

Mg²⁺ 和 SeO₃²⁻ 对鸡胚软骨细胞受模拟微重力不良影响的拮抗*

张旭¹⁾ 李小兵¹⁾ 李生广^{**} 江丕栋 林治焕

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 在回转模拟微重力条件下, 研究了鸡胚负重软骨细胞骨架的微管系统和碱性磷酸酶活性两项指标的变化, 以及 1 mg/L 亚硒酸钠和 5 mmol/L Mg²⁺ 对这些指标的影响. 流式细胞仪对微管含量的测定显示回转后微管蛋白含量的减少, 说明微管系统受到不良影响. 碱性磷酸酶活性比对照组明显降低, 表明模拟微重力能降低软骨细胞的钙化能力. 如果在回转前加入 SeO₃²⁻ 和 Mg²⁺, 发现 SeO₃²⁻ 可以在一定程度上拮抗模拟微重力引起的微管蛋白及碱性磷酸酶活性改变, 而 Mg²⁺ 基本上可以完全拮抗模拟微重力对这两项指标的不良影响.

关键词 软骨细胞, 模拟微重力, 回转器, 碱性磷酸酶, 微管

学科分类号 Q693

我们^[1,2]曾报道模拟微重力对软骨细胞胞外基质, 以及对作为软骨细胞钙化标志酶碱性磷酸酶活性的不良影响, 与 Freed 等^[3]报道的太空飞行真正微重力作用下软骨组织结构与细胞形态均有变化的结果是相似的, 与太空实验室 IML-1 中受真实微重力的作用胚胎肢芽培养细胞生成减少^[4], 以及腓骨骨折大鼠在太空飞行微重力作用下软骨的形成减少^[5]的结果也是一致的, 而且我们的结果更从亚细胞和分子水平揭示了这种变化. 这些结果的一致性表明模拟微重力可以用于地面进行微重力效应的研究及寻求克服微重力影响的方法手段的研究. Novak 等^[6]指出细胞的骨架系统可能涉及直接的微重力感应. 有报道认为一定浓度的 SeO₃²⁻ 有明显的促进软骨细胞生长和分裂作用, 促进软骨细胞的分化成熟, 同时 SeO₃²⁻ 与软骨基质中氨基多聚糖代谢、胶原代谢密切相关^[7], 而 Mg²⁺ 能促进细胞骨架微管聚合^[8], 因此本文选用鸡胚负重软骨细胞骨架的微管系统和碱性磷酸酶活性作为测定指标, 研究了一定浓度的 Mg²⁺ 和 SeO₃²⁻ 对模拟微重力不良影响的拮抗效应.

1 材料与方法

1.1 鸡胚软骨细胞的培养

参照文献 [9] 的方法进行. 新鲜白来亨鸡受精卵于 38℃ 温箱中孵化 14 d. 无菌操作取鸡胚下肢骨, 青霉素-链霉素双抗液中浸泡 5 min 后, 在 Simms 缓冲液中尽可能剥净软组织及骨外膜. 以 Simms 缓冲液配制的 0.25% 胰蛋白酶 37℃ 消化

10 min. 消化后的材料再次剥离骨膜及软组织, 截去骨干部, 留下骨骺端, 再用胰蛋白酶消化 15 min, 用 Simms 缓冲液及 F12 培养液冲洗后, 吸管吹打分散软骨细胞. 用 F12 培养液稀释为所要求的密度, 分装在培养瓶中.

使用含 5% 胎牛血清的 F12 培养基, 加入青霉素和链霉素各 100 U/ml, 培养瓶规格为 12 ml, 每瓶加培养液 2 ml, 细胞密度为 $\times 10^4$ 个/ml. 37℃ 下培养 40 h 待细胞牢固贴壁后, 分四组培养. 前三组在回转器模拟微重力条件下培养, 其中一组培养液中加入 1 mg/L 的亚硒酸钠, 一组加入 5 mmol/L 的 MgCl₂. 第四组正常环境静置对照培养. 培养瓶充满培养液以减小回转引起的机械剪切力. 每 48 小时换一次培养液.

使用的回转器为中国科学院生物物理研究所研制的 MG-6 型回转器. 回转速度为 30 r/min, 根据离心力的公式 $a = \omega^2 r$, 细胞最小回转半径为 1.6 mm, 最小离心力约为 $1.6 \times 10^{-3} g$, 最大回转半径 < 6 mm, 最大离心力 $< 6 \times 10^{-3} g$.

1.2 微管蛋白含量测定

细胞回转培养 48 h 后, 用 Simms 缓冲液洗一遍, 加胰蛋白酶消化 2 min, 加培养液吹打下来, 加入 4% 的甲醛溶液固定 5 min, 然后加入 0.1% 的

* 国家高技术“863”计划资助项目(2-7-2-14).

** 通讯联系人.

¹⁾ 张旭和李小兵同为第一作者.

Tel: 010-64888525, E-mail: lsg@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2001-08-24, 接受日期: 2001-10-18

Triton-X 100 将膜脂增溶打孔, 以 1000 r/min 离心 10 min. 培养液洗一遍, 离心. 加入 1:50 的抗微管蛋白抗体 (Sigma 公司) 37°C 孵育 1 h. 加培养液洗一遍, 离心, 再加 1:200 稀释的二抗羊抗兔 FITC 荧光抗体, 在 37°C 孵育 1 h, 离心后用流式细胞仪 (美国 COULTER 公司, ETICS XL 型) 观测, 激发波长 488 nm, 发射波长 530 nm, 以平均荧光强度代表微管蛋白的相对含量.

1.3 碱性磷酸酶比活的测定

将细胞刮入 Simms 缓冲液 (NaCl 0.274 mol/L, KCl 0.054 mol/L, Na₂HPO₄ 0.030 mol/L, 葡萄糖 0.111 mol/L, pH 7.2). 匀浆并超声处理后的样品用于碱性磷酸酶活性的测定及 DNA 含量的测定.

碱性磷酸酶活性的测定参照文献 [10]. 酶底物为 pNPP 5 mmol/L (Sigma104), Tris-HCl 1.5 mol/L, ZnCl₂ 1 mmol/L, MgCl₂ 1 mmol/L, pH 9.0. 室温测定 30 min 内 410 nm 处吸光值的变化. $1A_{410} = 64 \text{ nmol 产物 (pNP) 每微克 (DNA) 每分钟 (nmol} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$.

DNA 含量的测定参照文献 [11]. 将 0.5 ml 样品溶液与 DNA 测定液混合并用 Simms 缓冲液定容至 2 ml, 使 DNA 测定液中各成分的含量为 Na₃PO₄ 0.05 mol/L, NaCl 2.0 mol/L, EDTA 2 mmol/L, Hoechst H33258 1 mg/L, pH 7.4. 振

荡后室温避光放置 20 h, 1 000 g 离心 2 min 去除蛋白质沉淀. 上清液用 F4010 型荧光分光光度计测定激发波长 356 nm, 发射波长 458 nm 处的荧光强度 F . 再由 DNA 标准曲线确定的经验公式计算出样品溶液中的 DNA 含量. DNA 标准曲线采用小牛胸腺 DNA 作样品, 其他条件同上.

2 结果和讨论

2.1 SeO₃²⁻ 和 Mg²⁺ 对碱性磷酸酶活性改变的拮抗

软骨细胞的碱性磷酸酶通常被人们看做是软骨钙化的标志酶, 它的活性大小, 表示软骨钙化程度的高低. 在研究 SeO₃²⁻ 和 Mg²⁺ 拮抗效应时, Mg²⁺ 浓度选择 5 mmol/L, 为正常生理浓度的两倍, SeO₃²⁻ 采用林治焕等^[7]的最佳浓度 1 mg/L Na₂SeO₃. 加 SeO₃²⁻ 和 Mg²⁺ 后, 对照和各回转组回转 48 h 后碱性磷酸酶的比活数据如表 1. 从表 1 可以知道, 单纯回转组碱性磷酸酶活性下降, 表明模拟微重力使软骨细胞钙化程度降低. 1 mg/L 的 Na₂SeO₃ 和 5 mmol/L 的 Mg²⁺ 都能拮抗回转细胞碱性磷酸酶活性的改变, 其中 Mg²⁺ 使得其活性接近静置对照的水平. 表明 SeO₃²⁻ 能较好拮抗碱性磷酸酶活性免受模拟微重力的影响, 使软骨细胞钙化程度提高; 而 Mg²⁺ 几乎可以完全拮抗模拟微重力对碱性磷酸酶的改变, 使其钙化程度达到静置对照组的水平.

Table 1 Antagonistic effect of SeO₃²⁻ and Mg²⁺ against the change of ALPase activity induced by simulated microgravity

Experiment No.	ALPase specific activity/nmol·μg ⁻¹ ·min ⁻¹			
	Static control group (C)	Rotating control group (1)	Rotating group + 1 mg/L Na ₂ SeO ₃ (2)	Rotating group + 5 mmol/L Mg ²⁺ (3)
1	0.821	0.544	0.749	0.947
2	1.187	0.899	0.988	1.051
3	0.655	0.514	0.622	0.654
Relative average	1.000	0.735 ± 0.064	0.898 ± 0.060	1.012 ± 0.135

According statistics $P < 0.05$, there are significant difference between (C) and (1), (1) and (2), (1) and (3), and no significant difference between (C) and (2), (C) and (3).

2.2 SeO₃²⁻ 和 Mg²⁺ 对微管系统改变的拮抗

流式细胞仪测定微管蛋白含量结果见表 2 (以对照组为 100). 数据表明经回转后细胞内微管含量较对照组显著降低. 而 1 mg/L 的 Na₂SeO₃ 和 5 mmol/L 的 Mg²⁺ 能够显著地拮抗这种影响.

细胞微管具有多种功能, 除微管系统对细胞形

态的支持作用外, 细胞内外物质运输, 细胞分泌和信息传递也与微管系统相关. 单纯回转组微管含量比对照组的减少说明微管系统受到回转的不良影响. 微管主要是由 αβ 微管蛋白二聚体组成的多聚体结构, 处于聚合和解聚的动态平衡中. 微管的结构是具有极性的, 其聚合和解聚具有头-尾向^[8].

Table 2 Antagonistic effect of SeO_3^{2-} and Mg^{2+} against the change of microtubules induced by simulated microgravity

Group	Experiment No.				Average
	1	2	3	4	
Static control group (C)	100	100	100	100	100
Rotation group (1)	86.1	96.5	89.5	79.0	87.8 ± 7.28
Rotation group + SeO_3^{2-} (2)	96.4	102.0	95.4	105.0	99.7 ± 4.57
Rotation group + Mg^{2+} (3)	103.2	106.5	96.7	129.0	108.8 ± 14.0

According statistics $P < 0.05$, there are significant difference between (C) and (1), (1) and (2), (1) and (3), and no significant difference between (C) and (2), (C) and (3). The data in the control group were regarded as 100.

可以认为, 回转引起的重力方向的连续改变导致了微管动态平衡向有利于解聚的方向发生, 从而导致了微管含量的减少。

在拮抗实验中, 一定浓度的 SeO_3^{2-} 和 Mg^{2+} 的加入使得回转细胞的微管蛋白含量达到静置对照组的水平, 表明 SeO_3^{2-} 和 Mg^{2+} 能拮抗模拟微重力对微管的不良影响, 阻止微管解聚。Yang 等^[12]曾报道亚硒酸钠对人红细胞膜骨架有稳定作用。我们的实验也表明 SeO_3^{2-} 也可起到稳定细胞骨架的微管系统, 阻止其解聚, 对碱性磷酸酶也能较好地拮抗模拟微重力引起的不良影响。至于 SeO_3^{2-} 是如何对它们起到拮抗作用的, 尚有待进一步深入研究。

镁与骨代谢密切相关。有报道^[13]指出低镁使骨形成减少, 骨密度降低, 脆性增加, 出现骨发育不良, 也可引起胶原形成减少, 硫与糖胺聚糖的结合减少, 血清碱性磷酸酶降低; 若食物中每日补充 25 mmol/L 镁盐, 并增加维生素和矿物质, 可使骨密度增加 11%^[13]。我们使用加入 5 mmol/L Mg^{2+} 到回转组中, 发现 Mg^{2+} 很好地拮抗软骨碱性磷酸酶活性的下降和微管蛋白的减少。这些与上述报道的结果是一致的。 Mg^{2+} 之所以能拮抗碱性磷酸酶活性的下降, 可能是其与 ATP 结合形成的复合物能激活碱性磷酸酶活性有关。离体实验表明, 加 Mg^{2+} 和 GTP 可促使微管二聚体的聚合^[8]。本实验中加 Mg^{2+} 能拮抗微管的解聚, 很可能正是由于 Mg^{2+} 促进了微管聚合造成的。

机体必需的微量元素硒和常量元素镁, 对机体来讲都有一个最佳值平台, 更多硒的摄入将会使机体中毒, 过量镁的摄入, 也可能适得其反, 反而会造成骨钙流失, 骨质疏松。我们的实验结果表明, 在细胞模拟微重力响应中, 细胞骨架微管系统不仅是效应物, 更可能直接参与重力感应。这为理解微重力细胞效应机制提供了一定的思路。我们的实验

结果也可能为预防失重条件下骨钙丢失开辟一条新的途径。

参 考 文 献

- 1 李小兵, 杨树长, 李生广等. 模拟微重力对培养的软骨细胞生长及胞外基质的影响. 科学通报, 1999, **44** (7): 724~727
Li X B, Yang S Z, Li S G, *et al.* Chinese Science Bulletin, 1999, **44** (7): 724~727
- 2 杨树长, 李小兵, 李生广等. 模拟微重力对鸡胚软骨细胞碱性磷酸酶及胞内游离钙浓度的影响. 科学通报, 1999, **43** (18): 1977~1980
Yang S Z, Li X B, Li S G, *et al.* Chinese Science Bulletin, 1999, **43** (18): 1977~1980
- 3 Freed L E, Langer R, Martin I, *et al.* Tissue engineering of cartilage in space. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, **94**: 13885~13890
- 4 Duke J, Danne E, Montufar-Solis D, *et al.* Chondrocyte topology and matrix production in the "CELLS" spaceflight experiment. ASGSB Bulletin, 1992, **6** (1): 58~68
- 5 Kaplansky A S, Durnova G N, Burkovskaya T E, *et al.* The effect of microgravity on bone fracture healing in rats flown on Cosmos2044. Physiologist, 1991, **34** (1): 197~199
- 6 Novak F L, Moore D. The role of calcium acculation and the cytoskeleton in the perception and response of *Coprinus cinereus* to gravity. Adv Space Res, 1996, **17** (6/7): 87~90
- 7 Lin Z H, Li S G, Wu L Y, *et al.* Antagonistic effect of Se on the T-2 Toxin-Induced Changes in the ultrastructure and mitochondrial function of cultured chicken embryonic chondrocytes. J Clin Biochem Nutr, 1994, **17**: 119~132
- 8 鲁润龙, 顾月华. 细胞生物学. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 1991. 147~159
Lu R L, Gu Y H. Cell Biology. Hefei: Chinese Science and Technology University Press. 1991. 147~159
- 9 王维哲, 陈炳南, 乔有江, 等. 鸡胚软骨细胞培养方法的研究. 中国地方病学杂志, 1986, **1** (14): 271~274
Wang W Z, Chen B N, Qiao Y J, *et al.* Chinese Endemic Journal, 1986, **1** (14): 271-274
- 10 Hatori M, Teixeira C C, Dewbolt K, *et al.* Adenine nucleotide metabolism by chondrocytes *in vitro*: role of ATP in chondrocyte maturation and matrix mineralization. J Cellular Physiol, 1995, **165**: 468~474
- 11 Labarca C, Paigen K. A Simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. Analytical Biochemistry, 1980, **102** (2): 344~352
- 12 Yang F Y, Wu W H. Role of Se in stabilization of hemmoerythrocyte membrane skeleton. Biochem Int, 1987, **15**: 475~482

13 邵美贞. 镁的基础与临床. 成都: 四川科学技术出版社, 1996. 61~69

Shao M Z. The Basis and Clinic of Mg. Chengdu :Sichuan Science and Technology Press ,1996. 61~69

Antagonistic Effect of SeO_3^{2-} and Mg^{2+} Against Changes of ALPase Activity and Microtubulin Content Induced by Simulated Microgravity on Chondrocytes *

ZHANG Xu¹⁾, LI Xiao-Bing¹⁾, LI Sheng-Guang^{**}, JIANG Pei-Dong, LIN Zhi-Huan
(Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Under the simulated microgravity, the microtubulin content and the alkaline phosphatase activity of cultured chicken embryonic chondrocytes reduced remarkably, which indicated that the simulated microgravity induced the changes of microtubular system and the calcification of chondrocytes. The antagonistic effects of Mg^{2+} and SeO_3^{2-} against the changes were studied. The results showed that these changes can be partly antagonized by 1 mg/L Na_2SeO_3 and completely antagonized by 5 mmol/L Mg^{2+} .

Key words chondrocyte, simulated microgravity, clinostat, alkaline phosphatase, microtubule

* This work was supported by a grant from State 863 High-Technology R & D Project of China (2-7-2-14).

** Corresponding author. Tel :86-10-64888525, E-mail : lsg@sun5.ibp.ac.cn

¹⁾These two authors contributed equally to this work.

Received : August 24, 2001 Accepted : October 18, 2001