

锶盐对高浓度地塞米松作用下大鼠成骨细胞的影响

王晓东¹ 虎松艳^{2*} 王金枝³ 孙平¹ 周燕辉¹ 李青南⁴

1. 广东药学院附属第一医院骨外科, 广州 510080
2. 广东食品药品职业学院, 广州 510520
3. 山东省青岛即墨市人民医院肝胆外科, 青岛 266200
4. 广东药学院生命科学与生物制药学院新药功能研究中心, 广州 510006

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2015) 07-0807-05

摘要: **目的** 探讨雷奈酸锶(Sr)对高浓度地塞米松(Dex)作用下大鼠成骨细胞(OB)的影响。**方法** 采用大鼠骨髓基质干细胞(BMSCs)来源的成骨细胞,运用MTT试剂盒和AKP试剂盒分别测定Sr对细胞增殖和分化的影响,定量PCR方法测定Sr对高浓度地塞米松作用下成骨钙素(OC)和转化生长因子-β(TGF-β)表达的影响。**结果** Sr浓度在 10^{-5} 、 10^{-4} mol/L时,能够促进OB增殖和分化($P < 0.01$); Sr浓度为 10^{-4} mmol/L能够有效拮抗高浓度Dex(10^{-5} mol/L)对成骨细胞分化抑制作用($P < 0.01$),并能逆转Dex对成骨相关基因OC和TGF-β的抑制作用($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** Sr能够对大鼠BMSCs来源的成骨细胞的增殖、分化有促进作用,同时 10^{-4} mol/L Sr可以拮抗Dex(10^{-5} mol/L)对ALP和成骨相关基因的抑制作用。为Sr防治糖皮质激素性骨质疏松提供了细胞学依据。

关键词: 雷奈酸锶;地塞米松;大鼠;成骨细胞

Effect of strontium ranelate on rat osteoblasts under high dexamethasone concentration

WANG Xiaodong¹, HU Songyan², WANG Jinzhi³, SUN Ping¹, ZHOU Yanhui¹, LI Qingnan⁴

1. Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, 510080
2. Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou, 510006
3. Department of Hepatobiliary Surgery, the People's Hospital of Jimo, Qingdao, 266200
4. The Center of New medicine Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, 510006, China

Corresponding author: HU Songyan, Email: 759949207@qq.com

Abstract: Objective To study the effect of strontium ranelate (Sr) on rat osteoblasts under high dexamethasone (Dex) concentration. **Methods** Using rat bone marrow stromal stem cell-derived osteoblasts, the effect of Sr on the proliferation and differentiation of osteoblasts was detected with MTT and AKP commercial kits. The expression of OC and TGF-β under high Dex concentration was detected with RT-PCR. **Results** Proliferation and differentiation of OB were stimulated at concentrations of 10^{-5} mol/L and 10^{-4} mol/L of Sr ($P < 0.01$). Sr at concentration of 10^{-4} mol/L effectively antagonized the inhibitory effect of Dex on osteoblast differentiation ($P < 0.01$), and reverted the inhibitory effect of Dex on OC and TGF-β ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** Sr can promote the proliferation and differentiation of OB derived from BMSCs. Sr at concentration of 10^{-4} mol/L can effectively antagonize the inhibitory effect of Dex (10^{-5} mol/L) on ALP, OC, and TGF-β. It provide the cytological evidence for prevention and treatment of GIOP with Sr.

Key words: Strontium ranelate; Dexamethasone; Rat; Osteoblasts

长期大剂量使用糖皮质激素性(glucocorticoid, GC)不仅可抑制成骨细胞(osteoblast, OB)增殖,促进其凋亡,减少骨骼中活性成骨细胞成分,导致骨形

成下降,还能增加破骨细胞(osteoclast, OC)的数量和活性,促进骨吸收,造成骨量丢失,骨质疏松^[1-3]。研究表明,每日接受7.5 mg或者更高剂量的GC治疗3个月以上,超过50%的患者会发生严重的骨丢失,而且GC不仅降低了骨密度(bone mineral density, BMD),更重要的是它能破坏骨超微结构,造

基金项目: 2011年广东省医学科研基金项目(A2011317)

* 通讯作者: 虎松艳, Email: 759949207@qq.com

成骨强度下降导致骨折的发生。雷奈酸锶 (strontium ranelate, Sr) 是新一代抗骨质疏松药物, 具有促进骨形成和抑制骨吸收的双重作用, 能够刺激成骨细胞介导的骨形成, 同时抑制破骨细胞介导的骨吸收, 改善骨骼的机械抗性^[4, 5]。且具有良好的安全性和有效性, 有望为骨质疏松的预防和临床治疗翻开新的一页。

1 材料和方法

1.1 材料

实验动物: 5 周龄健康 SD 大鼠 10 只用于干细胞分离培养, 雌雄不拘, 所有动物均购于南方医科大学实验动物中心, 体质量 (85 ± 10) g, 动物质量合格证号: 0083138。

1.2 实验方法

1.2.1 BMSCs 体外分离与培养:

(1) BMSCs 的原代培养^[6]: 5 周龄 SD 大鼠颈椎脱位法处死, 体积分数 0.75 乙醇浸泡片刻, 严格无菌条件下取出其双侧股骨和胫骨, 去除骨表面的肌肉组织, PBS 漂洗, 剪去骨骺端, 暴露骨髓腔。7 号针刺入骨髓腔, 用含 10% FBS 的 L-DMEM 培养基冲出骨髓于培养皿内, 充分混匀, 转入离心管, 1 000 rpm/min 离心 5 min, 弃上清。用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素的 L-DMEM 培养液重悬细胞, 反复吹打制成骨髓单细胞悬液。将骨髓单细胞直接接种于 25 cm² 塑料培养瓶中, 置于 37℃, 5% 饱和湿度的 CO₂ 孵箱培养, 48 h 后更换培养液, 弃去未贴壁细胞, 此后每 3d 换液 1 次, 普通光学显微镜下观察细胞形态及生长。

(2) BMSC 的传代培养: 原代培养的细胞融合达 80% 左右时, 进行传代培养。传代方法如下: 吸弃培养液, 用 PBS 洗两遍去除残留血清。加适量胰蛋白酶于培养瓶内, 消化细胞, 室温消化约 2-3 min, 显微镜下可见细胞间隙增大、变圆, 用手轻拍培养器皿的壁, 当大约有 80% 细胞脱壁浮起时, 立即加入等体积的全培终止消化, 用移液管将细胞轻轻吹落, 离心重悬后以 1:2-1:3 比例将细胞接种至新的细胞培养瓶内, 于 37℃, 5% CO₂ 饱和湿度培养箱内培养。

1.2.2 BMSC 表面标记的检测: 流式细胞仪分析 BMSCs 表面标志 CD29、CD34、CD44。收集约 2 × 10⁶ 个细胞, 0.25% 的胰酶消化, 用 1 ml PBS 反复吹打制备成单细胞悬液, 1 000 rpm 离心 5 min, 弃上清, PBS 洗涤两遍, 0.1% X-Triton100 处理 15 min, 洗涤, 1 000 rpm 离心 5 min, 以 Buffer 溶液重悬, 吸取

100 μl 细胞悬液 (约 3.0 × 10⁵ 个细胞) 加入 Ep 管内。按量加入 pE 或 FITC 标记的单抗 CD29、CD34、CD44 和 PE-IgG1 抗体, 避光孵育 30 min。每样品管加入 1.5~2 ml Buffer 溶液, 1 100 rpm 离心 4 min 后弃去上清。每样品管加入 300 μl Buffer 溶液重悬, 上机检测。

1.2.3 BMSC 增殖能力的检测: 采用 MTT 法检测 BMSCs 的增殖能力, 取 P3 代细胞, 用含 0.25% 胰蛋白酶的消化液消化, 以每孔 3 000 个的细胞密度接种于 96 孔板, 每孔体积 200 μl, 至接种 24h 细胞贴壁粘附后, 吸弃原培养液, 依次加入等体积培养液, 含雷奈酸锶终浓度分别为: 0, 25, 50, 100, 200, 400, 800 μmol/L。每天取 5 孔细胞用 MTT 法检测活细胞数, 分别培养 24, 48 和 72 h。以培养时间 (d) 为横轴, 450 nm 处吸光值 (OD_{450nm}) 为纵轴, 绘制生长曲线。

1.2.4 BMSCs 分化能力的检测:

(1) 向成骨细胞诱导分化及鉴定: 取生长良好的 P3 代 BMSCs, 以每孔 1 × 10⁵ 个细胞接种于预先置有盖玻片的 6 孔板内以制备细胞爬片, 用含 10% FBS 的 L-DMEM 培养液, 细胞达到 80% 汇合后更换成骨诱导培养液每孔 2 ml (L-DMEM 培养液含 10% FBS、10 mmol/L β-磷酸甘油、10⁻⁵ mmol/L 地塞米松、0.5 mmol/L 抗坏血酸, 100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素)。将 Ob 培养于无菌的赖氨酸处理过的载玻片上, 2 天之后根据南京建成生物工程研究所生产的碱性磷酸酶染液操作说明书进行鉴定。倒置相差显微镜下观察, 拍照。

(2) ALP 的测定: 取培养 P3 代细胞, 以每孔 1 × 10⁸ 个细胞接种于 96 孔板, 每孔 200 μl, 每孔设 4 个复孔。检测时将细胞洗涤后以 0.2% Triton X-100 裂解液及反复冻融法充分裂解, 裂解液经低温离心机 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清 50 μl, 按试剂盒说明书进行操作, 于酶标仪 520 nm 波长处测定 ALP 值。

(3) 成骨细胞相关基因表达: 细胞生长至近合时, 分别给予锶盐与高浓度的地塞米松作用 48 h, Trizol 提取总 RNA, RNA, 按 PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver. 2 试剂盒说明进行逆转录直接合成 DNA。引物设计如下表。扩增条件: 95℃, 10 min, 1 个循环; 变性 95℃, 15 s; 退火 60℃, 30 s; 延伸 72℃, 15 s。共 40 个循环; 最后循环 60℃, 1 min, 95℃, 15 s, 1 个循环, 见表 1。

1.3 统计方法

所有数据采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示, 用

SPSS 13.0 统计软件进行统计分析, 各组间比较采用单因素方差分析 (*one-way ANOVA*), 组间差异用 *SNK* 法, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

表 1 定量 PCR 的引物序列

Table 1 Primer sequences for RT-PCR

基因	引物序列(5' to 3')	碱基数	Tm 值°C
Gapdh	F: gctctctgctcctccctgttct	22	59.4
	R: gccaatcgcgtcacaccgacct	23	59.7
OC	F: gtcccacacagcaactcg	18	54
	R: ccaaagctgaagctgccc	18	54
TGF-β	F: atgccgcctcctggggctg	18	58
	R: ccattagcaecgggggtgact	20	58

2 结果

2.1 BMSCs 细胞的形态

原代培养的 BMSCs 细胞 48 h 首次换液后可见大部分细胞贴壁, 细胞形态不一, 可为梭形、三角形、多角形或星芒状, 并出现散在集群状生长细胞克隆。其后细胞生长速度逐渐加快, 从克隆中部向周边贴壁生长爬行, 9 d 后细胞达 90% 融合; 之后每三四天即可传代 1 次。至第 3 代成熟的细胞多呈长梭形或多角形, 有不规则形突起, 排列成鱼群状或漩涡状。

2.2 BMSCs 细胞的表型鉴定

流式细胞仪检测结果显示, 第 3 代 BMSCs 主要表达细胞标记 CD29 (99.96%)、CD44 (98.99%); 低表达造血细胞标记 CD34 (3.04%)。

2.3 向成骨细胞诱导及其鉴定

P3 代 BMSCs 在成骨定向诱导分化体系中培养 (Sr 浓度为 0), 细胞体积逐渐增大, 由成纤维样的梭形细胞变成三角形或多边形, 局部可观察到细胞呈多层叠加生长, 并在细胞聚集区观察到细胞外基质分泌增多, 在不同处形成大小不一的颗粒沉淀。碱性磷酸酶活性检测, 可见大量染色阳性细胞 (图 1)。

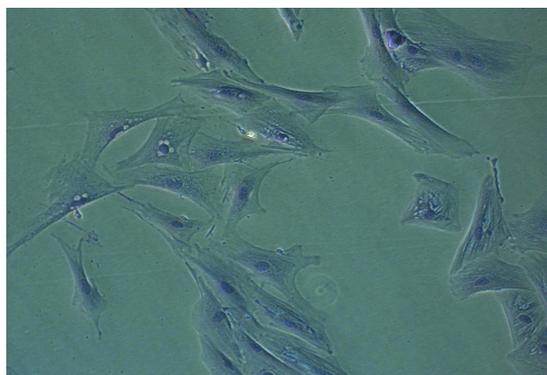


图 1 成骨细胞碱性磷酸酶染色结果 (×200)

Fig. 1 Results of ALP staining of OB (×200).

2.4 不同浓度 Sr 对成骨细胞增殖的影响 (表 2, 3, 图 2, 3)

表 2 不同浓度 Sr 对成骨细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of different concentrations of Sr on the proliferation of osteoblasts

组别	浓度 (mol L ⁻¹)	OD ₄₅₀	细胞增殖率
对照	—	0.442 ± 0.013	1
Sr	0.25 × 10 ⁻⁴	0.468 ± 0.006	1.06 ± 0.037**
	0.5 × 10 ⁻⁴	0.475 ± 0.017	1.08 ± 0.063**
	1.0 × 10 ⁻⁴	0.481 ± 0.014	1.09 ± 0.057**
	2.0 × 10 ⁻⁴	0.469 ± 0.023	1.07 ± 0.052*
	4.0 × 10 ⁻⁴	0.454 ± 0.017	1.04 ± 0.055
	8.0 × 10 ⁻⁴	0.435 ± 0.013	0.995 ± 0.037

* $P < 0.05$ VS Ctrl; ** $P < 0.01$ VS Ctrl; # $P < 0.05$ VS Dex; ## $P < 0.01$ VS Dex.

表 3 不同浓度 Sr 对成骨细胞分化的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of different concentrations of Sr on the differentiation of osteoblasts

组别	浓度 (mol L ⁻¹)	OD ₅₂₀	ALP activity (U L ⁻¹)
对照	—	0.405 ± 0.011	51.78 ± 1.44
Sr	10 ⁻⁶	0.416 ± 0.005	53.12 ± 0.75
	10 ⁻⁵	0.418 ± 0.008	53.44 ± 1.10*
	10 ⁻⁴	0.426 ± 0.013	54.40 ± 1.71*
	10 ⁻³	0.414 ± 0.008	52.87 ± 1.13
	10 ⁻²	0.322 ± 0.010	41.18 ± 1.34**

* $P < 0.05$ VS Ctrl; ** $P < 0.01$ VS Ctrl; # $P < 0.05$ VS Dex; ## $P < 0.01$ VS Dex.

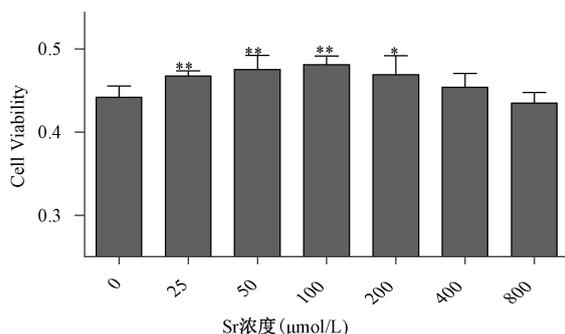


图 2 不同浓度 Sr 对成骨细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 2 Effect of different concentrations of Sr on the proliferation of osteoblasts

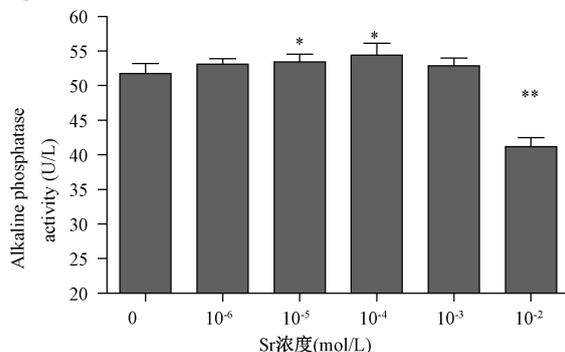


图 3 不同浓度 Sr 对成骨细胞分化的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 3 Effect of different concentrations of Sr on the differentiation of osteoblasts

2.5 不同浓度 Sr 对高浓度地塞米松作用下成骨细胞的影响(表4、图4)

表4 Sr 拮抗 Dex 对成骨细胞分化抑制作用 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Antagonism effect of Sr on inhibitory effect of Dex in the differentiation of osteoblasts

组别	浓度(mol L ⁻¹)	OD ₅₂₀	ALP activity(U·L ⁻¹)
Ctrl	—	0.364 ± 0.005	57.36 ± 0.89
Sr	10 ⁻⁴	0.382 ± 0.001	60.19 ± 0.26**
Dex	10 ⁻⁵	0.356 ± 0.002	55.98 ± 0.45**
Sr + Dex	10 ⁻⁴ + 10 ⁻⁵	0.378 ± 0.013	59.68 ± 2.18#

* $P < 0.05$ VS Ctrl; ** $P < 0.01$ VS Ctrl; # $P < 0.05$ VS Dex; ## $P < 0.01$ VS

Dex.

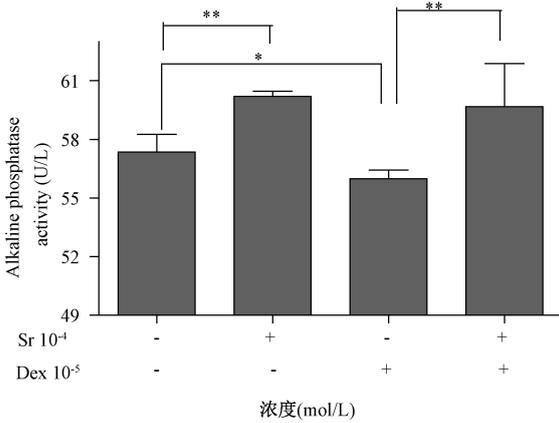


图4 Sr 拮抗 Dex 对成骨细胞分化抑制作用 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 4 Antagonism effect of Sr on inhibitory effect of Dex in the differentiation of osteoblasts

2.6 不同浓度 Sr 对高浓度地塞米松作用下成骨细胞 OC 和 TGF- β 表达的影响(图5、6)

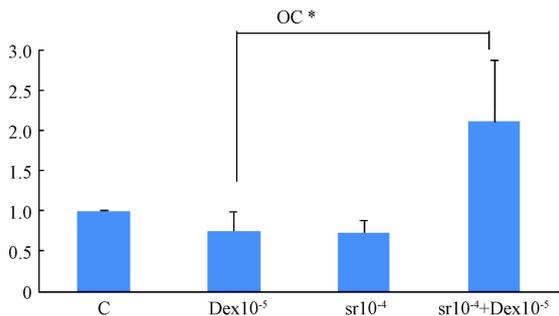


图5 不同浓度 Sr 对高浓度地塞米松作用下成骨细胞 OC 表达的影响

Fig. 5 Effect of different concentrations of Sr on the expression of OC in osteoblasts under high Dex concentration

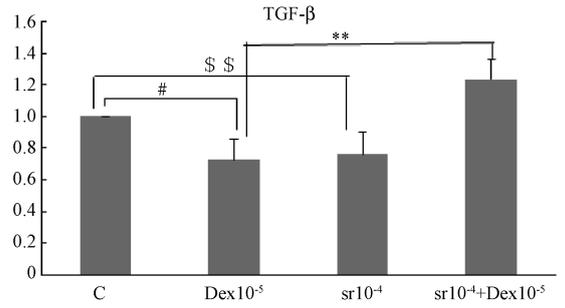


图6 不同浓度 Sr 对高浓度地塞米松作用下成骨细胞 TGF- β 表达的影响

Fig. 6 Effect of different concentrations of Sr on the expression of TGF- β in osteoblasts under high Dex concentration

3 讨论

BMSCs 在一定生物环境和细胞因子作用下,可分化成骨细胞,脂肪细胞,成软骨细胞,生肌细胞以及神经细胞等多种细胞^[7],从 BMSCs 的分化方向归属来看,成骨分化和成脂分化之间的关联最为紧密,向成骨细胞分化数目增多,必然导致成脂能力降低。

ALP 是细胞成骨分化的一个早期指标,是调节细胞矿化的重要酶之一。本实验采用 ALP 及钙结节形成作为判断 BMSC 向成骨细胞分化的指标。本研究发现, Sr 能显著增加 BMSC 的 ALP 活性及钙结节数量,提示 Sr 具有促进 BMSC 向成骨细胞分化的作用,这与文献报道^[8-11]的结果一致。

我们发现 Sr 浓度为 25 ~ 100 $\mu\text{mol/L}$ 时对 BMSCs 增殖作用最为明显,随着 Sr 浓度的增加其对 BMSCs 增殖作用逐渐减低。Sr 浓度为 10⁻⁶ 和 10⁻³ mmol/L 的 Sr 对成骨细胞分化作用不明显, Sr 浓度为 10⁻⁴ mmol/L 能够显著增加 Dex 作用下 ALP 和 OC 含量,同时有效拮抗 Dex 对成骨细胞分化抑制作用,而 10⁻² mmol/L 的 Sr 可以显著促进成骨细胞的分化,其所需要的有效浓度比较高,这可能与我们采用 Sr 粉剂为成品药物有关,成品药物多含有其他辅药,以成品药物计算应加入体外实验所需的总含量,其可能导致有效药物的含量低。TGF- β 能够通过影响 BMSCs 进而影响成骨细胞方向的转化,既往研究表明 Sr 在促进 BMSCs 向成骨细胞分化的过程中起着重要的作用,本研究显示 Sr 浓度为 10⁻⁴ mmol/L 能够使 Dex 组的 TGF- β 显著增加,提示 Sr 通过上调 TGF- β 表达可能是促进 BMSCs 向成骨细胞分化的重要作用机制之一。

综上所述, Sr可以在细胞水平和基因水平抑制 BMSCs 向成脂肪细胞或者脂肪细胞分化。Sr 浓度为 10^{-4} mmol/L 能够有效拮抗 Dex 对成骨细胞分化抑制作用, 而 10^{-2} mmol/L 的 Sr 可以显著促进成骨细胞的分化, 我们认为, Sr 所具有的一定的抑脂作用与它本身促进骨分化和矿分化作用密不可分。Sr 可控制 BMSCs 的定向分化平衡, 可通过逆转 BMSCs 分化紊乱而对抗骨质疏松的发生和发展。为防治骨质疏松症的及其新药的研发提供了新的作用靶点。

【参 考 文 献】

- [1] Patschan D, Loddenkemper K, Buttgerit F. Molecular mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis [J]. Bone, 2001, 29(6):498-505.
- [2] Hubbard R, Tattersfield A, Smith C, et al. Use of inhaled corticosteroids and the risk of fracture [J]. Chest, 2006, 130(4): 1082-1088.
- [3] Rodriguez J P, Garat S, Gajardo H, et al. Abnormal osteogenesis in osteoporotic patients is reflected by altered mesenchymal stem cells dynamics [J]. J Cell Biochem, 1999, 75(3):414-423.
- [4] Bonnelye E, Chabadel A, Saltel F, et al. Dual effect of strontium ranelate: stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro [J]. Bone, 2008, 42(1):129-138.
- [5] Sila-Asna M, Bunyaratvej A, Maeda S, et al. Osteoblast differentiation and bone formation gene expression in strontium-inducing bone marrow mesenchymal stem cell [J]. Kobe J Med Sci, 2007, 53(1-2):25-35.
- [6] Yang L, Zhang RH, Xie HJ, et al. Establishment of a stable isolation culture system and identification of rat bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering, 2009(6):1064-1068.
- [7] Peister A, Mellad J A, Larson B L, et al. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential [J]. Blood, 2004, 103(5):1662-1668.
- [8] 王雪鹏, 郝永强, 曹磊, 等. 雷奈酸锶对大鼠骨髓间充质干细胞增生和成脂分化的影响 [J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2011(01):36-43.
- WANG Xuepeng, HAO Yongqiang, CAO Lei, et al. The effect of strontium ranelate on cell proliferation and adipogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells. Chinese Journal of Osteoporosis and Bone Mineral Research, 2011(01):36-43.
- [9] Lv H, Huang X, Jin S, et al. [Strontium ranelate promotes osteogenic differentiation of rat bone mesenchymal stem cells through bone morphogenetic protein-2/Smad signaling pathway] [J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2013, 33(3):376-381.
- [10] Li Z, Wang Y, Wang X N, et al. [Strontium ranelate promotes osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells by increasing bone morphogenetic protein-7 expression] [J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2011, 31(11):1949-1953.
- [11] Saidak Z, Hay E, Marty C, et al. Strontium ranelate rebalances bone marrow adipogenesis and osteoblastogenesis in senescent osteopenic mice through NFATc/Maf and Wnt signaling [J]. Aging Cell, 2012, 11(3):467-474.

(收稿日期:2014-08-12)