

生长因子网络调节对骨形成作用的研究

III bFGF 对人胚成骨样细胞增殖及分化的影响

田卫东 王大章 乔 鞠 陈伟辉

摘要 目的: 研究不同剂量碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)对人胚成骨样细胞DNA、胶原蛋白和碱性磷酸酶合成的影响。方法: 实验分为4组, 每组6孔, 每组分别加入浓度为0.1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml的bFGF, 每组均设空白对照, 在实验后第1, 3, 5, 7天分别检测人胚成骨样细胞³H-TdR 和³H-脯氨酸的掺入量, 以及碱性磷酸酶合成量。结果: bFGF可明显促进人胚成骨样细胞的DNA合成, 但却抑制其胶原蛋白和碱性磷酸酶的合成, bFGF对人胚成骨样细胞具有双重效应。在含量为0.1~10 ng/ml, 呈剂量依赖性, 10 ng/ml时bFGF的作用最强。结论: bFGF在骨形成中有一定作用, 但仍需与其他细胞生长因子协同作用。

关键词 碱性成纤维细胞生长因子 人胚成骨样细胞 增殖与分化

成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factors, FGF)有多种生物学活性, 包括刺激细胞迁移、增殖和分化的能力, 其生物学效应是由靶细胞上高亲和力受体介导的。FGF可分为两种关系密切, 作用于共同受体的酸性和碱性成纤维细胞生长因子(aFGF和bFGF), 二者均储存于骨组织的细胞外基质, 推测可能作为一种自分泌或旁分泌性促有丝分裂因子对骨组织的生长发育发挥作用。本研究在建立人胚成骨样细胞分离培养基础上, 通过检测³H-胸腺嘧啶脱氧核苷(³H-TdR)和³H-脯氨酸(³H-Proline)的掺入量, 以及碱性磷酸酶合成量, 从剂量-效应和时间-效应两方面, 分别探讨bFGF对人胚成骨样细胞增殖和分化的作用及其特点。

1 材料和方法

1.1 材料

bFGF 购自 GIBCOBRL USA, ³H-TdR 和 ³H-Proline 购自中国原子能研究所。

1.2 方法

人胚成骨样细胞分离培养见参考文献 1。

1.2.1 实验分组 实验分为4组, 每组6个孔, 用DMEM培养液分别稀释bFGF, 使其终含量分别为0.1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml和100 ng/ml, 按4个浓度等级分别加入上孔内。各组均设空白对照组, 培养1, 3, 5, 7 d后, 用下列方法检测。

1.2.2 人胚成骨样细胞DNA、胶原蛋白合成 按各实验组预定的实验期间, 终止培养前6 h, 每孔加入18.5 kBq

(0.5 μCi) ³H-TdR 和 ³H-Proline, 继续培养。按预定时间终止培养后, 吸出培养液, 每孔加入300 μl含0.25%胰蛋白酶的培養液, 37 °C 孵育20 min, 以分离贴壁生长的成骨样细胞。收集细胞, 过滤后烘干滤纸, 将待测样品置于闪烁瓶内, 加入4 ml闪烁液(含0.4% PPO, 0.02% POPOP 二甲苯闪烁液), 用液体闪烁计数器测定放射性强度, 每次每个标本测定条件相同, 放射性强度测定值以计数/分(cpm)表示, 进行定量分析。

1.2.3 人胚成骨样细胞碱性磷酸酶合成 按各实验组预定的时间终止培养, 吸出培养液, 用无血清的199液清洗2次, 每孔加入200 μl 0.1% Triton X-100, 4 °C 过夜。用吸管反复吹打, 使细胞充分分解。2000 r/min离心10 min, 取上清液检测。采用酶动力学方法, 10 μl待测液加600 μl缓冲液, 37 °C 预温, 用501A型分光光度仪, 波长405 nm测定, 进行定量分析。

1.2.4 统计分析 各实验组及对照组检测结果经统计学方差分析, 及均数两两比较分析不同含量组之间及不同处理组间差异是否有显著性。

2 结 果

2.1 bFGF 对人胚成骨样细胞DNA 合成的作用

在人胚成骨样细胞中加入不同剂量的bFGF培养, 1 d后bFGF对成骨样细胞的DNA合成无明显影响, 3 d后, bFGF明显刺激成骨样细胞的DNA

国家教委博士点基金及CMB基金资助课题(编号CMBY-9401)

作者单位: 610041 华西医科大学口腔医学院

合成增加。培养 5 d 后, bFGF 的促进作用达到最大。7 d 后, bFGF 的作用明显减弱。作用特点: bFGF 含量在 1~ 10 ng/ml 时呈剂量依赖性, bFGF 为 100 ng/ml 时, 它的抑制作用反而减弱(图 1, 2)。

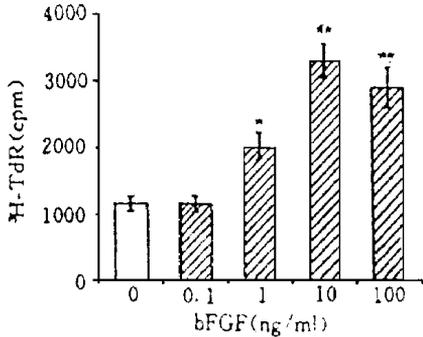


图 1 第 5 天时不同剂量 bFGF 对人胚成骨样细胞 ³H-TdR 掺入量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (以下各图同)

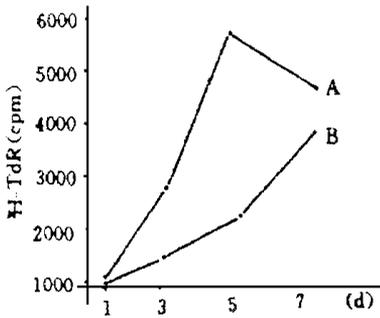


图 2 各实验期 10 ng/ml bFGF 对人胚成骨样细胞 ³H-TdR 掺入量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

A 实验组 B 对照组 (以下各图同)

2.2 bFGF 对人胚成骨样细胞胶原蛋白合成的作用

加入 bFGF 1 d 后, 不同剂量的 bFGF 对人胚成骨样细胞合成胶原蛋白无明显影响。3 d, 5 d 后, bFGF 可明显抑制成骨样细胞胶原蛋白的合成。含量 0.1~ 10 ng/ml, bFGF 的作用呈剂量依赖性, 剂量增大时, 作用反而呈下降趋势。7 d 后, 与对照组相比较, 胶原蛋白的含量无明显差异(图 3, 4)。

2.3 bFGF 对人胚成骨样细胞碱性磷酸酶合成的作用

加入不同含量的 bFGF, 1 d 后, bFGF 对人胚成骨样细胞合成碱性磷酸酶(ALP)无明显影响。3 d, 5 d 后, bFGF 可明显抑制成骨样细胞合成 ALP。含量为 10 ng/ml 时作用最强。含量增至 100 ng/ml, 其作用并不再增强。7 d 后, 所有实验组 ALP 含量与对照组相近(图 5, 6)。

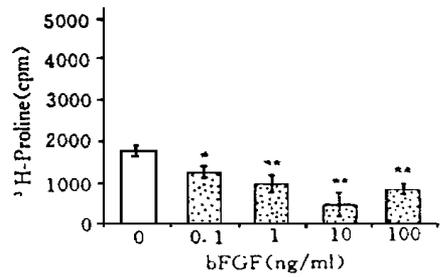


图 3 第 5 天时不同剂量 bFGF 对人胚成骨样细胞 ³H-Proline 掺入量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

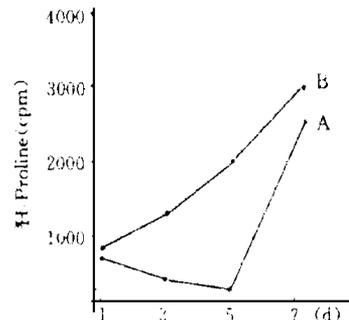


图 4 各实验期 10 ng/ml bFGF 对人胚成骨样细胞 ³H-Proline 掺入量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

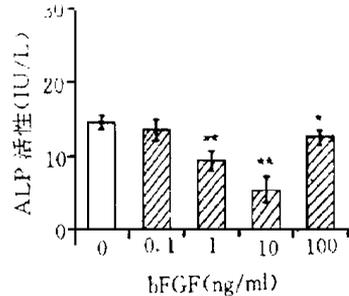


图 5 第 5 天时不同剂量 bFGF 对人胚成骨样细胞 ALP 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

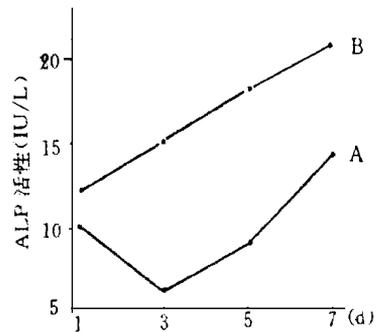


图 6 各实验期 10 ng/ml bFGF 对人胚成骨样细胞 ALP 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

FGF 最初从牛垂体中提取, 对 BALB/C3 T3 等成纤维细胞具有明显的生长促进作用, 并因此而命

名²。FGF 可分为两种关系密切, 作用于共同受体和具有高度结构同源性(55%)的碱性和酸性成纤维细胞生长因子(bFGF 和 aFGF)。二者的靶细胞主要为来源于中胚层衍生的细胞, 起着形态发生因子和促有丝分裂作用^{3,4}。bFGF 存在人和牛骨组织中。牛骨中, 有两种活性的 bFGF, 可分别用 1.5 mol/L 和 1.7 mol/L 氯化钠从肝素-葡萄糖色谱层析柱上洗脱。成年牛骨中, 后一种 bFGF 含量丰富, 而胎牛颌骨中前一种 bFGF 则更多⁵。培养的牛骨细胞能合成 bFGF 并贮存在细胞外基质中, 从骨细胞培养中提取的 bFGF 浓度比 aFGF 高出 10 倍⁶, 可见 bFGF 对骨细胞的作用比 aFGF 更为重要。

本实验发现, bFGF 可明显促进人胚成骨样细胞的 DNA 合成, 但却抑制其胶原蛋白和碱性磷酸酶的合成, 表明 bFGF 对人胚成骨样细胞具有双重效应。bFGF 的作用特点与胰岛素样生长因子(IGF-II)相似⁷, 含量为 0.1~10 ng/ml, 呈剂量依赖性。在人胚成骨样细胞培养 3, 5 d 后, 10 ng/ml bFGF 的作用最强, 7 d 后, bFGF 对 DNA 合成的促进作用及抑制胶原蛋白、碱性磷酸酶合成的作用都基本消失。这可能与 bFGF 长时间作用后, 生长因子的下行调节(down-regulation)机制有关。上述结果说明, bFGF 对骨形成的作用仅在于刺激成骨细胞的增殖, 而对成骨细胞的功能却表现为抑制作用, 提示 bFGF 在骨形成中并不起主要作用, 仍需与其它细胞生长因子协同作用。

从已建立的成肌细胞株的实验⁸证实, bFGF 可减少磷酸肌酸激酶及肌纤维蛋白 mRNA 的合成, bFGF 抑制细胞分化的作用有益于维持成肌细胞尽快增殖, 防止它们进入分化的终末阶段。因此, 作者推测在成骨细胞分化功能受到抑制的情况下,

bFGF 能促进成骨细胞的增殖, 这可能是 bFGF 参与调节骨形成的一种机制。此外, bFGF 是具有广泛生物学效应的生长因子, 它可通过作用于成纤维细胞, 在骨修复过程中与成骨细胞一起参与骨形成, 并可诱导间充质细胞分化, 进而刺激血管长入, 以增强成骨作用。对 bFGF 的这些作用还有待进一步研究证实。

4 参考文献

- 1 田卫东, 王大章 生长因子网络调节对骨形成作用的研究 I. TGF-β对人胚成骨样细胞增殖及分化的影响 华西口腔医学杂志, 1998, 16: 65
- 2 Gospodarowicz D. Localization of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature*, 1974, 249: 124
- 3 Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L et al. Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr Rev*, 1987, 8: 95
- 4 Neufeld G, Gospodarowicz D, et al. Basic and acidic fibroblast growth factor interacts with the same cell surface receptor. *J Biol Chem*, 1986, 261: 5631
- 5 Hauschka PV, Murrain AE, Iatrati MD, et al. Growth factor in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-sepharose. *J Biol Chem*, 1986, 261: 12665
- 6 Globus RK, Plovet J, Gospodarowicz D, et al. Cultured bovine cells synthesize basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta. *Endocrinology*, 1989, 124: 1539
- 7 田卫东, 王大章 生长因子网络调节对骨形成作用的系列研究 II. IGF-II 对人胚成骨样细胞增殖及分化的影响 华西口腔医学杂志, 1998, 16: 69
- 8 Wice B, Milbrandt J, Glaser L, et al. Control of muscle differentiation in BC3 H/cells by fibroblast growth factor and vanadate. *J Biol Chem*, 1987, 262: 1810

(1998-05-26 收稿)

The Effects of bFGF on the Proliferation and Differentiation of Human Osteoblast-like Cells

Tian Weidong, Wang Dazhang, Qiao Ju, et al

College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

Abstract

Objective: To study the effects of basic fibroblast growth factor(bFGF) with different concentration on the DNA, collagen and ALP activity of osteoblast-like cells isolated from embryonic human calvarium. **Methods:** Four experiment groups, each with 6 pores, were divided with 4 gradient concentration of bFGF (0.1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml and 100 ng/ml), then the incorporation of ³H-TdR, ³H-Proline and ALP activity of osteoblast-like cells was measured after 1 day, 3 days, 5 days and 7 days

Results: bFGF stimulated DNA synthesis of osteoblast-like cells, and suppressed the synthesis of collagen and alkaline phosphatase. The diverse directions of their effects on osteoblast-like cells appeared to be due to the difunction nature of bFGF. Its effect was the strongest for proliferation and differentiation of osteoblast-like cells, when the concentration was 10 ng/ml. **Conclusion:** The function of bFGF may be modified by other local growth factors of bone formation.

Key words: bFGF human osteoblast-like cells proliferation and differentiation

局部注射地塞米松预防下颌阻生智齿 拔除术后面部肿胀的临床观察

田洪君 杨淑琴

下颌阻生智齿拔除术后的开口困难、局部肿胀及疼痛是其常见并发症。因此,对预防阻生智齿拔除术后并发症的研究已成为口腔外科的研究课题之一。作者对80例局部注射地塞米松预防下颌阻生智齿拔除术后并发症取得了一定疗效,现报道如下。

1 材料和方法

本组80例患者为1993年7月~1994年9月在华西医科大学附属口腔医院口腔颌面外科门诊确诊需行下颌阻生智齿拔除术又无其它系统疾病的患者。所有病例术前均详细记录:病历号、姓名、性别、年龄、阻生牙部位、类型、局部有无炎症、拔牙方法(翻瓣、劈开、凿骨、增隙、缝合),术中情况(疼痛、断根),手术时间。随机将病例分为实验组和对照组,每组40例。

下颌传导阻滞麻醉后,实验组以地塞米松1ml(5mg)加入2%奴佛卡因(含肾上腺素)2ml稀释混匀后注射于下颌阻生智齿颊侧及远中软组织内。对照组则在相应部位注入含肾上腺素的2%奴佛卡因2ml。

阻生牙拔除后,嘱患者分别于术后24h、48h及72h复诊。复诊时主要观察并记录局部肿胀、疼痛和张口度。

术后肿胀标准采用卡尺测量面颊周径和医生主观评价相结合,将肿胀分为3级。I级:自患侧耳垂下至颞部正中与术前相比增长小于2mm,外观基本正常。II级:自患侧耳垂下至颞部正中与术前比增长2~12mm,外观肿胀明显。III级:自患侧耳垂下至颞部正中与术前比增长大于12mm,外观肿胀严重。

张口度用游标卡尺测量,以患者上下中切牙间距离为标准,大于20mm为I度,10~20mm为II度,小于10mm为III度。疼痛和吞咽痛依患者自诉轻、中、重分为I~III度。

2 结果

将两组病例48h复诊检查结果分别按I、II、III级统计,并行秩和检验作统计学分析,结果见表1。实验组和对照

组阻生智齿拔除术后面部肿胀分级经统计学处理有显著性差异($P < 0.05$),两组术后开口度和疼痛分级无显著性差异($P > 0.05$)。

表1 两组患者术后面部肿胀、开口度和疼痛分级

| 评价 分级 | 面部肿胀 | | 开口度 | | 疼痛 | |
|----------|------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 实验组 | 对照组 | 实验组 | 对照组 | 实验组 | 对照组 |
| I | 26 | 7 | 30 | 26 | 25 | 22 |
| II | 10 | 25 | 6 | 8 | 7 | 9 |
| III | 4 | 8 | 4 | 6 | 8 | 9 |

3 讨论

地塞米松可在不同程度上减轻手术后局部肿胀,但对阻生智齿拔除术后开口困难和疼痛无明显预防效果。因为术后开口困难及疼痛与多种因素有关,但由于局部肿胀的减轻,开口困难和疼痛随之也会有所好转。

阻生牙拔除术后肿胀与拔牙方法、拔牙难度、操作时间、创伤大小有直接关系,同时也与患者年龄、身体状况等有关。拔牙肿胀多见于阻生位置低、操作较困难、创伤较大的手术。肿胀多发生在术后第二天。一般在术后24~48h,肿胀最重,以后逐渐消退。局部肿胀最明显的部位多位于颊部与第一磨牙相对处,肿胀范围常以此为中心扩大。术后肿胀常伴有不同程度的开口困难及疼痛,局部淋巴结肿大,吞咽疼痛等症状。如继发感染,可伴中性粒细胞升高及其他感染征象。多数学者认为,拔牙后肿胀程度与开口困难、疼痛三者间呈正相关,如肿胀减轻,开口困难、疼痛等症状将随之减轻。作者认为,术后肿胀、开口困难、疼痛之间并不一定正相关。

(1998-06-23收稿,1998-08-11修回)

作者单位:610041 华西医科大学附属口腔医院口腔颌面外科(田洪君),江苏省中医院口腔科(杨淑琴)