

# 不同分化阶段的成骨细胞对强磁重力环境的响应

胡丽芳 蹇爱荣 李迪杰 李京宝 商 澎\*

(西北工业大学生命学院, 西北工业大学特殊环境生物物理学研究所,  
空间生物实验模拟技术国防重点学科实验室, 西安 710072)

**摘要** 研究强磁重力环境(high magneto-gravitational environment, HMGE)对不同分化阶段MC3T3-E1成骨细胞分化的影响及其可能机制。采用HMGE的 $\mu$  g[9 Tesla(T)], 1 g(16 T)和2 g(12 T)以及正常对照(1 g, 地磁场)环境, 分别对诱导成骨分化4 d和7 d的MC3T3-E1细胞处理12 h, 对硝基苯磷酸法检测成骨细胞碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性; 茜素红S染色检测细胞矿化结节形成情况; Real-time RT-PCR检测成骨分化相关分子ALP、runt-related transcription factor 2(Runx2), I型胶原 $\alpha$ 1(type I collagen  $\alpha$ 1, Col I $\alpha$ 1)、骨钙素(osteocalcin, OC)以及牙本质基质蛋白1(dentin matrix protein 1, DMP1) mRNA的表达。结果发现, 经过12 h的HMGE处理后, 与对照组(C)相比,  $\mu$  g组和1 g组成骨分化7 d的MC3T3-E1细胞ALP活性显著增加( $P<0.001$ ,  $P<0.01$ ), 而HMGE对成骨分化4 d细胞的ALP活性无显著影响。茜素红S染色显示,  $\mu$  g组和1 g组成骨分化7 d的MC3T3-E1细胞形成矿化结节较对照组增加。Real-time RT-PCR检测显示, HMGE处理12 h后, 成骨分化4 d与7 d细胞成骨分化相关基因(*ALP*、*Runx2*、*Col I $\alpha$ 1*、*OC*和*DMP1*)在 $\mu$  g组和1 g组的表达明显上调, 而2 g组下调( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ,  $P<0.001$ )。结果表明, 处于4 d与7 d不同分化阶段的MC3T3-E1细胞对12 h HMGE环境的处理敏感程度不同, 7 d矿化阶段的细胞对HMGE更敏感, 同时, 磁场表现出促进成骨细胞分化的作用。

**关键词** 强磁重力环境; 成骨细胞; 分化; 碱性磷酸酶; 矿化结节

## The Response to High Magneto-Gravitational Environment of Different Differentiating-Stage Osteoblasts

Hu Lifang, Qian Airong, Li Dijie, Li Jingbao, Shang Peng\*

(Key Laboratory for Space Bioscience and Biotechnology, Institute of Special Environmental Biophysics,  
School of Life Sciences, Northwestern Polytechnical University, Xi'an 710072, China)

**Abstract** To investigate the effects and possible mechanism of high magneto-gravitational environment (HMGE) on the differentiation of different differentiating stage MC3T3-E1 osteoblasts, the 4 d or 7 d osteogenic differentiating MC3T3-E1 osteoblasts were cultured under  $\mu$  g [9 Tesla(T)], 1 g (16 T), 2 g (12 T) and control (1 g, geomagnetic field) conditions for 12 h respectively. The alkaline phosphatase (ALP) activity was analyzed by p-nitrophenyl phosphate colorimetric assay. Alizarin red s staining was used to detect mineralized nodule formation. Real time RT-PCR was applied to detect the mRNA expression of osteogenic genes including *ALP*, *runt-related*

收稿日期: 2013-02-03 接受日期: 2013-04-21

国家重点基础研究发展计划(973)项目(批准号: 2011CB710903)和国家自然科学基金(批准号: 31100667、31170812)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 029-88460391, Fax: 029-88491671, E-mail: shangpeng@nwpu.edu.cn

Received: February 3, 2013 Accepted: April 21, 2013

This work was supported by State Key Development Program for Basic Research of China (Grant No.2011CB710903) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31100667, 31170812)

\*Corresponding author. Tel: +86-29-88460391, Fax: +86-29-88491671, E-mail: shangpeng@nwpu.edu.cn

网络出版时间: 2013-06-21 14:23 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130621.1423.002.html>

*transcription factor 2 (Runx2)*, *type I collagen  $\alpha 1$  (Col 1 $\alpha 1$ )*, *osteocalcin (OC)* and *dentin matrix protein 1 (DMP1)*. The results showed that 12 h treatment of  $\mu g$  and 1 g condition significantly increased the ALP activity of 7 d differentiating MC3T3-E1 cells ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ ) compared with control condition, while HMGE did not affect the ALP activity of 4 d differentiating MC3T3-E1 cells. Alizarin red S staining showed that the mineralized nodule formation of 7 d differentiating MC3T3-E1 cells increased under  $\mu g$  and 1 g condition. Real time RT-PCR results showed that the expressions of osteogenic genes (*ALP*, *Runx2*, *OC*, *Col 1 $\alpha 1$*  and *DMP1*) were significantly up-regulated by 12 h treatment of  $\mu g$  and 1 g condition while down-regulated under 2 g condition ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ) in both 4 d and 7 d osteogenic differentiating cells. These results demonstrate that 4 d and 7 d different differentiating stage MC3T3-E1 cells show different sensitivity to 12 h treatment of HMGE while 7 d mineralizing stage cells are more sensitive to HMGE and suggest the promotion effect of magnetic field on osteoblast differentiation.

**Key words** high magneto-gravitational environment; osteoblast; differentiation; alkaline phosphatase; mineralized nodule

随着载人航天事业的迅速发展, 空间失重环境引起航天员骨质流失问题已经成为航天医学研究的重要科学问题之一。空间失重环境引起航天员每月1%~2%的骨质流失<sup>[1-2]</sup>, 大大增加了航天员发生骨折的风险<sup>[3]</sup>。一些临床研究也表明, 航天员在经历长期空间飞行后, 部分骨骼区域的骨矿物质持续丢失5%~10%, 甚至更多<sup>[4]</sup>, 严重危害到航天员的健康。目前研究表明, 成骨细胞分化与骨形成受到抑制是引发空间失重性骨丢失的主要因素之一<sup>[5-8]</sup>, 然而由于成骨细胞分化是一个多步骤的复杂过程, 目前有关失重环境抑制成骨细胞分化的具体机制仍有待研究。

强磁重力环境(high magneto-gravitational environment, HMGE)是一种由大梯度强磁场产生的极端人工物理环境, 其抗磁悬浮技术是一种新型的空间失重环境地基模拟技术<sup>[9-10]</sup>, 在生命科学研究领域已有很多应用<sup>[11-16]</sup>。Hammer等<sup>[17]</sup>采用17 T大梯度强磁场产生的HMGE研究发现, HMGE处理MC3T3-E1成骨细胞48 h后, 相对于1 g(17 T)组, 0 g(12.5 T)和2 g(12.5 T)组细胞基因表达上调。本课题组前期研究也发现, HMGE影响成骨细胞形态, 并影响细胞增殖、黏附、周期及基因、蛋白表达等细胞功能, 而且还影响成骨细胞的主要元素含量<sup>[18-21]</sup>。此外, 我们还发现, HMGE影响人骨髓间充质干细胞的分化<sup>[22]</sup>。

在前期研究基础上, 本文进一步探讨HMGE对成骨分化不同阶段细胞的分化能力的影响, 可为强磁重力环境生物学研究提供实验支持, 并加深对强磁重力环境的认识。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞 小鼠成骨细胞系MC3T3-E1由澳大利亚悉尼大学ANZAC研究所周虹教授惠赠。

1.1.2 试剂 Alpha-MEM( $\alpha$ -MEM)培养基购自Life Technologies公司; 胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)购自上海依科赛生物制品有限公司; 抗坏血酸(ascorbic acid)、 $\beta$ -甘油磷酸钠( $\beta$ -glycerophosphate disodium salt hydrate)、Alkaline Phosphatase Yellow (pNPP) Liquid Substrate System for ELISA和茜素红S(alizarin red s)均购自Sigma-Aldrich公司; BCA Protein Assay Reagent购自Pierce公司; TRIpure Reagent购自北京艾德莱生物科技有限公司; PrimeScript<sup>®</sup> RT reagent kit和SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II购自大连宝生物工程有限公司; 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.1.3 仪器 JMTA-16T50MF大梯度强磁场超导磁体从日本JASTEC公司引进; 多功能酶标仪为Bio-Tek公司Synergy HT产品; 实时定量PCR仪购自Bio-Rad公司; 细胞培养箱为Thermo Scientific公司Forma Direct Heat CO<sub>2</sub> Incubator。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 采用完全培养基( $\alpha$ -MEM基本培养基添加10% FBS), 在5% CO<sub>2</sub>、37 °C培养箱中培养MC3T3-E1成骨细胞。诱导MC3T3-E1细胞成骨分化时, 当细胞生长至100%汇合度, 将完全培养基更换为成骨分化培养基( $\alpha$ -MEM基本培养基, 添加10% FBS、50  $\mu$ g/mL抗坏血酸和10 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸钠)培养细胞。

1.2.2 强磁重力环境(high magneto-gravitational environ-

ment, HMGE) HMGE由从日本JASTEC公司引进的JMTA-16T50MF大梯度强磁场超导磁体产生。该磁体利用抗磁性物质在大梯度强磁场中不同位置所受到的重力与磁化力合力不同的原理,可产生不同表观重力水平。本实验室已自主研发了与该磁体配套的适用于生物学研究的实验设备,可实现在超导磁体腔中对等效重力水平、样品位置、温度、湿度和气体浓度等进行检测和调控<sup>[23]</sup>。本研究利用 $\mu$  g、1 g和2 g三个不同的重力水平,其所对应的磁感应强度分别为9 T、16 T和12 T。实验设置4个组,分别为对照组(1 g, 地磁场)、 $\mu$  g( $\mu$  g, 9 T)组、1 g(1 g, 16 T)组和2 g(2 g, 12 T)组。

1.2.3 不同分化阶段细胞的处理 将对数生长期的MC3T3-E1细胞以 $1 \times 10^6$ /皿接种于35 mm细胞培养皿(Nunc)中,用完全培养基( $\alpha$ -MEM基本培养基添加10% FBS),在37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养24 h后,更换为成骨分化培养基( $\alpha$ -MEM基本培养基,添加10% FBS、50  $\mu$ g/mL抗坏血酸和10 mmol/L  $\beta$ -甘油磷酸钠)诱导细胞成骨分化(0 d),并分别在诱导分化4 d(分化中期)或7 d(矿化起始期)时,将细胞分为4组:即对照组(C)、 $\mu$  g组、1 g组和2 g组,继续培养12 h后,收集细胞样品用于后续检测。

1.2.4 对硝基苯磷酸(p-nitrophenyl phosphate, pNPP)法检测碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)活性 MC3T3-E1经诱导成骨分化4 d或7 d后,分别在对照、 $\mu$  g、1 g和2 g环境下继续培养12 h后,采用pNPP法检测细胞内的ALP活性<sup>[24]</sup>。从不同环境中取出细胞,去掉培养基,经PBS清洗后,向每皿中加入1 mL 0.5% Triton X-100,放入-80 °C,反复冻融3次后,将细胞裂解液吸入1.5 mL Eppendorf管中,15 000 g, 4 °C离心5 min,吸取上清,采用Alkaline Phosphatase Yellow (pNPP) Liquid Substrate System for ELISA检测细胞内ALP活性,分别在反应0 min与10 min时在405 nm读数,以10 min读数减去0 min读数来分析ALP活性,同时,采用BCA法检测蛋白浓度。ALP活性以蛋白含量做归一化处理以后以对照组为参照用百分比表示。

1.2.5 茜素红S染色检测矿化结节 MC3T3-E1经诱导成骨分化7 d后,分别在4种不同环境下继续培养12 h后,从不同环境中取出细胞,去掉培养基,经PBS清洗后,向每皿中加入2 mL 10%中性甲醛,固定细胞15 min, PBS清洗,每皿加入1 mL 0.5%茜素

红S染色15 min,用自来水在摇床上摇动清洗4次,每次5 min。采用扫描仪对着色的矿化结节进行扫描,并采用Image J软件(National Institutes of Health, NIH)对矿化结节面积进行分析。

1.2.6 Real-time RT-PCR检测成骨分化相关基因的表达 取出细胞, PBS清洗细胞后,向每皿中加入1 mL TRIpure Reagent, 氯仿、异丙醇提纯RNA,并分别采用1%琼脂糖凝胶电泳和微量紫外分光光度计检测RNA的完整性、纯度与浓度。取1  $\mu$ g总RNA,采用PrimeScript<sup>®</sup> RT reagent kit,将其反转录为cDNA。cDNA用于Real-time PCR检测成骨分化相关基因的表达,反应条件:95 °C, 30 s; 95 °C, 10 s, 58 °C或60 °C, 30 s,共40个循环;溶解曲线65 °C~95 °C每上升0.4 °C采集1次荧光。引物序列详见表1,以GAPDH作为内参基因对目的基因的表达进行归一化处理,采用2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub></sup>法对数据进行分析<sup>[25]</sup>。

1.2.7 统计学分析 采用GraphPad Prism 5软件对实验数据进行统计学分析,两组之间采用t检验进行分析,数据均以平均数 $\pm$ 标准差表示。 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

## 2 结果

### 2.1 HMGE对MC3T3-E1细胞ALP活性的影响

pNPP法检测细胞内ALP活性结果表明,成骨分化4 d(分化中期)的细胞经过12 h的HMGE处理后, $\mu$  g组、1 g组和2 g组与对照组(C)相比,细胞的ALP活性无显著差异(图1A)。成骨分化7 d(矿化起始期)的细胞经12 h的HMGE处理后,与对照组(C)相比, $\mu$  g组和1 g组细胞ALP活性分别增加56%和21%( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ ),2 g组ALP活性下降,但无显著差异;相对于 $\mu$  g组,2 g组细胞ALP活性显著下降了39%(图1B)。

### 2.2 HMGE对MC3T3-E1细胞成骨矿化结节形成的影响

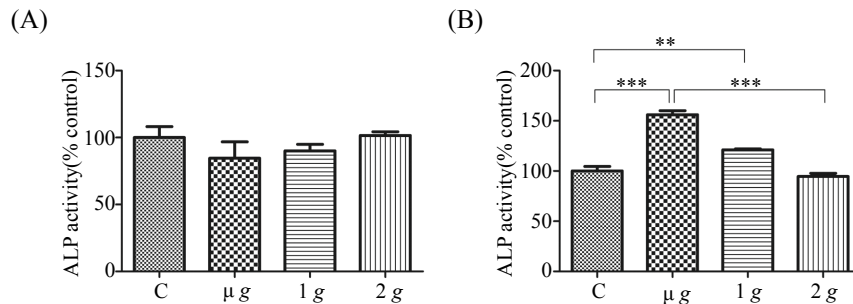
由于MC3T3-E1细胞诱导成骨分化7 d时开始矿化,因此, HMGE对诱导分化7 d的细胞处理12 h后,采用茜素红S染色观察矿化结节形成的变化。如图2所示, HMGE对7 d矿化起始期的细胞处理12 h后,与对照组(C)相比, $\mu$  g组细胞形成矿化结节面积增加111%( $P < 0.01$ ),1 g组矿化结节形成也增加,但无显著差异,而2 g组则略有下降;相对于 $\mu$  g组,2 g组细胞形成矿化结节面积显著减少(0.42倍vs  $\mu$  g,  $P < 0.05$ )(图2)。

表1 实时定量RT-PCR的引物序列  
Table 1 Primers sequences for quantitative real time RT-PCR

基因名称(基因库号) Gene name(Genbank No.)	引物序列(5'→3') Primer sequences(5'→3')	退火温度(°C) Annealing temperature(°C)
<i>ALP</i> (NM_007431.1)	F: 5'-GTT GCC AAG CTG GGA AGA ACA C-3' R: 5'-CCC ACC CCG CTA TTC CAA AC-3'	58
<i>Runx2</i> (NM_001145920.1)	F: 5'-TGC ACC TAC CAG CCT CAC CAT AC-3' R: 5'-GAC AGC GAC TTC ATT CGA CTT CC-3'	58
<i>Col 1a1</i> (NM_007742.3)	F: 5'-GAA GGC AAC AGT CGA TTC ACC-3' R: 5'-GAC TGT CTT GCC CCA AGT TCC-3'	58
<i>OC</i> (NM_007541.2)	F: 5'-GAA CAG ACT CCG GCG CTA-3' R: 5'-AGG GAG GAT CAA GTC CCG-3'	58
<i>DMP1</i> (NM_016779.2)	F: 5'-AGT GAG GAG GAC AGC CTG AA-3' R: 5'-GAG GCT CTC GTT GGA CTC AC-3'	60
<i>GAPDH</i> (NM_008084.2)	F: 5'-TGC ACC ACC AAC TGC TTA G-3' R: 5'-GGA TGC AGG GAT GAT GTT C-3'	58

*ALP*: 碱性磷酸酶; *Runx2*: *Runt*相关转录因子2; *Col 1a1*: I型胶原 $\alpha 1$ ; *OC*: 骨钙素; *DMP1*: 牙本质基质蛋白1; *GAPDH*: 3-磷酸甘油醛脱氢酶。

*ALP*: alkaline phosphatase; *Runx2*: runt-related transcription factor 2; *Col 1a1*: type I collagen  $\alpha 1$ ; *OC*: osteocalcin; *DMP1*: dentin matrix protein 1; *GAPDH*: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.



A: 12 h HMGE处理对成骨分化4 d MC3T3-E1细胞ALP活性的影响; B: 12 h HMGE处理对成骨分化7 d MC3T3-E1细胞ALP活性的影响; C: 正常对照组;  $\mu$ g:  $\mu$ g(9 T)组; 1g: 1g(16 T)组; 2g: 2g(12 T)组。 \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

A: effect of 12 h treatment of HMGE on the ALP activity of 4 d differentiating MC3T3-E1 cells; B: effect of 12 h treatment of HMGE on the ALP activity of 7 d differentiating MC3T3-E1 cells; C: normal control group;  $\mu$ g:  $\mu$ g(9 T) group; 1g: 1g(16 T) group; 2g: 2g(12 T) group. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 。

图1 HMGE处理12 h对不同分化阶段MC3T3-E1细胞碱性磷酸酶活性的影响

Fig.1 Effect of 12 h treatment of HMGE on ALP activity of different differentiating stage MC3T3-E1 cells

### 2.3 HMGE对成骨分化相关基因表达的影响

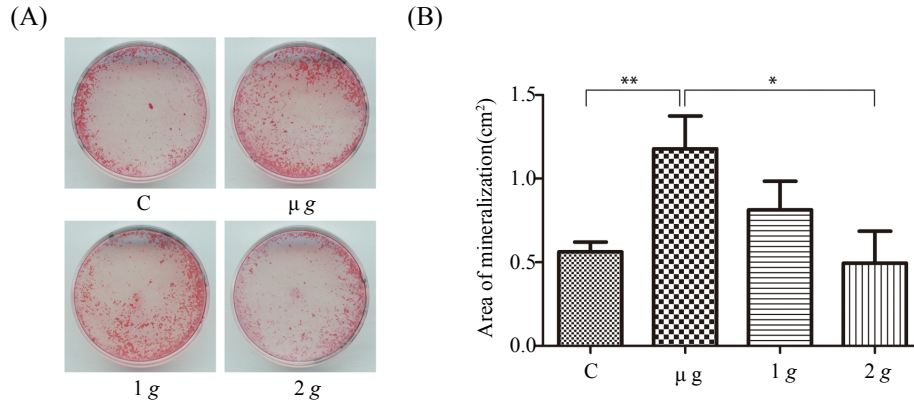
由图3、图4可以看出, 12 h的HMGE处理对诱导成骨分化4 d和7 d的MC3T3-E1成骨分化相关基因 *ALP*、runt-related transcription factor 2(*Runx2*), I型胶原 $\alpha 1$ (type I collagen  $\alpha 1$ , *Col 1a1*)、骨钙素(osteocalcin, *OC*)以及牙本质基质蛋白1(dentin matrix protein 1, *DMP1*)的表达均有显著影响, 且与对照组(C)相比,  $\mu$ g组和1g组基因表达均上调, 而2g组下调; 相对于 $\mu$ g组, 2g组基因表达均显著下降( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )。

诱导成骨分化4 d的MC3T3-E1细胞, 经12 h HMGE处理后, 与对照组(C)相比, 成骨分化标志分子 *ALP*的mRNA表达在 $\mu$ g组(3.54倍vs C)和1g组(2.45倍vs C)均显著上调( $P < 0.001$ ), 而2g组明显下调(0.64倍vs C,  $P < 0.01$ ); 调节成骨分化的关键转录因子 *Runx2*在 $\mu$ g组(2.84倍vs C)和1g组(3.83倍vs C)的表达均上调( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$ ), 而2g组下调( $P > 0.05$ ); 此外, 成骨细胞外基质蛋白分子 *Col 1a1*的表达在 $\mu$ g组(2.11倍vs C)和1g组(2.67倍vs C)也显著

上调, 而2 g组明显下降( $P<0.05$ ); 同样, *OC*与*DMP1*的mRNA表达在 $\mu$  g组与1 g组也分别增加, 而2 g组下降(图3)。

诱导成骨分化7 d的MC3T3-E1细胞, 经HMGE处理12 h后, 与对照组(C)相比, 成骨分化标志分子*ALP*的mRNA表达在 $\mu$  g组(5.95倍vs C)和1 g组

(1.5倍vs C)均显著上调, 而2 g组明显下调(0.11倍vs C); 同样, 转录因子*Runx2*在 $\mu$  g组(6.9倍vs C)和1 g组(3.79倍vs C)的表达均上调( $P<0.001$ ), 而2 g组(0.3倍vs C)下调( $P<0.001$ ); 细胞外基质蛋白分子*Col 1a1*的表达在 $\mu$  g组显著上调(3.1倍vs C), 2 g组明显下降(0.37倍vs C); 成骨矿化标志基因*OC*

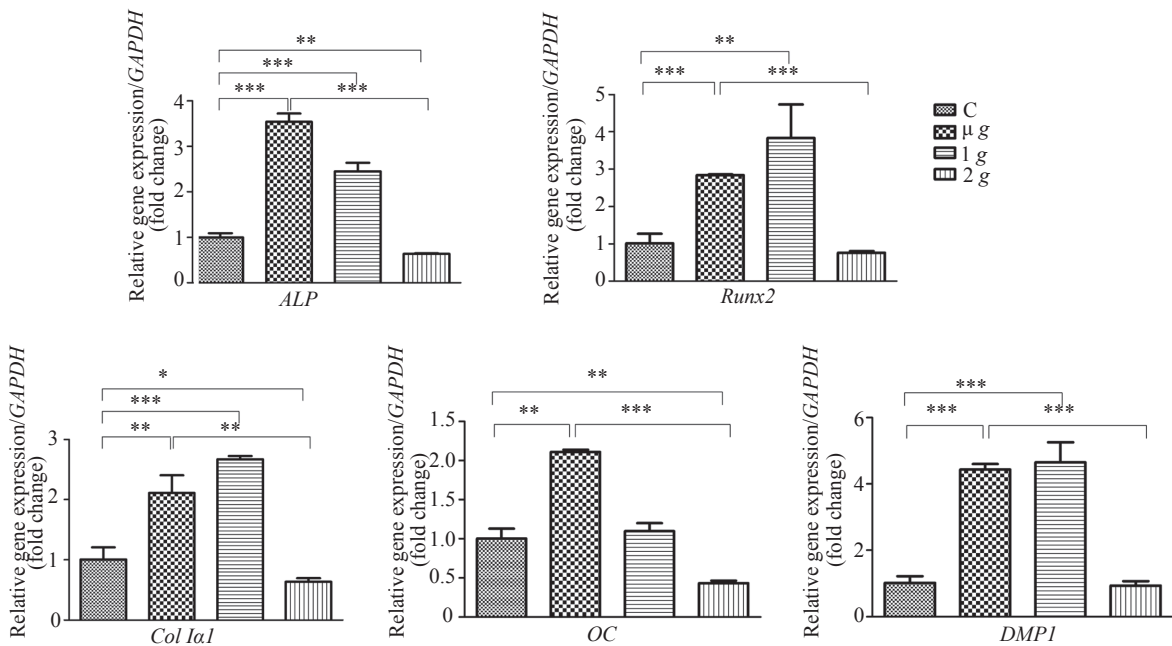


A: 经茜素红S染色的矿化结节; B: Image J软件对各组细胞形成矿化结节面积的分析; C: 正常对照组;  $\mu$  g:  $\mu$  g(9 T)组; 1 g: 1 g(16 T)组; 2 g: 2 g(12 T)组。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ 。

A: mineralized nodules stained with alizarin red S; B: quantitative analysis of the area of mineralization for each group using Image J software; C: normal control group;  $\mu$  g:  $\mu$  g(9 T) group; 1 g: 1 g(16 T) group; 2 g: 2 g(12 T) group. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ 。

图2 HMGE处理12 h对成骨分化7 d的MC3T3-E1细胞矿化结节形成的影响

Fig.2 Effect of 12 h treatment of HMGE on mineralized nodules formation of 7 d osteogenic differentiating MC3T3-E1 cells

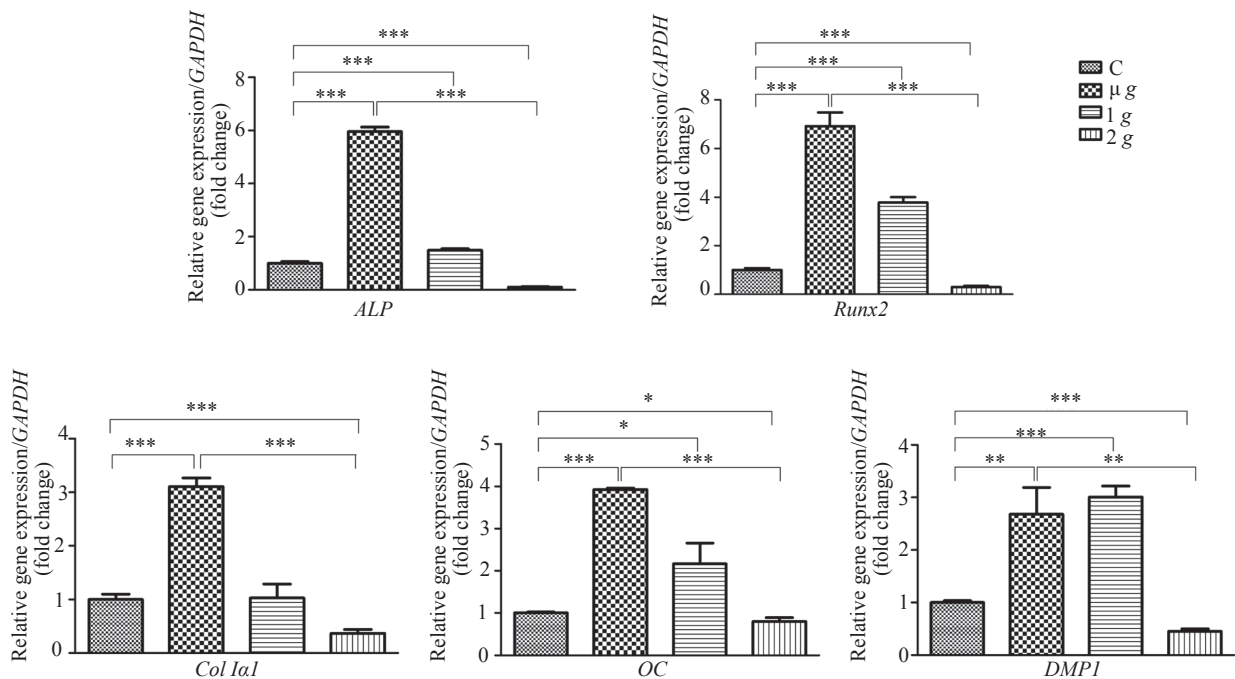


C: 正常对照组;  $\mu$  g:  $\mu$  g(9 T)组; 1 g: 1 g(16 T)组; 2 g: 2 g(12 T)组。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ 。

C: normal control group;  $\mu$  g:  $\mu$  g(9 T) group; 1 g: 1 g(16 T) group; 2 g: 2 g(12 T) group. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ 。

图3 HMGE处理12 h对成骨分化4 d的MC3T3-E1细胞成骨分化相关基因*ALP*, *Runx2*, *Col 1a1*, *OC*和*DMP1*表达的影响

Fig.3 Effect of 12 h treatment of HMGE on the expression of osteogenic genes *ALP*, *Runx2*, *Col 1a1*, *OC* and *DMP1* in 4 d osteogenic differentiating MC3T3-E1 cells



C: 正常对照组;  $\mu g$ :  $\mu g$ (9 T)组; 1 g: 1 g(16 T)组; 2 g: 2 g(12 T)组。\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001。

C: normal control group;  $\mu g$ :  $\mu g$ (9 T) group; 1 g: 1 g(16 T) group; 2 g: 2 g(12 T) group. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001.

图4 HMGE处理12 h对成骨分化7 d的MC3T3-E1细胞成骨分化相关基因ALP、Runx2、Col1a1、OC和DMP1表达的影响

Fig.4 Effect of 12 h treatment of HMGE on the expression of osteogenic genes ALP, Runx2, Col1a1, OC and DMP1 in 7 d osteogenic differentiating MC3T3-E1 cells

的mRNA表达在 $\mu g$ 组(3.9倍vs C)和1 g组(2.16倍vs C)也显著增加,而2 g组显著下降(0.8倍vs C);DMP1的表达同样在 $\mu g$ 组(2.68倍vs C)和1 g组(3.01倍vs C)显著增加,2 g组明显下降(0.46倍vs C)(图4)。

### 3 讨论

由大梯度强磁场超导磁体产生的强磁重力环境(high magneto-gravitational environment, HMGE)是一种极端的人工物理环境,其抗磁悬浮模拟失重技术是一种新型的地基模拟失重技术,为生命科学、材料科学等科学研究领域提供了一种新型的实验平台<sup>[11,26-27]</sup>。本课题组前期研究发现, HMGE影响成骨细胞的形态、增殖、黏附、周期、基因表达,以及成骨细胞的主要元素含量,而且对人骨髓间充质干细胞的分化也产生影响。本研究采用HMGE的 $\mu g$ (9 T)、1 g(16 T)和2 g(12 T),以及正常对照(1 g,地磁场)环境,研究HMGE对处于成骨分化4 d与7 d不同分化阶段的MC3T3-E1细胞分化的影响。

研究表明,ALP是成骨细胞分化的标志物,其活性会随着成骨细胞分化成熟而增加,同时,ALP在

成骨细胞矿化过程中也起着重要作用<sup>[28]</sup>。缺失ALP基因的成骨细胞在体外可以正常分化,但无法开始矿化<sup>[29]</sup>。对于体外诱导分化的成骨细胞,ALP通过水解成骨分化培养基中的 $\beta$ -甘油磷酸钠提供磷来诱导成骨矿化<sup>[30]</sup>。我们发现,经HMGE处理12 h后,与对照组(C)相比, $\mu g$ 组、1 g组和2 g组成骨分化4 d的MC3T3-E1细胞ALP活性没有显著变化(图1A),而成骨分化7 d进入矿化期的细胞, $\mu g$ 组和1 g组细胞ALP活性较对照组(C)明显增加,2 g组则呈下降趋势,且较 $\mu g$ 组显著降低(图1B)。通过茜素红S染色观察到,相对于对照组, $\mu g$ 组细胞形成矿化结节明显增加,1 g组矿化结节也增加,而2 g组下降,且较 $\mu g$ 组明显减少(图2),此结果与其ALP变化趋势一致。以上结果说明, $\mu g$ 和1 g环境可能通过提高ALP活性而促进7 d矿化期成骨细胞矿化,而2 g环境则表现出抑制作用。此外,结果还提示,对于12 h短时间的HMGE处理,7 d矿化起始期细胞可能较4 d分化期细胞更敏感。我们前期研究也发现, HMGE主要影响人骨髓间充质干细胞的分化起始<sup>[22]</sup>。

成骨细胞分化是一个多步骤的复杂过程,受多种成骨分化调节因子的调控。其中,Runx2作为

关键的成骨分化转录因子, 在成骨分化与矿化中起着重要作用。破坏*Runx2*基因使成骨细胞的成熟被阻滞, 进而导致骨形成完全缺失<sup>[31]</sup>, 而过表达*Runx2*则促进成骨细胞矿化<sup>[32]</sup>, 且*Runx2*还受力学信号调节<sup>[33]</sup>。此外, I型胶原(Col I)、骨钙素(OC)和牙本质基质蛋白1(DMP1)作为细胞外基质蛋白分子, 为成骨细胞分化、矿化提供有机质, 同时也调节成骨分化与矿化<sup>[34-36]</sup>。本实验发现, 与HMGE对7 d矿化起始期细胞ALP活性与矿化结节形成的影响一致, *ALP*、*Runx2*、*Col 1a1*、*OC*和*DMP1*的表达在 $\mu$  g组和1 g组均上调, 而在2 g组明显下调(图4)。此结果进一步表明,  $\mu$  g和1 g环境促进成骨细胞分化, 而2 g环境则表现出抑制作用, 并且提示*Runx2*转录因子及细胞外基质蛋白分子可能参与此过程。同样, 成骨分化4 d细胞的*ALP*、*Runx2*、*Col 1a1*、*OC*和*DMP1*基因表达也在 $\mu$  g组和1 g组上调, 而在2 g组下调(图3)。然而, 有趣的是, 与12 h HMGE对成骨分化4 d细胞的ALP活性无显著影响结果不同, *ALP*基因表达在 $\mu$  g组和1 g组明显增加, 而2 g组显著减少(图3)。我们推测, 由于基因对外界的刺激响应较快, 对于4 d成骨分化中期的细胞, 12 h的HMGE处理足以引起*ALP*基因表达的变化, 但由于ALP从基因表达达到发挥酶活性受多种因素调节<sup>[37-38]</sup>, 可能短时间处理未能引起此分化阶段细胞ALP酶活性的显著变化。

从以上结果可以看出, 1 g组较对照组(C)成骨分化相关基因的表达上调, 同时ALP活性及矿化结节形成也增加, 提示磁场具有促进成骨细胞分化的作用。Huang等<sup>[39]</sup>报道, 0.4 T静磁场可通过调节成骨分化早期调节因子而促进成骨细胞分化成熟, 而Kotani等<sup>[40]</sup>通过体外(*in vitro*)与体内(*in vivo*)实验均发现, 8 T强静磁场促进成骨细胞分化和骨形成。而相对于 $\mu$  g组, 2 g组成骨分化相关基因的表达均显著下调, 且7 d矿化期细胞ALP活性与矿化结节的形成均明显减少, 提示, 细胞对较短时间(12 h)HMGE处理的响应可能是一种应激反应, 细胞为维持原有功能而做出反馈调节, 即当细胞处于失重状态( $\mu$  g)时, 由于力学刺激的缺失, 细胞会通过上调相关基因表达来维持原有功能; 反之, 当细胞处于超重状态(2 g), 由于力学刺激增加, 细胞会下调相关基因的表达。

综上所述, 7 d矿化起始期MC3T3-E1成骨细胞较4 d分化中期细胞对12 h HMGE处理可能更敏

感; 细胞对于短时间(12 h)的HMGE处理表现出应激反应; 而磁场在成骨分化过程中表现出促进作用, 且ALP、成骨转录因子*Runx2*以及细胞外基质蛋白分子可能参与此过程。由于强磁重力环境(high magneto-gravitational environment, HMGE)是一种磁场与重力因素的复合环境, 所产生的生物学效应也是两种物理因素的复合效应, 对不同生物样品或不同分化期的细胞, 作用不同时间, 其产生的生物学效应可能不同。针对以上结果, 我们会在后续实验中进一步探讨其可能的作用机制。

## 致谢

感谢澳大利亚悉尼大学ANZAC研究所周虹教授惠赠MC3T3-E1成骨细胞系。

## 参考文献 (References)

- 1 Marie PJ, Jones D, Vico L, Zallone A, Hinsenkamp M, Cancedda R. Osteobiology, strain, and microgravity: Part I. Studies at the cellular level. *Calcif Tissue Int* 2000; 67(1): 2-9.
- 2 Vico L, Hinsenkamp M, Jones D, Marie PJ, Zallone A, Cancedda R. Osteobiology, strain, and microgravity. Part II: Studies at the tissue level. *Calcif Tissue Int* 2001; 68(1): 1-10.
- 3 Keyak JH, Koyama AK, LeBlanc A, Lu Y, Lang TF. Reduction in proximal femoral strength due to long-duration spaceflight. *Bone* 2009; 44(3): 449-53.
- 4 LeBlanc AD, Spector ER, Evans HJ, Sibonga JD. Skeletal responses to space flight and the bed rest analog: A review. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2007; 7(1): 33-47.
- 5 Morey ER, Baylink DJ. Inhibition of bone formation during space flight. *Science* 1978; 201(4361): 1138-41.
- 6 Turner RT, Evans GL, Wakley GK. Spaceflight results in depressed cancellous bone formation in rat humeri. *Aviat Space Environ Med* 1995; 66(8): 770-4.
- 7 Carmeliet G, Nys G, Bouillon R. Microgravity reduces the differentiation of human osteoblastic MG-63 cells. *J Bone Miner Res* 1997; 12(5): 786-94.
- 8 Oganov VS. Modern analysis of bone loss mechanisms in microgravity. *J Gravit Physiol* 2004; 11(2): 143-6.
- 9 Valles JM Jr, Lin K, Denegre JM, Mowry KL. Stable magnetic field gradient levitation of *Xenopus laevis*: Toward low-gravity simulation. *Biophys J* 1997; 73(2): 1130-3.
- 10 Valles JM Jr, Guevorkian K. Low gravity on earth by magnetic levitation of biological material. *J Gravit Physiol* 2002; 9(1): 11-4.
- 11 Qian AR, Yin DC, Yang PF, Lü Y, Tian ZC, Shang P. Application of diamagnetic levitation technology in biological sciences research. *IEEE T Appl Supercon* 2013; 23(1): 3600305.
- 12 Hill RJ, Larkin OJ, Dijkstra CE, Manzano AI, de Juan E, Davey MR, *et al*. Effect of magnetically simulated zero-gravity and enhanced gravity on the walk of the common fruitfly. *J R Soc Interface* 2012; 9(72): 1438-49.
- 13 Liu YM, Zhu DM, Strayer DM, Israelsson UE. Magnetic

- levitation of large water droplets and mice. *Adv Space Res* 2010; 45: 208-13.
- 14 Manzano AI, van Loon JJ, Christianen PC, Gonzalez-Rubio JM, Medina FJ, Herranz R. Gravitational and magnetic field variations synergize to cause subtle variations in the global transcriptional state of *Arabidopsis in vitro* callus cultures. *BMC Genomics* 2012; 13: 105.
- 15 Herranz R, Larkin OJ, Dijkstra CE, Hill RJ, Anthony P, Davey MR, *et al.* Microgravity simulation by diamagnetic levitation: Effects of a strong gradient magnetic field on the transcriptional profile of *Drosophila melanogaster*. *BMC Genomics* 2012; 13: 52.
- 16 Coleman CB, Gonzalez-Villalobos RA, Allen PL, Johanson K, Guevorkian K, Valles JM, *et al.* Diamagnetic levitation changes growth, cell cycle, and gene expression of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* 2007; 98(4): 854-63.
- 17 Hammer BE, Kidder LS, Williams PC, Xu WW. Magnetic levitation of MC3T3 osteoblast cells as a ground-based simulation of microgravity. *Microgravity Sci Technol* 2009; 21(4): 311-8.
- 18 Qian AR, Zhang W, Weng YY, Tian ZC, Di SM, Yang PF, *et al.* Gravitational environment produced by a superconducting magnet affects osteoblast morphology and functions. *Acta Astronautica* 2008; 63: 929-46.
- 19 Qian AR, Gao X, Zhang W, Li JB, Wang Y, Di SM, *et al.* Large gradient high magnetic fields affect osteoblast ultrastructure and function by disrupting collagen I or fibronectin/ $\alpha\beta 1$  integrin. *PLoS One* 2013; 8(1): e51036.
- 20 狄升蒙, 蹇爱荣, 田宗成, 张 维, 胡丽芳, 尹大川, 等. 强磁重力环境对人成骨细胞发动蛋白-2表达和定位的影响. *细胞生物学杂志*(Di Shengmeng, Qian Airong, Tian Zongcheng, Zhang Wei, Hu Lifang, Yin Dachuan, *et al.* Effects of high magnetic gravitational environment on expression and distribution of dynamin-2 in MG-63. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2008; 30(6): 766-70.
- 21 蹇爱荣, 张 维, 瓮媛媛, 杨鹏飞, 王 哲, 商 澎. 强磁重力环境对成骨细胞增殖、形态及其主要元素含量的影响. *第四军医大学学报*(Qian Airong, Zhang Wei, Weng Yuanyuan, Yang Pengfei, Wang Zhe, Shang Peng. Effects of high magneto-gravitational environment on proliferation, morphology and contents of main elements in osteoblasts. *J Fourth Mil Med Univ*) 2008; 29(19): 1729-32.
- 22 Shi D, Meng R, Deng W, Ding W, Zheng Q, Yuan W, *et al.* Effects of microgravity modeled by large gradient high magnetic field on the osteogenic initiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev* 2010; 6(4): 567-78.
- 23 Qian AR, Yin DC, Yang PF, Jia B, Zhang W, Shang P. Development of a ground-based simulated experimental platform for gravitational biology. *IEEE T Appl Supercon* 2009; 19(2): 42-6.
- 24 Hu LF, Qian AR, Wang Y, Di SM, Shang P. Inhibitory effect of simulated microgravity on differentiating preosteoblasts. *Adv Space Res* 2013; 51(1): 107-14.
- 25 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 2001; 25(4): 402-8.
- 26 Brooks JS, Reavis JA, Medwood RA, Stalcup TF, Meisel MW, Steinberg E, *et al.* New opportunities in science, materials, and biological systems in the low-gravity (magnetic levitation) environment. *J Appl Phys* 2000; 87(9): 6193-9.
- 27 曹建平, 尹大川, 蹇爱荣, 田宗成, 续惠云, 黄勇平, 等. 抗磁性物质悬浮方法在空间生物学与生物技术中的应用. *空间科学学报*(Cao Jianping, Yin Dachuan, Qian Airong, Tian Zongcheng, Xu Huiyun, Huang Yongping, *et al.* Application of magnetic levitation of diamagnetic materials for space biology and biotechnology. *Chin J Space Sci*) 2011; 31(1): 63-72.
- 28 Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch* 2010; 77(1): 4-12.
- 29 Wennberg C, Hessel L, Lundberg P, Mauro S, Narisawa S, Lerner UH, *et al.* Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice. *J Bone Miner Res* 2000; 15(10): 1879-88.
- 30 Ecarot-Charrier B, Glorieux FH, van der Rest M, Pereira G. Osteoblasts isolated from mouse calvaria initiate matrix mineralization in culture. *J Cell Biol* 1983; 96(3): 639-43.
- 31 Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, *et al.* Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 1997; 89(5): 755-64.
- 32 Byers BA, Pavlath GK, Murphy TJ, Karsenty G, Garcia AJ. Cell-type-dependent up-regulation of *in vitro* mineralization after overexpression of the osteoblast-specific transcription factor *Runx2/Cbfa1*. *J Bone Miner Res* 2002; 17(11): 1931-44.
- 33 Ziros PG, Gil AP, Georgakopoulos T, Habeos I, Kletsas D, Basdra EK, *et al.* The bone-specific transcriptional regulator *Cbfa1* is a target of mechanical signals in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 2002; 277(26): 23934-41.
- 34 Boskey AL. Biomineralization: Conflicts, challenges, and opportunities. *J Cell Biochem Suppl* 1998; 30/31: 83-91.
- 35 Boskey AL. Matrix proteins and mineralization: An overview. *Connect Tissue Res* 1996; 35(1/2/3/4): 357-63.
- 36 Ling Y, Rios HF, Myers ER, Lu Y, Feng JQ, Boskey AL. DMP1 depletion decreases bone mineralization *in vivo*: An FTIR imaging analysis. *J Bone Miner Res* 2005; 20(12): 2169-77.
- 37 Coleman JE. Structure and mechanism of alkaline phosphatase. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 1992; 21: 441-83.
- 38 Kiledjian M, Kadesch T. Post-transcriptional regulation of the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene. *J Biol Chem* 1991; 266(7): 4207-13.
- 39 Huang HM, Lee SY, Yao WC, Lin CT, Yeh CY. Static magnetic fields up-regulate osteoblast maturity by affecting local differentiation factors. *Clin Orthop Relat Res* 2006; 447: 201-8.
- 40 Kotani H, Kawaguchi H, Shimoaka T, Iwasaka M, Ueno S, Ozawa H, *et al.* Strong static magnetic field stimulates bone formation to a definite orientation *in vitro* and *in vivo*. *J Bone Miner Res* 2002; 17(10): 1814-21.