

# 高铁培养环境对小鼠前成骨细胞 MC3T3-E1 增殖、分化的影响

赵国阳<sup>1</sup> 何银锋<sup>2</sup> 李光飞<sup>2</sup> Xi Hang<sup>3</sup> 徐又佳<sup>2\*</sup>

1. 江苏大学附属医院骨一科, 镇江 212001
2. 苏州大学附属第二医院骨科, 苏州 215004
3. 美国纽约大学医学院, 美国纽约

中图分类号: R681 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2013) 10-1022-04

**摘要:** **目的** 观察高铁培养环境下小鼠前成骨样细胞 MC3T3-E1 增殖、分化指标的变化趋势, 探讨铁离子对成骨细胞增殖、分化的影响。**方法** 小鼠前成骨样细胞 MC3T3-E1 在 37℃ 条件下体外培养, 在 10 mmol/L β-甘油磷酸和 50 μg/mL 抗坏血酸的诱导分化的作用下, 分化为成骨细胞, 同时用不同浓度 (50、100、200 μmol/L) 枸橼酸铁铵 (FAC) 干预, 用 MTT 法检测细胞的增殖活性, RT-PCR 法检测成骨细胞分化基因成骨相关转录因子 (Runx2)、锌指结构转录因子 (Osterix)、骨唾液酸蛋白 (BSP) 和骨钙素 (OC) 的表达, 碱性磷酸酶 (ALP) 活性试剂盒检测细胞碱性磷酸酶活性。**结果** MC3T3-E1 细胞的增殖活性、成骨分化相关基因的表达以及 ALP 水平随 FAC 干预浓度的增加呈剂量依赖性降低 ( $P < 0.05$ )。**结论** 高铁培养环境可明显抑制小鼠前成骨样细胞 MC3T3-E1 的增殖和分化。

**关键词:** 铁离子; 成骨细胞; 细胞分化

## Effect of excess iron culturing on the proliferation and differentiation of mouse MC3T3-E1 preosteoblasts

ZHAO Guoyang<sup>1</sup>, HE Yin feng<sup>2</sup>, LI Guangfei<sup>2</sup>, Xi Huang<sup>3</sup>, XU Youjia<sup>2</sup>

1. Department of Orthopedics, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhengjiang 212001, China;
2. Department of Orthopedics, the Second Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215004, China
3. Department of Environmental Medicine, NYU School of Medicine, NY 10016, U. S. A.

Corresponding author: XU Youjia, Email: xuyoujia@medmail.com.cn

**Abstract: Objective** To observe the changing pattern of proliferative and differential indexes of mouse MC3T3-E1 preosteoblasts in the culture with excess iron, and to investigate the effect of iron on the proliferation and differentiation of osteoblasts. **Methods** Mouse MC3T3-E1 preosteoblasts were cultured at 37℃ *in vitro*. Under the induction of 10mmol/l β-glycerophosphate and 50μg/ml L-ascorbic acid, MC3T3-E1 preosteoblasts differentiated into osteoblasts. Meanwhile, different concentrations (50, 100, and 200 μmol/l) of FAC were added into the medium for intervention. Proliferation of MC3T3-E1 cells was detected using MTT method. The mRNA expressions of Runx2, Osterix, bone sialoprotein (BSP), and osteocalcin (OC) were detected using RT-PCR. ALP activity was measured using ALP viability kit. **Results** The proliferation of MC3T3-E1 cells, the mRNA expressions of Runx2, Osterix, BSP, and OC, and ALP activity decreased along with the increase of FAC concentration, showing a dose-dependent manner ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion** Excess iron culturing can significantly inhibit the proliferation and differentiation of mouse MC3T3-E1 preosteoblasts.

**Key words:** Iron ion; Osteoblast; Differentiation

目前,铁过载对骨关节系统影响的研究已成为一个新的热点。我们以前的多项研究表明,铁过载

可抑制骨形成,促进骨吸收,是骨质疏松的危险因素<sup>[1-3]</sup>。而在骨发育过程中,干细胞或前体细胞向成熟的成骨细胞分化非常重要。但是,铁过载对成骨细胞分化的影响如何却不十分明确。本研究以小鼠前体成骨样细胞 MC3T3-E1 为研究对象,用不同浓度的枸橼酸铁铵加入培养基中造成高铁培养环境,观察高铁环境对 MC3T3-E1 细胞增殖和分化过程中

基金项目: 国家自然科学基金(81273090);江苏省自然科学基金(BK2012608);苏州市科技基础设施建设计划之高新技术研究重点实验室资助项目(SZS2012208);苏州市应用基础研究计划之医疗卫生部分资助项目(SYS201002)

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

相关基因表达以及碱性磷酸酶活性的影响,旨在为高铁环境对成骨细胞影响的研究补充实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料、仪器

小鼠前体成骨样细胞 MC3T3-E1 (中科院上海细胞库), 枸橼酸铁铵 (FAC, 国药集团化学试剂有限公司), 改良型  $\alpha$ -MEM (美国 Gibco 公司), 新生胎牛血清 (美国 Gibco 公司), MTT 检测试剂盒 (美国 Sigma 公司), Trizol (美国 Invitrogen 公司), 碱性磷酸酶试剂盒 (南京建成公司), BCA 蛋白试剂盒 (碧云天公司), 高速冷冻离心机 (美国 Thermo 公司), Gene Amp PCR System 9700 PCR 仪 (美国 ABI 公司), 电泳仪 (Bio-Rad, PowerPPAC200, 美国)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 MC3T3-E1 细胞培养:** 小鼠 MC3T3-E1 细胞置于 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 培养箱内培养, 细胞培养基为改良型  $\alpha$ -MEM, 含 10% 的胎牛血清、青霉素 100  $\mu$ g/mL 和链霉素 100  $\mu$ g/mL。根据细胞的培养情况每 2~3 d 换液 1 次, 细胞密度长至 70%~80% 时进行传代。

**1.2.2 细胞增殖检测:** 采用 MTT 法。96 孔板接种细胞, 每孔 2000 个。细胞贴壁后更换培养液并加入终浓度为 10 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸钠和 50  $\mu$ g/mL 抗坏血酸, 同时分别加入不同浓度的 FAC (0、50、100、200  $\mu$ mol/L), 对照组 (0  $\mu$ mol/L) 加入不含 FAC 的等量培养基。细胞分为 4 组, 每组 5 孔。干预 24 h 后, 加入 MTT 液 (5 mg/mL) 20  $\mu$ L/孔, 37℃ 孵育 4 h, 吸去孔内液体, 加入 DMSO 液体 150  $\mu$ L/孔, 振荡 10 min, 用酶标仪选择 570 nm 波长测定各孔吸光值, 其值与细胞数量成正比。

**1.2.3 细胞分化相关基因表达检测:** 使用半定量 PCR 法测定成骨细胞相关基因成骨相关转录因子 (Runx2)、锌指结构转录因子 (Osterix)、骨唾液酸蛋白 (BSP) 和骨钙素 (OC) 的表达。细胞接种于培养瓶内, 细胞贴壁后更换培养液并加入终浓度为 10 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸钠和 50  $\mu$ g/mL 抗坏血酸, 同时分别加入不同浓度的 FAC (0、50、100、200  $\mu$ mol/L), 对照组 (0  $\mu$ mol/L) 加入不含 FAC 的等量培养基。细胞分为 4 组, 每组 3 瓶。在培养 4 d 后用 RNA gents Total RNA Isolation System 试剂盒提取各组细胞总 RNA, 提取后调整样本 RNA 的浓度为 1  $\mu$ g/ $\mu$ L。逆转录反应的体积为 20  $\mu$ L: 含模板总 RNA 1  $\mu$ g, Oligo (dT) 18 primer 1  $\mu$ L, 5  $\times$  Reaction

Buffer 4  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTP Mix 2  $\mu$ L, Ribolock™ RNase Inhibitor (20  $\mu$ g/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, RevertAid™ M-M $\mu$ LV Reverse Transcriptase (200  $\mu$ U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, 补加 DEPC 水至 20  $\mu$ L。于热循环仪中 65℃ 5 min 预变性, 42℃ 60 min 逆转录, 70℃ 5 min 终止反应。聚合酶链反应的总反应体积为 20  $\mu$ L: 内含 2  $\times$  Taq PCR mix 10  $\mu$ L, Water (nuclease-free) 7  $\mu$ L, 上下游引物各 1  $\mu$ L, 逆转录产物 1  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94℃ 3 min, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 33 个循环。引物根据 Genebank 与 Primer3 设计, 由上海生工合成, 序列见表 1。取 PCR 产物 6  $\mu$ L 点样于 1.2% 琼脂糖凝胶, 110 V 电泳 40 min, 于紫外线箱凝胶成像系统进行扫描并照相记录, 实验重复 3 次, 并用 Image J 图像分析软件对目的基因和参数基因条带光密度值进行分析。

表 1 GAPDH 和成骨细胞相关基因引物序列及分子大小 (bp)

Table 1 Primer sequences of GAPDH and osteoblast related gene and the molecular size (bp)

基因	引物序列	bp
GAPDH	上游: 5' - ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'	452 bp
	下游: 5' - TCCACCACCCCTGTGCTGTA-3'	
Runx-2	上游: 5' - AACTTCCTGTGCTCCGCTGCT-3'	208 bp
	下游: 5' - TCGTTGAACCTGGCTACTTGG-3'	
Osterix	上游: 5' - AGGAGGCACAAAGAAGCCATACG-3'	297 bp
	下游: 5' - ATGCCTGCCTGTACCACGAGC-3'	
Sialoprotein	上游: 5' - TCCATCGAAGAATCAAAGCAGAG-3'	286 bp
	下游: 5' - CGAGAGTGTGAAAAGTGTGGAG-3'	
OC	上游: 5' - GGACCATTTTCTGCTCACTCTG-3'	425bp
	下游: 5' - GTTCACTACCTTATTGCCCTCCTG-3'	

**1.2.4 细胞碱性磷酸酶活性检测:** 6 孔板中每孔接种  $1 \times 10^5$ /mL 个 MC3T3-E1 细胞。细胞贴壁后更换培养液并加入终浓度为 10 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸钠和 50  $\mu$ g/mL 抗坏血酸, 同时分别加入不同浓度的 FAC (0、50、100、200  $\mu$ mol/L), 对照组 (0  $\mu$ mol/L) 加入不含 FAC 的等量培养基。细胞分为 4 组, 每组 3 瓶。继续培养至 10 d 时, 各孔加 75  $\mu$ L 裂解液, 收集上清, -70℃ 冻存。用 BCA 试剂盒测总蛋白浓度, 用 LabAssay ALP 试剂盒测 ALP 含量。用酶标仪选择 520 nm 波长测定各孔吸光值 (OD 值), 根据测得 OD 值计算相对的 ALP 活性。

### 1.3 统计学处理

实验所得数据用均数  $\pm$  标准差表示。用 SPSS19.0 统计分析软件进行单因素方差分析, 各实验组间比较采用 Student-Newman-Keuls (SNK) 检验, 以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 细胞增殖检测结果

MTT 结果提示, FAC 干预 MC3T3-E1 细胞 24 h 后, OD 值随 FAC 浓度增加而降低, 各浓度组间比较有统计学差异 ( $P < 0.05$ ), 说明 FAC 具有抑制 MC3T3-E1 细胞的增殖效应 (图 1)。

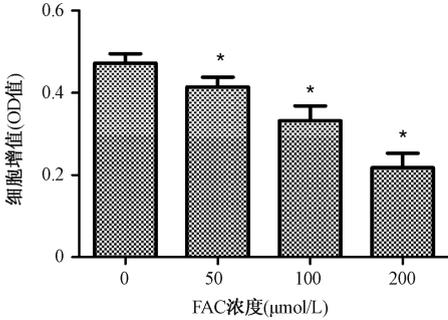


图 1 不同浓度的对枸橼酸铁铵对 MC3T3-E1 细胞增殖的影响

(各浓度组与对照组比较, \*  $P < 0.05$ ,  $N = 5$ )

Fig.1 Effect of different concentrations of FAC on the proliferation of MC3T3-E1 cells

(\*  $P < 0.05$  compared with control,  $N = 5$ )

### 2.2 细胞分化相关基因表达检测结果

GAPDH、Runx2、Osterix、BSP 和 OC 的扩增产物电泳结果显示, 各浓度组泳道条带 GAPDH 亮度近似, 各目的基因的亮度随 FAC 干预浓度的增加逐渐减弱 (图 2), 与 GAPDH 的光密度比值呈剂量依赖性降低 (图 3), 组间比较有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 提示 Runx2、Osterix、BSP 和 OC 基因的表达在高铁环境中受到抑制。

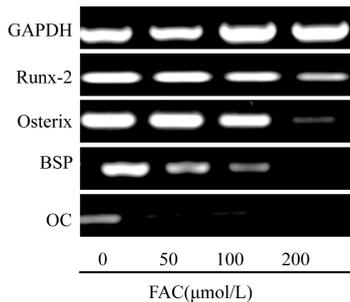


图 2 GAPDH、Runx2、Osterix、BSP 和 OC 的扩增产物的琼脂凝胶电泳图

Fig.2 The agarose gel electrophoresis of GAPDH,

Runx2, Osterix, BSP, and OC mRNA amplification products

### 2.3 碱性磷酸酶活性检测结果

本研究结果提示, FAC 干预 MC3T3-E1 细胞

10d 后, 碱性磷酸酶活性指标随 FAC 浓度增加而降低, 各浓度组与对照组比较有统计学差异 ( $P < 0.05$ ) (图 4)。

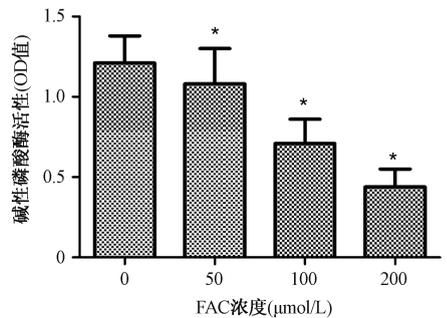


图 4 FAC 对 MC3T3-E1 细胞 ALP 活性的影响 (各浓度组与对照组比较, \*  $P < 0.05$ ,  $N = 3$ )

Fig.4 Effect of different concentrations of FAC on ALP activity in MC3T3-E1 cells

(\*  $P < 0.05$  compared with control,  $N = 3$ )

## 3 讨论

近年来多项研究表明, 铁过载可导致骨质疏松。在动物实验中发现, 铁过载可使动物骨密度降低, 骨形成指标降低, 骨吸收指标升高<sup>[4,5]</sup>; 同时我们的体外实验也证明, 高铁环境可抑制成骨细胞活性, 促进破骨细胞分化<sup>[6,7]</sup>。所以, 高铁环境对成骨细胞、破骨细胞以及骨形成、骨吸收均有显著影响。在骨代谢过程中, 成骨细胞的分化是一个复杂的过程, 对于成骨细胞功能的发挥有着重要的意义。本实验研究高铁环境对成骨细胞分化的影响, 有助于我们进一步了解铁过载对骨代谢的影响。

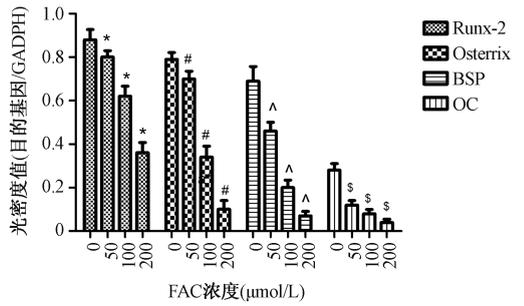


图 3 不同组 MC3T3-E1 细胞相关基因电泳条带光密度值分析

(与对照组比较, \*  $P$ 、# $P$ 、^ $P$ 、\$  $P < 0.05$ ,  $N = 3$ )

Fig.3 Optical density analysis of electrophoretic bands of related genes in MC3T3-E1 cells in different groups

(\*  $P$ 、# $P$ 、^ $P$ 、\$  $P < 0.05$  compared with control,  $N = 3$ )

MC3T3-E1 细胞是一种前成骨细胞系,由新生小鼠颅盖骨细胞建株,在体外培养中具有成骨细胞的表型特征,可在抗坏血酸和  $\beta$ -甘油磷酸的诱导作用下分化为成熟的成骨细胞,因而 MC3T3-E1 细胞可作为一个良好的研究成骨细胞分化的模型<sup>[8]</sup>。成骨细胞的分化过程可分为几个阶段,包括增殖、细胞外基质沉积、基质成熟和矿化。为了研究成骨细胞的分化过程,本实验测定了不同分化阶段相关标志物的表达水平,包括 Runx2、Osterix、ALP、BSP 和 OC。其中,Runx2 和 Osterix 在分化早期表达较高,是成骨细胞分化的早期标志物,而 ALP 和 BSP 的表达在中期达到高峰,分化后期则是 OC 和细胞外基质钙化的出现,OC 被认为是分化的晚期标志物<sup>[9]</sup>。Runx2 又称核心结合因子  $\alpha 1$  (Cbfa1),它的基因结合位点位于 BSP、OC 和 COL1 等基因的启动子,通过调节生长因子或细胞外基质的基因表达而参与成骨细胞分化及骨发育的全过程,因此 Runx2 被认为是成骨细胞分化的一个重要开关<sup>[10]</sup>;Osterix 是成骨细胞分化过程中一个重要的成骨细胞特异性转录因子,是 Runx2 的直接靶标,促进成骨相关基因的表达<sup>[11]</sup>;ALP 是成骨细胞所分泌的一种酶蛋白,特异性高,通过水解有机磷酸盐而增加局部磷酸盐的浓度,从而导致该处形成羟磷灰石结晶,是鉴定成骨细胞的生化和组织学标志,并可用来评价骨发生<sup>[12]</sup>;OC 由成骨细胞合成,与细胞外基质钙化高度相关,是骨细胞外基质特异性蛋白,成骨细胞的鉴定标志<sup>[13]</sup>。在本实验中,我们运用 FAC 作为铁离子的供体来提供细胞生长的高铁环境,结果发现,FAC 对于 MC3T3-E1 细胞的增殖具有明显的抑制作用;我们在细胞培养 4d 时即 MC3T3-E1 细胞分化的早期测定了 Runx2、Osterix、BSP 和 OC 基因的表达,结果发现,上述基因均有表达,其中 Runx2 和 Osterix 的表达相对较高,BSP 次之,而 OC 的表达相对最低,符合成骨细胞早期分化的特点。进一步用 FAC 干预后发现,上述基因的表达均受抑制;我们细胞培养 10d,即 ALP 分泌高峰时测定了 ALP 的活性,结果发现 FAC 对 ALP 的活性同样具有明显的抑制作用。因此,我们认为高铁环境可抑制 MC3T3-E1 细胞的分化。对于铁离子抑制成骨细胞增殖和分化的机制,一般认为与氧化应激有关。高浓度的铁离子可通过 Fenton 反应产生活性较高的羟基氧自由基,从而促进活性氧水平的升高,而后者可通过激活许多信号转导途径如促分裂原活化蛋白激酶 (MAPKs)、热休克因子 (HSF) 和核因子 (NF-Kb) 等

引起细胞的氧化损伤<sup>[14,15]</sup>。

总之,本研究发现高铁环境可抑制前成骨样细胞 MC3T3-E1 的增殖和分化。本研究从成骨前体细胞增殖和分化的角度阐述了铁离子对成骨细胞的作用,补充了我们对铁过载影响骨代谢的认识。

### 【参 考 文 献】

- [ 1 ] Li GF, Pan YZ, Xu YJ, et al. Iron homeostasis in osteoporosis and its clinical implications. *Osteoporos Int*, 2012, 23 ( 10 ): 2403-2408.
- [ 2 ] Xu Youjia, Lin Hua. Emphasis on the role of iron metabolism in prevention and treatment of women with osteoporosis. *Chinese Medical Journal*, 2011, 93(31): 2223-2225. (in Chinese)
- [ 3 ] Xu Youjia, Xi Huang. Decreasing iron overload; a new program for prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Chinese Journal of Osteoporosis and Bone Mineral Research*, 2012, 5:1-6. (in Chinese)
- [ 4 ] Kudo H, Suzuki S, Watanabe A, et al. Effects of colloidal iron overload on renal and hepatic siderosis and the femur in male rats. *Toxicology*, 2008, 246(2-3): 143-147.
- [ 5 ] Tsay J, Yang Z, Ross FP, et al. Bone loss caused by iron overload in a murine model: importance of oxidative stress. *Blood*, 2010, 116(14): 2582-2589.
- [ 6 ] Guo-yang Zhao, Li-ping Zhao, Yin-feng He, et al. A comparison of the biological activities of human osteoblast hFOB1.19 between iron excess and iron deficiency. *Biological Trace Element Research*, 2012, 149(3): 487-495.
- [ 7 ] Jia P, Xu YJ, Zhang ZL, et al. Ferric ion could facilitate osteoclast differentiation and bone resorption through the production of reactive oxygen species. *J Orthop Res*, 2012, 30 ( 11 ): 1843-1852.
- [ 8 ] Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro; reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol*, 1990, 143(3): 420-430.
- [ 9 ] Aubin JE. Advances in the osteoblast lineage. *Biochem. Cell Biol*, 1998, 76(6): 899 - 910.
- [ 10 ] Komor IT. Regulation of skeletal development by the Runx family of transcription factors. *Cell Biochem*, 2005, 95(3): 445-453.
- [ 11 ] Sun Dongmei, Liu Zhongbo, Zhang Yan, et al. Runx2 is involved in regulating Osterix promoter activity and gene expression. *Prog Biochem Biophys*, 2006, 33(10): 957-964.
- [ 12 ] Yin-feng He, Yong Ma, Chao Gao, et al. Iron overload inhibits osteoblast biological activity through oxidative stress. *Biological Trace Element Research*, 2013, 152(2): 292-296.
- [ 13 ] Yoshida CA, Furuichi T, Fujita T, et al. Core-binding factor beta interacts with Runx2 and is required for skeletal development. *Nat Genet* ( S1061- 4036 ), 2002, 32 ( 4 ): 633-638.
- [ 14 ] Yeon-Sook Lee, Xiaowei Chen, John J. B. Anderson. Physiological concentration of genistein stimulate the proliferation and protect against free radical-induced oxidative damage of MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Nutrition Research*, 2001, 21: 1287-1298.
- [ 15 ] Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol*, 2002, 192(1): 1-15.

(收稿日期: 2013-03-25; 修回日期: 2013-05-18)