

# 模拟失重对人成骨样细胞凋亡的影响

续惠云 安 龙 王 哲 曹建平 商 澎\*

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

**摘要** 为了探讨失重对人成骨样细胞凋亡情况的影响及对相关分子的作用, 采用双向多样本回转器模拟失重效应, 将培养的人成骨样细胞 MG-63 随机分为静止对照组、水平旋转对照组和失重实验组(用回转器模拟失重条件), 在实验的 12 h 取细胞用流式细胞仪检测早期凋亡情况, 同时检测 *bcl-2*、NF- $\kappa$ B (*p65*) mRNA 和 P53 的表达。结果显示, 在模拟失重 12 h 时, MG-63 细胞表现出一定的早期凋亡趋势, 且 *bcl-2*、NF- $\kappa$ B (*p65*) 的表达明显降低, P53 表达增加, 提示失重可能通过影响这几种凋亡相关因子的表达, 启动成骨细胞凋亡, 从而破坏骨形成和骨吸收之间的平衡。成骨细胞凋亡的启动可能是航天员骨丢失的原因之一。

**关键词** 模拟失重; 成骨样细胞; 凋亡; 骨丢失

航天员在空间失重环境下会产生生理上的一些改变, 其中, 失重引起的骨丢失是对航天员健康影响最主要的因素之一。目前, 对失重引起骨丢失的机制已经有大量的研究, 研究者认为失重造成的骨形成的减少和骨吸收的增加都是可能的原因。成骨细胞的凋亡作为失重环境下骨形成减少的一个因素, 已经引起了很多科学家的注意, 但关于失重条件下成骨细胞的凋亡特征和凋亡分子机制目前仍不清楚, 而且研究结果也不尽相同。本实验用双向多样本回转器模拟失重效应, 分析人成骨样细胞 MG-63 的凋亡情况以及对凋亡相关分子的影响, 旨在进一步探讨成骨细胞凋亡在失重骨丢失中所起的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

双向多样本回转器购自中国航天员科研训练中心, MEM 培养液为 Gibco 公司产品, 小牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司, 胎牛血清为 Hyclone 公司产品, RT-PCR 试剂盒和 TaKaRa RNAiso Reagent 是 TaKaRa 公司产品, NC 膜是 Pharmacia 公司生产, 膜联蛋白(annexin) V FITC kit 是 BD 公司产品, P53 单抗购自 R&D 公司, PCR 引物在上海生工合成, 流式细胞仪为 BD 公司 FACSCalibur。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 人成骨样细胞 MG-63 购自中国科学院上海生化细胞所细胞库, 使用含 100 ml/L 小

牛血清的 MEM 培养液; 实验处理分为三组, 静止对照组(SC组), 水平旋转对照组(RC组)和失重实验组(E组), 细胞均匀地在血盖片上贴壁 24 h 后, 随机选取血盖片置于样本支架上, 放在专用的细胞培养瓶中, 置于 37 °C 培养箱中培养 12 h。SC 组静止培养, RC 组以 30 r/min 进行水平旋转, E 组以 30 r/min 进行绕水平轴的旋转培养。

**1.2.2 RT-PCR** 将生长细胞的血盖片取下, 置于 6 孔板中, 用 TaKaRa RNAiso Reagent 裂解细胞, 氯仿抽提后用异戊醇沉淀, 750 ml/L 乙醇轻洗后适当干燥 RNA, 用 DEPC 水溶解沉淀。用紫外分光光度计对总 RNA 量进行测定, 琼脂糖电泳法检测总 RNA 的完整性。两步法进行 RT-PCR, 18S rRNA 做为内参对照, 用 Quality One 软件扫描定量。PCR 引物为: NF- $\kappa$ B (*p65*): 有义链: 5'-TGCCGAGTGAACCGAAAC-3', 反义链: 5'-TGGAGACACGCACAGGAGC-3'; *bcl-2*: 有义链: 5'-ATTATTATGGGACAAAGGAC-3', 反义链: 5'-ACTGGGTAAGACTAAAGGAC-3'; 18S: 有义链: 5'-AATCAGGGTTCGATTCGGGA-3', 反义链: 5'-CCAAGATCCAACACTACGAGCT-3'。

**1.2.3 蛋白质印迹** 将生长细胞的血盖片取下, 采用三去污裂解液在冰上裂解细胞, BCA 法进行蛋白质定量, 等量蛋白质上样进行 SDS-PAGE。结束后转

收稿日期: 2008-02-29 接受日期: 2008-06-04

中国博士后科学基金资助项目(No.20060400304)

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

移到 NC 膜, 封闭后加抗 P53 抗体, GAPDH 作为内参对照。用红外荧光标记的二抗显色后, 在 Odyssey 双通道红外扫描仪发光检测定量。

**1.2.4 流式细胞仪** 将生长细胞的血盖片取下, 胰蛋白酶消化后收集细胞, 用冰预冷的 PBS 洗两次, 用 PI、膜联蛋白 V FITC 染料与细胞在室温避光温育后上机测试。PI 染色的细胞为坏死的细胞, 膜联蛋白 V FITC 染色的细胞为早期凋亡的细胞, 凋亡率(%) =  $100\% \times \text{凋亡细胞数} / \text{总细胞数}$  [1]。

**1.2.5 统计学处理** 用 PRISM 3.0 分析软件对实验结果进行统计计算并作图。

## 2 结果

### 2.1 流式细胞仪检测凋亡

图 1A 为使用流式细胞仪检测细胞凋亡的其中一

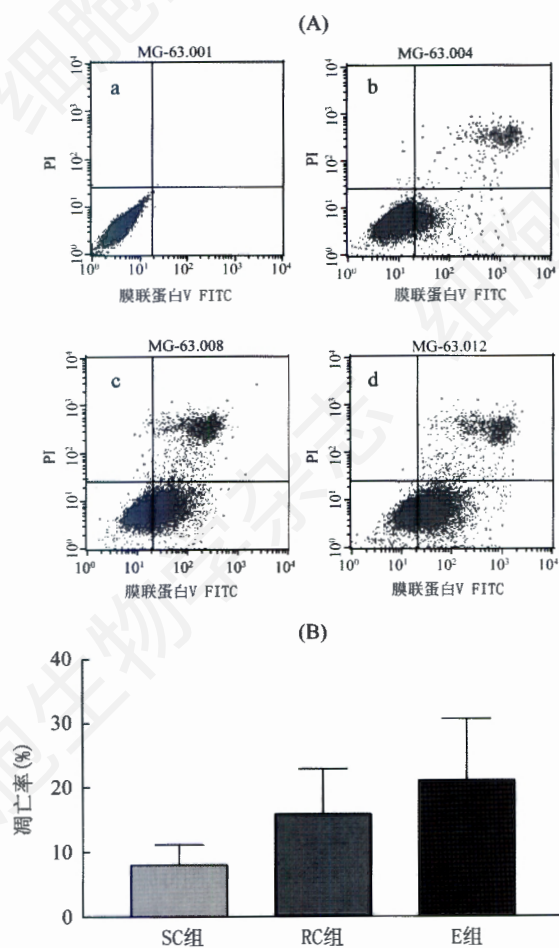


图 1 模拟失重对成人成骨样细胞凋亡的影响

A: 流式细胞仪检测细胞凋亡散点图。a: 阴性散点图; b、c、d: SC 组、RC 组和 E 组的散点图。B: 流式细胞仪检测细胞凋亡统计直方图。

次实验结果, 右下象限中为膜联蛋白 V FITC 染色的细胞, 预示着细胞的早期凋亡。图 1B 为根据几次实验结果所做的统计直方图, 从图中可以看出, 在回转变模拟失重处理以后, MG-63 细胞存在凋亡比例增加的趋势, 统计分析表明这种趋势的增加没有显著性的差异。

### 2.2 RT-PCR 检测 mRNA 表达

从图 2 中可以看出, 与 SC 和 RC 两组对照细胞相比, E 组细胞 *bcl-2* (A)、*NF-κB* (*p65*) mRNA (B) 的表达显著降低, 表明模拟失重培养 12 h 能显著抑制 MG-63 细胞中凋亡相关基因 *bcl-2* 和 *NF-κB* (*p65*) 在 mRNA 水平的表达。

### 2.3 Western 印迹检测蛋白质表达

灰度定量结果显示, 与 SC 和 RC 两组对照细胞相比, E 组细胞中 P53 的表达增加约 52%, 表明模拟失重培养 12 h 能明显促进 MG-63 细胞中 P53 的表达(图 3)。

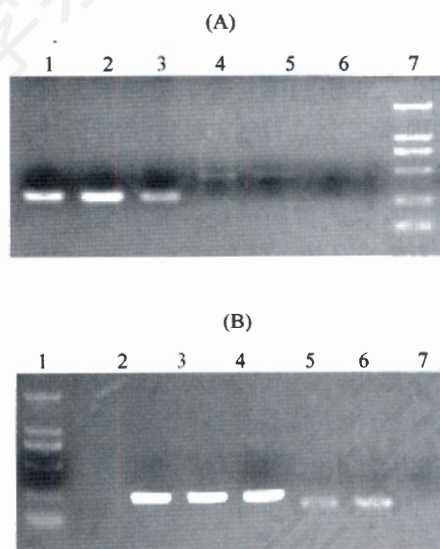


图 2 模拟失重 12 h 对 MG-63 细胞 *bcl-2* 和 *NF-κB* (*p65*) mRNA 表达的影响

A: *bcl-2* mRNA。1: 18S SC; 2: 18S RC; 3: 18S E; 4: *bcl-2* SC; 5: *bcl-2* RC; 6: *bcl-2* E; 7: DNA marker。B: *NF-κB* (*p65*) mRNA。1: DNA marker; 2: 18S SC; 3: 18S RC; 4: 18S E; 5: *NF-κB* (*p65*) SC; 6: *NF-κB* (*p65*) RC; 7: *NF-κB* (*p65*) E。

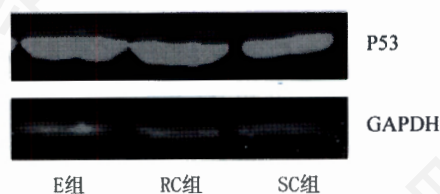


图 3 模拟失重 12 h 对 MG-63 细胞 P53 表达的影响



### 3 讨论

一些研究者认为,微重力引起的成骨细胞凋亡可能是空间飞行过程中骨形成减少的原因之一。Kumei等<sup>[2]</sup>发现航天飞机搭载的成骨细胞发生了凋亡,同时地面模拟失重情况下成骨细胞的凋亡指数(Bax/Bcl-2)明显上升。Bucaro等<sup>[3]</sup>发现在模拟微重力环境中培养小鼠成骨细胞(MCM-E1细胞)5天,细胞内线粒体膜电位消失、细胞的还原状态被打破、抗凋亡蛋白Bcl-2水平下降,这些参数表明模拟微重力引起线粒体功能障碍,增加了成骨细胞对凋亡的敏感性。Sarkar等<sup>[4]</sup>发现,旋转培养24 h内ROS17/2.8成骨细胞即开始出现凋亡。

与上述研究结果不同,有研究发现正常人成骨细胞在模拟微重力环境中培养24 h,细胞内促进凋亡的Bax/Bcl-2 mRNA与地面对照组比较增加,而凋亡抑制蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAPs) mRNA同时增加<sup>[5]</sup>。Kumei等<sup>[2]</sup>也发现,空间飞行后的大鼠成骨细胞内促凋亡的诱生型一氧化氮合酶(iNOS)和抗凋亡的GTP环氧化酶(GTPCH) mRNA表达水平均增加;认为两者的协同表达是微重力环境中成骨细胞的自我保护方式。研究证实,模拟微重力条件下培养的成骨细胞(ROS)内与凋亡有关的P53和caspase-8途径均未被激活。因此,一些研究者认为,微重力虽然可能引起线粒体上游凋亡信号的改变,但不影响效应性凋亡因子caspase-8的表达水平和细胞凋亡指数<sup>[6]</sup>。

本实验结果显示,在双向多样本回转器模拟失重效应以后,人成骨样细胞表现出凋亡比例增加的趋势,但统计分析表明这种趋势在组间没有显著性的差异。采用透射电镜对细胞形态的观察可以看出,在模拟失重后,人成骨样细胞的粗面内质网和线粒体数量减少,溶酶体空泡出现,表征着细胞损伤的加重(数据未显示)。这些结果提示,失重处理可能对人成骨样细胞造成了一定的伤害,并且使细胞向凋亡的方向发展,这可能也是细胞在特殊环境下保护自我的一种手段。但细胞虽然表现出这种趋势,不同处理组之

间却没有表现出显著性的差异,可能与失重处理的时间较短等因素有关。

*bcl-2*基因,是一种抑制细胞凋亡的基因,它通过阻断细胞凋亡的信号传递通路达到抑制或阻断凋亡过程。研究发现,野生型P53可以通过下调*bcl-2*基因,诱导Bax合成从而使细胞向凋亡方向进展<sup>[7]</sup>。另外,研究显示核转录因子NF- $\kappa$ B也参与了细胞凋亡的调节,NF- $\kappa$ B可以通过诱导抗凋亡因子Bcl-2家族、启动凋亡抑制蛋白IAPs等手段抑制凋亡进程<sup>[8]</sup>。NF- $\kappa$ B多为P65和P50组成的二聚体,P50结合DNA,P65参与调节基因转录的起始,并可促进P50与DNA的结合。本次研究RT-PCR和Western印迹的结果显示,失重处理条件下,*bcl-2* mRNA水平明显降低,而P53表达水平增加。提示失重造成的成骨样细胞凋亡的增加可能是通过调节*bcl-2*和P53的水平,从而启动了细胞凋亡的进程,保护自己不受这种特殊环境的伤害。而失重组细胞NF- $\kappa$ B(p65)的表达也比对照组低,提示失重诱导细胞凋亡的进展也可能与NF- $\kappa$ B信号通路相关,NF- $\kappa$ B受到抑制,从而下调了*bcl-2*的表达,启动了细胞凋亡。

综上所述,双向多样本回转器模拟失重效应以后,人成骨样细胞表现出凋亡比例增加的趋势,且*bcl-2*、NF- $\kappa$ B(p65)的表达明显降低,P53表达增加,提示失重作为一种特殊的环境,可能通过诱导调节这几种凋亡相关因子的表达,启动成骨细胞凋亡,从而造成骨形成的减少,破坏了骨形成和骨吸收之间的平衡。成骨细胞凋亡的启动可能是航天员骨丢失的原因之一。

#### 参考文献(References)

- [1] Vermes I et al. *J Immunol Methods*, 1995, **184**: 39
- [2] Kumei Y et al. *J Gravit Physiol*, 2002, **9**: P263
- [3] Bucaro MA et al. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, **1027**: 64
- [4] Sarkar D et al. *J Bone Miner Res*, 2000, **15**: 489
- [5] Nakamura H et al. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, **1010**: 143
- [6] Rucci N et al. *J Cell Biochem*, 2002, **85**: 167
- [7] 周桔等. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, **11**: 1950
- [8] Li HL et al. *World J Gastroenterol*, 2002, **8**: 431

## The Effects of Simulated Weightlessness on Apoptosis of Osteoblast

Hui-Yun Xu, Long An, Zhe Wang, Jian-Ping Cao, Peng Shang\*

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

**Abstract** To investigate the effects of two dimensional rotating wall vessels (2D-RWVs) simulated weightlessness on apoptosis in osteoblasts, one group of cultured MG-63 cells were exposed to 2D-RWVs simulated weightlessness for 12 h. At the same time, the two other groups of cells were cultured in stationary control group and horizontal rotation control group. Flow cytometer was used to detect cell apoptosis. And the gene expression of *bcl-2*, *p53*, NF- $\kappa$ B (*p65*) was examined by RT-PCR or Western blot. The results showed that after 12 h exposure to simulated weightlessness, MG-63 cells displayed the tendency to apoptosis, and the expression of *bcl-2* and NF- $\kappa$ B (*p65*) mRNA decreased significantly, P53 expression increased. Exposure to simulated weightlessness for 12 h might influence the expression of apoptosis-related factors and switch on apoptosis in osteoblast-like cells, which could destroy the balance of bone formation and bone resorption, so lead to bone loss of astronauts.

**Key words** simulated weightlessness; osteoblast-like cells; apoptosis; bone loss

Received: February 29, 2008 Accepted: June 4, 2008

This work was supported by the China Postdoctoral Science Foundation (No.20060400304)

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