

雷奈酸锶在模拟微重力环境对成骨细胞分化功能的影响

宋淑军 司少艳 刘俊丽 周金莲 谭小清 贾桂玥 张建中

中图分类号: R852.22 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2012)08-0721-04

摘要: 目的 观察雷奈酸锶这种新型的抗骨质疏松药,在模拟微重力环境对成骨细胞分化功能的影响。**方法** 利用碱性磷酸酶活性测定了解小鼠成骨样细胞 MC3T3-E1 的分化情况,利用旋转细胞培养系统模拟微重力环境。**结果** 模拟微重力环境可以抑制 MC3T3-E1 细胞分化功能,雷奈酸锶可以保护模拟微重力环境 MC3T3-E1 细胞的分化功能。**结论** 在模拟微重力环境雷奈酸锶对成骨细胞分化功能具有保护作用,这为雷奈酸锶治疗微重力环境骨丢失提供了理论和实验依据。

关键词: 微重力; 雷奈酸锶; 成骨细胞; 分化; 骨丢失

The effect of strontium ranelate on differentiation of osteoblasts in simulated microgravity SONG Shujun, SI Shaoyan, LIU Junli, et al. Department of Pathology and Experimental Medicine, 306 Hospital of PLA, Beijing 100101, China)

Corresponding author: ZHANG Jianzhong, Email: zhangjz55@sina.com

Abstract: Objective To investigate the effect of strontium ranelate, a novel anti-osteoporotic agent, on the differentiation of osteoblasts under simulated microgravity. **Methods** The differentiation of mouse osteoblasts MC3T3-E1 was measured with alkaline phosphatase activity. Microgravity was induced by rotating the cell culture system. **Results** Simulated microgravity inhibited the differentiation of MC3T3-E1 cells and this could be protected by strontium ranelate. **Conclusion** Strontium ranelate plays a protective role in the differentiation of osteoblasts in simulated microgravity. This provides a theoretical and experimental evidence for strontium ranelate to treat microgravity-induced bone loss.

Key words: Microgravity; Strontium ranelate; Osteoblast; Differentiation; Bone loss

航天飞行过程中微重力环境使人体多个器官和组织发生显著而持续的生理或病理变化,其中骨丢失是目前航天事业面临最严重的问题,也是长期太空飞行最大的障碍^[1]。太空微重力环境骨代谢平衡紊乱是导致快速骨丢失的重要原因,骨形成功能降低,骨吸收功能增强,从而导致骨代谢的不平衡^[2,3]。在骨代谢的两种主要细胞成分——成骨细胞和破骨细胞中,成骨细胞在骨代谢过程中起着非常重要的作用,成骨细胞不仅负责骨的形成,而且负责调节破骨细胞的生成和活性,成骨细胞功能的正常是维持骨代谢正常的必要保障。因此微重力环境中成骨细胞功能的研究对了解微重力所致骨代谢不

平衡具有重要意义。成骨细胞形成或分化是受 runx2 等转录因子的控制,在模拟微重力培养情况下,可明显抑制成骨细胞标志分子如碱性磷酸酶、骨钙素和 I 型胶原表达^[4],说明微重力对成骨细胞分化有抑制作用。细胞分化功能的正常是在细胞新陈代谢过程中维持成骨细胞数量的必备条件。因此纠正微重力对成骨细胞分化的影响可能是治疗微重力环境骨丢失的一种重要手段。

雷奈酸锶是一种新型的抗骨质疏松药,具有促进骨形成、抑制骨吸收的双重作用^[5,6],与微重力环境呈反方向影响骨代谢,因此从理论上推测,雷奈酸锶可能是一种预防及治疗太空微重力环境骨丢失的理想药物。雷奈酸锶不仅可以促进成骨细胞的增殖、抑制其凋亡还可以促进成骨细胞的分化。有研究显示^[7,8],雷奈酸锶可以增加成骨细胞分化因子 runx2 的表达,还可以提高碱性磷酸酶的活性,但雷

作者单位: 100101 北京,中国人民解放军第 306 医院病理实验科(宋淑军、司少艳、刘俊丽、周金莲、谭小清、张建中); 100120 北京,北京黄寺美容外科医院妇产科(贾桂玥)

通讯作者: 张建中, Email: zhangjz55@sina.com

奈酸锶在微重力环境对成骨细胞分化的影响尚未见报道。本研究目的是利用地面上模拟微重力实验技术,探讨雷奈酸锶在模拟微重力环境对成骨细胞分化的影响,为微重力环境骨丢失的防治提供实验和理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

细胞培养液 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)及新生牛血清为 Gibco 产品。小鼠成骨样细胞系 MC3T3-E1 为本室保存。雷奈酸锶由法国 Servier 公司研制生产。碱性磷酸酶(ALP)测定试剂盒和蛋白定量试剂盒分别购自南京建成生物工程研究所和北京索莱宝科技有限公司。

1.2 MC3T3-E1 细胞传代培养

小鼠成骨样细胞株 MC3T3-E1 培养液使用 DMEM,含有 10% 新生牛血清,青霉素(100 U/ml),链霉素(100 U/ml),细胞培养在 37℃、含 5% 的 CO₂培养箱中,生长至 80% 融合时进行传代或实验。

1.3 细胞 ALP 活性的测定

经传代的细胞被种植在 24 孔板(10⁴/cm²),培养过夜,然后细胞换为促成骨细胞分化培养液(除含普通细胞培养液的成分外还含有 10⁻⁸ mol/L 地塞米松, 10 mmol/L β-甘油磷酸钠和 50 μmol/L 抗坏血酸,以及含不同浓度的雷奈酸锶培养 7 天(于第 4 天换液), PBS 冲洗细胞后每孔加 100 μl 的 PBS 含 0.5% Triton X-100。30 分钟后,从每孔分别取两个相同体积的标本用做 ALP 和蛋白的测定,测定方法按试剂盒使用说明操作。细胞碱性磷酸酶活性是成骨细胞分化的标志物, ALP 活性的测定可以反映成骨细胞的分化程度。碱性磷酸酶可以将磷酸苯二钠分解成游离酚和磷酸,在碱性环境下游离酚和 4-氨基安替吡啉作用而产生红色的醌类化合物,生成醌类化合物颜色的深浅与碱性磷酸酶的活性成正比,因此根据酚标准物可以计算出待测样本中 ALP 作用于底物产生游离酚的量,以此计算标本中 ALP 的活性。为了排除由于细胞数量对 ALP 活性测定的影响, ALP 活性通过细胞蛋白量来校正,单位采用微克/毫克(μg/mg)表示。

1.4 模拟微重力环境的细胞培养

体外模拟微重力细胞培养采用充满液体的圆柱形培养容器沿水平轴旋转。细胞 MC3T3-E1(10⁴/cm²)被种植在置于 6 孔板中的玻片(2.2 cm × 2.6 cm)上,在各孔中加入新生牛血清的培养基中, 37℃、含

5% 的 CO₂中进行培养过夜,然后把玻片转移至盛满促成骨细胞分化培养液以及不同浓度的雷奈酸锶的回转器专用培养容器中,沿水平轴连续回转(30 r/min, 37℃)培养 7 天(于第 4 天换液),并设对照组(在相同的培养容器中)静止培养 7 天。然后把玻片经 PBS 冲洗,细胞用 100 微升的 PBS 含 0.5% Triton X-100 裂解 30 分钟,分别取两个相同体积的标本用做 ALP 和蛋白的测定。

1.5 统计学方法

采用双尾非成对 Student's *t*-检验法比较处理组和对照组间测定值, *P* < 0.05 被判定为统计学有显著差异。

2 结果

2.1 雷奈酸锶对成骨细胞分化的影响

在促成骨细胞分化培养环境中雷奈酸锶对成骨细胞 ALP 的活性呈剂量依赖性的促进作用, 锶的浓度在 1 μmol/L 时即可显著增加 MC3T3-E1 细胞 ALP 的活性(*P* < 0.05), 5 mol/L 雷奈酸锶使 ALP 活性进一步增加(图 1A),即在促成骨细胞分化培养环境中,雷奈酸锶有促成骨细胞分化的功能,同时蛋白定量分析在促成骨细胞分化培养环境雷奈酸锶可以使成骨细胞蛋白量增加(图 1B),这与雷奈酸锶促细胞增殖有关,这一作用通过 MTT 法得以证实(结果在此未列出)。

2.2 雷奈酸锶在模拟微重力环境对成骨细胞分化的影响

为了探讨在模拟微重力环境雷奈酸锶对成骨细胞分化的影响,本实验利用多样本回转器,发现旋转培养的 ALP 活性较未旋转组明显降低,表示细胞分化功能在模拟微重力环境明显减弱(图 2A)。而当细胞培养液中加入 1 mol/L 或 5 mol/L 的雷奈酸锶时,旋转培养的细胞所得 ALP 的活性则较无雷奈酸锶旋转组明显提高,与无旋转组接近(图 2),说明雷奈酸锶可保护 MC3T3-E1 细胞在模拟微重力环境下的分化功能,而且通过蛋白定量分析观察到,在模拟微重力环境促成骨细胞分化培养条件下雷奈酸锶可以促进成骨细胞蛋白量增加(图 2B)。

3 讨论

雷奈酸锶呈剂量依赖性的增强成骨样细胞 MC3T3-E1 的 ALP 活性,这证实了雷奈酸锶对成骨细胞分化功能的刺激作用。雷奈酸锶不仅可以促进成骨细胞的增殖、抑制其凋亡还可以促进成骨细胞

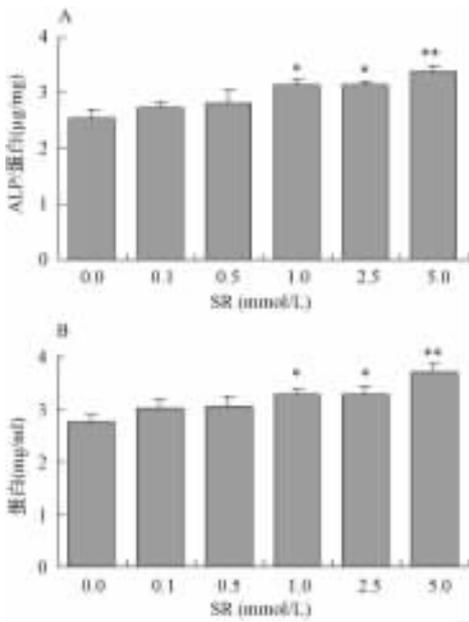


图1 雷奈酸锶(SR)在促成骨细胞分化培养环境对ALP活性和蛋白的影响
与无雷奈酸锶处理组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

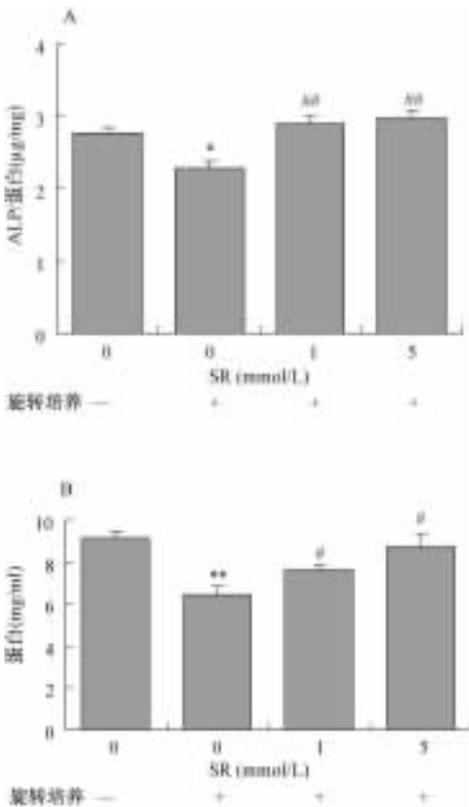


图2 在模拟微重力环境雷奈酸锶(SR)对MC3T3-E1细胞ALP活性和蛋白的影响
与未旋转培养对照组比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与旋转培养无雷奈酸锶组比# $P < 0.05$; ## $P < 0.01$

万方数据

的分化^[7,8]。细胞分化功能的正常对保持组织结构和功能完整具有非常重要的作用,无论是正常组织代谢还是组织修复,充足的细胞数量是必要的保障。这种功能在模拟微重力环境是否有同样的效果,目前尚无报道。

本实验结果显示模拟微重力环境使成骨样细胞ALP活性降低,即抑制细胞的分化功能,而雷奈酸锶在模拟微重力环境中可以防止ALP活性的下降,保护成骨样细胞的分化功能,而免受模拟微重力环境对成骨细胞分化功能的抑制作用。这可能从细胞水平为使用雷奈酸锶治疗太空微重力环境的骨丢失提供了依据。

近年来为了深入了解微重力环境骨丢失的机理,人们在细胞水平做了大量研究。重力或机械刺激对成骨细胞的形成和功能起着非常重要的作用,在微重力情况下培养的成骨细胞,表现为受抑制状态。小鼠成骨样细胞MC3T3-E1在太空中培养9天,明显抑制细胞的早期生长基因/生长因子环氧化酶-2、c-myc、细胞增殖核抗原、成纤维细胞生长因子等的基因表达,刺激诱导凋亡的基因表达^[9,10],而抑制成骨细胞分化因子runx2和标志物(碱性磷酸酶、骨钙素和I型胶原)的表达^[4],这些结果均说明微重力环境对成骨细胞的负面影响,这可能是导致微重力环境快速失骨的重要原因之一。本实验结果显示雷奈酸锶可以纠正由于微重力环境所致成骨细胞分化功能的下降,而且以前我们实验结果也显示雷奈酸锶可以在模拟微重力环境促进成骨细胞的增殖和抑制成骨细胞的凋亡^[11],说明雷奈酸锶在微重力环境对成骨细胞功能具有促进或保护作用。这可能为雷奈酸锶从细胞水平针对病因治疗微重力环境骨丢失提供了理论证据,但有关雷奈酸锶对微重力环境骨丢失的治疗作用尚需进行大量体内外的研究。

结论:体外实验结果显示模拟微重力环境可以降低成骨细胞的分化功能,而雷奈酸锶在模拟微重力环境对成骨样细胞的分化功能具有保护作用,使其免受微重力环境的影响。

【参 考 文 献】

[1] FONG K. The next small step. BMJ, 2004, 329 (7480):1441-1444.
 [2] NABAHI N, Khandani A, Camirand A, et al. Effects of microgravity on osteoclast bone resorption and osteoblast cytoskeletal organization and adhesion. Bone, 2011,9(5):965-74.

- [3] TAMMA R, Colianni G, Camerino C, et al. Microgravity during spaceflight directly affects in vitro osteoclastogenesis and bone resorption. *FASEB J*, 2009, 23(8):2549-54.
- [4] SHEYN D, Pelled G, Netanel D, et al. The effect of simulated microgravity on human mesenchymal stem cells cultured in an osteogenic differentiation system: a bioinformatics study. *Tissue Eng Part A*, 2010, 16(11):3403-12.
- [5] PRZEDLACKI J. Strontium ranelate in post-menopausal osteoporosis. *Endokrynol Pol*, 2011, 62(1):65-72.
- [6] REGINSTER JY, Deroisy R, Neuprez A, et al. Strontium ranelate: new data on fracture prevention and mechanisms of action. *Curr Osteoporos Rep*, 2009, 7(3):96-102.
- [7] BRENNAN TC, Rybchyn MS, Green W, et al. Osteoblasts play key roles in the mechanisms of action of strontium ranelate. *Br J Pharmacol*. 2009, 157(7):1291-300.
- [8] FROMIGUÉ O, Haÿ E, Barbara A, et al. Essential role of nuclear factor of activated T cells (NFAT)-mediated Wnt signaling in osteoblast differentiation induced by strontium ranelate. *J Biol Chem*, 2010, 285(33):25251-8.
- [9] HUGHES-Fulford M. Changes in gene expression and signal transduction in microgravity. *J Gravit Physiol*, 2001, 8:1-4.
- [10] CAPULLI M, Rufo A, Teti A, et al. Global transcriptome analysis in mouse calvarial osteoblasts highlights sets of genes regulated by modeled microgravity and identifies a "mechanoresponsive osteoblast gene signature". *J Cell Biochem*, 2009, 107(2):240-52.
- [11] 宋淑军, 司少艳, 牛忠英, 等. 雷奈酸锶在模拟微重力环境对成骨细胞增殖功能的影响. *中国骨质疏松杂志*, 2011, 17(2): 106-108.

(收稿日期: 2012-02-29)

(上接第 766 页)

- of metformin by osteoblasts from rat mandible. *Arch Oral Biol*, 2009, 54(10):951-962.
- [14] Cortizo A M, Sedlinsky C, McCarthy A D, et al. Osteogenic actions of the anti-diabetic drug metformin on osteoblasts in culture. *Eur J Pharmacol*, 2006, 536(1-2):38-46.
- [15] Kanazawa I, Yamaguchi T, Yano S, et al. Metformin enhances the differentiation and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells via AMP kinase activation as well as eNOS and BMP-2 expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 375(3):414-419.
- [16] Gao Y, Li Y, Xue J, et al. Effect of the anti-diabetic drug metformin on bone mass in ovariectomized rats. *Eur J Pharmacol*, 2010, 635(1-3):231-236.
- [17] Tang ZH, Sahu SN, Khadeer MA, et al. Overexpression of the ZIP1 zinc transporter induces an osteogenic phenotype in mesenchymal stem cells. *BONE*, 2006, 38(2):181-198.
- [18] Komori T. Regulation of skeletal development by the Runx family of transcription factors. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2005, 95(3):445-453.
- [19] Franceschi RT, Ge CX, Xiao GZ, et al. Transcriptional regulation of osteoblasts 2007. 1116, 196-207.
- [20] Marie PJ. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2008, 473(2):98-105.
- [21] Jang WG, Kim EJ, Bae IH, et al. Metformin induces osteoblast differentiation via orphan nuclear receptor SHP-mediated transactivation of Runx2. *Bone*, 2011, 48(4):885-893.
- [22] Levasseur R, Lacombe D, de Vernejoul MC. LRP5 mutations in osteoporosis-pseudoglioma syndrome and high-bone-mass disorders. *Joint Bone Spine*, 2005, 72(3):207-214.
- [23] Mai QG, Zhang ZM, Xu S, et al. Metformin stimulates osteoprotegerin and reduces RANKL expression in osteoblasts and ovariectomized rats. *J Cell Biochem*, 2011, 112(10):2902-2909.
- [24] Singh DK, Winocour P, Summerhayes B, et al. Low serum osteoprotegerin levels in normoalbuminuric type 1 diabetes mellitus. *Acta Diabetologica*, 2010, 471: S105-S110.
- [25] Bak E J, Park H G, Kim M, et al. The Effect of Metformin on Alveolar Bone in Ligature-Induced Periodontitis in Rats: A Pilot Study. *Journal of Periodontology*, 2010, 81(3):412-419.
- [26] Sedlinsky C, Molinuevo MS, Cortizo AM, et al. Metformin prevents anti-osteogenic in vivo and ex vivo effects of rosiglitazone in rats. *Eur J Pharmacol*, 2011, 668(3):477-485.

(收稿日期: 2012-02-28)

雷奈酸锶在模拟微重力环境对成骨细胞分化功能的影响

作者: [宋淑军](#), [司少艳](#), [刘俊丽](#), [周金莲](#), [谭小清](#), [贾桂玥](#), [张建中](#)
作者单位: [宋淑军, 司少艳, 刘俊丽, 周金莲, 谭小清, 张建中\(中国人民解放军第306医院病理实验科, 北京, 100101\)](#), [贾桂玥\(北京黄寺美容外科医院妇产科, 北京, 100120\)](#)
刊名: [中国骨质疏松杂志](#) 
英文刊名: [CHINESE JOURNAL OF OSTEOPOROSIS](#)
年, 卷(期): 2012, 18(8)

参考文献(11条)

1. [FONG K](#) [The next small step](#) 2004(7480)
2. [NABAVI N](#); [Khandani A](#); [Camirand A](#) [Effects of microgravity on osteoclast bone resorption and osteoblast cytoskeletal organization and adhesion](#)[外文期刊] 2011(05)
3. [TAMMA R](#); [Colaianni G](#); [Camerino C](#) [Microgravity during spaceflight directly affects in vitro osteoclastogenesis and bone resorption](#) 2009(08)
4. [SHEYN D](#); [Pelled G](#); [Netanel D](#) [The effect of simulated microgravity on human mesenchymal stem cells cultured in an osteogenic differentiation system:a bioinformatics study](#)[外文期刊] 2010(11)
5. [PRZEDLACKI J](#) [Strontium ranelate in post-menopausal osteoporosis](#) 2011(01)
6. [REGINSTER JY](#); [Deroisy R](#); [Neuprez A](#) [Strontium ranelate:new data on fracture prevention and mechanisms of action](#) 2009(03)
7. [BRENNAN TC](#); [Rybchyn MS](#); [Green W](#) [Osteoblasts play key roles in the mechanisms of action of strontium ranelate](#)[外文期刊] 2009(07)
8. [FROMIGUÉ O](#); [Ha E](#); [Barbara A](#) [Essential role of nuclear factor of activated T cells \(NFAT\)-mediated Wnt signaling in osteoblast differentiation induced by strontium ranelate](#)[外文期刊] 2010(33)
9. [HUGHES-Fulford M](#) [Changes in gene expression and signal transduction in microgravity](#) 2001
10. [CAPULLI M](#); [Rufo A](#); [Teti A](#) [Global transcriptome analysis in mouse calvarial osteoblasts highlights sets of genes regulated by modeled microgravity and identifies a "mechanoresponsive osteoblast gene signature"](#) 2009(02)
11. [宋淑军](#); [司少艳](#); [牛忠英](#) [雷奈酸锶在模拟微重力环境对成骨细胞增殖功能的影响](#) 2011(02)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201208010.aspx