

尼古丁对牙槽骨破骨细胞的作用及其机制的研究进展

杨佩佩 杨羽晨 张强

南昌大学第一附属医院口腔颌面外科 南昌 330006

[摘要] 吸烟对牙周疾病具有促进作用，而尼古丁作为烟草中有毒化学物质之一，是导致牙周病包括牙龈出血、牙周袋形成、牙槽骨吸收、牙齿松动的重要诱因。牙槽骨的吸收是骨组织的动态平衡被破坏的后果，是指成骨细胞主导的骨形成和破骨细胞主导的骨吸收失去平衡。通过研究尼古丁对破骨细胞及其诱导因子的调控作用，可以阐明尼古丁对于骨代谢的特殊作用，从而进一步论证尼古丁对牙周病发展的诱导作用。本文就尼古丁对破骨细胞的作用及其机制的研究进展进行综述。

[关键词] 尼古丁；破骨细胞；调控机制

[中图分类号] R 781.4 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.7518/gjkq.2020052



开放科学（资源服务）
标识码（OSID）

Advances in the mechanism and effect of nicotine on alveolar osteoclasts Yang Peipei, Yang Yuchen, Zhang Qiang.

(Dept. of Oral and Maxillofacial Surgery, First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China)

This study was supported by National Natural Science Foundation of China (81560189, 81260169).

[Abstract] Smoking can promote periodontal disease. As one of the toxic chemicals in tobacco, nicotine is an important cause of periodontal diseases, including gingival bleeding, periodontal pocket formation, alveolar bone absorption and tooth loosening. Alveolar bone resorption results from the disrupted dynamic balance of bone tissue, which refers to the imbalance of bone resorption regulated by osteoblasts and osteoclasts. The special effect of nicotine on bone metabolism was clarified by studying the regulatory effect of nicotine on osteoclasts and inducing factors. The inducing effect of nicotine on the development of periodontal disease was further analysed. This article reviewed the research progress on the effect of nicotine on osteoclasts.

[Key words] nicotine; osteoclasts; regulatory mechanism

尼古丁是烟草燃烧时产生的有毒化学物质之一，有很强的中枢神经毒性和器官毒性。动物实验表明，尼古丁暴露在体内体外会产生氧化应激反应。氧化应激是指体内氧化与抗氧化作用失衡，被认为是导致疾病的重要因素。尼古丁可通过激活氧自由基来抑制成骨细胞分化和诱导破骨细胞吸收参与骨重塑^[1]。流行病学和临床研究^[2]发现，吸烟与骨量减少和骨折风险增加之间存在一定程度的关联。因此，探索尼古丁对破骨细胞及其诱导因子的影响具有重要的意义。

[收稿日期] 2019-11-01; [修回日期] 2020-04-26

[基金项目] 国家自然科学基金 (81560189, 81260169)

[作者简介] 杨佩佩，硕士，Email: 978566228@qq.com

[通信作者] 张强，主任医师，博士，Email: zhq100@aliyun.com

破骨细胞由破骨细胞前体形成，破骨细胞前体是来源于脾和肝脏的祖细胞，其相互融合形成多核破骨细胞。破骨细胞对骨质的改建发挥着重要的作用。本文就尼古丁对破骨细胞作用的研究进展进行综述。

1 尼古丁对临床牙周疾病的意义

牙周炎是一种由微生物菌斑和环境因素共同引起的多因素疾病，最终会导致牙周结缔组织和牙槽骨的破坏，细菌是牙周炎的始动因子，但宿主对致病性感染的反应在疾病进展中至关重要^[3]。流行病学和临床资料^[4]表明，吸烟是牙周炎进展过程中的重要危险因素之一，在无牙周干预的6个月

内，吸烟人群与非吸烟人群相比，菌斑、结石以及牙龈炎症、探诊出血的风险相对增加。研究^[5]表明，吸烟与牙周炎的发展呈显著的正相关，包括牙周袋形成，附着丧失，牙槽骨吸收，牙齿脱落。

尼古丁是烟草中的有毒化学物质之一。Chang等^[6]研究尼古丁以剂量依赖性的方式抑制人牙周韧带成纤维细胞生长、增殖和蛋白质合成，证实尼古丁对牙周膜成纤维细胞的细胞毒性作用，表明尼古丁对牙周膜组织具有破坏作用。Kubota等^[7]通过小鼠模型研究尼古丁和烟冷凝物对结扎性牙周炎牙槽骨破坏的影响，发现尼古丁和烟冷凝物可加重结扎性牙周炎的牙槽骨丢失，同时伴有破骨细胞生成和核因子κB受体活化因子配体（receptor activator of nuclear factor-κB ligand, RANKL）表达的增加，并抑制牙槽骨的修复。

治疗牙周病的最终目标是重建具有功能学和结构学的牙周组织（包括牙槽骨、牙龈、牙周膜和牙骨质），而牙槽骨的再生作为治疗牙周病中至关重要的一步，其形态发生及重建主要在于成骨细胞和破骨细胞介导的骨吸收过程。因此，研究尼古丁对破骨细胞的调控机制对口腔临床研究至关重要。

2 尼古丁对破骨细胞的调控机制

2.1 尼古丁对RANKL相关信号通路的影响

20世纪90年代中期，核因子κB受体活化因子（receptor activator of nuclear factor-κB, RANK）-RANKL-骨保护素（osteoprotegerin, OPG）系统被发现用于调节骨吸收。RANKL/RANK系统对成熟破骨细胞的形成至关重要，是T细胞介导的破骨细胞发生的关键因素。

RANKL是RANK的配体，是一种Ⅱ型同源三聚体跨膜蛋白，已公认的作用为通过成骨细胞基质细胞诱导RANKL的表达从而刺激破骨细胞的形成。而且，其在淋巴结、胸腺、乳腺和肺中也有高表达，在包括脾脏和骨髓在内的多种其他组织中有低水平表达^[8]。

RANK是肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor, TNF）受体超家族的同型三聚体跨膜蛋白成员，可以表达于破骨细胞前体、成熟的破骨细胞和树突状细胞，也可表达于乳腺中^[9]。

OPG可由成骨细胞分泌，还可由心脏、肾

脏、肝脏和脾的细胞分泌。

研究^[10]报告显示，B细胞分泌的OPG可能占总量的64%，B细胞缺乏的小鼠易患骨质疏松。成骨细胞在破骨细胞表面与RANK结合后，产生RANKL以及肿瘤坏死因子受体相关因子（TNF receptor associated factor, TRAF）2、5、6，连接RANK在细胞质域内的特异性位点，基于对TRAF2、TRAF5和TRAF6缺陷小鼠的观察，发现其中只有TRAF6缺陷小鼠发生了骨硬化病，随后，多种信号通路包括核因子（nuclear factor, NF）-κB、c-Jun氨基末端激酶（c-Jun N-terminal kinase, JNK）、p38、细胞外调节蛋白激酶（extracellular regulated protein kinase, ERK）、蛋白激酶B（protein kinase B, PKB/Akt）被激活。而活化的NF-κB易位进入细胞核，与活性T细胞核因子（nuclear factor of activated T cell, NFAT）C1相互作用，启动破骨基因的转录，形成破骨细胞^[11]。OPG可以阻止RANK与RANKL的结合，因此RANKL与OPG的比例决定着RANKL的生物学功效及其对破骨细胞形成的作用。人牙周膜细胞表达并分泌OPG和RANKL，提示它们可能通过OPG/RANKL系统调节牙槽骨代谢^[12]。

Lee等^[13]研究表明，通过采用逆转录聚合酶链反应（reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR）和Western blotting检测尼古丁处理的人牙周膜细胞中成骨细胞标志物RANKL、OPG和抗氧化防御酶的表达。采用RT-PCR观察尼古丁对RANKL、OPG等成骨细胞标志物mRNA表达的影响，结果显示尼古丁显著降低碱性磷酸酶、骨桥蛋白、骨钙素mRNA在人牙周膜细胞中的表达。在尼古丁浓度为0~15 mmol·L⁻¹的细胞中，RANKL的上调和OPG的下调均呈浓度依赖性；加入尼古丁10 mmol·L⁻¹后，人牙周膜细胞中RANKL mRNA表达上调，OPG mRNA表达下调。由此可以说明尼古丁能激活破骨细胞调节分子RANKL和OPG，抑制牙周膜细胞中成骨细胞的分化。

2.2 尼古丁对巨噬细胞集落刺激因子的刺激

巨噬细胞集落刺激因子（macrophage colony stimulating factor, M-CSF）主要存在于骨髓腔内，对单核细胞的增殖、分化及维持其活性有重要作用。M-CSF可在间充质细胞如成纤维细胞、成骨细胞及内皮细胞中合成，也可在激活的巨噬细胞、B细胞、T细胞及多种肿瘤细胞中产生，可

诱导破骨细胞发生，调节破骨细胞活性，抑制破骨细胞凋亡^[14]。

革兰阴性菌产生的脂多糖是其细胞壁的组成成分之一，被认为是重要的致病因素。脂多糖的功能之一是刺激破骨细胞的骨吸收^[15]。研究^[16]表明，牙周炎牙槽骨破坏的原因之一是菌斑中革兰氏阴性菌脂多糖作用。Tanaka等^[17]研究发现，尼古丁或尼古丁+脂多糖的加入对破骨细胞形成产生影响。人骨肉瘤细胞（Saos-2细胞）在尼古丁或尼古丁+脂多糖影响下与对照组相比，可以抑制碱性磷酸酶的活性，而M-CSF的表达量与前列腺素E₂呈剂量依赖性上升。相反，OPG的表达呈剂量依赖性下降。实验结果表明，尼古丁与脂多糖的结合通过增加M-CSF和前列腺素E₂的产生而促进破骨细胞的形成，同时减少成骨细胞OPG的产生。

有研究^[18]显示，在一定范围内，在RANKL存在的条件下，M-CSF可诱导抗酒石酸酸性磷酸酶（tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP）阳性破骨细胞成熟，并伴随M-CSF剂量的增加，TRAP阳性破骨细胞数明显增加。而在M-CSF存在下进行培养的人外周血单核细胞，可表现出较高水平的TRAP活性、破骨细胞相关基因的表达和骨吸收活性；在破骨细胞分化活跃的破骨细胞前体中，低浓度尼古丁（32 μg·L⁻¹）可导致TRAP活性和基因表达增加，特别是在活化因子c-Src存在的情况下^[19]。研究^[20]发现，M-CSF对骨髓中的髓系祖细胞、单核吞噬细胞祖细胞、破骨细胞以及血管中单核细胞均具有调节作用。M-CSF通过与其独特的受体结合诱导生物应答，CSF-1受体中的7个酪氨酸残基被磷酸化，从而触发下游信号级联，包括有丝分裂原活化蛋白激酶/细胞外调节蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated protein kinase kinases, MEK）/ERK和磷脂酰肌醇3-激酶（phosphoinositide 3-kinase, PI3K）/Akt，对破骨细胞增殖具有重要作用，而PI3K的激活对破骨细胞的存活有重要的意义^[20-21]。

2.3 尼古丁对胆碱能抗炎通路的影响

TNF-α不仅是种促炎因子，还是损伤后天然免疫反应的重要组成部分，参与了骨吸收的正常调节过程。

有研究^[22]显示，敲除TNF-α受体基因的小鼠软骨内组织吸收延迟2~3周，提示TNF-α介导的软骨细胞凋亡以及控制破骨细胞软骨内组织重塑的促吸收细胞因子的表达。Chen等^[23]认为，α7烟碱

型乙酰胆碱受体（nicotinic acetylcholine receptor, nAChR）是最重要的炎症治疗靶点，其主要表达于免疫细胞（包括单核细胞、巨噬细胞、T和B淋巴细胞、树突状细胞）的细胞膜和成纤维细胞样滑膜。总之，α7nAChR通过与烟碱激动剂（尼古丁、乙酰胆碱等）联合作用于免疫细胞，通过触发各种信号机制（其中包括JAK2-STAT3和NF-κB信号通路）相互作用，达到抗炎作用。吸烟释放的尼古丁可能与α7nAChR结合，激活抗炎途径，JAK2-STAT3信号通路被激活，NF-κB信号通路被抑制。因此，TNF-α的产量将大大减少，从而导致骨折愈合时间延长。

蒙超龙等^[24]通过观察不同浓度TNF-α对人牙周膜干细胞的增殖及成骨向分化的影响，提示在牙周炎症微环境中，不同含量的TNF-α可对人牙周膜干细胞的增殖活性及分化产生不同的影响，低浓度的TNF-α可促进人牙周膜干细胞中成骨向分化相关基因（如OPN、BSP）的表达，而高浓度的TNF-α可使人牙周膜干细胞中上述各成骨向分化相关基因的表达水平均较对照组明显下调。TNF-α通过TNFR1和TNFR2这2个细胞表面受体（也称为TNFRP55和TNFRP75）诱导大量的生物反应，TNFR1和TNFR2都能传递细胞内的信号，刺激NF-κB的细胞质抑制剂IKB的分解。活化的NF-κB随后被转移到细胞核中，在细胞核内诱导多个TNF-α反应基因的转录^[25]。

据报道，TNF-α可通过激活成熟的破骨细胞，或通过刺激破骨细胞前体的增殖和分化，或间接通过对成骨细胞的主要作用，在体外和体内促进骨吸收。Azuma等^[26]研究结果显示TNF-α可强烈诱导MDBM细胞（M-CSF依赖性骨髓巨噬细胞）分化为成熟破骨细胞，同时在TNF-α处理下，也可形成TRAP阳性多核细胞。

2.4 尼古丁对其他骨吸收细胞因子及骨组织形态计量学的影响

骨细胞因子是在骨骼单位内介导细胞与细胞间相互作用中起关键作用的可溶性因子，在骨代谢单位的调控中起着至关重要的作用，促进骨吸收的细胞因子有白细胞介素（interleukin, IL）-1、IL-6等^[27]。Hapidin等^[28]研究发现，用尼古丁处理Sprague-Dawley雄鼠4个月后，血清IL-1、IL-6和可替宁水平较预处理前显著升高，提示尼古丁可促进骨吸收，而骨形态计量学参数显示尼古丁组未达到正常骨结构。破骨细胞表面、侵蚀表面

和单标记表面（骨吸收指标）升高所显示的破骨细胞骨吸收过度，骨小梁微结构恶化，导致骨吸收。且尼古丁处理组骨小梁相对体积、骨小梁厚度、双向荧光标记表面和矿化沉积率（骨形成指标）均低于对照组。结果说明，尼古丁暴露导致氧化应激，导致自由基产生增加，抗氧化水平降低。尼古丁诱导破骨细胞分化，促进细胞因子IL-1和IL-6的促进骨吸收作用，由于破骨细胞被自由基激活，而且破骨细胞本身也能产生自由基吸收骨。

3 小结

破骨细胞形成于一个错综复杂细胞串扰的网络，涉及了许多信号分子，主要包括激活因子M-CSF和RANKL，以及一些其他的促进骨吸收的细胞因子IL-1、IL-6等，酪氨酸激酶c-Src也是破骨细胞活化网络中的一个重要中介物。一旦被激活，破骨细胞开始将H⁺运输到细胞外的骨表面，腐蚀骨表面羟磷灰石晶体，同时可以分泌溶解酶（尤其是组织蛋白酶K），降解骨基质的有机成分^[29]。

吸烟与骨质疏松症和牙槽骨丧失等多种骨骼疾病密切相关，而尼古丁作为烟草中有毒化学物质之一，可以通过多种通路调控成骨细胞和破骨细胞的分化和矿化，表明尼古丁在调节骨代谢中具有特殊作用。而且尼古丁可影响牙周膜细胞中碱性磷酸酶、骨桥蛋白、骨钙素mRNA的表达，与牙周炎的发展呈显著的正相关，因此对于牙周炎患者进行有效的戒烟干预措施，对牙周病的治疗及提高治疗效果具有积极作用。

4 参考文献

- [1] Wetscher GJ, Bagchi M, Bagchi D, et al. Free radical production in nicotine treated pancreatic tissue[J]. Free Radic Biol Med, 1995, 18(5): 877-882.
- [2] Kim JH, Patel S. Is it worth discriminating against patients who smoke? A systematic literature review on the effects of tobacco use in foot and ankle surgery[J]. J Foot Ankle Surg, 2017, 56(3): 594-599.
- [3] Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. Periodontal diseases[J]. Nat Rev Dis Primers, 2017, 3: 17038.
- [4] Müller HP, Stadermann S, Heinecke A. Longitudinal association between plaque and gingival bleeding in smokers and non-smokers[J]. J Clin Periodontol, 2002, 29(4): 287-294.
- [5] Johnson TM. Smoking and periodontal disease[J]. US Army Med Dept J, 2017: 67-70.
- [6] Chang YC, Huang FM, Tai KW, et al. Mechanisms of cytotoxicity of nicotine in human periodontal ligament fibroblast cultures *in vitro*[J]. J Periodont Res, 2002, 37(4): 279-285.
- [7] Kubota M, Yanagita M, Mori, et al. The effects of cigarette smoke condensate and nicotine on periodontal tissue in a periodontitis model mouse[J]. PLoS One, 2016, 11(5): e0155594.
- [8] Boyce BF, Xing LP. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling[J]. Arch Biochem Biophys, 2008, 473(2): 139-146.
- [9] Christoph F, König F, Lebentrau S, et al. RANKL/RANK/OPG cytokine receptor system: mRNA expression pattern in BPH, primary and metastatic prostate cancer disease[J]. World J Urol, 2018, 36(2): 187-192.
- [10] Li Y, Toraldo G, Li AM, et al. B cells and T cells are critical for the preservation of bone homeostasis and attainment of peak bone mass *in vivo*[J]. Blood, 2007, 109(9): 3839-3848.
- [11] Liu W, Zhang XL. Receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL)/RANK/osteoprotegerin system in bone and other tissues (review)[J]. Mol Med Rep, 2015, 11(5): 3212-3218.
- [12] Sojod B, Chateau D, Mueller CG, et al. RANK/RANKL/OPG signalization implication in periodontitis: new evidence from a RANK transgenic mouse model[J]. Front Physiol, 2017, 8: 338.
- [13] Lee HJ, Pi SH, Kim Y, et al. Effects of nicotine on antioxidant defense enzymes and RANKL expression in human periodontal ligament cells[J]. J Periodontol, 2009, 80(8): 1281-1288.
- [14] De Vries TJ, Schoenmaker T, Aerts D, et al. M-CSF priming of osteoclast precursors can cause osteoclastogenesis-insensitivity, which can be prevented and overcome on bone[J]. J Cell Physiol, 2015, 230 (1): 210-225.
- [15] Zeng L, Xu YM, Xing GY. Effect of lipopolysac-

- charide on osteoclasts formation and bone resorption function and its mechanism[J]. Chin J Reparative Reconstr Surg, 2018, 32(5): 568-574.
- [16] Amano S, Kawakami K, Iwahashi H, et al. Functional role of endogenous CD14 in lipopolysaccharide-stimulated bone resorption[J]. J Cell Physiol, 1997, 173(3): 301-309.
- [17] Tanaka H, Tanabe N, Shoji M, et al. Nicotine and lipopolysaccharide stimulate the formation of osteoclast-like cells by increasing macrophage colony-stimulating factor and prostaglandin E₂ production by osteoblasts[J]. Life Sci, 2006, 78(15): 1733-1740.
- [18] 王晓庚, 刘文佳, 周洪, 等. 不同浓度破骨细胞分化因子和巨噬细胞集落刺激因子体外诱导大鼠破骨样细胞形成的研究[J]. 口腔医学, 2008, 28(4): 169-172.
- Wang XG, Liu WJ, Zhou H, et al. Differentiation of osteoclast-like cells induced by using different concentrations of M-CSF and RANKL[J]. Stomatology, 2008, 28(4): 169-172.
- [19] Zhao QX. Osteoclast differentiation and gene regulation[J]. Front Biosci, 2007, 12(1): 2519.
- [20] Pixley FJ, Stanley ER. CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action[J]. Trends Cell Biol, 2004, 14(11): 628-638.
- [21] Yeo CE, Kang WY, Seong SJ, et al. Neuromedin B and its receptor silencing suppresses osteoclast generation by modulating precursor proliferation via M-CSF/c-Fms/D-type cyclins[J]. Exp Cell Res, 2017, 359(1): 112-119.
- [22] Chen C, Xie J, Rajappa R, et al. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α increase stiffness and impair contractile function of articular chondrocytes[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2015, 47(2): 121-129.
- [23] Chen YH, Guo QS, Pan XH, et al. Smoking and impaired bone healing: will activation of cholinergic anti-inflammatory pathway be the bridge[J]. Int Orthop, 2011, 35(9): 1267-1270.
- [24] 蒙超龙, 王祥, 段建民, 等. 肿瘤坏死因子- α 对人牙周膜干细胞的增殖及成骨分化的影响[J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2018, 28(2): 63-68.
- Meng CL, Wang X, Duan JM, et al. The effects TNF- α on the proliferation and osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells[J]. Chin J Conserv Dent, 2018, 28(2): 63-68.
- [25] Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, et al. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction[J]. J Exp Med, 2000, 191(2): 275-286.
- [26] Azuma Y, Kaji K, Katogi R, et al. Tumor necrosis factor- α induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts[J]. J Biol Chem, 2000, 275(7): 4858-4864.
- [27] Mundy GR. Role of cytokines in bone resorption[J]. J Cell Biochem, 1993, 53(4): 296-300.
- [28] Hapidin H, Othman F, Soelaiman IN, et al. Negative effects of nicotine on bone-resorbing cytokines and bone histomorphometric parameters in male rats[J]. J Bone Miner Metab, 2007, 25(2): 93-98.
- [29] Costa-Rodrigues J, Rocha I, Fernandes MH. Complex osteoclastogenic inductive effects of nicotine over hydroxyapatite[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(2): 1029-1040.

(本文编辑 胡兴戎)