

# La<sup>3+</sup>通过重组细胞骨架影响大鼠成骨细胞增殖、分化<sup>\*</sup>

王熙 黄健<sup>\*\*</sup> 张天蓝<sup>\*\*</sup> 王夔

北京大学医学部药学院化学生物学系, 北京 100083

**摘要** 研究了稀土离子 La<sup>3+</sup> 对体外培养的成骨细胞增殖、分化及细胞骨架的影响, 并初步探讨了相关机理. 用细胞计数法检测了成骨细胞的增殖. 用 RT-PCR 技术测定了碱性磷酸酶 (ALP)、骨钙素 (OC)、骨桥蛋白 (OPN), 骨涎蛋白 (BSP) 以及 *cbfa-1* mRNA 水平. 采用激光扫描共聚焦显微镜观察了细胞中 F 肌动蛋白 (F-actin) 的变化. 结果显示: La<sup>3+</sup> 在 48h 促进了成骨细胞增殖; 在 4d 促进了早期分化指标 ALP, BSP 和 *cbfa-1* mRNA 的表达; 在 21d 促进了晚期分化指标 OC 和 OPN mRNA 的表达. 与此同时, La<sup>3+</sup> 使成骨细胞骨架发生重组. 另外, Western Blot 分析证实 La<sup>3+</sup> 作用于成骨细胞短时间即可激活粘着斑激酶 (FAK) 酪氨酸磷酸化. 结果提示, La<sup>3+</sup> 通过提高 FAK 酪氨酸的磷酸化水平, 改变细胞骨架的分布和聚合, 从而促进成骨细胞的增殖和分化.

**关键词** La<sup>3+</sup> 成骨细胞 增殖 分化 细胞骨架

近年来, 稀土药用研究越来越为人们重视. 除了钆配合物用于磁共振成像造影剂以外, 碳酸镧已被用于治疗晚期肾衰所引发的高磷酸血症<sup>[1]</sup>, 另外 Gd (III)-texaphyrin 也进入了临床试验阶段<sup>[2]</sup>. 总的来说, 大量研究工作显示稀土有着多方面的潜在药理作用. 与此同时, 稀土对生物体的负面影响也一直被广为关注.

镧 (La) 是镧系金属中的第一个元素, 由于 La<sup>3+</sup> 和 Ca<sup>2+</sup> 的离子半径相近, 这种相似性使得 La<sup>3+</sup> 对骨有很高的亲和性<sup>[3-5]</sup>, 因而骨是镧在体内最重要的蓄积部位<sup>[6,7]</sup>. 骨中蓄积的镧可能进入晶格, 也可能结合在晶体表面, 甚至结合在细胞外基质蛋白中. 此外, 尽管成年后骨构建即停止, 而由成骨细胞和破骨细胞介导的骨重建在一生中都会发生<sup>[8]</sup>, 镧也可能通过干扰成骨细胞和破骨细胞的活性来影响骨重建, 从而影响骨的形成. 关于镧对骨形成的影响文献报道不尽相同: Lacour 等的实验结

果表明镧能够促进骨形成<sup>[9]</sup>, Huang 等的实验结果表明镧能够抑制骨形成<sup>[10]</sup>, 还有的实验结果表明镧对骨形成无影响<sup>[11]</sup>. 然而对于上述现象发生的过程, 在细胞和分子层次的研究却不多, 还难以对动物实验结果做出合理的解释.

成骨细胞是骨形成细胞, 对骨组织的生长发育、损伤修复、骨代谢平衡及骨量维持起关键作用. 成骨细胞是由骨髓基质细胞 (MSCs) 中的间充质干细胞分化而来. 刘红梅等<sup>[12]</sup>发现 La<sup>3+</sup> 能够抑制培养早、中期 MSCs 向成骨细胞分化, 但对最终的基质钙化成骨并无明显影响. 张金超等<sup>[13]</sup>发现, La<sup>3+</sup> 可促进体外培养的成骨细胞系 UMR106 的分化, 表现为增强细胞碱性磷酸酶 (ALP) 活性及钙化能力. 但是, 关于镧的上述效应引起的后续反应及其分子机制, 目前尚未见报道.

肌动蛋白 (actin) 单体 G-actin 以一定方式组装成多聚体 F-actin, 再构成微丝网络. 细胞中微丝骨

2008-03-12 收稿, 2008-04-01 收修改稿

<sup>\*</sup> 国家自然科学基金 (批准号: 20271005, 20571006, 20637010) 和北京市自然科学基金 (批准号: 2062007) 资助项目

<sup>\*\*</sup> 通信作者, E-mail: hj\_by2005@yahoo.com.cn; tlzhangcums@yahoo.com.cn

©1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

架处于动态的组装和去组装, 并通过这种方式实现其生物学功能. 细胞的形态、迁移、极化、胞质分裂和吸附复合体的形成等均依赖于微丝形成的骨架结构. 研究表明, 在成骨细胞分化和迁移时, 整合素可以沟通细胞内外的信息传递, 激活粘着斑激酶(FAK), 并且使 F-actin 发生重组<sup>[14]</sup>. 因此, 研究  $\text{La}^{3+}$  对细胞骨架的影响对明确其对细胞生理活动特别是对细胞功能的影响有着重要的意义. 在本文中, 我们以从大鼠头盖骨中得到的成骨细胞为模型, 研究了  $\text{La}^{3+}$  对成骨细胞增殖、分化的影响. 并且观察了  $\text{La}^{3+}$  对细胞微丝结构和对 FAK 磷酸化的影响, 讨论了细胞增殖、分化和微丝结构重组的相关性.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

DMEM 培养基(高糖 4.5g/L)和 TRIZol 购自 Gibco BRL; 胎牛血清(FBS)购自 Hyclone; *Taq* DNA 聚合酶, RNA 酶抑制剂和 M-MLV 逆转录酶购自 Promega; oligo(dT)<sub>15</sub> 和 cDNA 引物由上海生物工程技术有限公司合成; Hoechst 33258, rhodamine-conjugated phalloidin 购自 Sigma; 兔抗 125<sup>FAK</sup>, pp125<sup>FAK</sup>IgG 和 FITC 标记羊抗兔 IgG 抗体购自 Santa Cruz 生物技术公司; 其余试剂均为国产分析纯.  $\text{La}^{3+}$  ( $\text{LaCl}_3$ )溶液的配制参考文献[15].

### 1.2 方法

**1.2.1 成骨细胞培养** 出生 1—2 d 的 SD 大鼠以 70%乙醇浸泡 1 min, 用 D-Hank's 平衡盐溶液洗去乙醇. 在无菌条件下剪开头皮, 取颅骨; 去净颅骨内外表面的骨膜及软组织, 沿冠状缝和人字缝剪开, 去除骨缝处的结缔组织; 用 0.25%的胰蛋白酶预消化 30 min, 再用 0.1% II 型胶原酶消化两次, 每次在 37℃振荡消化 60 min; 将消化液于 4℃离心 10 min, 所得沉淀物即为成骨细胞. 经 D-Hank's 清洗后, 加入 DMEM 培养基(含 10% FBS 及青、链霉素), 制成细胞悬液, 接种于培养瓶培养. 第 2 d 换液, 以后每隔 2—3 d 换液一次. 取第 3—6 代细胞进行以下实验.

**1.2.2 成骨细胞计数** 取对数生长期的大鼠成骨

细胞(ROB), 加入  $10^{-6}$  mol/L  $\text{La}^{3+}$  继续培养 24 h 和 48 h 后进行计数. 每个样品均在同一普通光学显微镜下计数, 相同部位在一个 400 倍放大视野内进行成骨细胞计数.

**1.2.3 成骨细胞标志性蛋白 mRNA 水平测定** ROB 中加入  $10^{-6}$  mol/L  $\text{La}^{3+}$ , 继续培养 4 d, 参照 Gibco 公司提供的 TRIZol 法提取细胞总 RNA. 碱性磷酸酶(ALP)、骨钙素(OC)、骨桥蛋白(OPN)、骨涎蛋白(BSP)以及 *cbfa-1* 的 mRNA 水平通过半定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)测定. 取 5  $\mu$ g 样品 RNA, 利用随机引物 oligo(dT)<sub>15</sub> 和 M-MLV 逆转录酶合成 cDNA. 取 5  $\mu$ L 逆转录所得 cDNA, 利用 PCR 进行扩增. ALP, OC, OPN, BSP, *cbfa-1* 及  $\beta$ -actin 的特异性引物序列参照文献[16]. 以不含 cDNA 模板的反应体系为空白对照组, 以  $\beta$ -actin 为内参照物测定每个样品的 mRNA. PCR 扩增程序为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 60℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min. PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳和溴化乙啶染色后, 采用 Alphamager 2200 凝胶成像仪(Alpha Innotech Corporation)进行图像扫描和分析, 得到成骨细胞标志性蛋白相对于  $\beta$ -actin 的 mRNA 表达量的相对值.

**1.2.4 细胞骨架的荧光染色** 分别在各时间点取出细胞爬片, 按下述步骤分别进行细胞骨架荧光染色: 40 g/L 中性多聚甲醛 4℃ 固定 15 min, PBS 浸洗, 用含 1 ml/L Triton X-100 的 PBS 处理细胞 5 min, PBS 浸洗, 滴加 phalloidin, 于湿盒中室温避光孵育 20 min, PBS 浸洗后室温下以 Hoechst 33258 进行细胞核染. 实验中为消除非特异性染色在 phalloidin 染液中加入 10 g/L 的 BSA. 将染色后的细胞爬片置于激光共聚焦显微镜下观察, 记录图片, 并用图像处理软件 Image-Pro Plus 处理.

**1.2.5 FAK 磷酸化分析** 加入  $10^{-6}$  mol/L  $\text{La}^{3+}$  分别作用 1, 3, 6, 12 和 24 h 后, 用 Western Blot 检测 ROB 中 FAK 磷酸化水平. 细胞用冷 PBS 洗两次. 用裂解液(含 50 mmol/L hepes, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 0.4% SDS, 5  $\mu$ g/mL aprotinin, 5  $\mu$ g/mL leupeptin,

1 mmol/L PMSF 和 10 mmol/L DTT) 在 4 °C 裂解 5 min, 提取总蛋白. 用 Lowry 法测定细胞总蛋白浓度. 取 40 μg 蛋白进行 7.5% SDS-PAGE 电泳, 然后将凝胶上蛋白电转移到 PVDF 膜上, 5% 的脱脂奶粉/ TBS-T 封闭, 再依次用兔抗 FAK 或 pFAK 和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 进行反应, 最后用增强化学发光法显示蛋白带. 用 UVI 凝胶成像系统摄像, 并用 Image-Pro Plus 510 软件分析条带灰度值.

**1.2.6 统计分析** 所有数据进行方差分析, 以  $\bar{x} \pm SD$  表示, 组间比较采用双侧 *t* 检验,  $P < 0.05$  为有显著性差异.

## 2 实验结果

### 2.1 La<sup>3+</sup> 促进成骨细胞增殖

由图 1 可知, 培养 24 h 后, 只有 10<sup>-6</sup> mol/L La<sup>3+</sup> 对成骨细胞增殖起到促进作用. 但 48 h 后, 10<sup>-8</sup>—10<sup>-4</sup> mol/L La<sup>3+</sup> 均能促进成骨细胞的增殖, 且与对照组有显著差异.

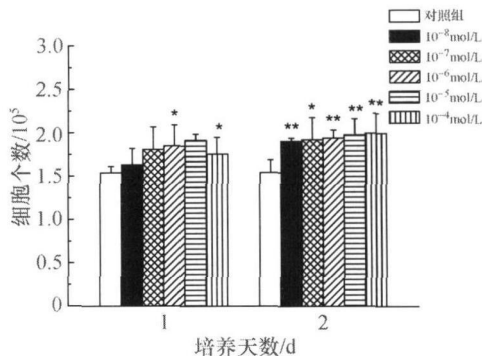


图 1 La<sup>3+</sup> 对成骨细胞增殖的影响  
 $\bar{x} \pm SD, n = 4, *P < 0.05, **P < 0.01$

### 2.2 La<sup>3+</sup> 引起成骨细胞标志性蛋白表达的改变

通过半定量 RT-PCR 技术研究了不同时期 La<sup>3+</sup> 对成骨细胞中与分化相关蛋白 mRNA 水平的影响. 结果显示, 在加入 10<sup>-6</sup> mol/L La<sup>3+</sup> 后培养第 4 d 的成骨细胞中 ALP, *cbfa-1* 和 BSP 表达增加, 作用到 14 d 差异减小甚至下降, 培养到 21 d, OPN 和 OC mRNA 水平显著升高 (图 2).

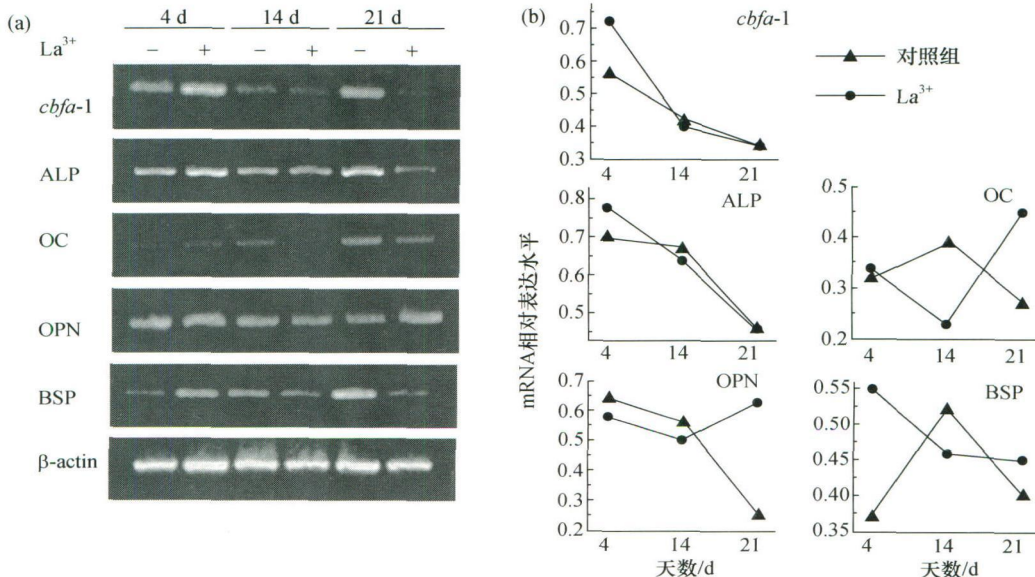


图 2 La<sup>3+</sup> 引起成骨细胞标志性蛋白表达的改变

### 2.3 La<sup>3+</sup> 引起成骨细胞微丝骨架的改变

激光共聚焦显微镜下观察, 可见对照组细胞的微丝主要分布在细胞的周围和核周, 细胞周围的微

丝形成致密的周围束, 相互平行排列. 当细胞受到 10<sup>-6</sup> mol/L La<sup>3+</sup> 刺激 48 h 后, 微丝密度增加, 遍及整个细胞, 微丝变粗, 细胞中央微丝呈束状排列, 荧光标记强度明显增强 (图 3).

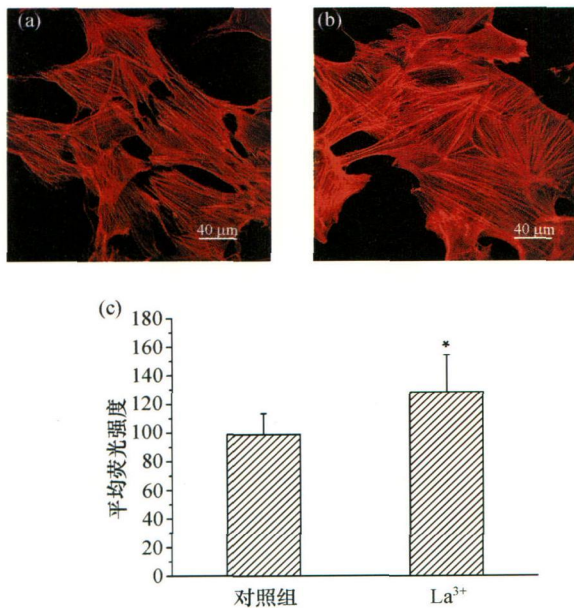


图 3  $\text{La}^{3+}$  引起成骨细胞微丝骨架的改变

(a) 对照组; (b)  $10^{-6}$  mol/L  $\text{La}^{3+}$ ; (c) 平均荧光强度定量分析 ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ ,  $n=30$ , \* $p<0.05$ )

## 2.4 $\text{La}^{3+}$ 激活粘着斑激酶(FAK)磷酸化

为了进一步探讨  $\text{La}^{3+}$  影响成骨细胞增殖分化功能的机制, 采用 Western Blot 技术分析了  $\text{La}^{3+}$  对细胞中 FAK 磷酸化的影响. 结果如图 4 所示, 在  $10^{-6}$  mol/L  $\text{La}^{3+}$  作用 12h 后使 FAK 磷酸化水平开始上升, 在 24h 时 FAK 磷酸化水平显著高于激活前的水平.

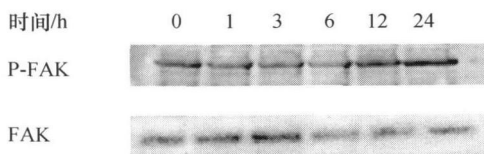


图 4  $\text{La}^{3+}$  对成骨细胞中 FAK 磷酸化的影响

## 3 讨论

在成骨细胞的发育过程中, 基因表达的变化为 3 个阶段: 细胞增殖、细胞外基质成熟和矿化. 最初, 活跃增殖的细胞表达细胞周期和细胞生长调节基因, 产生粘连蛋白或 I 型胶原等细胞外基质. 随后, 进入细胞外基质成熟阶段, 细胞增殖完成, 胶原蛋白沉积, 成骨细胞表型的特殊标志基因 ALP

表达升高; 在较后的矿化发生阶段, OPN 和骨钙素(OC)表达增加<sup>[17,18]</sup>. 我们的实验结果表明,  $\text{La}^{3+}$  不仅能够促进成骨细胞增殖, 还能够促进不同阶段的成骨细胞标志性蛋白基因的表达. 不同阶段成骨细胞表现不同的特征显示  $\text{La}^{3+}$  对成骨细胞的影响与成骨细胞的成熟程度相关.  $\text{La}^{3+}$  是通过哪种途径产生该效应, 以及和成骨细胞作用后引起的后续效应等一系列问题是我们研究的重点.

在骨细胞中有数种转导途径, 包括细胞膜离子通道(特别是牵拉激活的阳离子选择性通道 SA-CAT)与 G 蛋白偶联的磷脂酶 C 通路. 细胞内钙离子和细胞骨架等都参与了细胞的信号转导<sup>[19]</sup>, 稀土通过哪条信号通路影响成骨细胞增殖与分化与稀土的物种、浓度及作用条件等有关, 在许多情况下是几种机制并存. 我们已经观察到  $\text{La}^{3+}$  通过 G 蛋白偶联受体影响成骨细胞分化, 但是不能排除  $\text{La}^{3+}$  通过其他途径对成骨细胞起作用. 在本文中我们主要研究  $\text{La}^{3+}$  与细胞骨架和细胞功能之间的关系.

细胞骨架参与细胞形态维持和多种细胞功能, 其结构重排及聚合和解聚的动态变化在一定程度上反映了细胞的功能状况<sup>[14]</sup>. F-actin 呈纤维状, 是构成细胞骨架的主要部分. Phalloidin 能够特异性结合 F-actin, 因而采用激光扫描共聚焦显微镜可以很好地观察细胞中 F-actin 的变化.  $\text{La}^{3+}$  作用后, 我们观察到细胞微丝明显变粗变长, 数量增多, 这表明  $\text{La}^{3+}$  使成骨细胞 F-actin 表达增加, 从而导致细胞骨架发生了重排. 而细胞骨架的重组和分布的改变, 将直接影响细胞内信号的整合和转导、细胞周期的改变和基因表达, 进而影响细胞增殖和分化.

整合素是细胞表面一类重要的兼具粘附与信号传导功能的质膜蛋白, 其胞外段可结合细胞外基质, 胞内段可与细胞骨架、信号传导分子相结合参与调节细胞运动、极化、生长和生存过程<sup>[20]</sup>. 整合素的功能依赖于二价阳离子. 已知, 将  $\text{Ca}^{2+}$  从其结合位点去除或加入  $\text{Mn}^{2+}$  都能够增加整合素蛋白的配基结合活性<sup>[21]</sup>. 还有研究表明, 稀土离子  $\text{Tb}^{3+}$  也可与整合素的结构域 I 结合, 从而激活整合素<sup>[22]</sup>. 考虑到离子相似性,  $\text{La}^{3+}$  可能通过结合整合素影响微丝的分布, 并进一步激活一系列下游信号传导分子, 最终对细胞功能产生影响.

FAK 是整合素信号传导途径中的关键蛋白, 是信号通路的一个上游枢纽. 整合素胞质结构域一般不直接与细胞骨架纤维相连, 而是通过各种粘着斑胞质蛋白与肌动蛋白纤维束状结构连接<sup>[23]</sup>. 在信号传递过程中整合素与细胞外基质结合促使粘着斑形成, 激活 FAK 等多种蛋白激酶. FAK 激活时, 可以促进它与其他信号分子的连接, 引发其他细胞骨架蛋白和信号蛋白的酪氨酸磷酸化, 这些磷酸化蛋白质对调节细胞存活、增殖、分化及凋亡等多种生物功能发挥重要作用<sup>[24]</sup>.  $\text{La}^{3+}$  作用使 FAK 磷酸化水平上升, 且在 24h 时 FAK 磷酸化水平显著高于激活前的水平, 进一步表明  $\text{La}^{3+}$  有可能通过与整合素的相互作用, 进而引发 FAK 磷酸化.

综上所述, 本实验结果提示  $\text{La}^{3+}$  可能通过直接与整合素的作用, 使粘着斑激酶的含量和活性发生改变, 并引起细胞骨架的重组, 进而促进成骨细胞增殖和增强不同阶段的成骨细胞标志性蛋白基因的表达.

### 参 考 文 献

- Berns JS, Kobrin S. Boning up on lanthanum. *Semin Dial*, 2006, 19(1): 87—89
- Magda D, Miller RA. Motexafin gadolinium: A novel redox active drug for cancer therapy. *Semin Cancer Biol*, 2006, 16(6): 466—476
- Beattie J, Best S, Skelton B, et al. Structural studies on the caesium alums,  $\text{CsM}^{\text{III}}[\text{SO}_4]_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ . *J Chem Soc Dalton Trans*, 1981, 2105—2111
- Hardie MJ, Raston CL, Salinas A. A 3, 12-connected vertex sharing adamantoid hydrogen bonded network featuring tetrameric clusters of cyclotrihexatriene. *Chem Commun (Camb)*, 2001, 18: 1850—1851
- Jalilvand F, Spangberg D, Lindqvist-Reis P, et al. Hydration of the calcium ion. An EXAFS, large-angle X-ray scattering, and molecular dynamics simulation study. *J Am Chem Soc*, 2001, 123(3): 431—441
- Vanholder R, Cornelis R, Dhondt A, et al. The role of trace elements in uraemic toxicity. *Nephrol Dial Transplant*, 2002, 17(2): 2—8
- Wang K. The analogy in chemical and biological behavior between non-special ions compared with essential ions. *S Afr J Chem*, 1997, 50: 232—238
- Boivin G, Meunier PJ. The mineralization of bone tissue: A forgotten dimension in osteoporosis research. *Osteoporos Int*, 2003, 14(Suppl 3): S19—24
- Lacour B, Auchere D, Ruellan N, et al. Chronic renal failure is associated with increased tissue deposition of lanthanum after 28-day oral administration. *Kidney Int*, 2005, 67(3): 1062—1069
- Huang J, Zhang TL, Xu SJ, et al. Effects of lanthanum on composition, crystal size, and lattice structure of femur bone mineral of Wistar rats. *Calcif Tissue Int*, 2006, 78(4): 241—247
- Behets GJ, Verberckmoes SC, D'Haese PC, et al. Lanthanum carbonate: A new phosphate binder. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2004, 13(4): 403—409
- 刘红梅, 张天蓝, 许善锦, 等. 镧离子对骨髓基质细胞向成骨细胞分化的影响. *科学通报*, 2006, 51(1): 28—33
- 张金超, 许善锦, 王 夔. 稀土离子对体外兔成熟破骨细胞骨吸收功能的影响. *科学通报*, 2003, 48(16): 1767—1771
- Maniotis A, Christopher C, Ingber D. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(3): 849—854
- Liu HX, Hu J, Liu XI. Effects of lanthanide ions on hydrolysis of phosphatidylinositol in human erythrocyte membranes. *Chinese Science Bulletin*, 2001, 46(5): 401
- Kim IS, Song JK, Zhang YL, et al. Biphasic electric current stimulates proliferation and induces VEGF production in osteoblasts. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1763(9): 907—916
- Aubin JE, Liu F, Malaval L, et al. Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone*, 1995, 17(2): 77—83
- Stein G, Lian J, Owen TA. Relationship of cell growth to the regulation of tissue specific gene expression during osteoblast differentiation. *Faseb J*, 1990, 4(13): 3111—3123
- 李 彬, 张西正, 张永亮. 骨组织工程中的应力与生长. *国外医学生物医学工程分册*, 2003, 26(3): 129—134
- Arthur WT, Noren NK, Burridge K. Regulation of Rho family GTPases by cell-cell and cell-matrix adhesion. *Biol Res*, 2002, 35(2): 239—246
- 隋森芳, 张 帆, 路英杰. 表面等离子共振生物传感器研究整合素蛋白  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  与 RGD 多肽的特异结合. *生物化学与生物物理进展*, 2002, 29(5): 132—136
- Dickeson SK, Bhattacharya-Pakrasi M, Mathis NL, et al. Ligand binding results in divalent cation displacement from the alpha 2 beta 1 integrin I domain: Evidence from terbium luminescence spectroscopy. *Biochemistry*, 1998, 37(32): 11280—11288
- Duncan R, Turner C. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int*, 1995, 57(5): 344—358
- Zachary I. Focal adhesion kinase. *Int J Biol Chem Cell Biol Res*, 1997, 29(7): 929—934