尼古丁对兔成骨细胞生物学性能的影响及维生素C的拮抗作用

沈 跃[1] 程少文[1] 聂鹏飞[1] 应晓洲[1] 柳海晓[1] 陈庆玉[1]
程小杰[1] 徐华梓[1] 彭 磊[1,2]* 张 宇[1]*
([1]温州医学院附属第二医院骨外科, 温州 325000; [2]海南医学院附属医院创伤中心, 海口 570206)

摘要 为了探究不同浓度尼古丁对体外细胞增殖分化的影响以及维生素C对尼古丁的生物学作用的影响, 该文以兔成骨细胞为实验材料, 对细胞增殖和各项分化指标进行了检测。MTT结果显示: 与空白对照组相比, 1×10^{-6}, 1×10^{-5} mmol/L尼古丁组有促细胞增殖的作用, 但是高浓度尼古丁(1 mmol/L)组对细胞增殖有明显的抑制作用。RT-PCR检测发现: 用低浓度尼古丁处理细胞, *ALP*、*COLI*和*OCN*的基因表达上调; 相反, 高浓度尼古丁下调了细胞*ALP*、*COLI*和*OCN*的表达。ALP染色和Von Kossa钙结节染色也显示出高浓度尼古丁对成骨细胞的毒性作用。加入维生素C后, 1 mmol/L尼古丁组对成骨细胞增殖和各基因表达的影响有所改善, 类似的结果也见于ALP染色和Von Kossa染色。由此证实, 极低浓度尼古丁对成骨细胞确有促进增殖、增强ALP活性和上调*ALP*、*COLI*、*OCN*基因表达的作用; 但是, 高浓度尼古丁却有相反的作用, 抑制成骨细胞的增殖和分化。同时, 维生素C具有部分拮抗高浓度尼古丁对成骨细胞毒性作用的能力。

关键词 尼古丁; 维生素C; 成骨细胞; 增殖; 分化

据报道, 吸烟与一些骨科慢性疾病相关, 例如背部疼痛和椎间盘退变[1-3]。骨质疏松是一种常见的骨代谢疾病, 越来越引起人们的重视[4]。虽然吸烟被认为是导致骨质疏松的一个重要原因, 相关临床报道见Daniell[5]、Aloia等[6]、Jensen等[7]和Riggs等[8]的研究结果, 而且尼古丁被认为是香烟中一种有效的物质, 但是微量尼古丁对骨质疏松的影响尚存在争议。Porter等[9]的研究发现, 低浓度范围的尼古丁能够增强成骨细胞的代谢活性, 酶活性和胶原合成都呈剂量依赖性增加, 这意味着可能是香烟中的其它成分对骨骼肌肉产生了有害的作用, 而不是尼古丁导致。究竟尼古丁和成骨细胞有着怎么样的关系呢?

已有研究涉及到维生素C在骨代谢中的调控作用。在一次针对妇女的健康调查回顾分析中发现, 相对于单独使用雌激素, 增加维生素C的妇女的所有部位的骨矿物质密度都明显地增加[10]。在绝经的妇女中, 骨质疏松是临床上常见的疾病。C端肽是骨吸收的重要标志物之一, 摄入高水平维生素C可以降低C端肽的水平[11], 同时, 低水平的维生素C摄入增加了骨损失的比率[12]。有学者实验发现缺乏一种维生素C产生的必需酶的老鼠会在早期发生自发性骨折, 也显示维生素C可诱导胚胎干细胞分化为成骨细胞[13]。继而推测维生素C对骨质疏松有一定的疗效, 对成骨细胞也具有有利的作用。鉴于前期已有报道高浓度尼古丁对成骨细胞的毒性作用, 我们通过比较细胞增殖, 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、I型胶原(collagen type I, COLI)、骨钙素(osteocalcin, OCN)的表达等方面的差异来评估不同浓度尼古丁和高浓度尼古丁+维生素C对成骨细胞的不同影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料和仪器

1.1.1 实验材料 怀孕日本大耳白兔(温州医学院实验动物中心), 尼古丁(Wako公司, 日本), 胰酶、DMEM培养基、MTT试剂(Gibco公司), 焦碳酸二乙酯(diethylpyrocarbonate, DEPC)、PBS、胎牛血

收稿日期: 2011-09-24 接受日期: 2011-11-28
海南省卫生厅(No.2011-34)、温州市科技局(No.Y20070133)和浙江省卫生厅医药卫生研究基金(No.2007B147)资助项目
*通讯作者。Tel: 0577-88832693, E-mail: xiaobo197518@163.com; Tel: 0577-86689747, E-mail: wenzhouzhangyu@163.com

清(Hyclone公司), 抗坏血酸、对硝基苯磷酸(PNPP)(Sigma公司), 二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)(Amresco公司), ALP检测试剂盒(北京柏定生物工程有限公司), 一次性25 cm^2培养瓶、24孔培养板、96孔酶标板(Nunc), RT-PCR试剂盒(日本TaKaRa公司), 引物合成(上海生工生物工程技术服务有限公司)。

1.1.2 主要仪器 二氧化碳培养箱(Hereaus, BB16UV/BB5060UV), Olympus倒置显微镜(日本OLYMPUS公司), 全自动酶标仪(ELX 800, 美国Bio-Tek公司)。

1.2 方法

1.2.1 成骨细胞的分离与培养 取出生1 d的日本大耳白兔处死后立即投入体积分数为75%的酒精中消毒, 无菌操作取出颅盖骨, 放入盛有无菌PBS液的培养皿中, 尽量去除骨膜和周围的结缔组织。在无菌条件下, 用无菌PBS液洗2次后, 将颅盖骨剪成约1 mm×1 mm大小的骨碎块。将骨碎块均匀地铺于培养瓶, 4 h后加入含有10% FBS的DMEM培养基, 置于37 ℃、5% CO_2的培养箱中。当组织骨块周围已长出足够多细胞时, 取出骨块并换液。待细胞铺满瓶底80%后弃培养液, 加入2.5 g/L的胰酶2 mL, 待细胞变圆后倒掉胰酶, 加入DMEM培养基(含10% FBS)终止消化, 吹打并进行传代, 以1:2接种到25 cm^2的细胞培养瓶中传代。取第3代的细胞进行实验。

1.2.2 细胞增殖检测(MTT法) 实验分为4组, 即对照组、1×10^{-6} mmol/L尼古丁组、1×10^{-5} mmol/L尼古丁组和1 mmol/L尼古丁组。取兔成骨细胞消化后, 用含10% FBS的DMEM培养基配制并接种到4块96孔培养板中, 每孔加入约1×10^4个细胞。按实验分组换入含0, 1×10^{-6}, 1×10^{-5}, 1 mmol/L尼古丁的含10% FBS的培养液, 每组12孔。置于37 ℃、5% CO_2及饱和湿度的培养箱中培养, 每48 h换液1次, 分别于培养的第1, 4, 7, 14 d在每孔中加入MTT溶液(5 mg/mL)20 μL, 在培养箱中继续培养4 h, 然后小心吸弃孔内培养液, 每孔加入DMSO 200 μL, 在室温下放置并振荡20 min, 充分溶解结晶物并混匀。选择490 nm波长, 在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值(*D*), 记录结果。*D*值代表细胞的增殖情况, 细胞增殖能力被促进得越强, *D*值越大, 反之*D*值越小。

另取1块96孔培养板作为1 mmol/L尼古丁+0.5 mmol/L维生素C实验组, 接种细胞共计48孔, 分别于培养的第1, 4, 7, 14 d进行上述操作, 每次12孔, 测定*D*值。

1.2.3 ALP活性检测 用PNPP偶氮法检测ALP活性。取培养好的第3代兔成骨细胞, 方法及分组同上, 每组12孔。于第10天, 弃培养液, PBS洗2遍, 加入0.2% Triton X-100后4 ℃过夜。取40 μL细胞裂解产物与100 μL反应底物37 ℃避光孵育30 min, 加0.4 mol/L NaOH 100 μL终止反应, 用酶标仪于405 nm波长下测定*D*值, 按照样品*D*值在ALP标准曲线上读取酶活性值。

1.2.4 逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)检测*ALP*、*COLI*和*OCN*基因的相对表达 取培养至第3代的兔成骨细胞, 方法及分组同上。在第7天和第14天应用Trizol法提取细胞总RNA, 应用RT-PCR扩增目的基因后, 1%琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯激发光成像。25 μL反应体系包括: 12.5 μL SYBR Premix Ex Taq(2×)、2 μL cDNA、9.5 μL dH_2O、上游和下游引物各0.5 μL。PCR反应和循环条件: 94 ℃, 30 s; 53 ℃, 30 s; 72 ℃, 30 s; 共40个循环。上、下游引物设计用Primer 5软件完成, *ALP*的上、下游引物分别为5'-CGC AGG CAA TGC TTT TCG-3'和5'-CGG GGT CAC TGG TAT CGT TCT-3'; *COLI*的上、下游引物分别为5'-GCT TCT CAT TCT CAT GGA TG-3'和5'-GCA GCA ATG ACA ACA AGA C-3'; *OCN*的上、下游引物分别为5'-GAC ACC ATG AGG ACC CTC TC-3'和5'-GCC TGG TAG TTG TTG TGA GC-3'。管家基因*GAPDH*的上、下游引物分别为5'-GCC TGG TCA CCA GGG CTG C-3'和5'-TGC TAA GCA GTT GGT GGT GCA-3'。

1.2.5 ALP染色和Von Kossa染色 ALP染色: 采用第3代成骨细胞, 于24孔培养板中培养10天, 采用南京建成碱性磷酸酶染色试剂盒进行ALP染色。细胞核染为红棕色, ALP阳性细胞胞浆为蓝色。Von Kossa染色: 取第3代成骨细胞, 24孔板培养21天, 弃培养液, PBS冲洗2~3次, 4%多聚甲醛固定5 min, 去离子水洗2~3次。5% $Na_2S_2O_3$溶液孵育30 min。加入1% $AgNO_3$溶液, 在紫外灯下照射30 min。弃残留$AgNO_3$溶液, 去离子水洗3次; 继续用5% $Na_2S_2O_3$溶液染色2 min, 中和残留的$AgNO_3$溶液。吸出残液, 1%中性红复染10 min, 去离子水漂洗3次, 室温下晾干, 置4 ℃保存。

1.3 统计学方法

数据以均数±标准差表示, 采用SPSS 15.0统计

分析软件对数据进行处理。组间的差异是否有统计学意义采用方差分析, 与对照组比较时采用*t*检验, 当$P<0.05$时, 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 培养成功的兔成骨细胞形态观察(本实验采用第3代成骨细胞)

根据上述方法分离并培养兔成骨细胞, 48~72 h后骨组织块周围出现细胞, 镜下形态呈纺锤形、多边形、类梭形, 实验用细胞为第3代。

2.2 尼古丁对细胞增殖的影响及维生素C的拮抗作用(MTT比色实验)

通过对0, 1×10^{-6}, 1×10^{-5}, 1 mmol/L尼古丁处理组进行MTT比色分析, 在1, 4, 7, 14 d以均数±标准差制作表1。结果显示: 1×10^{-6} mmol/L尼古丁组和1×10^{-5} mmol/L尼古丁组对体外培养的兔成骨细胞有促增殖作用, 在第7天和第14天时与对照组相比差异有统计学意义($P<0.05$), 且随着尼古丁浓度的增加, 细胞数也随着增加; 相反, 高浓度尼古丁(1 mmol/L)组*D*值呈下降趋势, 对细胞增殖起抑制作用; 与对照组相比, *D*值下降有显著差异($P<0.01$)。

另外, 0.5 mmol/L维生素C+1 mmol/L尼古丁组对成骨细胞增殖的抑制作用与1 mmol/L尼古丁组相比, *D*值有所上升; 与对照组相比, 差异无统计学意义($P>0.05$), 如表1所示。

2.3 尼古丁对ALP活性的影响(PNPP偶氮法)

实验显示: 第10天1×10^{-6} mmol/L尼古丁组和1×10^{-5} mmol/L尼古丁组ALP的活性与对照组相比明显增高, 有统计学差异($P<0.05$)。而1 mmol/L尼古丁组的ALP值相比对照组有所下降, 差异有统计学意义($P<0.01$)。1 mmol/L尼古丁+0.5 mmol/L维生素C组与空白组相比, ALP值稍有下降, 差异无统计学意义。如表2所示。

表1　不同浓度尼古丁作用与尼古丁+维生素C共同作用后对成骨细胞增殖的影响(于1, 4, 7, 14 d进行检测, $n=12, \bar{x}\pm s$)

Table 1　Effect of nicotine with different concentrations and nicotine+vitamin C on the cell proliferation(analyzed at 1, 4, 7, 14 days, $n=12, \bar{x}\pm s$)

组别 Groups	D_{405}值 D_{405} value			
	1 d	4 d	7 d	14 d
0 mmol/L Nic	0.386±0.031	0.795±0.041	1.251±0.047	1.602±0.055
1×10^{-6} mmol/L Nic	0.413±0.055	0.836±0.038	1.431±0.039*	1.761±0.041*
1×10^{-5} mmol/L Nic	0.412±0.027	0.836±0.045	1.451±0.023*	1.721±0.036*
1 mmol/L Nic	0.361±0.029	0.641±0.036*	0.887±0.029#	1.101±0.042#
1 mmol/L Nic+ 0.5 mmol/L vitamin C	0.376±0.039	0.765±0.041	1.211±0.047	1.565±0.045

*$P<0.05$, #$P<0.01$, 与空白对照组相比。

*$P<0.05$, #$P<0.01$ vs control group.

表2　不同浓度尼古丁分别作用和尼古丁+维生素C共同作用10天后的ALP活性($n=12, \bar{x}\pm s$)

Table 2　ALP activity after treated for 10 days with different concentrations of nicotine and nicotine+vitamin C($n=12, \bar{x}\pm s$)

组别 Groups	ALP活性(*D*值) ALP activity(*D* value)
0 mmol/L Nic	23.269±1.724
1×10^{-6} mmol/L Nic	29.436±1.687*
1×10^{-5} mmol/L Nic	28.062±2.114*
1 mmol/L Nic	11.536±1.572#
1 mmol/L Nic+0.5 mmol/L vitamin C	21.324±2.031

*$P<0.05$, #$P<0.01$, 与空白对照组相比。

*$P<0.05$, #$P<0.01$ vs control group.

2.4 对*ALP*、*COLI*和*OCN*基因表达的影响(RT-PCR)

于第7天和第14天分别检测ALP、COLI和OCN的相对表达量, 统计结果见表3和表4。第7天与对照组相比, 1×10^{-6}, 1×10^{-5} mmol/L尼古丁组的COLI和ALP表达增加, 差异有统计学意义($P<0.05$); 对于OCN的表达, 1×10^{-6} mmol/L尼古丁组与对照组相比有所增高($P<0.05$); 1 mmol/L尼古丁组则显示这三个指标都有被抑制的趋势($P<0.05$)。而加入维生素C的1 mmol/L尼古丁组与对照组相比, ALP、COLI和OCN的相对表达量均有上调。

表3　不同浓度尼古丁分别作用和尼古丁+维生素C共同作用7天后的基因表达情况(n=12, $\bar{x}\pm s$)

Table 3　Genes expression levels after 7 days cultured with different concentrations of nicotine and nicotine+vitamin C(n=12, $\bar{x}\pm s$)

组别 Groups	各基因mRNA相对表达量 mRNA expression levels of different genes		
	COLI *COLI*	*ALP* *ALP*	*OCN* *OCN*
0 mmol/L Nic	3.272±0.241	7.414±0.132	1.621±0.321
1×10^{-6} mmol/L Nic	4.904±0.361*	9.987±0.223*	2.731±0.141*
1×10^{-5} mmol/L Nic	4.538±0.114*	10.213±0.356*	2.421±0.265*
1 mmol/L Nic	2.151±0.221*	4.631±0.083#	0.747±0.172#
1 mmol/L Nic+ 0.5 mmol/L vitamin C	2.983±0.341	7.114±0.231	1.421±0.321

*P<0.05, #P<0.01, 与空白对照组相比。

*P<0.05, #P<0.01 vs control group.

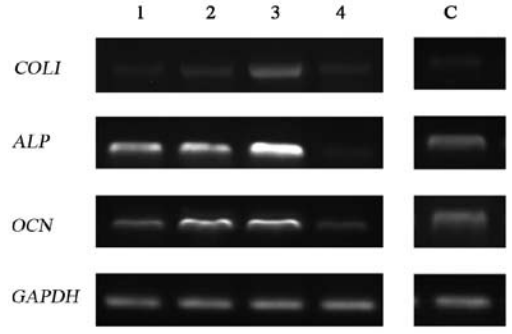
表4　不同浓度尼古丁分别作用和尼古丁+维生素C共同作用14天后的基因表达情况(n=12, $\bar{x}\pm s$)

Table 4　Genes expression levels after 14 days cultured with different concentrations of nicotine and nicotine+vitamin C(n=12, $\bar{x}\pm s$)

组别 Groups	各基因 mRNA相对表达量 mRNA expression levels of different genes		
	COLI *COLI*	*ALP* *ALP*	*OCN* *OCN*
0 mmol/L Nic	2.353±0.215	8.834±0.278	2.521±0.231
1×10^{-6} mmol/L Nic	3.812±0.345*	11.642±0.324*	3.767±0.241*
1×10^{-5} mmol/L Nic	3.552±0.152*	10.712±0.152*	2.865±0.368
1 mmol/L Nic	1.051±0.321#	5.854±0.183#	1.151±0.253#
1 mmol/L Nic+ 0.5 mmol/L vitamin C	1.973±0.311	8.354±0.254	1.634±0.231*

*P<0.05, #P<0.01, 与空白对照组相比。

*P<0.05, #P<0.01 vs control group.



1: 0 mmol/L对照组; 2: 1×10^{-6} mmol/L尼古丁组; 3: 1×10^{-5} mmol/L尼古丁组; 4: 1 mmol/L尼古丁组; C: 1 mmol/L尼古丁+0.5 mmol/L 维生素C组。

1: 0 mmol/L nicotine; 2: 1×10^{-6} mmol/L nicotine; 3: 1×10^{-5} mmol/L nicotine; 4: 1 mmol/L nicotine; C: 1 mmol/L nicotine+0.5 mmol/L vitamin C.

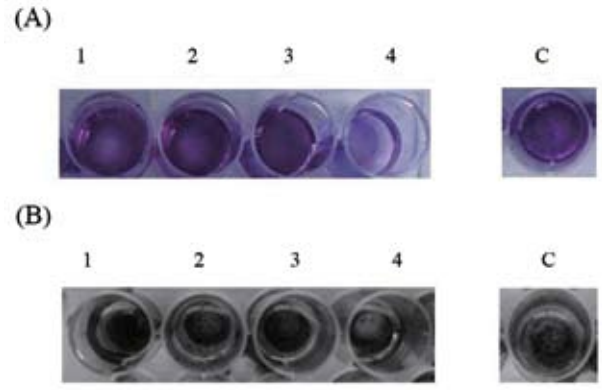
图1　第14天时成骨细胞*ALP*、*COLI*和*OCN*基因mRNA相对表达凝胶电泳图

Fig.1　The expression of *ALP*, *COLI* and *OCN* in osteoblast was detected by electrophoresis at 14th day

第14天时的ALP、COLI和OCN电泳结果如图2所示。显示第14天时, OCN表达较第7天上升, ALP基本持平, 而COLI显著下降。并且对于1×10^{-6}和1×10^{-5} mmol/L尼古丁组, 在一定范围内, ALP和COLI的表达呈现随着尼古丁含量递增而上调的趋势。相反, 1 mmol/L尼古丁组3个指标表达均下调。加入维生素C后的1 mmol/L尼古丁组, 较1 mmol/L尼古丁组上调了ALP和COLI的表达, 但差异均没有统计学意义(P>0.05), 而OCN仍显示低水平表达。

2.5 ALP染色和Von Kossa染色

图2A显示的是0, 1×10^{-6}, 1×10^{-5}, 1 mmol/L尼古丁组和维生素C+1 mmol/L尼古丁组的ALP染色情况。结果发现: 1×10^{-6}, 1×10^{-5} mmol/L尼古丁组阳性率高于空白组, 1 mmol/L尼古丁组有极少量的细胞显示阳性染色, 加入维生素C后, 阳性率有所提高。图2B显示的是Von Kossa钙结节染色情况, 其中, 1×10^{-6}和1×10^{-5} mmol/L尼古丁组有较多的钙化结节形成。



A: 第10天时进行成骨细胞碱性磷酸酶染色; B: 第21天时进行成骨细胞钙结节染色。1: 0 mmol/L对照组; 2: 1×10^{-6} mmol/L尼古丁组; 3: 1×10^{-5} mmol/L尼古丁组; 4: 1 mmol/L尼古丁组; C: 1 mmol/L尼古丁+0.5 mmol/L维生素C组。

A: ALP staining at 10th day; B: Von Kossa staining at 21st day.1: 0 mmol/L nicotine; 2: 1×10^{-6} mmol/L nicotine; 3: 1×10^{-5} mmol/L nicotine; 4: 1 mmol/L nicotine; C: 1 mmol/L nicotine+0.5 mmol/L vitamin C.

图2　碱性磷酸酶染色和Von Kossa钙结节染色

Fig.2　Alkaline phosphatase staining and Von Kossa mineralization nodus staining

3　讨论

香烟产生的烟雾由挥发相和微粒相构成, 分别占约92%和8%。氮化物、氧化物和碳的化合物占了香烟烟雾85%的比重[14]。其中, 已经被证实存在于烟雾中的物质超过4 000种, 并且大部分被证实为

有害物质[15], 而尼古丁便是烟雾中最具生理活性的物质[16]。最近Gullihorn等[17]研究发现: 尼古丁对成骨细胞的代谢活动有直接的刺激作用, 但是含有同等剂量尼古丁的香烟烟雾浓缩物, 却对成骨细胞的代谢有抑制作用, 这和之前Porter等[9]的研究结果相符。在Leslie等[18]的研究中, 对比了烟草烟雾和尼古丁浸润液对成骨细胞的影响, 发现它们产生了完全不同的作用。由此推断, 临床上发生的延迟骨愈合极有可能是由于吸烟病人吸收了烟雾中的其他有害成分, 而不是由于直接吸收尼古丁所导致。所以, 当我们寻找临床上骨质疏松发生的原因时, 必须区分开吸烟因素和尼古丁因素。一种可能的情况是: 导致骨质疏松的是烟雾中其他的有害成分, 而不是尼古丁因素。甚至有可能, 尼古丁有一定程度的刺激成骨作用。事实上, 有关尼古丁对其它细胞种系的促增殖作用已有文献报道, 如软骨细胞[19]、内皮细胞[20]、上皮细胞[21]等, 其中各种实验剂量有所不同。

本实验中, 用MTT法对成骨细胞增殖进行检测, 结果显示1×10^{-6}, 1×10^{-5} mmol/L尼古丁组对体外培养的成骨细胞有促进增殖作用, 14天时与对照组相比, 差异有统计学意义($P<0.05$), 且随着尼古丁浓度的增加, 细胞数呈剂量依赖性增加; 相反, 高浓度尼古丁(1 mmol/L)组对细胞增殖起抑制作用, 与对照组相比, 差异有统计学意义($P<0.01$)。加入维生素C后, 1 mmol/L尼古丁的抑制作用被基本抵消, 细胞数和对照组相比, 差异无统计学意义($P>0.05$)。类似的结果也见于ALP的活性检测(PNPP偶氮法), 这说明尼古丁对成骨细胞的增殖作用呈双向性: 低浓度的尼古丁在一定范围内对成骨细胞增殖和ALP活性有促进作用; 当尼古丁浓度达到1 mmol/L时已经对成骨细胞产生毒性作用。相似的报道也见于前人已做的一些研究, 如Walker等[22]的研究中也发现尼古丁对成骨细胞的增殖有双向性作用。同时他们发现, c-fos和骨桥蛋白OCN结合于成骨细胞表面的α-乙酰胆碱受体(neuronal nicotinic acetylcholine receptor, nAChR)在低浓度尼古丁促进细胞增殖的过程中发挥了作用。另外, 加入维生素C能部分对抗高浓度尼古丁产生的毒性作用。

成骨细胞的主要功能是合成、分泌骨基质并促进基质矿化形成骨组织。成骨细胞分泌COLI、骨结合素(osteonectin, ON)、OCN、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、纤维连接蛋白(fibronectin, FN)及一系列生长因子。体外培养的成骨细胞表现为增殖态和功能态两种相对状态, 按顺序进入增殖期、胞外基质合成期和钙化期。COLI从增殖期开始表达, 基质合成期达到高峰; ALP是成骨细胞分化的早期标志物, 基质合成期开始出现, 钙化期达到高峰; OCN是成骨细胞分化成熟的标志, 钙化早期开始表达, 钙结节成熟后达到高峰, 一般将COLI、ALP、OCN作为成骨细胞功能状态的评价指标[23]。本实验中检测了14天时COLI、ALP和OCN的表达量, 1×10^{-6}, 1×10^{-5} mmol/L尼古丁组与对照组比较, 表达量基本呈剂量依赖性递增, 而且差异具有统计学意义; 7天时, 各种基因表达量从高至低依次为*COLI*、*ALP*和*OCN*, 基本符合上述成骨细胞分化早期物质表达趋势。而14天时, *OCN*的表达明显增加, 表明细胞进入矿化期。1×10^{-6}, 1×10^{-5} mmol/L尼古丁组的*ALP*和*COLI*表达有显著的统计学意义, 这表明尼古丁对成骨细胞骨基质和胶原合成有一定的帮助作用, 但这种作用是在低浓度范围内的; 当尼古丁到达较高浓度时, 对成骨细胞的毒害作用是显而易见的: 不论是增殖状态, 还是COLI、ALP和OCN的表达都呈下降趋势。另外, 14天时, 维生素C的作用尚不能有效拮抗1 mmol/L尼古丁的作用, 这说明维生素C的拮抗作用还是有一定局限性的, 只能短期内部分削减高浓度尼古丁的毒害作用。但是, 本实验尚缺乏动物体内实验的证据, 有待进一步的实验。

越来越多的证据表明低剂量尼古丁对促进成骨细胞增殖和分化有促进作用。之前的研究中, Ramp等[24]的结果显示尼古丁抑制成骨细胞的ALP活性, 但可以促进DNA的表达和细胞增殖, 这与本次实验中尼古丁提高ALP活性的结果不一致。这种差异可能是由于实验对象和实验组的尼古丁处理浓度不同所致。另外, 对于血管内皮细胞, 尼古丁也显示了双向性的作用, 低浓度时上调DNA表达并促进增殖, 见Morris等[25]和Villablanca等[26]的研究。本实验中, 对于高浓度尼古丁的明显毒性作用, 维生素C能表现出一定的对抗毒性作用。在Takamizawa等[27]和Shiga等[28]的研究中, 对此机制进行了部分阐述: 维生素C对成骨细胞增殖和分化的有利影响是通过增加胶原的累积, 并且增加碱性磷酸酶在细胞中的表达实现的。

众所周知, 吸烟人群承受着高水平的氧化应激反应, 并由此产生氧化免疫系统激活带来的损伤。可以预想, 抗氧化剂, 例如维生素C, 可能会对高浓

度尼古丁带来的氧化应激反应有拮抗作用。维生素C又称抗坏血酸, 有报道称, 抗坏血酸是一种氧自由基清除剂并且能够修复淋巴系统的DNA损伤[29]。在Harada等[30]和Franceschi等[31]的研究中, 维生素C对MC3T3-E1的细胞增殖表现出促进作用, 其机制和促进胶原的合成有关。在Carinci等[13]的研究中, 应用DNA micro-arrays检测技术发现, 约有15 000种基因的表达可以通过维生素C进行调节, 维生素C广泛的生物学效应通过以下几个方面实现: (1)细胞生长; (2)细胞代谢; (3)细胞形态变化; (4)细胞死亡; (5)细胞连接。因此, 维生素C对高浓度尼古丁的影响就成为一个值得深入探讨的问题。本实验中, 高浓度尼古丁处理后, 维生素C表现出的对成骨细胞的保护作用和上述研究是一致的。

在最近的研究中, Rothem等[32]第一次证实, 另外给予一定浓度剂量的尼古丁类似物作用于中度吸烟的人群, 发现有促进成骨细胞增殖和加快骨代谢的作用; 将相同剂量尼古丁类似物, 用于重度吸烟的人群, 则产生了相反的作用。这表明低剂量尼古丁甚至可以部分对抗吸烟中其他活性物质对成骨细胞的毒害作用。Rothem等[33]的研究还揭示了尼古丁作用过程中的基因表达变化, 在他最新提出的一种学说中, 低浓度尼古丁和高浓度尼古丁分别作用于成骨细胞膜上的不同种类的nAChR, 产生促成骨细胞增殖分化和基因表达上调的结果, 或者产生相反的抑制和下调的生物作用。这些证据都表明: 低剂量尼古丁对促进成骨细胞增殖分化、提高骨密度、甚至预防骨质疏松都可能存在一定的疗效。综上, 低剂量尼古丁可能成为预防治疗骨质疏松疾病的一种崭新的方法[34]。另外, 对于重度吸烟的人群, 可以建议其通过增加维生素C的摄入, 来部分对抗吸烟对骨质疏松的不良影响。

参考文献 (References)

1 Goldberg MS, Scott SC, Mayo NE. A review of the association between cigarette smoking and the development of nonspecific back pain and related outcomes. Spine 2000; 25(8): 995-1014.

2 Fogelholm RR, Alho AV. Smoking and intervertebral disc degeneration. Med Hypotheses 2001; 56(4): 537-9.

3 Kaila-Kangas L, Leino-Arjas P, Riihimaki H, Luukkonen R, Kirjonen J. Smoking and overweight as predictors of hospitalization for back disorders. Spine 2003; 28(16): 1860-8.

4 Johnell O, Kanis J. Epidemiology of osteoporotic fractures. Osteoporos Int 2005; 16(S2): S3-7.

5 Daniell HW. Osteoporosis and the slender smoker: Vertebral compression fractures and loss of metacarpal cortex in relation to postmenopausal cigarette smoking and lack of obesity. Arch Intern Med 1976; 136(3): 298-304.

6 Aloia JF, Cohn SH, Vaswani A, Yeh JK, Yuen K, Ellis K. Risk factors for postmenopausal osteoporosis. Am J Med 1985; 78(1): 95-100.

7 Jensen J, Christiansen C. Cigarette smoking, serum estrogens and bone loss during hormone replacement therapy early after menopause. N Engl J Med 1985; 313(16): 973-5.

8 Riggs BL, Melton JM. Involutional osteoporosis. N Engl J Med 1986; 314(26): 1676-84.

9 Porter SE, Hanley EN. The musculoskeletal effects of smoking. J Am Acad Orthop Surg 2001; 9(1): 9-17.

10 Morton DJ, Barrett-Connor EL, Schneider DL. Vitamin C supplement use and bone mineral density in postmenopausal women. J Bone Miner Res 2001; 16(1): 135-40.

11 Pasco JA, Henry MJ, Wilkinson LK, Nicholson GC, Schneider HG, Kotowicz MA. Antioxidant vitamin supplements and markers of bone turnover in a community sample of nonsmoking women. J Womens Health (Larchmt) 2006; 15(3): 295-300.

12 Kaptoge S, Welch A, McTaggart A, Mulligan A, Dalzell N, Day NE, *et al*. Effects of dietary nutrients and food groups on bone loss from the proximal femur in men and women in the 7th and 8th decades of age. Osteoporos Int 2003; 14(5): 418-28.

13 Carinci F, Pezzetti F, Spina AM, Palmieri A, Laino G, de Rosa A, *et al.* Effect of Vitamin C on pre-osteoblast gene expression. Arch Oral Biol 2005; 50(5): 481-96.

14 Liu YY, Schmeltz I, Hoffmann D. Chemical studies on tobacco smoke. Quantitative analysis of hydrazine in tobacco and cigarette smoke. Anal Chem 1974; 46(7): 885-9.

15 Rodgman A, Smith CJ, Perfetti TA. The composition of cigarette smoke: A retrospective, with emphasis on polycyclic components. Hum Exp Toxicol 2000; 19(10): 573-95.

16 Russell MA, Jarvis M, Iyer R, Feyerabend C. Relation of nicotine yield of cigarettes to blood nicotine concentrations in smokers. Br Med J 1980; 280(6219): 972-6.

17 Gullihorn L, Karpman R, Lippiello L. Differential effects of nicotine and smoke condensate on bone cell metabolic activity. J Orthop Trauma 2005; 19(1): 17-22.

18 Leslie G, Robert K, Louis L. Differential Effects of Nicotine and Smoke Condensate on Bone Cell Metabolic Activity. J Orthop Trauma 2005; 19(1): 17-22.

19 Gullahorn L, Lippiello L, Karpman R. Smoking and osteoarthritis: Differential effect of nicotine on human chondrocyte glycosaminoglycan and collagen synthesis. Osteoarthritis Cartilage 2005; 13(10): 942-3.

20 Zimmerman M, McGeachie J. The effect of nicotine on aortic endothelial cell turnover. An autoradiographic study. Atherosclerosis 1985; 58(1/2/3): 39-47.

21 Mazhari NJ, Mandal AK, Thusso TK. Carcinogenic effect of nicotine on normal mammary ductal epithelial cells and the protective role of beta carotene. Indian J Pathol Microbiol 2003; 46(1): 24-7.

22 Walker LM, Preston MR, Magnay JL, Thomas PB, El Haj AJ. Nicotinic regulation of c-fos and osteopontin expression in human-derived osteoblast-like cells and human trabecular bone organ culture. Bone 2001; 28(6): 603-8.

23 Yang Zhiming. Basic and clinical research on tissue engineering. Chengdu: Sichuan Science and Technology Publishing Company. 2004, 125.

24 Ramp WK, Lenz LG, Galvin RJ. Nicotine inhibits collagen synthesis and alkaline phosphatase activity, but stimulates DNA synthesis in osteoblast-like cells. Proc Soc Exp Biol Med 1991; 197(1): 36-43.

25 Morris BJ, Hicks AA, Wisden W, Darlison MG, Hunt SP, Barnard EA. Distinct regional expression of nicotinic acetylcholine receptor genes in chick brain. Mol Brain Res 1990; 7(4): 305-15.

26 Villablanca AC. Nicotine stimulates DNA synthesis and proliferation in vascular endothelial cells *in vitro*. J Appl Physiol 1998; 84(6): 2089-98.

27 Takamizawa S, Maehata Y, Imai K, Senoo H, Sato S, Hata R. Effects of ascorbic acid and ascorbic acid 2-phosphate, a long-acting vitamin C derivative, on the proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells. Cell Biol Int 2004; 28(4): 255-65.

28 Shiga M, Kapila YL, Zhang Q, Hayami T, Kapila S. Ascorbic acid induces collagenase-1 in human periodontal ligament cells but not in MC3T3-E1 osteoblast-like cells: Potential association between collagenase expression and changes in alkaline phosphatase phenotype. J Bone Miner Res 2003; 18(1): 67-77.

29 Newman MB, Arendash GW, Shytle RD, Bickford PC, Tighe T, Sanberg PR. Nicotine's oxidative and antioxi-dant properties in CNS. Life Sci 2002; 71(24): 2807-20.

30 Harada S, Matsumoto T, Ogata E. Role of ascorbic acid in the regulation of proliferation in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. J Bone Miner Res 1991; 6(9): 903-8.

31 Franceschi RT, Iyer BS. Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells. J Bone Miner Res 1992; 7(2): 35-46.

32 Rothem DE, Rothem L, Soudry M, Dahan A, Eliakim R. Nicotine modulates bone metabolism-associated gene expression in osteoblast cells. J Bone Miner Metab 2009; 27(5): 555-61.

33 Rothem DE, Rothem L, Dahan A, Eliakim R, Soudry M. Nicotinic modulation of gene expression in osteoblast cells, MG-63. Bone 2011; 48(4): 903-9.

34 Zhang J, Chen F, Yun F, Chen J. Low level nicotine: A novel approach to reduce osteoporosis incidence. Med Hypotheses 2010; 74(6): 1067-8.

Nicotine Affects Proliferation and Differentiation of the Rabbit Osteoblasts *in vitro* and the Antagonistic Action of Vitamin C

Shen Yue[1], Cheng Shaowen[1], Nie Pengfei[1], Ying Xiaozhou[1], Liu Haixiao[1], Chen Qingyu[1], Cheng Xiaojie[1], Xu Huazi[1], Peng Lei[1,2]*, Zhang Yu[1]*

([1]*Department of Orthopaedic Surgery, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou, 325000, China*; [2]*Trauma Center of the Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570206, China*)

Abstract To study the effects of nicotine on the proliferation and differentiation of osteoblasts in neonatal rabbits and the antagonism of vitamin C *in vitro*, the issue cell culture method was used to isolate the rabbit osteoblasts. The cells were cultured with DMEM medium containing 10% fetal bovine serum with 0, 1×10^{-6}, 1×10^{-5}, 1 mmol/L nicotine and 0.5 mmol/L vitamin C+1 mmol/L nicotine for 1, 4, 7, 14 days. The cell proliferation was evaluated by MTT. The alkaline phosphatase (ALP) activity was estimated by PNPP. The expression of ALP, collagen type I (COLI) and osteocalcin (OCN) was estimated by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). ALP staining and Von Kossa staining are adopted to have a direct observation. The proliferation of neonatal rabbit osteoblasts was increased at 1×10^{-6}, 1×10^{-5} mmol/L of nicotine, whereas inhibited at 1 mmol/L nicotine. ALP activity was increased at the same trend with proliferation. The expression of *ALP*, *COLI* and *OCN* was up-regulated at 1×10^{-6}, 1×10^{-5} mmol/L of nicotine, while down-regulated at 1 mmol/L. The inhibition on proliferation and differentiation of 1 mmol/L nicotine group was antagonized partly by vitamin C. Nicotine had a two-phase effect on osteoblasts, showing as low level of nicotine could promote the proliferation and differentiation of the rabbit osteoblasts while the high level gets the opposite effect. Vitamin C could antagonize the inhibitory effect of higher concentration of nicotine on proliferation and differentiation of osteoblasts in part.

Key words nicotine; vitamin C; osteoblast; proliferation; differentiation

Received: September 24, 2011 Accepted: November 28, 2011

This work was supported by Project of Health Department in Hainan Province (No.2011-34), Medical and Health Research Fund of Zhejiang Health Department (No.2007B147) and Project of Science and Technology Bureau of Wenzhou City (No.Y20070133)

*Corresponding author. Tel: 86-577-88832693, E-mail: xiaobo197518@163.com; Tel: 86-577-86689747, E-mail: wenzhouzhangyu@163.com