

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.02.007

模拟微重力通过调节 AKT 磷酸化抑制前成骨细胞的增殖 *

周 骅 曹新生 胡泽兵 王 瀚 王艺璇 张 舒[△]

(第四军医大学航空航天生物动力学教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的: 研究模拟微重力对前成骨细胞的增殖作用及其分子机制。**方法:** 利用 2D 回转器模拟失重条件培养前成骨细胞 MC3T3-E1 24 小时; 将 p-AKT 激活剂 SC79 加入细胞培养基后模拟失重条件下培养前成骨细胞 MC3T3-E1 24 小时; 利用 Western blot 技术分别检测细胞增殖相关蛋白 PCNA 以及 AKT、p-AKT 的表达变化情况。**结果:** ①与对照组相比,模拟失重组前成骨细胞增殖受到抑制($P<0.01$), p-AKT/AKT 比值减小($P<0.01$); ②加入 SC79 组与对照组相比, p-AKT/AKT 比值显著增加; ③加入 SC79 的模拟失重组(MG+SC79)与模拟失重组相比(MG), p-AKT/AKT 比值增加, PCNA 蛋白表达增加($P<0.01$), 成骨细胞增殖有所恢复。**结论:** 模拟微重力可能通过抑制 AKT 的磷酸化形式抑制前成骨细胞的增殖, 加入 p-AKT 激活剂可部分恢复前成骨细胞的增殖。

关键词: 模拟微重力; MC3T3-E1 细胞; AKT; 增殖

中图分类号: R852.22 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2017)02-229-04

Simulated Microgravity Inhibits the Proliferation of Osteoblasts by Regulating the Phosphorylation of AKT*

ZHOU Hua, CAO Xin-sheng, HU Ze-bing, WANG Han, WANG Yi-xuan, ZHANG Shu[△]

(Department of Aerospace Biodynamics, FMMU, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of simulated microgravity on the proliferation and the molecular mechanism of the osteoblast. **Methods:** 2D rotator was used to simulate weightlessness condition. The MC3T3-E1 cells were divided into 4 groups: control group (CON), the simulated weightlessness group (MG), the control with SC79 group (CON+SC79) and simulated weightlessness treatment with SC79 group (MG+SC79). AKT phosphorylation activator SC79 was added into the cell culture medium before exposing to simulated weightlessness, then all the MC3T3-E1 cells were cultured for 24 h. Changes among MC3T3-E1 cells were detected by Western blot analysis, which including cell proliferation related protein PCNA, p-AKT and AKT. **Results:** ① Compared with the CON group, cell proliferation of MG group is inhibited ($P<0.01$), and the ratio of p-AKT/AKT was decreased ($P<0.01$). ② Compared with the CON group, the ratio of p-AKT/AKT of CON+SC79 group was raised. ③ Compared with MG group, p-AKT / AKT ratio was increased, PCNA protein expression was increased partially ($P<0.01$), and osteoblast proliferation had been restored in the MG+SC79 group. **Conclusion:** Simulated microgravity can inhibit the proliferation of osteoblasts by inhibiting the phosphorylation of AKT. The proliferation of osteoblasts are partially restored by the addition of p-AKT activator.

Key words: Simulated microgravity; MC3T3-E1 cell; AKT; Cell proliferation

Chinese Library Classification(CLC): R852.22 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)02-229-04

前言

随着载人航天飞行的发展,航天员在空间失重环境下引发的一系列生理病理改变愈显突出。其中,失重环境造成的骨代谢失衡是威胁长期航天飞行航天员健康的主要因素之一^[1,2]。正常的骨重建过程依赖骨形成与骨吸收过程的动态平衡,而这一过程分别与成骨细胞和破骨细胞的功能密切相关。大量研究显示,在失重/模拟失重导致的骨质丢失中,成骨细胞功能障碍是主要原因^[3-5],但是航天失重下骨代谢紊乱的确切机制尚未完全阐明。丝/苏氨酸蛋白激酶(serine-threonine kinase, Akt)广泛

分布于各种细胞中,参与细胞多种生理过程,发挥着重要的促进增殖的作用^[6]。很多研究均发现 AKT 在骨形成和骨重建中发挥着重要的调控作用^[7]。但失重条件下 AKT 和成骨细胞增殖变化的关系尚未见报道。本实验验证了模拟失重状态下前成骨细胞 MC3T3-E1 细胞增殖受到抑制,并在此基础上进一步探索模拟失重是否是通过影响 AKT 的蛋白磷酸化水平从而影响细胞增殖,初步探索失重条件下骨代谢紊乱可能的分子机制,为进一步深入研究和临床用药提供实验依据。

1 材料与方法

* 基金项目:国家自然科学基金项目(31570939;81471815;31170889)

作者简介:周骅(1989-),硕士研究生,主要研究方向:航空航天医学,电话:13659249312, E-mail: krinazhou@163.com

△ 通讯作者:张舒(1972-),博士,教授、博士生导师,主要研究方向:航空航天医学,电话:029-84774811, E-mail: shuzhang@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2016-08-24 接受日期:2016-09-20)

1.1 实验材料

前成骨细胞 MC3T3-E1 (ATCC 细胞库), DMEM-F12/1:1 培养基, 磷酸盐缓冲液, 双抗和胎牛血清 (Hyclone 公司), 胰蛋白酶 (Millipore 公司), RIPA 细胞裂解液, PSMF, 丽春红染液, 一抗稀释液 (Beyotime), 预制胶, PVDF 膜 (美国 Invitrogen 公司), BCA 蛋白定量试剂盒 (美国 Sigma 公司), 蛋白 MARK-ER, 磷酸酶抑制剂 (Roche), PCNA 抗体, 磷酸化 AKT 抗体, AKT 抗体, GAPDH 抗体 (Cell Signaling Technology)。回转器 (2D-RWVs-ISME, 中国航天员科研训练中心), 超净工作台 (天津泰斯特仪器有限公司), CO₂ 培养箱 (美国 Thermo 公司)。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 细胞培养 将前成骨细胞 MC3T3-E1 在 DMEM-F12/1:1 培养基中培养, 培养基含有 10% 的胎牛血清, 1% 的双抗, 细胞置于 37℃ 孵箱中。每 2 天换液 1 次, 当细胞的汇合度达到 90% 左右时, 使用不含 EDTA 的胰蛋白酶进行传代培养。选取 3-6 代呈对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 回转器模拟失重模型的建立 采用 2D 回转器进行 MC3T3-E1 细胞模拟失重效应的研究。回转半径为 1.5 cm, 转速为 24 r/min, 回转时间为 24 h。用胰酶将 MC3T3-E1 细胞消化下来并用 DMEM-F12/1:1 培养基重悬。在 6 孔板中放置好回转器专用玻片, 将重悬细胞接种在玻片上, 每个孔加入 2 mL 的细胞稀释悬液, 待细胞完全贴壁后给细胞换液。在回转培养瓶中灌满培养基并放于 37℃ 孵箱中预热。将 6 孔板中的玻片插入回转培养瓶的卡槽内, 接种细胞的一面朝向内, 将回转培养瓶盖拧紧, 用注射器排出多余的气泡。将排空气泡的回转瓶安装于 2D 回转器上, 对照组 (CON) 进行垂直回转, 模拟失重组 (MG) 进行水平回转。回转完成后提取细胞样本进行相应检测。

1.2.3 Western blot 检测 Western blot 检测 p-Akt、Akt、PCNA 蛋白表达: 提取 MC3T3-E1 细胞总蛋白, 加入蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂防止其降解, BCA 法测定蛋白质浓度, 并加入 loading buffer 煮沸 10 min。取 40 μg 样品上样至预制胶上, 恒压 90 V 电泳 30 min, 而后 120 V 电泳 90 min, 常规转膜, 牛奶封闭 4 h, 分别加入 p-Akt、Akt、PCNA 抗体 (1:1000) 4℃ 孵育过夜, 用 TBST 充分洗涤, 加 HRP 标记羊抗兔二抗 (1:5000) 孵育 60 min, TBST 洗涤, 加入 ECL 发光液进行发光并拍摄照片。采用 Image J 软件分析图像条带灰度值并计算蛋白相对含量。

1.3 统计学方法

全部数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 两样本间比较采用独立样本 t 检验, 将 $P < 0.05$ 定为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 模拟失重 24 h 抑制前成骨细胞的增殖

研究发现 PCNA 蛋白与细胞 DNA 合成关系密切, 在细胞增殖的启动上起重要作用, 是反映细胞增殖状态的良好指标^[89]。故将前成骨细胞 MC3T3-E1 放入 2D 回转器模拟失重条件下培养 24 h, 采用 Western blot 技术检测 PCNA 蛋白表达。结果显示模拟失重 24 h 组与对照组相比 PCNA 蛋白表达显著减少, $P < 0.01$ (图 1), 细胞增殖受到抑制。

2.2 模拟失重 24h p-AKT 减少

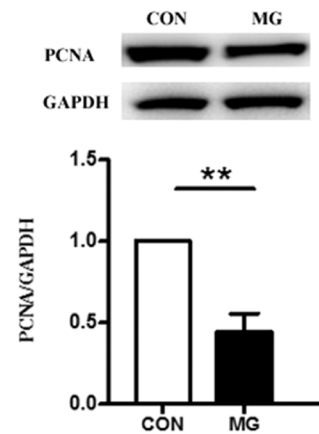


图 1 Western blot 检测各组 MC3T3-E1 细胞中 PCNA 的表达

Fig.1 The expression of PCNA in MC3T3-E1 cells was detected by Western blot. ** $P < 0.01$ vs CON

大量研究表明 AKT 磷酸化水平与细胞增殖有着密切联系^[10-13]。本实验采用 Western blot 技术检测 p-AKT 以及 AKT 蛋白表达, 发现模拟失重条件下培养 24 h 后 AKT 蛋白的磷酸化水平受到显著抑制, p-AKT 与 AKT 比值减小 $P < 0.01$ (图 2)。

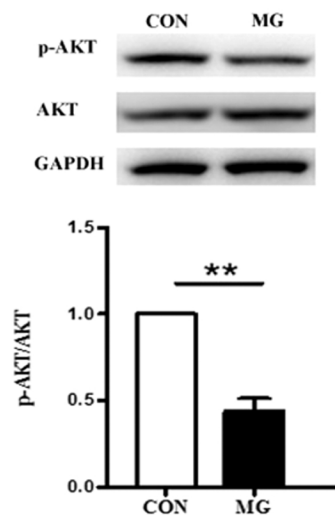


图 2 Western blot 检测各组 MC3T3-E1 细胞中 p-AKT、AKT 的表达

Fig.2 The expressions of p-AKT, AKT in MC3T3-E1 cells were detected by Western blot

2.3 模拟失重通过影响 p-AKT 水平抑制前成骨细胞增殖

在模拟失重环境下, 前成骨细胞增殖受到抑制, 同时我们发现 AKT 磷酸化水平显著下降。我们推测模拟失重环境可能通过影响 AKT 蛋白的磷酸化水平进而影响前成骨细胞的增殖。因此在模拟失重条件下在细胞培养基中加入 p-AKT 的激动剂 SC79^[14, 15], 观察提高 p-AKT 后能否逆转模拟失重对细胞增殖的抑制作用。

2.3.1 加入 SC79 能提高细胞 p-AKT 水平 按照说明书推荐剂量 8 μg/mL^[16, 17], 在细胞培养基中加入 SC79 培养 24 h 后提取总蛋白, 采用 Western blot 技术检测 p-AKT、AKT 蛋白表达, 实验发现加入 SC79 的细胞与对照组相比 p-AKT 以及 p-AKT/AKT 均有提高, $P < 0.01$ (图 3); 而 AKT 蛋白总量无明显变化。

2.3.2 在模拟失重条件下加入 SC79 能部分提高 p-AKT 水平,促进细胞增殖 实验分为 2 个组,单纯模拟失重 24 h 组、模拟失重加 SC79 组。实验发现加入 SC79 的模拟失重组相比单纯模拟失重 24 h 组 p-AKT、p-AKT/AKT 明显升高, $P<0.01$ (图 4);同时 PCNA 蛋白的表达增加, $P<0.01$ (图 5),提示细胞增殖能力增强。

3 讨论

本实验利用回转器模拟失重效应刺激 MC3T3-E1 细胞 24 h,发现其 PCNA 蛋白表达减少,细胞增殖受到抑制。同时我们检测了 p-AKT 以及 AKT 蛋白的表达,发现 p-AKT 减少,

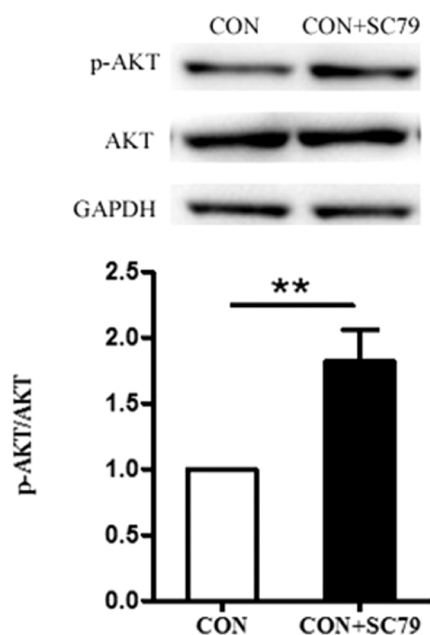


图 3 加入 SC79 后 MC3T3-E1 细胞中 p-AKT、AKT 的表达

Fig.3 The expression of p-AKT, and AKT in MC3T3-E1 cells with SC79 were detected by Western blot.

** $P<0.01$ vs CON

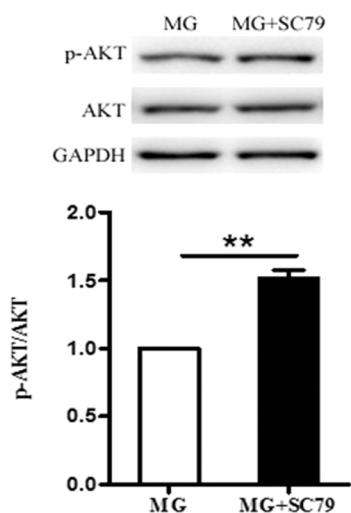


图 4 Western blot 检测模拟失重各组 MC3T3-E1 细胞中 p-AKT、AKT 表达

Fig.4 The expressions of p-AKT, AKT in MC3T3-E1 cells exposed to simulated microgravity were detected by Western blot. ** $P<0.01$ vs MG

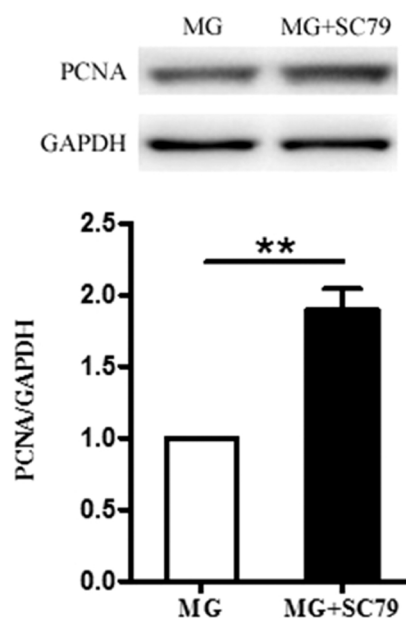


图 5 Western blot 检测模拟失重各组 MC3T3-E1 细胞中 PCNA 的表达

Fig.5 The expression of PCNA in MC3T3-E1 cells exposed to simulated microgravity was detected by Western blot. ** $P<0.01$ vs MG

p-AKT 与 AKT 比值减小。补充 p-AKT 的激动剂 SC79 后则显著提高了模拟失重下 MC3T3-E1 细胞中 PCNA 蛋白的表达水平。结果提示模拟失重可能通过干扰 AKT 蛋白的磷酸化,从而抑制成骨细胞的增殖;提高 p-AKT 的表达,则能够部分对抗模拟失重对成骨细胞增殖的抑制作用。

骨是一种对力学刺激十分敏感的组织,骨组织的结构以及功能的变化都与力学刺激的改变密切相关^[18,19]。重力是一种以场力的形式作用于骨的力,重力也是维持骨的正常生理功能状态的重要力刺激。当骨骼失去重力作用后骨吸收与骨重建失衡,骨质减少,骨小梁变薄,次级骨松质消失^[20-22]。随着我国航天事业的发展,航天员在轨时间不断增加,失重状态下航天员骨质持续丢失且无自限性的状况令人担忧。目前,失重造成骨质丢失的分子机制还未阐明。但是大量研究显示成骨细胞功能障碍是导致失重性骨质丢失的主要原因^[5,23]。

AKT 蛋白分子量约为 60kD,由 480 个氨基酸组成。目前,在哺乳动物中发现 3 种 Akt 亚型: Akt1、Akt2 和 Akt3。Akt1 广泛存在于各种细胞中,而 Akt2 主要分布于肌肉和脂肪细胞中, Akt3 只存在于大脑与睾丸中^[24]。P-AKT 是 AKT 的活化形式, AKT 具有两个活化位点 Thr308 与 Ser473。AKT 能被细胞内多种物质激活并参与细胞多种生理过程,发挥抑制凋亡、促进增殖的重要作用^[6,25]。AKT 在骨形成和骨重建中发挥着重要的调控作用,研究显示,敲除 Akt1 /Akt2 的小鼠骨化延迟^[7],而敲除 Akt 的小鼠骨骼变短,并且延迟了次级骨化中心的形成^[26]。为了进一步验证失重环境是否通过影响 AKT 磷酸化水平进而影响成骨细胞的增殖能力,本实验采用 2D 回转器模拟失重效应,回转器所形成的等效重力加速度(即离心加速度与重力加速度的比值)可以达到 10^{-3} - 10^{-5} G^[27]。实验结果显示模拟失重后 MC3T3-E1 细胞增殖受到抑制,p-AKT 减少,p-AKT 与 AKT 比值减小。为了进一步明确模拟失重下 MC3T3-E1 细胞中 AKT 和增殖的关系,我们采用激动剂提升 p-AKT 的水平,发现提升

p-AKT 的水平后可部分恢复前成骨细胞 MC3T3-E1 细胞的增殖能力。以上结果提示模拟失重下 AKT 在 MC3T3-E1 细胞的增殖变化中发挥了重要的调控作用。

本实验在细胞学基础上初步证明模拟失重环境可通过影响 AKT 蛋白的磷酸化水平从而抑制成骨细胞的增殖, 为模拟失重环境下骨丢失的细胞学机制研究提供了理论依据。但值得注意的是通过 2D 回转器建立的模拟失重条件并不能完全等同于真实失重条件, 而 Akt 也并不是唯一影响成骨细胞增殖的因素。虽然提高细胞 AKT 磷酸化水平能改善模拟失重环境对细胞增殖的抑制, 但是细胞增殖并未恢复到正常水平。模拟失重下 AKT 与其它分子之间的相互作用以及在动物整体水平上的变化, 对成骨细胞增殖的影响作用是我们下一步研究的方向。

参考文献(References)

- [1] Goyden J, Tawara K, Hedeon D, et al. The Effect of OSM on MC3T3-E1 Osteoblastic Cells in Simulated Microgravity with Radiation[J]. PloS one, 2015, 10(6): e0127230
- [2] Carmeliet G, Vico L, Bouillon R. Space flight: a challenge for normal bone homeostasis [J]. Critical reviews in eukaryotic gene expression, 2001, 11(1-3): 131-144
- [3] Morey ER, Baylink DJ. Inhibition of bone formation during space flight[J]. Science, 1978, 201(4361): 1138-1141
- [4] Blaber EA, Dvorochkin N, Lee C, et al. Microgravity induces pelvic bone loss through osteoclastic activity, osteocytic osteolysis, and osteoblastic cell cycle inhibition by CDKN1a/p21[J]. PloS one, 2013, 8(4): e61372
- [5] Wang H, Sun Z, Wang Y, et al. miR-33-5p, a novel mechano-sensitive microRNA promotes osteoblast differentiation by targeting Hmga2[J]. Scientific reports, 2016, 6: 23170
- [6] Liang D, Yang M, Guo B, et al. Zinc inhibits H₂O₂-induced MC3T3-E1 cells apoptosis via MAPK and PI3K/AKT pathways[J]. Biological trace element research, 2012, 148(3): 420-429
- [7] Peng XD, Xu PZ, Chen ML, et al. Dwarfism, impaired skin development, skeletal muscle atrophy, delayed bone development, and impeded adipogenesis in mice lacking Akt1 and Akt2 [J]. Genes & development, 2003, 17(11): 1352-1365
- [8] Dietrich DR. Toxicological and pathological applications of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), a novel endogenous marker for cell proliferation [J]. Critical reviews in toxicology, 1993, 23(1): 77-109
- [9] Juríková M, Danihel L, Polák Š, et al. Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer[J]. Acta histochemica, 2016, 118(5): 544-552
- [10] Lawlor MA, Alessi DR. PKB/Akt: a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses [J]. Journal of cell science, 2001, 114(Pt 16): 2903-2910
- [11] Zheng D, Chen Z, Chen J, et al. Exogenous hydrogen sulfide exerts proliferation, anti-apoptosis, migration effects and accelerates cell cycle progression in multiple myeloma cells via activating the Akt pathway[J]. Oncology reports, 2016, [Epub ahead of print]
- [12] Ju-Rong Y, Ke-Hong C, Kun H, et al. Transcription Factor Trps1 Promotes Tubular Cell Proliferation after Ischemia-Reperfusion Injury through cAMP-Specific 3',5'-Cyclic Phosphodiesterase 4D and AKT [J]. Journal of the American Society of Nephrology: JASN, 2016 [Epub ahead of print]
- [13] Yang Y, Huang Y, Wang Z, et al. HDAC10 promotes lung cancer proliferation via AKT phosphorylation [J]. Oncotarget, 2016 [Epub ahead of print]
- [14] Hao S, Song C, Shang L, et al. Phosphorylation of Akt by SC79 Prevents Iron Accumulation and Ameliorates Early Brain Injury in a Model of Experimental Subarachnoid Hemorrhage [J]. Molecules: a journal of synthetic chemistry and natural product chemistry, 2016, 21(3): 325
- [15] Zhang D, Zhang H, Hao S, et al. Akt Specific Activator SC79 Protects against Early Brain Injury following Subarachnoid Hemorrhage[J]. ACS chemical neuroscience, 2016, 7(6): 710-718
- [16] Jo H, Mondal S, Tan D, et al. Small molecule-induced cytosolic activation of protein kinase Akt rescues ischemia-elicited neuronal death [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(26): 10581-10586
- [17] So EY, Ouchi T. BRAT1 deficiency causes increased glucose metabolism and mitochondrial malfunction [J]. BMC cancer, 2014, 14: 548
- [18] Belavý DL, Baecker N, Armbrrecht G, et al. Serum sclerostin and DKK1 in relation to exercise against bone loss in experimental bed rest [J]. Journal of bone and mineral metabolism, 2016, 34(3): 354-365
- [19] Ksiezopolska-Orłowska. Changes in bone mechanical strength in response to physical therapy[J]. Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej, 2010, 120(9): 368-373
- [20] Vester H, Holzer N, Neumaier M, et al. Green Tea Extract (GTE) improves differentiation in human osteoblasts during oxidative stress [J]. Journal of inflammation, 2014, 11: 15
- [21] Oh JE, Kim HJ, Kim WS, et al. PlexinA2 mediates osteoblast differentiation via regulation of Runx2 [J]. Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research, 2012, 27(3): 552-562
- [22] Tong HY, Hu SM, Zhou P, et al. Effects on rats' bone mineral density and bone biomechanics by suspensory simulated weightlessness and removing suspension [J]. China journal of orthopaedics and traumatology, 2008, 21(4): 276-279
- [23] Hu Z, Wang Y, Sun Z, et al. miRNA-132-3p inhibits osteoblast differentiation by targeting Ep300 in simulated microgravity [J]. Scientific reports, 2015, 5: 18655
- [24] Hers I, Vincent EE, Tavaré JM. Akt signalling in health and disease [J]. Cellular signalling, 2011, 23(10): 1515-1527
- [25] Tsubaki M, Kato C, Manno M, et al. Macrophage inflammatory protein-1α (MIP-1α) enhances a receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) expression in mouse bone marrow stromal cells and osteoblasts through MAPK and PI3K/Akt pathways [J]. Molecular and cellular biochemistry, 2007, 304(1-2): 53-60
- [26] Ulici V, Hoenselaar KD, Agoston H, et al. The role of Akt1 in terminal stages of endochondral bone formation: angiogenesis and ossification[J]. Bone, 2009, 45(6): 1133-1145
- [27] 赵博伦, 李东韬, 胡泽兵, 等. 多种地面失重或模拟失重细胞学研究方法的进展[J]. 解放军医学院学报, 2013, 34(10): 1075-1078
- Zhao Bo-lun, Li Dong-tao, Hu Ze-bin, et al. Advances in Cellular Research Methods of Ground or Simulation Gravity [J]. Academic Journal of Chinese PLA Medical School, 2013, 34(10): 1075-1078