

· 论著 ·

辐射对成骨细胞系 MC3T3-E1 细胞增殖和功能基因表达的影响

薛虚慧¹ 杨冰² 薛虚智³ 王骏滢¹ 孙元明^{1*}

1. 中国医学科学院北京协和医学院放射医学研究所, 天津 300192

2. 天津医科大学基础医学院, 天津 300070

3. 上海交通大学, 上海 200240

中图分类号: R68 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2016) 07-0828-04

摘要: 目的 为了深入了解辐射对成骨细胞的影响, 探讨成骨细胞系 MC3T3-E1 细胞受到辐射后的功能变化。方法 将 MC3T3-E1 细胞体外培养, 诱导成骨前体细胞和成骨细胞, 经¹³⁷Cs γ 射线照射后, 用 MTT 法分析细胞的存活率, 用实时定量 PCR 方法分析 ALP、RunX2 和 M-CSF 基因的 mRNA 表达。结果 MTT 实验表明, 随照射剂量增加, 正常 MC3T3-E1 细胞生长率明显下降, 而经过诱导分化的 MC3T3-E1 细胞生长率变化越来越不明显。实时定量 PCR 实验结果表明, 经过¹³⁷Cs γ 射线照射后, MC3T3-E1 细胞的 ALP、RunX2 和 M-CSF 基因的 mRNA 表达出现明显的降低; 经过诱导分化为成骨前体细胞的, ALP、RunX2 和 M-CSF 基因的 mRNA 表达与相应的正常组相比没有明显的规律变化; 经过诱导进一步分化成为成骨细胞的, ALP 和 RunX2 表达下降, M-CSF 表达呈现升高趋势。结论 辐射抑制早期成骨细胞的增殖、发育和分化。随着成骨细胞的分化, 辐射对成骨细胞的增殖和生长发育影响减小, 但是对成骨细胞发挥调节破骨细胞功能的作用并没有减少。

关键词: MC3T3-E1 细胞; 辐射; ALP; Runx2; M-CSF**Effect of radiation on the proliferation and functional gene expression of MC3T3-E1 osteoblast cell line**XUE Xuhui¹, YANG Bing², XUE Xuzhi³, WANG Junying¹, SUN Yuanming¹

1. Institute of Radiation Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Tianjin 300193

2. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

3. Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China

Corresponding author: SUN Yuanming, Email: sunyuanming@irm-cams.ac.cn

Abstract: **Objective** In order to understand the effects of radiation on osteoblast, the function changes after radiation was investigate by MC3T3-E1 cells. **Methods** MC3T3-E1 cells were cultured in vitro, and induced into osteoblast precursor and osteoblasts using induction medium. After¹³⁷Cs γ irradiation, the survival of the cells was tested with MTT analysis. The gene expression of RunX2, ALP, and M-CSF was examined using real-time quantitative PCR. **Results** MTT results showed that with the increase of irradiation doses, the growth rate of normal MC3T3-E1 cells decreased significantly, but it was not obvious in induced cells. Real-time quantitative PCR results showed that after¹³⁷Cs γ irradiation, the gene expression of ALP, RunX2, and M-CSF obviously decreased in MC3T3-E1 cells, but the change was not obvious in the osteogenic precursor cells compared with the normal cells. The gene expression of ALP and Runx2 decreased, and M-CSF showed an increasing trend in differentiated osteoblasts. **Conclusion** Radiation inhibits the proliferation, development, and differentiation of osteoblasts in early stage. With the differentiation of osteoblasts, the effect of radiation on the proliferation and growth of osteoblasts decreases, but the role of radiation in the osteoblast regulation of osteoclast function is not reduced.

Key words: MC3T3-E1 cell; Radiation; ALP; Runx2; M-CSF

基金项目: 天津自然科学基金项目(14JCYBJC26700)

* 通讯作者: 孙元明, Email: sunyuanming@irm-cams.ac.cn

目前,放射性治疗是临床上治疗肿瘤的主要手段,但在治疗的同时却给患者带来放射性骨损伤等副作用。临床研究表明,肿瘤放射疗法会损伤正常

机体骨组织,引起骨折、骨损伤等临床病症^[1]。实验动物研究证实,小鼠全身受到 2Gy 照射后,骨密度出现明显减少^[2]。骨折、骨组织损伤主要是骨质减少造成的。成骨细胞起源于间充质干细胞,合成骨基质,促进骨形成^[3]。MC3T3-E1 细胞系是源于 C57BL/6 小鼠颅盖骨的成骨细胞系,在体外,经诱导分化具有成骨细胞特性的成骨细胞样细胞,增殖能力强,是研究成骨细胞的良好模型^[4]。本研究采用 MC3T3-E1 细胞为模型,研究电离辐射对成骨细胞功能的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

细胞和试剂:MC3T3-E1 细胞系来自中国医学科学院基础医学研究所细胞库;使用 Gibco 公司的 α -MEM 培养基和胎牛血清(FBS);美国 Invitrogen 公司的 Trizol 试剂、M-MLV 逆转录酶试剂盒和实时定量 PCR (Real-time PCR, RT-PCR) Platinum[®] SYBR. Green qPCR SuperMix—UDG with ROX 试剂盒。

仪器设备:¹³⁷Cs γ 射线放射源是加拿大的 GammaII40;CFX96Touch[™] Real time PCR 仪来自美国 Bio-Rad 公司;M200 型酶标仪来自瑞士 Tecan 公司;Nanodrop 2000 UV-Vis 分光光度计是美国 Thermo 公司产品。

1.2 细胞培养和成骨细胞诱导分化

将 MC3T3-E1 细胞置于含有 10% 胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS)的 α -MEM 培养基中,在 37℃、5% CO₂ 并且维持饱和湿度的培养箱中培养,每 2~3 天更换一次培养液,直至细胞贴壁达到 70%~80% 融合。根据文献^[5]报道,此时将培养液更换为成骨细胞分化培养液(Osteoblast differentiation medium, OBDM)培养,同样,每 2~3 天换液 1 次,培养 8 天左右则可分化为成骨细胞前体细胞,培养 18 天左右分化为成熟的成骨细胞。OBDM 是 10% FBS 的 α -MEM 培养液中含有 10⁻⁸ mol/L β -甘油磷酸钠、50 μ g/ml 维生素 C 和 8⁻¹⁰ mol/L 地塞米松。

1.3 细胞照射

以¹³⁷Cs γ 射线为放射源,剂量率为 71.80 R/min;MC3T3-E1 细胞、以及在 OBDM 培养基中分别培养 5 天(成骨前体细胞)和 15 天(成骨细胞)的细胞,都分别进行 2Gy 和 4 Gy 剂量照射。在照射 3 天后进行实验分析。

1.4 细胞增殖实验

运用 MTT 方法比较 MC3T3-E1 细胞和其被诱导形成的成骨前体细胞以及成骨细胞在经过 2Gy 和 4Gy 照射后的增殖分化情况的变化。将对数生长期的细胞,用胰酶消化,使其悬浮,接种到 96 孔板中,每孔中细胞数为 7×10^3 个,每个剂量组有 8 个孔作为平行样,细胞在培养箱中培养 5 天后,每孔中加入 5 mg/ml 的 MTT 20 μ l,继续培养 4 小时,弃上清,每孔加入二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO) 150 μ l,震荡 10 mins 使样品的蓝紫色结晶完全溶解,然后用酶标仪,在 490 nm 波长处测定吸光值。重复 3 次实验。具体实验方法参照本实验室相关论文^[6]。

1.5 实时定量 PCR(Real Time-PCR, RT-PCR)

提取 RNA,逆转录,进行 RT-PCR 实验参照本实验室以往发表的论文^[7]。

1.6 统计分析

使用 SPSS 统计软件处理数据,两两比较采用 t 检验方法,以 $P < 0.05$ 认为具有统计学意义,以 $P < 0.01$ 认为差异具有显著性意义。

2 结果

用 MTT 方法比较 MC3T3-E1 细胞及其被诱导形成的成骨前体细胞和成骨细胞在受到 2Gy 和 4Gy 剂量照射后和对照组的增殖分化情况的变化。细胞增殖率为实验组存活细胞值/对照组存活细胞值 $\times 100\%$ 。设未照射的 MC3T3-E1 细胞的细胞增殖率为 100%,其它受到 2 Gy 和 4Gy 照射的 MC3T3-E1 细胞相应地对照未照射组的 MC3T3-E1 细胞增殖率见图 2。实验结果表明:正常的 MC3T3-E1 细胞随照射剂量的增加,相对细胞增殖率明显下降;、经诱导分化的成骨细胞前体细胞受到照射 2Gy 剂量后,细胞增殖率明显下降,而在 4Gy 照射剂量时,细胞增殖率与受 2Gy 照射剂量相比,有明显的升高,但与未照射组相比下降不明显;经诱导分化成熟的成骨细胞,经过 2Gy 和 4Gy 照射后,细胞增殖率的变化不明显(图 1)。

用 RT-PCR 方法检测正常 MC3T3-E1 细胞和其被诱导形成的成骨前体细胞和成骨细胞在未受照射及受 2Gy 和 4Gy 剂量照射后,目的基因 ALP、Runx2 和 M-CSF 的表达量的变化。以各组细胞的 cDNA 作为模板,进行 RT-PCR 实验,得到相应的溶解曲线见图 2,可以看出它们都只有一个主峰,且底部没有出现异常增宽,PCR 产物经过凝胶电泳证明为单条

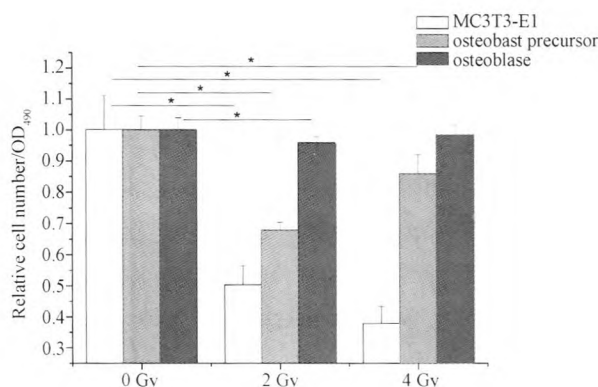


图1 辐射对细胞增长率变化的影响

Fig.1 Effect of radiation on cell proliferation.

* $P < 0.05$ vs. control

带,表明这几个基因在扩增过程中没有出现特异性产物和污染。

ALP、Runx2 和 M-CSF 基因在 MC3T3-E1 细胞、其诱导形成的成骨前体细胞和成骨细胞中的表达变化情况见图 2。图 2 中的柱状图以各基因在未受照射组的表达量设为 100%, 在 2Gy 和 4Gy 剂量照射组的表达量为未照射组的百分数。

由图 2A 可以看出,ALP 基因在正常 MC3T3-E1 细胞中的表达量随照射剂量的增加而显著降低;在经诱导分化的成骨前体细胞的各组中,表达变化不明显;对于经诱导分化的成熟成骨细胞,在 2Gy 照射组中的表达量上升,4Gy 照射组中的表达显著下降。

由图 2B 可以看出,正常 MC3T3-E1 细胞受到 2Gy 和 4Gy 剂量照射后,Runx2 的表达均明显降低;经诱导分化的成骨前体细胞受照射后,Runx2 基因表达变化有上升趋势;经诱导分化的成熟成骨细胞受照射后,Runx2 基因表达呈现出显著性下降。

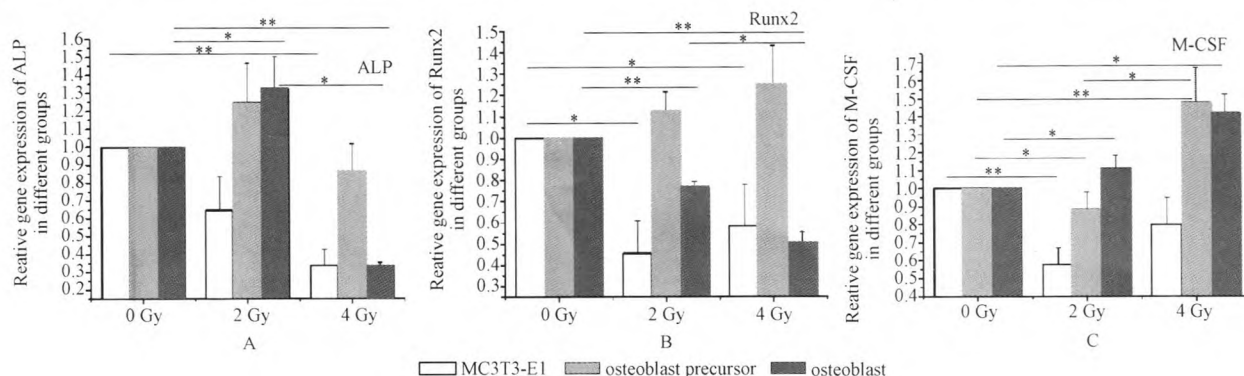


图2 ALP、Runx2 和 M-CSF 的相对基因表达量

Fig.2 Relative expression of ALP, Runx2, and M-CSF.

* $P < 0.05$ vs. control, ** $P < 0.01$ vs. control

由图 2C 可以看出,经过 2Gy 和 4Gy 剂量照射后,正常的 MC3T3-E1 细胞的 M-CSF 表达量降低,经诱导分化为成骨细胞前体细胞和成熟的成骨细胞的 M-CSF 的表达量随照射剂量升高而明显升高。

3 讨论

在骨骼重建过程中,成骨细胞的主要功能是促进新骨的形成,破骨细胞促进骨的吸收,二者的数量和功能对于维持骨骼的稳定是非常重要的。在肿瘤的放射治疗中,患者平均每次接受 1.8 ~ 2.0 Gy 的照射,照射的总剂量会达到 50 ~ 80 Gy^[8];宇航员在持续 8 ~ 24 h 的较大太阳粒子事件中,将会接受 1 ~ 2 Gy 的照射^[9]。有文献表明受到 2Gy 照射后,小鼠出现明显的骨损伤和骨质疏松^[2]。因此,本实验选用¹³⁷Cs γ 射线对细胞分别进行 2Gy 和 4Gy 的照射,并进行研究。

通过 MTT 实验表明,经过 2 Gy 和 4 Gy 剂量的电离辐射,MC3T3-E1 细胞的生长率下降,具有辐射剂量依赖性;MC3T3-E1 细胞诱导形成的成骨前体细胞和成骨细胞的生长率与细胞的分化程度密切相关,分化越成熟的细胞对辐射损伤的敏感性越小。也有文献研究表明 MC3T3-E1 细胞在电离辐射条件下,增殖能力降低,而随着分化能力升高,则具有辐射剂量依赖性^[10],这与本研究结果相一致。

为了研究 MC3T3-E1 细胞和其分化的成骨前体细胞和成骨细胞受辐射影响出现的功能变化,选择了 ALP、Runx2 和 M-CSF 基因做为观察指标。ALP 是成骨细胞分化和矿化过程中的特征性标志^[11],Runx2(runt 相关蛋白 2,又称为 Cbfa1)是成骨细胞分化和骨形成过程中一种重要的转录因子^[12],其在骨骼形成过程中的多个阶段都具有重要的作用^[13],

ALP 和 Runx2 被用来表示成骨细胞的更新和分化调控功能。成骨细胞是通过 RANK/RANKL/骨保护素通路对破骨细胞的分化、功能、存活等进行调控^[14],而 Hodge 等^[15]进一步证明成骨细胞是通过表达 M-CSF 基因作用于 RANK/RANKL/骨保护素通路从而促进破骨细胞分化和骨吸收能力,则用 M-CSF 代表成骨细胞对破骨细胞的调节功能。

经过 2Gy 和 4Gy 的¹³⁷Csγ 射线照射后,正常 MC3T3-E1 细胞的 ALP, RunX2 和 M-CSF 基因的 mRNA 表达出现明显的降低,与 MC3T3-E1 受照后的生存率的降低是一致的,说明辐射影响 MC3T3-E1 生长增殖、分化发育和对破骨细胞的调节功能;经诱导分化成为的 MC3T3-E1 成骨前体细胞,受到射线照射后相对生存率的下降幅度低于正常 MC3T3-E1 细胞,三个重要的成骨细胞标志基因的表达与相应对照组相比没有明显的变化,说明 MC3T3-E1 细胞经过诱导分化为成骨前体细胞对辐射损伤作用的敏感性降低,也可能分化的成骨细胞前体细胞表现出的适应性反应的因素;经诱导进一步分化为的 MC3T3-E1 成骨细胞,受到照射后成骨细胞的相对生存率变化更不明显,ALP 和 Runx2 基因的 mRNA 表达呈现下降趋势,Runx2 基因的 mRNA 表达变化更明显,M-CSF 基因的 mRNA 表达却出现上升。这说明辐射抑制早期的成骨细胞的增殖和生长发育,而随着成骨细胞的发育,辐射对成骨细胞的增殖和生长发育影响减小,但是对成骨细胞发挥调节破骨细胞功能的作用并没有减少。

【参 考 文 献】

- [1] Bongers EM, Haasbeek CJ, Lagerwaard FJ, et al. Incidence and risk factors for chest wall toxicity after risk-adapted stereotactic radiotherapy for early-stage Lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2011, 6(12):2052-2057.
- [2] S. A. Hamilton, J. J. Pecaut, D. S. Gridley, et al. A murine model for bone loss from therapeutic and space-relevant source of radiation[J]. *J. Appl. Physiol*. 2006, 101:789-793.
- [3] Watanabe K, Ikeda K. Osteoblast differentiation and bone formation. *Nihon Rinsho*[J]. 2009, 67(5):879-886.
- [4] Chaves Neto AH, Machado D, Yano CL, et al. Antioxidant defense and apoptotic effectors in ascorbic acid and beta-glycerophosphate-induced osteoblastic differentiation[J]. *Dev Growth Differ*, 2011, 53(1):88-96.
- [5] Wang D, Christensen K, Chawla K, et al. Isolation and characterization of MC3T3 — E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralization potential [J]. *J Bone Miner Res*, 1999, 14(6):893-903.
- [6] Bing Yang, Quan Tang, Janine Post, et al. Effect of radiation on the Noeth signaling pathway in osteoblasts[J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(3):698-706.
- [7] Bing Yang, Hui Zhou, Xiao-Dong Zhang, et al. Effect of radiation on osteoblast marker gene expression in RAW264.7 [J]. *Mol Med Report*, 2012, 5(4):955-958.
- [8] Schmittgen TD, Livak K J. Analyzing real—time PCR data by the comparative C(T) method [J] *Nat Protoc*, 2008, 3(6):1101-1108.
- [9] Brown SA, TA Guise. Cancer treatment-related bone disease [J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2009, 19(1):47-60.
- [10] Willey JS, Lloyd SA, Nelson GA, et al. Space radiation and bone loss[J]. *Gravit Space Biol Bull*, 2011, 5(1):14-21.
- [11] Dudziak ME, Saadeh PB, Mehrara BJ, et al. The effects of ionizing radiation on osteoblast-like cells in vitro [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2000, 106(5):1049-1061.
- [12] Coelho MJ, Fernandes MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation[J]. *Biomaterials*, 2000, 21(11):1095-102.
- [13] Renny T, Franceschi GX. Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: Responsiveness to multiple signal transduction pathways [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2003, 88(3):446-454.
- [14] Komori T. Runx2, a multifunctional transcription factor in skeletal development[J]. *J Cell Biochem*, 2002, 87(1):1-8.
- [15] Tamma R, Zallone A. Osteoblast and osteoclast crosstalks; from OAF to Ephfin. *InflammAllergyDrugTargets*, 2012, 11(3):196-200.
- [16] Hodge JM, Collier FM, Pavlos NJ, et al. M—CSF potently augments RANKL—induced resorption activation in mature human osteoclasts[J]. *PLoS One*, 2011, 6(6):e21462.

(收稿日期: 2016-04-28)