咳痰(6.3%)、胸闷(5.2%)、气短(5.2%)。

133人中胸片有异常表现者20人。其中7人两肺中下野可见弥漫性结节状影(2人左下肺以网状影为主); 12人有散在的结节状影, 主要分布在中下肺野的中外带, 密度较低; 1人肺纹理增粗、紊乱。

3 讨论

从该药厂连续9年的粉尘浓度及分散度监测结果看, 生产岗位药尘浓度并不高, 并且未检出游离SiO₂。可以肯定胸片所表现的结节状影不是矽结节。我们认为引起工人肺部结节状阴影的可能原因是过敏反应。直径<5 μm的药尘通过鼻咽、口腔及喉, 到达气管、支气管、肺泡区。一些对青霉素类药物过敏的职工, 因反复少量吸入阿莫西林, 可引起过敏性肺炎。据文献报道, 有50%的过敏性肺炎病例呈隐匿进展直到肺纤维化, 而结节状影是由上皮细胞、巨噬细胞和不同程度胶原纤维化组成。本组接触药尘工人呼吸系统的主要症状为咳嗽、咳痰、胸闷、气短, 但听诊无异常。据报道, 慢性型过敏性肺炎早期临床症状可不明显。

关于药物性粉尘对职工健康的影响, 文献报道不多, 有待于进一步研究探讨。