

美兰染色对药物干预后成骨样细胞增殖功能的检测

马艳芬 李万根 陈澍

摘要:目的 用胰岛素(INSU)、胰岛素样生长因子-1(IGF-1)干预体外培养的人成骨肉瘤细胞 MG63(MG63)并以 17-β 雌二醇(E₂)做阳性对照。观察细胞增殖功能的改变,为治疗 OP 提供实验依据。方法 将 MG63 细胞接种到 DMEM 培养基中培养,并进行药物干预。用美兰染色,酶标仪测定细胞 OD 值。结果 各药物组内 OD 值比较均有统计学差异($P < 0.05$),量效关系呈抛物线形。三药物组间细胞增殖率差异无统计学意义($P > 0.05$)。三组药物的最佳药物浓度分别为 5×10^{-8} mol/L、 5×10^{-8} mol/L、 10^{-8} mol/L。结论 与 E₂ 相同,INSU、IGF-1 两种药物均有促进 MG63 细胞增殖的作用。

关键词: 胰岛素; IGF-1; MG63 细胞; 增殖

Methylene blue staining examination for the proliferation of human osteosarcoma cell line MG63 MA Yanfen, LI Wangen, CHEN Shu. Department of Endocrinology, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510260, China

Abstract: Objective To investigate the effect of insulin (INSU) and insulin like growth factor-1 (IGF-1) on proliferation of the human osteosarcoma cell line MG63 (MG63) *in vitro*, and to observe the changes of cell proliferation thus to provide evidence for OP treatment. **Methods** The MG63 cell (10^5 /mL) were transferred into the phenol-free DMEM medium with 10% fetal bovine serum (FBS) for 24 hours. The cultured MG63 were exposed to five different concentrations of INSU, IGF-1 and E₂ (10 paralleled wells for every each concentration of medicine) followed by 44 hours culture with 0.1% bovine serum albumin (BSA) phenol-free DMEM. Zero concentration served as control group (CON). 17-β estradiol (E₂) was used as positive control. After stained by 3-[4,5-Dimethylthiazolyl]-2,5-Diphenyl Tetrazo-diumbromide, the OD of INSU, IGF-1 and E₂ groups were examined. **Results** No difference was found in the proliferation rate among the three groups ($P > 0.05$), but significant difference was shown within each group between pre-and after medication was added ($P < 0.05$). The changes in proliferation rate was dose-independent. **Conclusions** INSU and IGF-1 can promote MG63 proliferation as E₂.

Key words: Insulin; IGF-1; MG63 cell; Proliferation

骨质疏松(OP)是以骨量及骨质量进行性减少为特征并导致脆性增加,容易骨折的临床综合征,骨质疏松已成为老年人骨折的主要原因。糖尿病患者大约有50%发生OP^[1]。Langdahl等^[2]应用胰岛素样生长因子-1(IGF-1)对体外培养的人类成骨样细胞进行干预,结果发现IGF-1有促进成骨样细胞增殖的作用,并呈剂量依赖性,其增殖率为49%~

190%。Marcus^[3]实验发现,给原发性OP病人用外源性的IGF-1治疗,骨形成增加。而IGF-1与胰岛素原有60%的结构同源性且具有胰岛素(INSU)样作用^[1]。本研究用美兰染色法对成骨样细胞MG63增殖功能进行检测,旨在观察INSU和IGF-1对成骨细胞增殖功能的影响。探讨OP的发生机制并观察INSU这一糖尿病的常用药物及IGF-1,是否与17-β雌二醇(E₂)一样具有保护骨量的作用,为OP尤其是糖尿病性OP的治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(000333)

作者单位:102600 北京大兴区人民医院内分泌科(马艳芬,原工作单位广州医学院第二附属医院)广州医学院第二附属医院内分泌科(李万根、陈澍)

通讯作者:马艳芬,Email: lilymyf@sohu.com

MG63 细胞(美国 ATCC)以无酚红的 10% FBS 的 DMEM(Invitrogen 公司)培养基培养于 5% CO₂ 95% 空气、饱和湿度、37°C 的 CO₂ 培养箱(Queue Systems, Inc)中。DMEM 内加有 100 U/ml 的青霉素、100 μg/ml 的链霉素及 5 × 10⁻³ mol/L 的羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES), 3 d 传代一次。将 MG63 按 1 × 10⁴/孔接种于 96 孔培养板(Castor 公司)的中间 60 孔(以排除边缘效应), 每种药物浓度 10 个平行孔, 并用 10 个空白未加药组做对照。用含 10% 胎牛血清(FBS, 杭州四季青生物工程材料有限公司)的无酚红的 DMEM 培养基培养。24 h 后吸去培养液, PBS 洗 2 次, 换以 0.1% 牛血清白蛋白(BSA)的 DMEM。

1.2 药物干预

用不同浓度的 INSU(Lily 公司)和 IGF-1(Sigma 公司)对 MG63 进行干预, 以 17-β 雌二醇(E₂, Sigma 公司)做阳性对照组。各药物干预 MG63 浓度(单位为 mol/L)分别为 INSU: 0, 10⁻⁸, 2 × 10⁻⁸, 5 × 10⁻⁸, 10⁻⁷, 2 × 10⁻⁷; IGF-1: 0, 10⁻⁹, 10⁻⁸, 2 × 10⁻⁸, 5 × 10⁻⁸, 10⁻⁷; E₂: 0, 10⁻¹⁰, 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶。分别以 C1, C2, C3, C4, C5, C6 表示(表 1), 其中 0 浓度组为空白对照(CON)。

1.3 美兰法检测成骨样细胞增殖功能

表 1 美兰染色检测不同药物对 MG63 增殖功能 OD 值的变化(̄x ± s)

组别	各药物浓度组平均 OD 值					
	C1(CON)	C2	C3	C4	C5	C6
INSU	0.21 ± 0.03 [#]	0.25 ± 0.02	0.29 ± 0.07 [△]	0.29 ± 0.14 ^{*△}	0.26 ± 0.05	0.19 ± 0.04 [#]
IGF-1	0.14 ± 0.03 [#]	0.15 ± 0.06 [#]	0.16 ± 0.02 [#]	0.18 ± 0.03 [△]	0.20 ± 0.05 ^{*△}	0.18 ± 0.06 [△]
E ₂	0.09 ± 0.04 [#]	0.10 ± 0.02 [#]	0.10 ± 0.03 [#]	0.14 ± 0.02 ^{*△}	0.14 ± 0.04 [△]	0.12 ± 0.03 ^{#△}

注: * 为最佳药物浓度组。同一药物组内比较[△]与 CON 组比较 P < 0.05; # 与最佳药物浓度组比较 P < 0.05

进一步计算不同药物对 MG63 增殖率的影响。细胞增殖率(%) = (最佳药物浓度组 - CON) / CON (OD 值); INS, IGF-1, E₂ 的细胞增殖率分别为(38.1 ± 10.2)%、(42.9 ± 10.6)%、(55.5 ± 26.2)%。3 组比较差异无显著性(P > 0.05), 见图 1。

3 讨论

本文所用的细胞培养方法参照 Palmer 等^[4]所用方法。由于一般的培养基为实验观察方便而加酚红, 而酚红有雌激素样作用, 因此, 本实验选用无酚红的 DMEM 培养基, 排除了酚红的上述干扰。另外也有些研究者选用 2% BSA 的无血清培养基进行细胞增殖功能的检测^[5]。本研究在实验开始时即应用 0.1% BSA 的无血清培养基, 以排除血清中雌激素的

药物干预 48 h 后吸去培养液, 0.15 mol/L 的盐水洗 3 次, 10% 的中性福尔马林固定 60 min, 1% 的美兰染色 30 min, 0.01 mol/L 的硼酸缓冲液洗 3 次, 加入 1:1 的无水乙醇和 0.01 mol/L 盐酸混合液(V/V), 30 min 后在全自动酶标仪上读取波长 630 nm 的吸光度(OD)值。

1.4 统计学处理

用 SPSS11.0 统计学软件进行统计分析及作图。所有数据均以均数 ± 标准差(̄x ± s)表示, 采用随机区组设计方差分析方法进行统计学处理, P < 0.05 为差异有显著性。

2 结果

美兰染色镜下观察, 细胞均匀分布, 其活细胞胞核和胞质均呈蓝色, 胞核深染。

美兰染色检测不同药物对 MG63 增殖功能的影响, 结果显示, 各组内不同药物浓度间 OD 值差异有显著性(P 均 < 0.05); INSU、IGF-1、E₂ 的最佳药物浓度分别为 5 × 10⁻⁸ mol/L、5 × 10⁻⁸ mol/L、10⁻⁸ mol/L。各组从低浓度至最佳药物浓度, 其 OD 值随药物浓度的增加而呈增加趋势, 达到最佳药物浓度后, 其 OD 值随药物浓度的增加而呈下降趋势, 其量效关系曲线呈抛物线型, 见表 1。

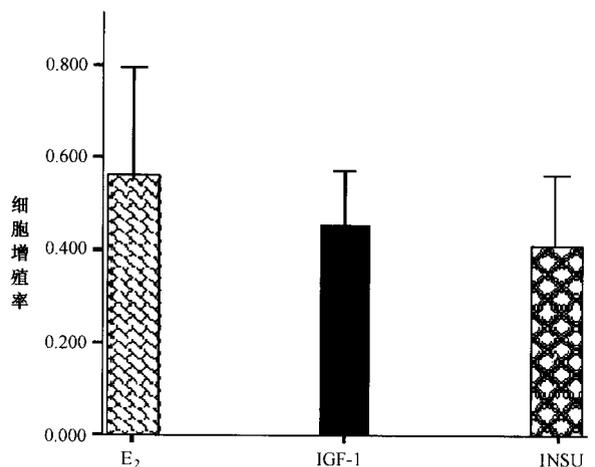


图 1 美兰染色法, 各药物组增殖率变化及比较

影响。

目前认为检测细胞增殖有以下几种方法,即活细胞记数、同位素掺入、美兰(美兰酶标法)和流式计数法。其中美兰染色法是沿用已久的一种成熟的细胞计数法,它经济、方便、无污染,是目前国内外认可的一种细胞计数方法,如 Langdahl 等^[2]用 IGF-1 和 IGF-2 对人成骨细胞进行干预,检测其 BGP 和血清 COL1 羧基端前肽(PICP)水平,同时应用美兰染色进行细胞计数。本方法灵敏度高、重复性好、操作简单,已广泛应用于各种活细胞的检测。因此,本研究选用美兰酶标法检测细胞的增殖功能,其中美兰测定采用 Tumber 等^[6]所用方法。结果显示:INSU、IGF-1 及阳性对照 E_2 均可促进 MG63 的增殖。

本研究按照药物干预实验梯度增加的给药原则并参考国内外文献,确定各种药物的干预剂量,其中 INSU 的剂量参考文献^[7],文中 Kim 用 10^{-9} mol/L、 10^{-8} mol/L、 10^{-7} mol/L 的 INSU 干预成骨样细胞系,发现其胶原水平呈剂量依赖性增加,在 10^{-7} mol/L 浓度时检测其胶原增加量为 50%。本实验 INSU 的浓度分别为 10^{-8} mol/L、 5×10^{-8} mol/L、 2×10^{-7} mol/L,其最佳药物浓度在 2×10^{-7} mol/L,提示 INSU 浓度仍有增加的必要。应用 IGF-1 干预成骨样细胞的研究较多,其剂量从 10^{-9} ~ 10^{-7} mol/L 不等^[8,2],本实验选用 10^{-9} ~ 10^{-7} mol/L 之间的 5 个浓度作为干预剂量。Kasukawa 等^[9]的实验也发现 IGF-1 的干预可使原骨祖细胞数量增加 63% ;Rydziel 等^[8]发现 IGF-1 在抑制胶原酶 3 的转录过程中,在 10^{-8} ~ 10^{-7} mol/L 范围内,其作用呈浓度依赖性。本研究与上述结果相仿。关于 E_2 的浓度选择,Cheng 等^[10]发现在 10^{-8} ~ 10^{-7} mol/L 浓度时, E_2 对成骨样细胞的作用最强,与本实验结果相符。

纵观近 10 年来国内外在此领域的研究,大多用 IGF-1、IGF-2^[2]、生长素^[11]、雌激素^[12]、PTH 和其他生长因子等干预成骨样细胞系来检测细胞增殖和分化功能。用 INSU 作为干预药物的报道甚少。本研究采用了 INSU 作为干预药物,首次发现 INSU 有促进成骨样细胞增殖的作用,证实了 INSU 这一来源方便、费用经济、副作用少的生物性制剂和 IGF-1 具有与 E_2 相同的促进成骨样细胞增殖的作用。众所周知 2 型 DM 患者成骨细胞功能下降的主要影响因

素是高血糖的毒性作用和 INSU 的相对或绝对不足^[13]。所以,INSU 的发现为 INSU 类药物用于临床来治疗 OP,尤其是糖尿病伴发 OP 提供了理论和实验依据。

【参 考 文 献】

- [1] 王宗焯,许樟荣,宋淑军. 糖尿病的临床表现及影像学特点. 中国糖尿病杂志,1998,6:230-231,33.
- [2] Langdahl BL, Kassem M, Moller MK, et al. The effect of IGF-1 and IGF-2 on proliferation and differentiation of human osteoblast and interactions with growth hormone. Euro J Clin Invest,1998,28:176-183.
- [3] Marcus R. Skeletal effects of GH and IGF-1 in adults. Endocrine, 1997,7:53-55.
- [4] Palmer G, Bonjour J P, Caverzasio J. Expression of a newly identified phosphate transporter/retrovirus receptor in human SaOS-2 osteoblast-like cells and its regulation by insulin-like growth factor I. Endocrinology,1997,138:5202-5209.
- [5] Kawakami A, Nakashima T, Tsuboi M, et al. Insulin-like growth factor I stimulates proliferation and Fas-mediated apoptosis of human osteoblasts. Biochem Biophys Res Commun,1998,247:46-51.
- [6] Tumber A, Meikle MC, Hill PA. Autocrine signals promote osteoblast survival in culture. J Endocrinol,2000,167:383-390.
- [7] Kim SJ, Chun JY, Kim MS. Insulin stimulates production of nitric oxide via ERK in osteoblast cells. Biochem Biophys Res Commun, 2000,278:712-718.
- [8] Rydziel S, Delany AM, Canalis E. Insulin-like growth factor I inhibits the transcription of collagenase 3 in osteoblast cultures. J Cell Biochem,1997,67:176-183.
- [9] Kasukawa Y, Stabnov L, Miyakoshi N, et al. Insulin-like growth factor I effect on the number of osteoblast progenitors is impaired in ovariectomized mice. J Bone Miner Res,2002,17:1579-1587.
- [10] Cheng MZ, Rawlinsine SC, Pitsillides AA, et al. Human osteoblast proliferative responses to strain and 17β -estradiol are mediated by the estrogen receptor and the receptor for insulin-like growth factor I. J Bone Miner Res,2002,17:593-602.
- [11] Devlin RD, Du Z, Buccilli V. Transgenic mice overexpressing insulin-like growth factor binding protein-5 display transiently decreased osteoblastic function and osteopenia. Endocrinology,2002,143:3955-3962.
- [12] Kassem M, Okazaki R, Harris SA, et al. Estrogen effects on insulin-like growth factor gene expression in a human osteoblastic cell line with high levels of estrogen receptor. Calcif Tissue Int,1998,62:60-66.
- [13] 邝建,周晓红,陈红梅. 2 型糖尿病患者血清 I 型前胶原羧基端前肽改变. 广东医学,2000,21:653-654.

(收稿日期:2005-02-28)