

雷奈酸锶在模拟微重力环境对成骨细胞增殖功能的影响

宋淑军 司少艳 牛忠英 周金莲 史亮 刘俊丽 张建中

中图分类号: R852.22 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2011)02-0106-04

摘要: 目的 观察新型的抗骨质疏松药雷奈酸锶在模拟微重力环境下对成骨细胞增殖功能的影响。方法 利用沿水平轴连续回转(30 r/min)细胞培养系统模拟微重力环境,使用MTT比色法或台盼兰染色、细胞计数法观察小鼠成骨样细胞MC3T3-E1的增殖情况。结果 模拟微重力环境可以降低MC3T3-E1增殖功能,雷奈酸锶在模拟微重力环境可以增强MC3T3-E1增殖功能。结论 在模拟微重力环境下雷奈酸锶对成骨细胞增殖功能具有保护作用,为雷奈酸锶治疗微重力环境骨量丢失提供了理论和实验证据。

关键词: 微重力; 雷奈酸锶; 成骨细胞; 增殖

Effects of strontium ranelate on osteoblast proliferation in simulated microgravity SONG Shujun¹, SI Shaoyan¹, NIU Zhongying², et al. ¹Department of Pathology and Laboratory, ²Department of Stomatology, PLA 306 Hospital, Beijing 100101, China

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

Abstract: Objective To investigate the role of strontium ranelate, the novel antiosteoporotic agent, in regulating the proliferation of mouse osteoblastic cell MC3T3-E1 in simulated microgravity. **Methods** Cell proliferation were evaluated using MTT assay or trypan blue staining and viable cell counting in a rotating cell culture system (30rpm/minutes) that simulated microgravity. **Results** Simulated microgravity induced a decrease in proliferation of MC3T3-E1 cells and this could be reversed by treatment with strontium ranelate. **Conclusion** Strontium ranelate played protective role for osteoblast proliferation in simulated microgravity environment. This provides a theoretical and experimental evidence for the treatment of microgravity induced bone loss with strontium ranelate.

Key words: Strontium ranelate; Microgravity; Ostoblasts; Proliferation

随着载人航天事业的发展,航天医学的研究变得越来越重要。航天飞行过程中微重力环境可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,其中骨量丢失是目前面临最严重的问题^[1],尚无有效的防治措施。太空微重力环境骨代谢平衡紊乱是导致骨量快速丢失的重要原因,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,不仅负责骨的形成,而且负责调节破骨细胞的生成和活性。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失衡具有重要意义。重力或机械刺激对成骨细胞的功能有显著影响,在微重力情况下培养的成骨细胞呈收缩状态、细胞的数量减少^[4],太空微重力环境可明显抑制成骨细胞的增殖^[5],细胞增殖功能的正常是细胞新陈代谢过程中维持细胞数量的必备条件。纠正微重力对成骨细胞增殖的影响可能是治疗微重力环境骨量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^[6-8]。本研究利用地面上模拟微重力实验技术,探讨雷奈酸锶在模拟

基金项目: 国家教育部留学回国人员启动资金资助

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、周金莲、刘俊丽、张建中);中国人民解放军第306医院口腔科(牛忠英、史亮)

通讯作者: 张建中, Email: zhangjz55@sina.com

微重力环境对成骨细胞增殖功能的影响,为微重力环境骨量丢失的防治提供实验和理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要材料

细胞培养液 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)为 Gibco 产品。小牛血清购自杭州四季青生物制剂公司。小鼠成骨样细胞系 MC3T3-E1 购自 ATCC。MTT 检测试剂购自 Sigma。雷奈酸锶药物由法国 Servier 公司研制生产。

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% 小牛血清,青霉素(100U/mL),链霉素(100 U/mL),细胞培养在 37℃、含 5% 的二氧化碳培养箱中,生长至 80% 融合时进行传代。

1.3 细胞增殖的检测

使用 MTT 比色法。在本实验中为了解雷奈酸锶有效工作浓度,正常培养的 MC3T3-E1 细胞种植在 96 孔板($10^4/\text{CM}^2$)中,在 37℃、含 5% 的二氧化碳的培养箱中培养 3 d 后无血清饥饿培养 16 h,然后采用不同剂量的雷奈酸锶(以锶离子的浓度表示 0~2500 $\mu\text{mol/L}$)处理细胞 48 h,加入 10% MTT 溶液(5 mg/mL)继续培养细胞 2 h,弃去细胞培养液,并加入 DMSO(100 $\mu\text{L}/\text{孔}$)轻微震荡,采用比色法通过酶标仪检测 A_{490} 值。

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。小鼠成骨样细胞 MC3T3-E1(3×10^4)被种植在置于 6 孔板中的玻片(2.2 cm \times 2.6 cm)上,在含 10% 小牛血清的培养基中,37℃、含 5% 的二氧化碳中培养 3 d,随后在相同条件下无血清培养 16 d,然后把玻片转移至盛满无血清培养液(含或不含 2500 $\mu\text{mol/L}$ 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℃) 48 h,并设对照组(在相同的培养容器中)静止培养 48 h。然后把玻片转移至含 10% MTT 的无血清培养液的 6 孔板中继续培养 2 h,弃去细胞培养液,并加入 DMSO(700 $\mu\text{L}/\text{孔}$)轻微震荡混匀,每孔各取 100 μL 至 96 孔板用酶标仪检测 A_{490} 值。此外部分实验在模拟微重力环境培养完成后,用胰酶消化细胞,采用台盼兰染色,活细胞计数法观察细胞增殖的情况。

1.5 统计学处理

采用双尾非成对 Student's *t* 检验法比较处理组万方数据

和对照组间细胞 A_{490} 值和细胞计数的差异, $P < 0.05$ 被判定为统计学有显著差异。

2 结果

2.1 雷奈酸锶在正常细胞培养环境促进成骨细胞增殖

雷奈酸锶对成骨细胞增殖的影响已有报道^[9],但不同的实验条件下其有效作用浓度会有一些的差异,故为了解本实验中雷奈酸锶的有效作用浓度,首先在普通细胞培养环境中,通过 MTT 法进行检测,结果显示雷奈酸锶呈剂量依赖性地促进小鼠成骨样细胞株 MC3T3-E1 的增殖(图 1),锶的浓度在 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 时即可显著增加 MC3T3-E1 的增殖($P < 0.05$),在 10~2500 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内随雷奈酸锶浓度的增加,所得 A_{490} 值也逐步增加,故在下面模拟微重力环境的实验中均使用 2500 $\mu\text{mol/L}$ 的雷奈酸锶。

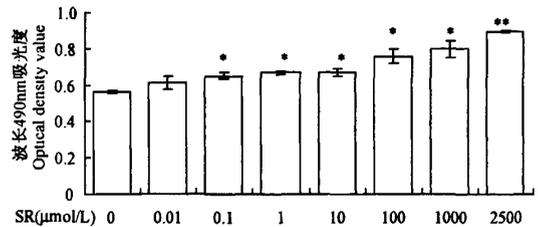


图 1 雷奈酸锶对 MC3T3-E1 细胞增殖功能的影响

与对照组相比 * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。SR: strontium ranelate, 雷奈酸锶

2.2 雷奈酸锶在模拟微重力环境对成骨细胞增殖的影响

为了探讨在模拟微重力环境雷奈酸锶对成骨细胞增殖的作用,本实验利用 MTT 比色法和多样本回转器,发现旋转培养的 MC3T3-E1 所得 A_{490} 值较未旋转组明显缩小,预示细胞增殖功能在模拟微重力环境明显减弱(图 2)。而当细胞培养液中加入 2500 $\mu\text{mol/L}$ 的雷奈酸锶时 A_{490} 值明显提高($P < 0.01, n = 3$),与无旋转组的 A_{490} 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增殖功能。

此外,在部分实验中利用活细胞计数法了解模拟微重力环境雷奈酸锶对细胞增殖的影响,细胞均在模拟微重力环境中培养,使用不同剂量的雷奈酸锶处理细胞,结果显示在模拟微重力环境所测两个雷奈酸锶剂量(1000 $\mu\text{mol/L}$ 和 2500 $\mu\text{mol/L}$)均可以增加成骨细胞数量($P < 0.01$, 图 3)。

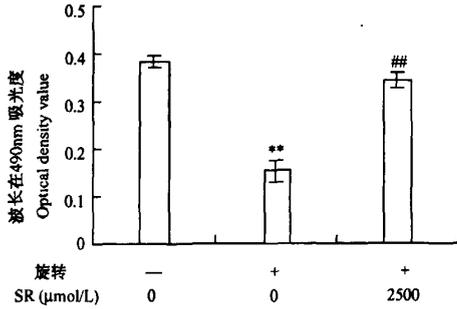


图2 在模拟微重力环境雷奈酸锶对 MC3T3-E1 细胞增殖功能的影响
与未旋转培养对照组比较,** $P < 0.01$;与旋转培养无雷奈酸锶组比较,** $P < 0.01$ 。SR: 雷奈酸锶

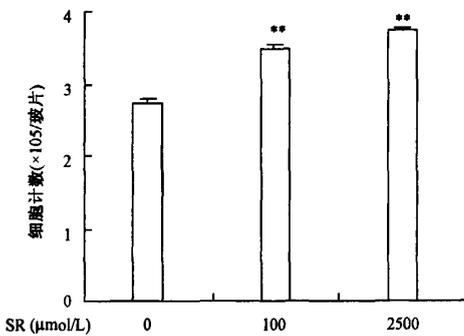


图3 细胞计数法测模拟微重力环境雷奈酸锶对 MC3T3-E1 细胞增殖功能的影响
和无雷奈酸锶组比较,** $P < 0.01$ 。SR: 雷奈酸锶

3 讨论

本实验使用剂量为 0.1 ~ 2500 $\mu\text{mol/L}$ 的雷奈酸锶作用于成骨细胞 2 d,结果显示雷奈酸锶呈剂量依赖性增强小鼠成骨样细胞 MC3T3-E1 的增殖功能,即在生理情况下雷奈酸锶能促进成骨细胞的增殖功能,这与其他作者报道是一致的^[8,9]。在颅骨组织培养中用放射自显影以及组织测量方法,显示雷奈酸锶还能增强前成骨细胞的增殖功能^[10]。细胞增殖功能的正常对保持组织结构和功能完整以及组织损伤的修复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。刺激成骨细胞的增殖,促进骨形成是雷奈酸锶治疗骨质疏松的机制之一,但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能使成骨样细胞数量明显减少,而雷奈酸锶在模拟微重力环境中可以防治细胞数量的减少,保护成骨样细胞的增殖

功能,部分逆转微重力环境对成骨细胞增殖的抑制作用。本实验证明雷奈酸锶可以纠正由于微重力环境所致成骨细胞增殖功能的下降,保证有足够的成骨细胞数量和骨的形成,从细胞水平为使用雷奈酸锶治疗太空微重力环境的骨量丢失提供了依据。

近年来为了深入了解微重力环境骨量丢失的机理,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 d,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^[8]。体内实验也证实失负荷可抑制小梁骨和骨膜的前成骨细胞的增殖功能^[11]。这些结果均说明微重力环境对成骨细胞的负面影响,可能是导致微重力环境快速骨量丢失的重要原因之一。本实验证明雷奈酸锶可以纠正由于微重力环境所致成骨细胞增殖功能的下降,也即雷奈酸锶在微重力环境对成骨细胞的增殖功能仍具有保护作用。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量丢失提供了理论证据,但有关雷奈酸锶对微重力环境骨量丢失的治疗作用尚需进行大量的研究。

此外,在微重力环境,雷奈酸锶使细胞数量的增加似乎小于 MTT 实验中 A_{490} 值的改变,其可能原因是雷奈酸锶在增加细胞数量的同时,提高细胞的代谢活性。

结论:体外实验结果显示模拟微重力环境可抑制成骨细胞的增殖功能,而雷奈酸锶在模拟微重力环境下对成骨样细胞的增殖功能具有保护作用。

【参 考 文 献】

- [1] Fong K. The next small step. *BMJ*, 2004, 329 (7480):1441-1444.
- [2] Makihira S, Kawahara Y, Yuge L, et al. Impact of the microgravity environment in a 3-dimensional clinostat on osteoblast- and osteoclast-like cells. *Cell Biol Int*, 2008, 32 (9):1176-1181.
- [3] Tamma R, Colaianni G, Camerino C, et al. Microgravity during spaceflight directly affects in vitro osteoclastogenesis and bone resorption. *FASEB J*, 2009, 23(8):2549-54.
- [4] Hughes-Fulford M. Physiological effects of microgravity on osteoblast morphology and cell biology. *Adv Space Biol Med*, 2002, 8:129-157.
- [5] Hughes-Fulford M. Changes in gene expression and signal transduction in microgravity. *J Gravit Physiol*, 2001, 8:1-4.

(下转第 112 页)

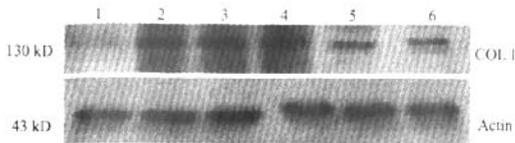


图1 各组大鼠骨组织 I 型胶原蛋白表达结果

注:1. OVX; 2. SHAM; 3. E₂; 4. ABH; 5. ABM; 6. ABL

栖息的场所,骨组织 I 型胶原的代谢状况与骨的代谢密切相关^[4]。骨胶原的过度降解或合成减少均可引起骨弹性和韧性降低,骨盐失去依附,溶解增多,极易导致骨质疏松。骨 I 型胶原相关研究是揭示骨质疏松症发病机理及药物干预机制的重要手段。

血清碱性磷酸酶(BAP)和骨钙素(BGP)是反映骨形成的敏感指标;而抗酒石酸酸性磷酸酶(TRACP)和尿 NTx/Cr 的比值是反映骨吸收的比较敏感性、特异性较强的指标,在预测骨量丢失趋势及疗效监测方面具有重要的价值。本研究发现,牛膝醇提取物能增加血清 BAP 和 BGP 的水平,显著降低血清 TRACP 和尿中 NTx/Cr 的比值,且随着剂量的增大,作用有增强趋势。其中,AB 高剂量组的作用与 E₂ 组相当。提示 AB 具有较强的促进骨形成,降低骨基质的降解、抑制骨吸收的作用。且经牛膝处提取物治疗 12w 后,可显著增高 OVX 大鼠的全身 BMD,并随着剂量的增加而呈现上升的趋势,其中 320 mg/kg 的 AB 增加全身 BMD 的作用与 10 μg/kg 的 E₂ 相当。

本研究结果还显示:OVX 组 I 型胶原蛋白的表达低于假手术组($P < 0.01$),牛膝醇提取物高、中剂量组 I 型胶原蛋白的表达高于 OVX 组($P < 0.01$),接近假手术组。提示牛膝醇提取物可以通过增加成骨细胞的 I 型胶原蛋白的表达水平,促进骨组织 I 型胶原的合成,从而促进骨形成。崔洪英和王冬春等用含有牛膝的补肾中药对去势大鼠进行骨形态的研究,发现补肾复方中药能使大鼠骨小梁的宽度、面积、总体积以及密质骨面积增大,而骨髓腔面积减小^[5,6]。综合以上的研究结果,牛膝醇提取物具有提高去势大鼠骨密度和抗骨组织 I 型胶原蛋白丢失的作用。

【参 考 文 献】

- [1] 孙益,童培建,肖鲁伟. 绝经后骨质疏松症与中医体质的相关性. 中医杂志,2009,50(8):696-699.
- [2] 林肖慧,刘鹏,徐为人,等. 牛膝不同炮制品中多糖的测定. 中草药,2008,39(8):1180-1182.
- [3] 孟大利,吉双,张予川,等. 牛膝中萜类及糖类成分的分离与鉴定. 沈阳药科大学学报,2009,26(5):348-352.
- [4] Stavros C, Manolagas SC, Ika RL. Bone marrow, cytokines and bone remodeling. N Eng JMed,1995,332(5):305-311.
- [5] 崔洪英,张柏丽,安秀玲. 补肾中药对骨质疏松大鼠骨形态的影响. 天津中药,1997,14(5):226-227.
- [6] 王冬春,檀爱民,马世平,等. 仙灵强骨口服液对去势老龄大鼠骨质疏松症的影响. 中国中药杂志,2007,32(10):965-968.

(收稿日期:2010-07-20)

(上接第 108 页)

- [6] Marie PJ. Strontium ranelate: a novel mode of action optimizing bone formation and resorption. Osteoporos Int, 2005, 16 (Suppl 1):S7-S10.
- [7] 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.
- [8] Chattopadhyay N, Quinn SJ, Kifor O, et al. The calcium-sensing receptor (CaR) is involved in strontium ranelate-induced osteoblast proliferation. Biochem Pharmacol, 2007, 74(3):438-447.

- [9] Caverzasio J. Strontium ranelate promotes osteoblastic cell replication through at least two different mechanisms. Bone, 2008, 42:1131-1136.
- [10] Canalis E, Hott M, Deloffre P, et al. The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro. Bone, 1996,18(6):517-523.
- [11] Barbara A, Delannoy P, Denis BG, et al. Normal matrix mineralization induced by strontium ranelate in MC3T3-E1 osteogenic cells. Metabolism, 2004,53(4):532-537.

(收稿日期:2010-08-09)

雷奈酸锶在模拟微重力环境对成骨细胞增殖功能的影响

作者: [宋淑军](#), [司少艳](#), [牛忠英](#), [周金莲](#), [史亮](#), [刘俊丽](#), [张建中](#)
作者单位: [宋淑军, 司少艳, 周金莲, 刘俊丽, 张建中\(中国人民解放军第306医院病理实验科, 北京, 100101\)](#), [牛忠英, 史亮\(中国人民解放军第306医院口腔科\)](#)
刊名: [中国骨质疏松杂志](#) **ISTIC**
英文刊名: [CHINESE JOURNAL OF OSTEOPOROSIS](#)
年, 卷(期): 2011, 17 (2)

参考文献(11条)

1. [Barbara A;Delannoy P;Denis BG Normal matrix mineralization induced by strontium ranelate in MC3T3-E1 osteogenic cells](#) 2004(04)
2. [Canalis E;Hott M;Deloffre P The divalent strontium salt Sr2911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro](#)[外文期刊] 1996(06)
3. [Caverzasio J Strontium ranelate promotes osteoblastic cell replication through at least two different mechanisms](#)[外文期刊] 2008(6)
4. [Chattopadhyay N;Quinn SJ;Kifor O The calcium-sensing receptor \(CaR\) is involved in strontium ranelate-induced osteoblast proliferation](#)[外文期刊] 2007(03)
5. [Reginster JY;Deroisy R;Neuprez A Strontium ranelate:new data on fracture prevention and mechanisms of action](#)[外文期刊] 2009(03)
6. [Marie PJ Strontium ranelate:a novel mode of action optimizing bone formation and resorption](#) 2005(Suppl 1)
7. [Hughes-Fulford M Changes in gene expression and signal transduction in microgravity](#) 2001
8. [Hughes-Fulford M Physiological effects of microgravity on osteoblast morphology and cell biology](#) 2002
9. [Tamma R;Colaianni G;Camerino C Microgravity during spaceflight directly affects in vitro osteoclastogenesis and bone resorption](#) 2009(08)
10. [Makihira S;Kawahara Y;Yuge L Impact of the microgravity environment in a 3-dimensional clinostat on osteoblast-and osteoclast-like cells](#)[外文期刊] 2008(09)
11. [Fong K The next small step](#)[外文期刊] 2004(7480)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201102004.aspx