

原代培养成骨细胞烟碱型乙酰胆碱受体 $\alpha 1$ 亚基 免疫阳性物质表达的初步研究

车晓霞* 白玉兴 郭杰¹ 李小玉²

(首都医科大学附属口腔医院正畸科, 北京 100050; ¹ 山东大学口腔医院正畸科, 济南 250012; ² 四川大学华西口腔医学院, 成都 610041)

摘要 采用原位杂交和免疫细胞化学的方法检测原代培养的 SD 大鼠成骨细胞烟碱型乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptor, nAChR) $\alpha 1$ 亚基的表达, 结果显示 nAChR $\alpha 1$ 亚基 mRNA 和蛋白质在原代培养的 SD 大鼠成骨细胞上呈阳性表达, 提示骨内可能存在胆碱能神经和突触样结构, 调控骨组织的各种生理活动。

关键词 大鼠; 细胞培养; 成骨细胞; 烟碱型乙酰胆碱受体

骨是高度神经化组织, 骨组织发育、生长和改建等活动都受到神经系统调控^[1,2]。从解剖的角度, 骨神经的三种特征: 在动脉壁的中层和外膜之间形成神经网; 围绕毛细血管周围生长; 终止于实质内^[3]。

神经系统通过不同递质调节骨组织的代谢活动, 应用间接免疫荧光技术及免疫组织化学技术, 发现肽能神经在骨中广泛分布^[4], 在代谢活跃的部位如骨膜、干骺端及骺板附近最多。这些肽能神经主要与血管伴行, 有少数游离神经末梢伸出并止于骨膜衬里细胞层、骨髓细胞团等, 其作用的靶细胞为骨内成骨细胞和破骨细胞^[5,6]。

烟碱型乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptor, nAChR) 是典型的配体门控型离子通道受体, 位于细胞膜, 在与乙酰胆碱结合的数毫秒内引起细胞膜的电位变化, 形成动作电位或使膜超极化, 产生相应的靶细胞效应。传统观点认为 nAChR 包括两种类型, 肌肉型表达在神经肌接头, 神经型表达在中枢或外周神经系统。但有研究发现, 在应力感知细胞(耳蜗和前庭迷路)中表达 nAChR 的 $\alpha 9$ 和 $\alpha 10$ 亚基, 不属于传统的分类^[7], 骨组织亦为应力承载机构, 但目前尚未见到骨细胞上拥有 nAChR 的报道。

1 材料与方法

1.1 原代成骨细胞体外培养及鉴定

1.1.1 材料 F12 培养基(Gibco BRL); 胰蛋白酶

(Gibco BRL); 新生小牛血清(杭州四季青); L-多聚赖氨酸, 青、链霉素, EDTA, PBS, D-Hank's 液(Sigma); 兔抗鼠骨钙素多克隆抗体(武汉博士德)及免疫组织化学试剂盒(福州迈新)。

1.1.2 成骨细胞的原代培养 选用 SD 大鼠 3~5 天乳鼠(北京维通利华实验动物技术有限公司提供), 清洗消毒, 在无菌条件下分离颅盖骨, PBS 洗涤后剪碎至 0.5~1 mm 左右, 均匀放置于 25 ml 培养瓶中, 加入 3 ml 含 20% 小牛血清的 F12 培养基, 置 37 °C 5% 的 CO₂ 培养箱中培养。

5 天后见梭形细胞游出, 换液。待细胞铺满培养瓶底部 80% 时, 去除碎骨片, 加入 0.25% 胰蛋白酶消化收集细胞, 加入完全 DMEM 培养液, 采用差速贴壁法纯化成骨细胞, 即将上述细胞悬液按 10⁵ 个/ml 接种于培养瓶中, 每 20 min 吸取培养液加入到另一新的培养瓶中, 重复 2 次。最后以 5 × 10⁴ 个/ml 接种于培养瓶中, 继续培养、传代。本研究中所有实验中所用细胞均为第 3 代成骨细胞。

1.1.3 原代培养成骨细胞的鉴定 将第 3 代成骨细胞铺于备有 1 cm² 盖玻片的 24 孔板底, 3 天后细胞生长至 60% 后, 取出玻片, 采用 SP 法进行免疫细胞化学实验, 兔抗鼠骨钙素多克隆抗体稀释比例为 1:100 (V:V), 以成肌细胞作为阴性对照。

1.2 成骨细胞 nAChR $\alpha 1$ 亚基 mRNA 原位杂交

收稿日期: 2005-05-24 接受日期: 2005-08-08

* 通讯作者。Tel: 010-67099221, Fax: 010-67099310, E-mail: chexiaoxia@163.com

表达及 nAChR 免疫组化定位

1.2.1 材料 nAChR $\alpha 1$ 亚基原位杂交试剂盒(武汉博士德), 包括胃蛋白酶, 预杂交液, nAChR 寡核苷酸探针杂交液, 封闭液, 生物素化鼠抗地高辛, SABC-POD 及生物素化过氧化物酶; 兔抗鼠 nAChR $\alpha 1$ 亚基多克隆抗体(武汉博士德)及免疫组织化学试剂盒(福州迈新)。多聚甲醛, DEPC, 20% 甘油, 缓冲液, 原位杂交用 PBS 等。

1.2.2 原位杂交检测成骨细胞 nAChR $\alpha 1$ 亚基 mRNA 表达 针对大鼠 nAChR $\alpha 1$ 亚基的多项寡核苷酸探针序列为: (1) 5'-CGAAC ATGAG ACGCG TCTGG TGGCA AAGCT-3'; (2) 5'-GACGG CTCTG TGGTG GCCAT TAACC CGGAA-3'; (3) 5'-GGATC ACATC CTCCT CGGAG TCTTC ATGCT-3'。将第 3 代成骨细胞接种在载玻片上生长, 待生长至 60% 后, 进行 nAChR $\alpha 1$ 亚基的原位杂交实验, 其程序按照试剂盒说明书进行。

1.2.3 成骨细胞 nAChR $\alpha 1$ 亚基免疫组化定位 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min 后, 采用 SP 法进行免疫组织化学染色。兔抗人 nAChR $\alpha 1$ 亚基的多克隆抗体稀释度为 1:200 (V:V)。生物素标记的山羊抗兔多克隆抗体稀释度为 1:200 (V:V)。实验过程与骨钙素的免疫组化实验相同, 以 PBS 替代一抗作为阴性对照, 以成肌细胞作为阳性对照。

2 结果

2.1 原代培养成骨细胞形态学观察及鉴定

新鲜植块培养 3~7 天后, 植块周围有细胞长出, 呈长梭形, 随培养时间延长而逐渐呈多角形或菱形, 细胞核为圆形, 多有 1 个核仁, 也有 2~3 个的。骨钙素免疫细胞化学染色显示阳性细胞胞浆呈棕黄色, 经苏木精复染后细胞核呈蓝色(图 1, 图 2)。

2.2 nAChR mRNA 表达的原位杂交检测

原位杂交实验显示原代培养的成骨细胞 nAChR $\alpha 1$ 亚基 mRNA 呈阳性反应(图 3, 图 4), 细胞浆着色呈棕黄色, PBS 代替探针的阴性对照实验(图 5)结果未见阳性杂交信号。

2.3 nAChR $\alpha 1$ 亚基免疫组化检测

原代培养的成骨细胞 nAChR $\alpha 1$ 亚基免疫细胞化学反应染色结果显示细胞膜和细胞浆呈棕黄色, 苏木精复染后细胞核呈蓝色的阳性反应(图 6, 图 7), 未加一抗的替代对照(图 8)呈阴性。成肌细胞

可见细胞膜呈棕黄色阳性对照。

3 讨论

很多实验证明骨组织的生长发育和代谢活动受到神经组织调控。在年轻大鼠, 下齿槽神经切除使下颌骨骨膜中细胞分裂减少^[8], 下颌骨生长不足造成长度显著减小。很多神经肽可以作为信号分子作用于骨细胞^[9-11], 提示外周神经在骨生长和代谢中发挥作用。

以往的观点认为 nAChR 存在于神经和肌肉组织中, 但 Romano 等^[12]通过实验发现在肌腱和骨膜发育的早期表达 nAChR $\alpha 7$ 亚基, 我们的实验证实 nAChR $\alpha 1$ 亚基存在于原代培养的成骨细胞上, 提示胆碱能神经对骨生理活动可能存在的调控作用。

据目前所知, 所有与生物活动有关的乙酰胆碱受体特性都是在与乙酰胆碱结合时引起的, 乙酰胆碱是最早被鉴定的神经递质, 广泛分布在中枢神经系统和外周神经系统及神经肌接头处, 以突触的形式在神经和肌肉间传递电信号。Zhang 等^[13]认为骨内存在电信号传递, 而且从解剖结构上讲纤细的环状神经终止于骨髓实质细胞与骨内膜接触的成骨细胞周围^[14], 提示骨组织内可能存在类似的突触结构, 以 Ach-nAChR 形式引起细胞兴奋, 传递电信号, 在细胞水平影响骨组织的结构和代谢, 这或许是非肽能神经对骨组织生长发育的一种调控方式。

另一个支持骨内可能存在胆碱能神经调控的实验依据是成骨细胞表达乙酰胆碱酯酶^[15], 尽管研究认为 AChE 是一种新的非胶原性骨基质蛋白, 调节细胞和基质间的相互作用^[16], 但不能否定乙酰胆碱酯酶通过水解乙酰胆碱而终结胆碱能神经递质这一最经典的作用功效。

具有启发意义的是 Dan 等^[17]曾报道过肌纤维自身在受到乙酰胆碱刺激时可自发地量子化释放乙酰胆碱, 如果进行更大胆的猜测, 是否骨内细胞也会具有相同的功能? 但最重要的是获得直接的实验证据说明在骨内存在乙酰胆碱, 存在的突触样的结构以及骨细胞是一种可兴奋细胞, 这些问题值得进一步探讨。

从生理功能上来讲, nAChR 是一种离子通道受体, 在与乙酰胆碱相结合后构象发生变化, 其偶联的离子通道开启, 细胞膜两侧离子浓度梯度变化而导致膜去极化, 产生细胞膜上的动作电位及细胞内外钙离子浓度的变化, 从而产生多种细胞效应, 这

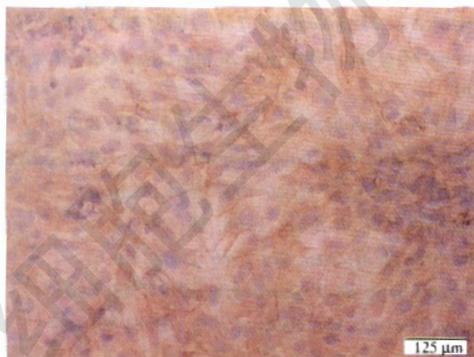


图1 成骨细胞骨钙素免疫细胞化学染色(100 ×)



图5 原位杂交检测成骨细胞 nAChR mRNA 的表达阴性对照(400 ×)



图2 成骨细胞骨钙素免疫细胞化学染色(400 ×)

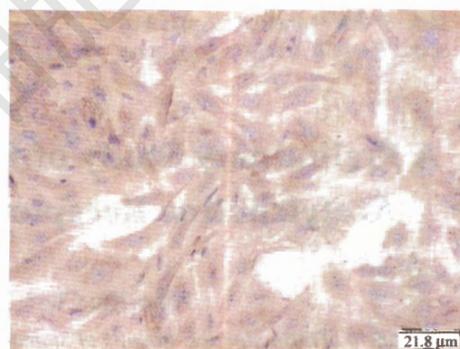


图6 成骨细胞 nAChR 免疫细胞化学染色(100 ×)

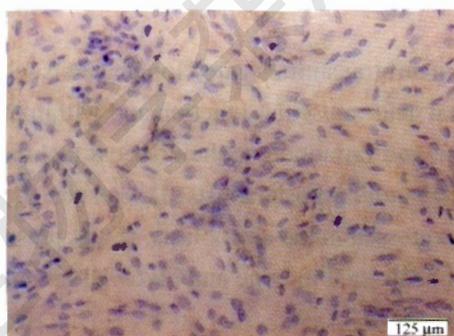


图3 原位杂交检测成骨细胞 nAChR mRNA 的表达(100 ×)

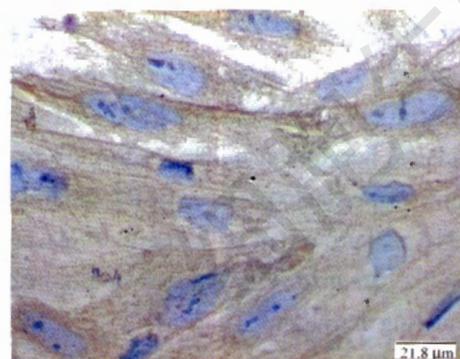


图7 成骨细胞 nAChR 免疫细胞化学染色(400 ×)

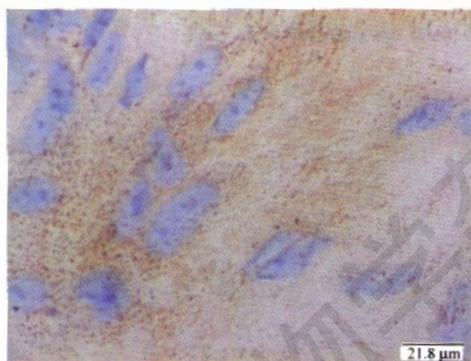


图4 原位杂交检测成骨细胞 nAChR mRNA 的表达(400 ×)



图8 成骨细胞 nAChR 免疫细胞化学染色阴性对照(400 ×)

可能与骨组织生长发育及矿化相关。

重症肌无力是一种自身免疫疾病，在患者血液中存在非正常的乙酰胆碱受体的抗体，竞争性阻断乙酰胆碱与其受体的结合而导致肌肉瘫痪。成骨细胞上存在的乙酰胆碱受体同样是乙酰胆碱受体抗体的结合位点，因而这种疾病应该在骨组织中也有所表现，但对于这一点似乎还没有引起学者和医生的关注。

参考文献 (References)

- [1] Chenu C. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 2004, **4**: 132
- [2] Artico M *et al. Int J Mol Med*, 2002, **10**: 77
- [3] 秦煜等 *中华骨科杂志*, 2002, **22**: 118
- [4] 苗军等 *国外医学内分泌学分册*, 2001, **21**: 322
- [5] Togari A *et al. J Neurosci Lett*, 1997, **233**: 125
- [6] Ransjo M *et al. J Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **274**: 400
- [7] Millar NS. *Biochem Soc Trans*, 2003, **31**: 869
- [8] Bunch WH *et al. Clin Orthop Relat Res*, 1977, **122**: 333
- [9] Hill EL *et al. Cell Tissue Res*. 1991, **264**: 469
- [10] Hara-Irie F *et al. Bone*, 1996, **18**: 29
- [11] Imai S *et al. Microsc Res Tech*, 2002, **58**: 61
- [12] Romano SJ *et al. J Neurochem*, 1997, **68**: 640
- [13] Zhang D *et al. Ann Biomed Eng*, 1998, **26**: 644
- [14] Ficat RP *et al. Necrosis of the Femoral Head*. In: Hungerford DS (ed.) *Ischemia and Necroses of Bone*, Baltimore: Williams and Wilkins, 1980, 171
- [15] Grisaru D *et al. Mol Cell Biol*, 1999, **19**: 788
- [16] Genever PG *et al. Bone*, 1999, **24**: 297
- [17] Dan Y *et al. Nature*, 1992, **359**: 733

A Preliminary Study of Expression of $\alpha 1$ Subunit of Nicotinic Acetylcholine Receptors in Primary Cultured Osteoblasts

Xiao-Xia Che*, Yu-Xing Bai¹, Jie Guo¹, Xiao-Yu Li²

(Department of Orthodontics, Faculty of Stomatology, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100050 China;

¹Department of Orthodontics, Faculty of Stomatology, Shandong University, Jinan 250012, China;

²Department of Orthodontics, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract Nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are neurotransmitter-gated ion channels which were traditionally considered that often expressed at the vertebrate skeletal neuromuscular junction and within the central and peripheral nervous systems. In this study *in situ* hybridization and immunocytochemical technique were used to probe into the expression of $\alpha 1$ subunit of nAChRs in primary cultured osteoblasts. The results showed that both mRNA and protein of $\alpha 1$ subunit of nAChRs were positively expressed in the osteoblasts. It was presumed that structures like synapse at the skeletal neuromuscular junction might be existed in bone and involved in bone growth and remodeling activities.

Key words rat; osteoblast; nicotinic acetylcholine receptors

Received: May 24, 2005 Accepted: August 8, 2005

*Corresponding author. Tel: 86-10-67099221, Fax: 86-10-67099310, E-mail: chexiaoxia@163.com