

# 对不同月龄雄性大鼠成骨细胞内钙和钙通道电流的实验研究

李磊 田万里 孙宏丽 田军 陶天遵 陶树清 张伟 高峰 单宇

**摘要：**目的 研究不同月龄的雄性大鼠成骨细胞内钙浓度及钙通道电流是否存在差异。方法 采用二次酶消化法分离不同月龄(分别为1、2、3、5、7、9、11、13、15)雄性大鼠的原代成骨细胞,通过激光扫描共聚焦技术测定细胞内游离钙浓度( $[Ca^{2+}]_i$ )(以平均荧光强度表示),同时应用全细胞膜片钳技术记录成骨细胞膜钙电流( $I_{Ca}$ )的变化。结果 共聚焦结果显示随月龄增加,成骨细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 逐渐降低,但相邻2月龄组之间细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 无显著性差异( $P > 0.05$ );1、2、3月龄组与11、13、15月龄组成骨细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 有显著性差异( $P < 0.05$ );5、7、9月龄组与各组相比均无差异( $P > 0.05$ )。应用全细胞膜片钳技术发现刺激电压为+10 mV时,2、7、13月龄组鼠 $I_{Ca}$ 分别为 $(-392.77 \pm 97.07)$  pA、 $(-330.33 \pm 33.86)$  pA和 $(-287.68 \pm 71.01)$  pA,13月龄组鼠与2月龄组鼠相比, $I_{Ca}$ 明显降低( $P < 0.05$ ),而7月龄组鼠与2月龄组鼠和13月龄组鼠相比, $I_{Ca}$ 均没有明显差异( $P > 0.05$ )。结论 不同月龄大鼠成骨细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 存在差异,其机制可能与细胞膜上钙通道活性改变相关。

**关键词：**成骨细胞;细胞内钙;钙电流

**Study on intracellular calcium concentration and calcium current of osteoblast in male rats of different months old** LI Lei, TIAN Wanli, SUN Hongli, et al. The Second Department of Orthopedics, The Second Clinical College, Harbin Medical University, Harbin 150086, China

**Abstract :** **Objective** To investigate the difference of intracellular calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) and calcium current ( $I_{Ca}$ ) of osteoblast in male rats of different months old. **Methods** The first generation of osteoblast was isolated and purified from male Wistar rats of different months old (1, 2, 3, 5, 7, 9, 11, 13 and 15) by sequential enzyme digestion.  $[Ca^{2+}]_i$  represented by fluorescent intensity (FI) was detected by laser scanning confocal microscopy, and the changes of  $I_{Ca}$  was recorded by whole-cell patch-clamp technique. **Results** Confocal experiments showed that  $[Ca^{2+}]_i$  was decreased gradually in male rats osteoblast with the increase of age, but no significant difference was found between the group and the one next to them ( $P > 0.05$ ).  $[Ca^{2+}]_i$  in 1-, 2- and 3-month groups was higher than that of 11-, 13- and 15-months groups ( $P < 0.05$ ), respectively. However  $[Ca^{2+}]_i$  of 5-, 7- and 9-month groups showed no statistical difference to of other groups ( $P > 0.05$ ). Patch-clamp studies displayed that, when at +10 mV, the  $I_{Ca}$  was  $(-392.77 \pm 97.07)$  pA,  $(-330.33 \pm 33.86)$  pA and  $(-287.68 \pm 71.01)$  pA in 2-, 7- and 13-month groups rats, respectively.  $I_{Ca}$  in the 13-month group was significantly decreased when compared with that of 2-month group ( $P < 0.05$ ), and  $I_{Ca}$  of 7-month rats had no difference compared with that in 2- and 13-month rats ( $P > 0.05$ ). **Conclusions**  $[Ca^{2+}]_i$  varies in male Wistar rats osteoblast of different months old, which might be associated with the changes of electrophysiological activity of calcium channel.

**Key words :** Osteoblast; Intracellular calcium; Calcium current

对正常骨代谢的研究主要集中在骨形成、骨破

坏、骨矿化的过程及其相关的生物影响因子几个方面。成骨细胞作为重要的骨组织细胞在骨代谢的各个阶段均起到重要作用,其生物活性直接反映骨代谢的水平。目前对其作用已得到公认的是其可以分泌I型胶原蛋白以提供骨支架并且能够分泌促进骨

作者单位:150086 哈尔滨,哈尔滨医科大学附属第二医院骨外科(李磊、田万里、田军、陶天遵、陶树清、高峰、单宇);哈尔滨医科大学药理教研室(孙宏丽);哈尔滨市第五医院(张伟)

通讯作者:李磊,Email:hlsl2002@yahoo.com

矿化的生物因子。但成骨细胞在正常生命周期的不同阶段、在维持细胞结构稳定的前提下其细胞内环境是否有变化?如果有变化其机制是什么?其变化又能代表什么?此类研究我们尚未发现报道。因此我们设计了此试验,选择在骨代谢与细胞代谢中均起到重要作用的钙离子作为实验指标,应用激光扫描共聚焦技术和膜片钳技术观察成骨细胞内钙在不同生命时期的变化并初步探讨其机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

DMEM培养基购自Gibco公司;胎牛血清购自Hyclone公司;II型胶原酶、Pluronic F-127、EGTA、HEPES和 $\text{Na}_2\text{ATP}$ 购自Sigma公司。Fluo-3/AM购自美国分子探针公司,二甲基亚砜(DMSO)溶解,  $-20^\circ\text{C}$ 冰箱避光冻存。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物分组:**健康雄性Wistar大鼠(哈尔滨医科大学附属第二医院动物实验中心提供),选择新生、2、3、5、7、9、11、13、15月龄分为9组,每组7只(新生组为生后半月内的,每次试验6只共42只,分组时不足整月以十五日分为界点)。

**1.2.2 成骨细胞的培养与鉴定:**无菌取出大鼠颅盖骨及四肢骨(新生组只取颅盖骨),采用二次酶消化法、反复贴壁法分离纯化培养大鼠成骨细胞。倒置显微镜观察成骨细胞形态、超微结构,改良钙钴法碱性磷酸酶染色对成骨细胞进行鉴定。当培养的原代细胞铺满培养板里的盖玻片后待用。

**1.2.3 Fluo-3/AM染色和 $[\text{Ca}^{2+}]$ 的测定:**将培养好的原代成骨细胞用 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的Fluo-3/AM染色,加入0.01% Pluronic F-127在 $37^\circ\text{C}$ 恒温水浴中孵育50 min,然后用培养液洗涤两次,以去除细胞外残留的Fluo-3/AM。应用激光扫描共聚焦显微镜(Fluoview-FV 300, Olympus, Japan),在激发波长为488 nm,发射波长为530 nm,40 $\times$ 物镜下测定 $[\text{Ca}^{2+}]$ 。计算细胞XY平面内平均荧光强度(fluorescent intensity, FI),以FI代表 $[\text{Ca}^{2+}]$ 。

**1.2.4 膜片钳实验:**将共聚焦结果分析后,对钙离子浓度有显著性差别的各组细胞置于浴槽中,用细胞外液( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ :  $\text{BaCl}_2$  110,  $\text{NaOH}$  10, HEPES 10, 调pH为7.40)以 $2\sim 3\text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速度灌流冲洗细胞表面,选择状态良好的细胞进行封接实验。按文献描述的方法<sup>[1,2]</sup>,用两步拉制仪制备的玻璃微电极在

灌注电极液( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ :  $\text{CsCl}$  140, EGTA 10,  $\text{Na}_2\text{ATP}$  1, 用 $\text{CsOH}$ 调pH为7.20)后阻抗为 $2\sim 4\text{ M}\Omega$ ,连接于膜片钳放大器(Axopatch 200 B)上,信号以1 kHz的低频过滤,指令脉冲由pCLAMP软件(Axon Instrument)控制的12位数字模拟转换器产生,数据由最大转换率为100 kHz的模拟数字转换器获得,存储于IBM兼容计算机硬盘,在微电极接触细胞形成紧密的管膜封接阻抗( $>10\text{ G}\Omega$ )后,轻轻抽吸打破细胞膜获得全细胞构型,在电压钳模式下记录电流。

**1.2.5 统计学分析:**数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用t-test进行差异的显著性检验,以双尾概率 $P < 0.05$ 判断具有显著性意义。

## 2 结果

### 2.1 成骨细胞鉴定

**2.1.1 形态学观察:**细胞培养后隔日相差显微镜观察,成骨细胞贴壁前呈均匀一致的球型,细胞周围有光晕,胞核偏于一侧,可见清晰的核仁。24 h至72 h细胞全部贴壁,观察细胞为单核,形态呈三角形、卵圆形、多角形。培养时间延长,细胞伸出较多突起,有的突起相互连接直至融合成片。时间约为6~10 d,应用此时细胞进行实验。

**2.1.2 碱性磷酸酶(ALP)染色(改良Gomori氏钙-钴法):**染色后镜下可见90%以上的细胞ALP染色阳性,可见成骨细胞浆内有灰黑或深黑色颗粒,ALP染色阴性成纤维细胞呈现均匀一致的淡红色(图1)。



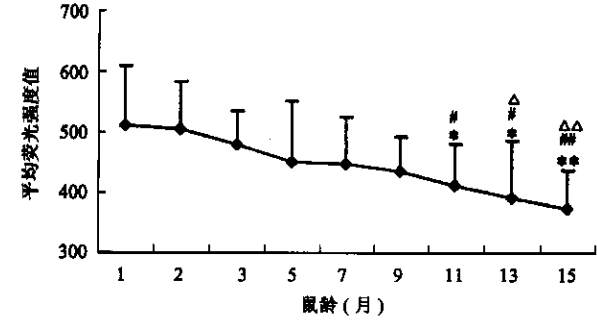
图1 钙-钴法染色后的成骨细胞

可见细胞浆内有大量灰黑或深黑色颗粒,胞浆丰富,细胞呈梭形,胞核偏于一侧 光镜 $\times 100$

### 2.2 不同月龄雄性大鼠成骨细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 的变化

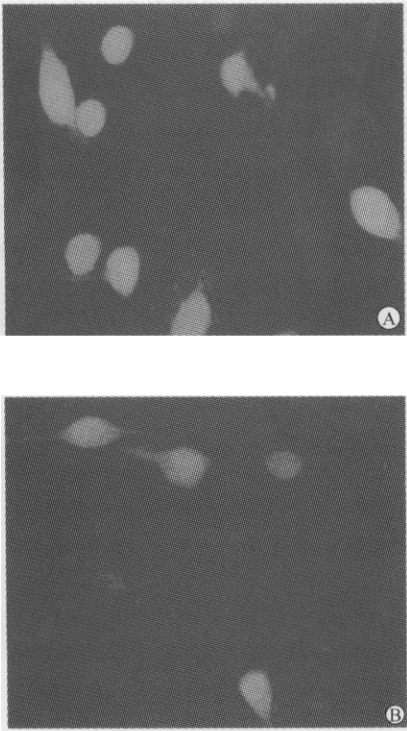
应用激光扫描共聚焦技术观察不同月龄雄性大鼠成骨细胞内钙的差别,结果显示随着大鼠月龄增

加成骨细胞内钙呈递减趋势,相邻两组的钙差异无统计学意义( $P > 0.05$ );与 1 月龄组相比 11、13、15 三个月龄组均有统计学意义( $P < 0.05$ );与 2 月龄组比较 11、13、15 三个月龄组有统计学意义( $P < 0.05$ );与 3 月龄组比较 13、15 两个月龄组有统计学意义( $P < 0.05$ );其中 15 月龄组与 1、2、3 三个月龄组比较差异更加显著( $P < 0.01$ )。结果见图 2、3。



注:与 1 月龄鼠相比 \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ;与 2 月龄鼠相比 \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ;与 3 月龄鼠相比 ^  $P < 0.05$ , ^^  $P < 0.01$ ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

图 2 不同月龄雄性大鼠成骨细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化

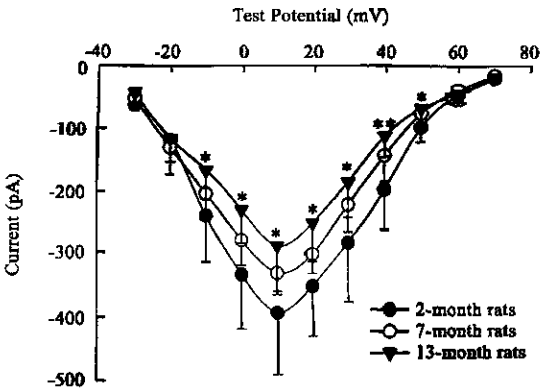


注:A:2 月龄组鼠成骨细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ ;B:13 月龄组鼠成骨细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ ;

图 3 不同月龄雄性大鼠成骨细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的典型荧光图像

2.3 不同月龄雄性大鼠成骨细胞膜钙电流( $I_{Ca}$ )的差异

取共聚焦实验有意义的 2、7、13 三个月龄组的成骨细胞进行膜片钳实验。在记录  $I_{Ca}$  时,保持电压固定于  $-40\text{ mV}$ ,实验刺激电压从  $-30\text{ mV}$  起以  $10\text{ mV}$  的步阶刺激阶跃至  $+70\text{ mV}$ ,时程  $300\text{ ms}$ ,刺激间隔为  $10\text{ s}$ ,以保证通道完全复活,可以记录到稳定的  $I_{Ca}$ 。测定  $I_{Ca}$  从  $0$  时起到  $300\text{ ms}$  之间的内向电流峰值。在本实验条件下  $I_{Ca}$  峰值在刺激电压为  $+10\text{ mV}$  时达到。结果显示随着鼠月龄的增加,  $I_{Ca}$  逐渐减小。刺激电压为  $+10\text{ mV}$  时,2、7、13 月龄鼠  $I_{Ca}$  分别为  $(-392.77 \pm 97.07)\text{ pA}$ 、 $(-330.33 \pm 33.86)\text{ pA}$  和  $(-287.68 \pm 71.01)\text{ pA}$ ,13 月龄鼠与 2 月龄鼠相比,  $I_{Ca}$  明显降低( $P < 0.05$ ),而 7 月龄鼠与 2 月龄鼠相比,  $I_{Ca}$  没有明显差异( $P > 0.05$ ),13 月龄鼠与 7 月龄鼠之间,  $I_{Ca}$  也没有明显差异( $P > 0.05$ ,图 4)。



注:与 2 月龄鼠相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

图 4 不同月龄雄性大鼠成骨细胞膜钙电流( $I_{Ca}$ )电流-电压曲线的变化

3 讨论

成骨细胞在骨代谢的不同时期均起到重要作用。目前已经得到确认的是其能够分泌大量的细胞外基质以提供骨结构的支架,并分泌碱性磷酸酶、组织型谷氨酰胺转移酶、IGF-1 等一系列酶和生物因子,对骨矿化和细胞代谢调控其重要作用<sup>[3]</sup>。同时成骨细胞也受到多种方式的调控,如靠 PTH、雌激素等激素来完成的体液调解,靠细胞间相连接的微管网系统来完成的用于感应力学变化的神经调节等<sup>[4]</sup>。在这多种因素的调控下不同生长发育阶段的成骨细胞所表现的生物活性是不同的。但现在对于这些调控信号如何在成骨细胞内外进行传导,并对

成骨细胞产生何种靶效应我们还知之甚少,也许这将成为破译骨代谢中某些秘密的关键。

钙离子在骨代谢中不仅作为骨组织的重要组成部分,同时作为第二信使在细胞内外信号传递的过程中也发挥着极其重要的作用。目前虽然对于骨矿化的过程,成骨细胞的功能是如何表达的等一系列问题尚未完全清晰,但在骨代谢中细胞内外的活动是作为一个整体存在密切的关系已得到广泛认可。细胞内钙离子浓度的变化可能正是反映这种联系的关键。已测明成骨细胞内钙离子浓度为  $10^{-5} \sim 10^{-8}$  mol/L,细胞外液中钙离子浓度为  $10^{-2}$  mol/L<sup>[5]</sup>。但细胞内钙是处于相对稳定状态,其浓度是随着多种调控因素的变化而变化的。有研究表明在氟制剂作用的情况下成骨细胞内的钙离子浓度也相应增加,同时其成骨作用也明显加强,两者存在剂量依赖性<sup>[6]</sup>。我们可以推论细胞内钙离子浓度作为多种调控因素的靶效应,通过其变化从而改变成骨细胞的生物学活性。目前已知在成骨细胞样细胞和原代培养的 OB 表面存在 L-型钙通道。OB 上的钙通道在调控细胞内外的钙平衡上起重要作用,许多骨调节因子可以活化 OB 的钙通道,通过改变钙浓度而在骨的塑建与重建中起重要作用<sup>[7]</sup>。

目前对各个生命时期中成骨细胞内钙离子浓度是否有规律性变化,其变化机制和生理作用是什么等问题尚无报道。本实验对不同月龄雄性大鼠未加干扰因素,采用 Fluo-3/AM 染色激光扫描共聚焦技术测定成骨细胞内钙离子浓度,该技术是目前研究细胞内钙离子变化比较可靠的方法之一,结合新一代钙荧光探针 Fluo-3/AM,此项技术已广泛应用于精确地分析  $[Ca^{2+}]$  的变化。实验结果显示随着月龄增加成骨细胞内钙离子浓度出现规律性递减变化。对于不同月龄大鼠的骨量与骨结构的变化已有报道<sup>[8]</sup>,大鼠在 4.5 月~10 月龄骨量稳定在一定水平,6 月龄骨量达到高峰值,并维持此骨量并不断完成骨结构的重建以使骨骼性质达到最佳,大鼠 9 月龄后骨量开始减少,骨有机质减少导致骨结构变化、骨质变脆,至 10 月龄后这种变化更加明显。这与我们对成骨细胞内钙离子浓度的研究结果相吻合,提示

细胞内钙浓度与骨量存在直接关系。为进一步揭示细胞内钙变化机制我们采用膜片钳技术直接测定成骨细胞钙通道电流,膜片钳技术是以记录通过离子通道的离子电流来研究细胞膜上离子通道分子活动的新技术。目前已成为从功能角度探讨生理、病理生理及药物作用机制最直接最理想的方法。实验结果显示钙通道电流的兴奋性及峰值随月龄增加而递减,与测定的细胞内钙浓度结果相吻合。

同时我们注意到成骨细胞内钙离子浓度是在一定范围内变化的,这可能与钙离子作为细胞膜结构和功能的“稳定剂”以维持细胞正常形态有关。通过本实验可以证明不同月龄大鼠成骨细胞内钙离子浓度的变化不是一过性的和瞬时的,其变化程度可以反映成骨细胞生物活性的改变,其机制可能与细胞膜上钙离子通道兴奋性改变有关。这为进一步阐明骨代谢的机理并开发通过改变钙离子通道活性从而提高细胞内钙离子浓度以治疗骨代谢疾病的药物提供理论支持。

## 【参 考 文 献】

- [1] Wang Z, Femini B, Nattel S. Rapid and slow components of delayed rectifier current in human atrial myocytes. *Cardiovasc Res*, 1994, 28: 1540-1546.
- [2] Li BX, Yang BF, Zhou J, et al. Inhibitory effects of berberine on  $I_{K1}$ ,  $I_K$ , and HERG channels of cardiac myocytes. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, 22: 125-131.
- [3] 刘忠厚, 主编. 骨质疏松学. 北京: 科学出版社, 1998: 19-21.
- [4] Huo B, Dossings AR, Dimuzio MT, et al. Generation and characterization of a human osteosarcoma cells line stably transfected with the human estrogen receptor gene. *J Bone Miner Res*, 1995, 10: 769-774.
- [5] 廖二元, 谭利华, 主编. 代谢性骨病学. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 82-85.
- [6] 华坤, 赵红, 黄民, 等. 氟对成骨细胞样细胞内钙和钙通道电流的影响. *中国应用生理学杂志*, 2003, 19: 179-181.
- [7] Barry EL. Expression of mRNAs for the alpha 1 subunit of voltage-gated calcium channels in human osteoblast-like cell lines and in normal human osteoblasts. *Calcif Tissue Int*, 2000, 66: 145-150.
- [8] 刘晓青, 崔燎, 吴铁, 等. 不同月龄正常大鼠骨形态计量学参数动态变化的研究. *中国临床药理学与治疗学杂志*, 2005, 10: 184-186.

(收稿日期: 2005-09-19)