

铁调素及铁离子对人成骨细胞(hFOB 1.19)内钙离子转运的影响

张鹏 徐又佳 赵东阳 王冰 马勇 钱忠明 柯亚

中图分类号: R336 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2008)07-0504-04

摘要:目的 研究铁调素(Hepcidin)及铁离子对人成骨细胞(hFOB 1.19)内 Ca^{2+} 转运的影响。方法 成骨细胞 34°C 培养 3~4 天至细胞密度为 90% 胰蛋白酶消化后分种于 12 孔培养板(每孔内置一圆形盖玻片)。(1)空白组加入双蒸水,实验组加入不同浓度 Hepcidin(双蒸水配制),干预 24 h 后用激光共聚焦扫描显微镜(CLSM)检测。(2)空白组加入双蒸水,实验组加入不同浓度的 DFO 和 FAC,分别干预后立即用激光共聚焦扫描显微镜检测。结果 经激光共聚焦扫描显微镜(CLSM)检测发现(1)随着成骨细胞外 Hepcidin 浓度的升高,成骨细胞内钙离子的绿色荧光强度增强。(2)随着成骨细胞外 DFO 浓度的升高,成骨细胞内钙离子的绿色荧光强度增强,相反,随着成骨细胞外 FAC 浓度的升高,成骨细胞内钙离子的绿色荧光强度减弱。结论 (1)Hepcidin 可促进成骨细胞内 Ca^{2+} 增加。(2)成骨细胞外 Fe^{3+} 浓度的减少可以增加细胞内的 Ca^{2+} ,而胞外 Fe^{3+} 浓度增加则减少细胞内的 Ca^{2+} 。

关键词: 铁调素; 铁离子; 钙离子; 人成骨细胞(hFOB 1.19); 激光共聚焦扫描显微镜

Influence of hepcidin and iron ion out of osteoblast on calcium transportation ZHANG Peng, XU Youjia, ZHAO Dongyang, et al. Department of Orthopedics, the Second Hospital Affiliated to Soochow University, Jiangsu Suzhou 215004, China

Abstract: **Objective** To study the influence of Hepcidin and Fe^{3+} concentrations change out of hFOB 1.19 cells on Ca^{2+} transportation. **Methods** The hFOB 1.19 was cultured at 34°C for 3-4 days, being digested with Trypsin, then placed in the 12 hole culture board(one coverslip in one hole).(1) Add double distilled water into the control group and Hepcidin of different concentrations into the experimental group. Confocal laser scanning microscope(CLSM) was used in this study 24 hours later. (2) Add double distilled water into the control group and add DFO and FAC of different concentrations into the experimental group, then confocal laser scanning microscope(CLSM) was used in this study immediately. **Results** It was observed under CLSM: (1) the fluorescence intensity of Ca^{2+} in hFOB 1.19 increased significantly with the increase of Hepcidin outside them; (2) the fluorescence intensity of Ca^{2+} in hFOB 1.19 also increased gradually with the decrease of Fe^{3+} concentration outside them, however, it decreased with the increase of Fe^{3+} concentration out of them. **Conclusions** (1)The Ca^{2+} transportation was increased with the increase of Hepcidin out of hFOB 1.19 cells; (2)The Ca^{2+} transportation was increased with the decrease of Fe^{3+} out of hFOB 1.19 cells but was hindered with the increase of Fe^{3+} out of them.

Key words: Hepcidin; Ca^{2+} ; Fe^{3+} ; hFOB 1.19; Confocal laser scanning microscope(CLSM)

基金项目: 江苏省高校自然科学基金(05KJB320125) 苏州市国际科技合作项目(SWH0617) 苏州大学医学发展基金(E126621) 江苏省六大高峰人才项目(07-B-032) 江苏省医学重点人才项目(RC2007100)

作者单位: 215004 苏州 苏州大学附属第二医院骨科(张鹏、徐又佳、赵东阳、王冰、马勇),香港理工大学(钱忠明),香港中文大学(柯亚)

通讯作者: 徐又佳, Email: xuyoujia@medmail.com.cn

近来许多研究显示体内铁贮存与骨质矿化有着密切的联系,并且成骨细胞系中有以铁蛋白为基础的铁摄入和贮存系统存在,它能够调节骨内金属离子动态平衡^[1]。铁调素是新近发现的调节铁代谢的类激素,其在哺乳动物体内的铁动态平衡中发挥有效作用,可以作为激素样物质调节铁代谢旁路途径的吸收、利用、贮存和再利用^[2]。成骨细胞是骨组织中的主要成份,是骨的修复与重建过程中的重要功能细胞,由其分泌的钙结节和胶原纤维构成骨骼的力学基础。因此关于铁动态平衡的改变如何影响骨代谢的研究显得十分有意义,这可能会为今后骨质疏松的干预提供新的思路及平台。

1 材料和方法

1.1 细胞与试剂

实验细胞:人成骨细胞(hFOB 1.19)(中国科学院上海细胞所细胞库),按常规方法进行培养,用 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM, Gibco) F12(Gibco)胎牛血清(FBS,杭州四季青)新霉素(G418);实验试剂:荧光指示剂(Fluo-3/AM,苏州大学放射医学与公共卫生实验室提供)铁调素(Hepcidin, Peptide Institute)去铁铵(Desferrioxamine/DFO,诺华制药) Fe^{3+} 供体枸橼酸铁铵(Ferric ammonium Citrate/FAC,国药集团化学试剂有限公司);DFO、FAC均用双蒸水配制。

1.2 细胞准备

人成骨细胞(hFOB 1.19)34℃培养3~4 d,胰蛋白酶消化、细胞密度达90%后按分组要求分种不同编号的12孔培养板,培养板每孔内放置一圆形载玻片(载玻片清洗并用无水乙醇浸泡预处理);细胞培养液比:DMEM(高糖)/F12=1/1,加入胎牛血清(终浓度10%)G418(终浓度0.3%)继续培养。

1.3 实验分组

1.3.1 铁调素组 细胞种于12孔培养板后(每孔内置一圆形盖玻片),每四孔内的细胞为一组,待细胞密度长至60%~70%,空白组加双蒸水(H_0 组),实验组加不同浓度的Hepcidin(双蒸水配制,终浓度分别为10、50 nM/L,称为 H_1 组、 H_2 组),干预24 h后用CLSM检测。临测前2 h换成无血清培养基,防止荧光染色剂淬灭。

1.3.2 低浓度铁组 细胞种于12孔培养板后(每孔内置一圆形盖玻片),每四孔内的细胞为一组,待细胞密度长至60%~70%,换成无血清培养基,防止荧光染色剂淬灭。空白组加入双蒸水(D_0 组),实验

组加入不同浓度的DFO(终浓度分别为200、300 $\mu\text{mol/L}$,称为 D_1 组、 D_2 组),干预后立即用CLSM检测。

1.3.3 高浓度铁组 细胞种于12孔培养板后(每孔内置一圆形盖玻片),每四孔内的细胞为一组,待细胞密度长至60%~70%,换成无血清培养基,防止荧光染色剂淬灭。空白组加入双蒸水(F_0 组),实验组加入不同浓度的FAC(终浓度分别为50、100 $\mu\text{mol/L}$,称为 F_1 组、 F_2 组),干预后立即用CLSM检测。

1.4 CLSM 检测

先吸去各孔中的细胞培养液,用PBS冲洗载玻片2次。各孔均加入Fluo-3/AM(终浓度为20 $\mu\text{mol/L}$,DMSO配制),混匀后在34℃ 5%的 CO_2 培养箱内孵育并避光40 min,取出载玻片后用PBS清洗2次,洗掉多余的Fluo-3/AM,即可用于观察。然后置于激光共聚焦扫描显微镜载物台上,以波长488 nm的激光进行观察,记录细胞最佳切面的荧光分布以及亮度。

1.5 统计学处理

用Confocal assistant 软件采集细胞内钙离子荧光强度数据。用SPSS 13.0统计软件对观察结果进行统计处理,从每组约300个数据中随机选取60个数据。因每组数据不完全符合正态性和方差齐性故采用Brown-Forsythe近似方差检验,组间比较采用Dunnett's T3检验。

2 结果

2.1 不同铁调素组 Ca^{2+} 荧光强度的表现

激光共聚焦扫描显微镜检测发现 H_0 组荧光强度较弱为 54.73 ± 35.38 ($P < 0.05$)。随着Hepcidin浓度的增加,成骨细胞内钙离子的荧光强度逐渐增强, H_1 组的荧光强度为 73.19 ± 43.99 ($P < 0.05$), H_2 组为 151.84 ± 54.81 ($P < 0.05$),表明 Ca^{2+} 向细胞内的转运量增加,并且这种增加的趋势十分明显(图1)。

2.2 不同剂量低铁组 Ca^{2+} 荧光强度的表现

激光共聚焦扫描显微镜检测发现 D_0 组荧光强度较弱为 115.92 ± 63.51 ($P < 0.01$)。随着DFO浓度的增加,成骨细胞内钙离子的荧光强度呈增强趋势(其中 D_1 组的荧光强度为 133.82 ± 46.65 , D_2 组为 142.63 ± 40.38 , $P < 0.01$) (图2)。

2.3 不同剂量高铁组 Ca^{2+} 荧光强度的表现

激光共聚焦扫描显微镜检测发现 F_0 组荧光强

度较强 115.92 ± 63.51 ($P < 0.01$)。随着 FAC 浓度的增加,成骨细胞内钙离子的荧光强度呈减弱趋势

(其中 F_1 组的荧光强度为 76.16 ± 36.27 , F_2 组为 51.19 ± 28.75 , $P < 0.01$)(图 3)。

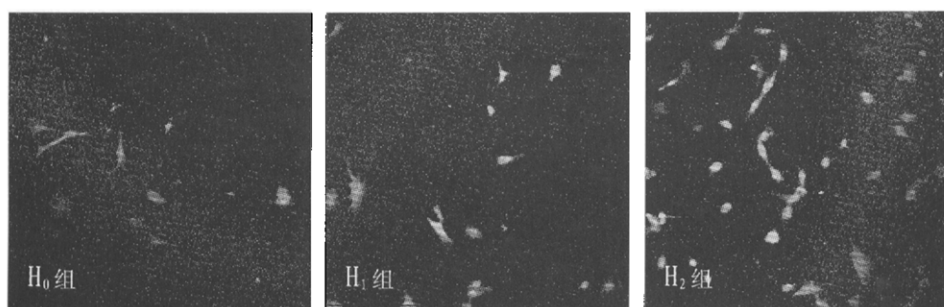


图 1 各组成骨细胞钙离子经荧光染色后的显像情况($\times 10$) H_0 组的成骨细胞内钙离子绿色荧光强度最弱; H_1 组成骨细胞内钙离子绿色荧光强度比空白组稍强; H_2 组成骨细胞内钙离子绿色荧光强度最强

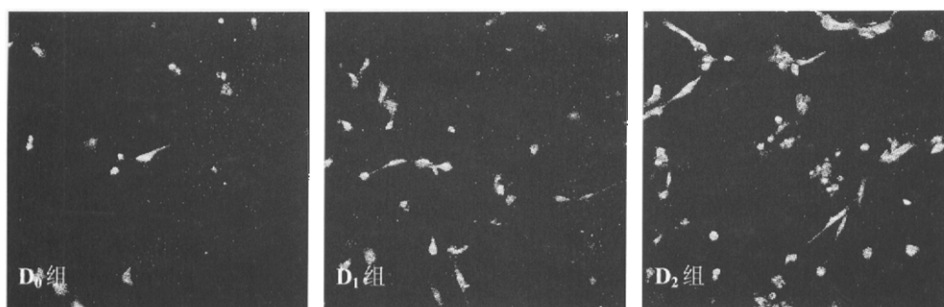


图 2 各组成骨细胞钙离子经荧光染色后的显像情况($\times 10$) D_0 组的成骨细胞内钙离子绿色荧光强度最弱; D_1 组成骨细胞内钙离子绿色荧光强度比空白组稍强; H_2 组成骨细胞内钙离子绿色荧光强度最强

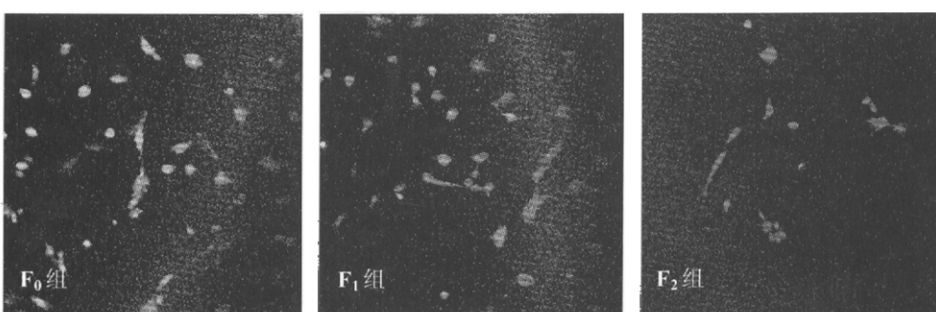


图 3 各组成骨细胞钙离子经荧光染色后的显像情况($\times 10$) F_0 组的成骨细胞内钙离子绿色荧光强度最强; F_1 组成骨细胞内钙离子绿色荧光强度比空白组稍弱; F_2 组成骨细胞内钙离子绿色荧光强度最弱

3 讨论

3.1 研究背景

铁是人体最丰富的必需微量元素之一,在生命代谢过程中有着重要作用。近几年来,许多研究结果认为体内铁贮存与骨质矿化有着密切的联系。

2000 年 Malecki 等^[3]的研究结果提出在铁缺乏状态,血清铁、铁转运蛋白的浓度影响骨矿化的正常过程。2004 年 Isomura 等^[4]在研究骨代谢与氧化应激的关系时发现:铁过载的饮食可以影响骨细胞的代谢过程。同年, Farrukh 等^[5]研究表明镰状红细胞贫血病人由于体内铁过载,会造成其骨量明显减少,骨质疏松的发病率明显增高。2005 年南非学者

Schnitzler^[6]研究认为:非洲黑人股骨颈骨折(FNF)患者的骨质疏松情况依次与铁超载、酗酒、坏血病相关。2006 年 Parelman 等^[7]使用刚断奶的雌性大鼠分别给予低铁、低钙的饮食喂养 10 周,测量大鼠骨骼骨矿物质含量(BMC)发现:铁缺乏会引起大鼠全身骨骼 BMC 下降,骨连接密度降低,小梁数目减少,小梁间隔增大,股骨皮质密度降低。

铁调素是一个富含半胱氨酸的抗菌多肽,是铁在小肠内吸收的主要调节因子。细胞外(血清中)铁浓度由铁调素控制,铁调素可抑制血清中铁的供给即抑制细胞内的铁向细胞外转运。目前研究表明体内铁调素主要作用于小肠、脾和骨组织,铁调素和转铁蛋白的相互作用维持细胞外正常的铁浓度;细胞外铁浓度变化可涉及机体相应组织正常功能变化^[8]。

2006 年马勇^[9]报道:在实验性骨质疏松模型中有铁代谢相关指标(铁调素)的显著性变化。以上各位学者在大体水平的发现为作者尝试以成骨细胞为平台,铁调素、铁离子、钙离子三者为载体来研究骨质疏松的细胞学改变提供了崭新的思路 and 理论依据。

3.2 本研究的主要发现细胞内钙离子浓度变化的可能原因

本实验是国内首次用铁调素及铁离子直接干预成骨细胞并观察细胞内钙离子的转运情况,如果细胞外的铁调素及铁离子可以影响成骨细胞内 Ca^{2+} 的浓度变化,那么通过刺激成骨细胞内 Ca^{2+} 浓度的增加便可促进成骨细胞外的钙盐沉淀,为骨基质的形成提供物质基础,从而为骨质疏松的治疗开辟新的思路。本研究发现:在离体情况下,①随着 hFOB 1.19 外铁调素的浓度增加, Ca^{2+} 向细胞内的转运量增加,并且这种增加的趋势十分明显。②hFOB 1.19 外 Fe^{3+} 浓度的降低有促进 Ca^{2+} 向细胞内转运的作用,但随着成骨细胞外 Fe^{3+} 浓度增加则有抑制细胞内 Ca^{2+} 向胞内转运的作用,且这两种促进和抑制作用都十分明显。这些都与以上各位学者在大体水平的发现有着惊人的吻合:①血清铁缺乏(血清中铁调素的浓度增加)→成骨细胞外 Fe^{3+} 减少→成骨细胞内钙离子增多→骨矿化受影响;②血清铁超载→成骨细胞外 Fe^{3+} 增多→成骨细胞内钙离子减少→骨质疏松~股骨颈骨折或椎体骨折。

3.3 成骨细胞内钙离子浓度变化的可能原因

钙离子通道是参与成骨细胞功能调节的重要途径之一^[10,11]。静息状态下,细胞内维持着一定的钙

离子水平,当细胞膜受到信号(膜电位的改变或特定的化学物质)刺激时,钙离子通道蛋白构象变化表现为通道的开放状态或关闭状态。在开放状态下,钙离子可以由胞外进入胞内;反之,关闭状态下,钙离子是不能通过此通道进入细胞内。由此,我们是否可以做出以下推断:成骨细胞外 Fe^{3+} 浓度降低或升高所导致的细胞内 Ca^{2+} 增多和减少与成骨细胞膜上的电压依赖性钙通道的开放与关闭有关。成骨细胞外 Fe^{3+} 浓度改变导致成骨细胞膜电位升高或降低从而引起钙通道的开放与关闭。

3.4 本研究中存在问题的分析

本实验中所检测的 H_0 、 D_0 、 F_0 都是未加任何干预的空白组细胞,理论上三者值应该相近,但本研究所检测的 H_0 值明显低于 D_0 和 F_0 。作者认为主要原因可能有以下两点:①培养细胞的代数、天数 培养细胞以 1 比 2 传代第 2 天和以 1 比 3 传代第 3 天的细胞密度可能是相似的,但功能状态可能不同,因为细胞的个别功能需要一定时间分化表达^[12]。 H_0 组细胞为待细胞密度长到 60%~70% 后 24 h 后检测而 D_0 和 F_0 组细胞为待细胞密度长到 60%~70% 后立即检测,这 24 h 的差异可能是导致细胞活性及功能状态不同的原因之一。②冻复细胞功能上的差异 王小兵等^[13]在人眼睫状肌细胞的研究中发现冻复细胞的荧光染色效果及细胞功能要差于正常的培养细胞,这可能与细胞在冻复过程中曾受到高浓度二甲亚砷所造成的细胞膜损害有关,进而影响细胞功能以及相关测定。作者于中国科学院上海细胞所细胞库购买细胞后,经过数次传代,将一半细胞冻存,另一半继续培养、传代、冻存。第一部分实验所使用的 D_0 和 F_0 组细胞未经冻复。而 2 个月所做第二部分实验的 H_0 组细胞为经过二甲亚砷冻存和复苏后的细胞。

【参 考 文 献】

- [1] 徐又佳,钱忠明,俞晨.铁调素(Hepcidin)在骨质矿化中的作用.中国骨质疏松杂志,2005,11:541-543.
- [2] Fleming RE, Sly WS. Mechanisms of iron accumulation in hereditary hemochromatosis. Annu Rev Physiol, 2002, 64: 663-680.
- [3] Malecki EA, Buhl KM, Beard JL, et al. Bone structural and mechanical properties are affected by hypotransferrinemia but not by iron deficiency in mice. Bone and Mineral Res, 2000, 15: 271-277.
- [4] Isomura H, Fujie K, Shibata K, et al. Bone metabolism and oxidative stress in postmenopausal rats with iron overload. Toxicology, 2004, 197: 93-100.

(下转第 535 页)

(上接第 507 页)

- [5] Farrukh TS ,Ratna C. Adults with severe sickle cell anaemia and Iron overload have a high incidence of osteopenia and osteoporosis. *Blood* , 2004 ,104 :1684.
- [6] Schnitzler CM , Schnaid E , MacPhail AP , et al. Ascorbic Acid Deficiency , Iron Overload and Alcohol Abuse Underlie the Severe Osteoporosis in Black African Patients with Hip Fractures-A Bone Histomorphometric Study. *Calcif Tissue Int* , 2005 ,76 :79-89.
- [7] Mardi P ,Barbara S. Iron restriction negatively affects bone in female rats and mineralization of hFOB osteoblast cells experimental. *Biology and Medicine* 2006 ,231 :378-386.
- [8] Tomas Ganz ,Elizabeth Nemeth. Regulation of iron acquisition and iron distribution in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta* ,2006 ,1763 : 690-699.
- [9] 马勇 ,徐又佳 ,王爱东等. 大鼠骨质疏松模型中肝脏 Hpcidin 基因表达的初步研究. *苏州大学学报(医学版)* ,2006 ,26 :367-

369.

- [10] Zahanich I , Graf EM. Molecular and functional expression of voltageoperated calcium channels during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bone Miner Res* 2005 ,20(9) :1637-1646.
- [11] Zhang J , Ryder KD , Bethel JA , et al. PTH-induced actin depolymerization increases mechanosensitive channel activity to enhance mechanically stimulated Ca^{2+} signaling in osteoblasts. *Bone Miner Res* 2006 ,21(11) :1729-1737.
- [12] Chen W , Andom T , Bhattacharjee P , et al. Intracellular calcium mobilization following prostaglandin receptor activation in human ciliary muscle cells. *Current Eye Research* ,1997 ,16 :847-853.
- [13] 王小兵 ,李志辉. 激光共焦显微镜测量细胞内钙离子时的几个关键因素. *医疗设备信息* 2001 ,6 :10-11.

(收稿日期 :2007-12-17)