

低强度脉冲超声对 MC3T3-E1 细胞增殖、分化和矿化的影响

王然¹, 马俊¹, 詹欣¹, 辛敏¹, 王婕², 王晓文², 唐劲天², 岳秉飞^{1,3}

1. 北京中医药大学生物制药系, 北京 100102
2. 清华大学工程物理系, 北京 100084
3. 中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所, 北京 100050

摘要 为了研究低强度脉冲超声促进 MC3T3-E1 细胞增殖、分化和矿化的有效性, 初步筛选频率和强度参数, 分别对细胞施加不同参数(频率、强度)的超声, 采取 CCK-8 法检测细胞的增殖情况, 碱性磷酸酶检测试剂盒检测分化效果, 茜素红染色观察矿化效果。发现 30mW/cm² 和 40mW/cm² 的超声对细胞产生促增殖作用, 50mW/cm² 抑制增殖; 1.5MHz 和 1.7MHz 的较低强度组均较对照组的 ALP 活性有增加; 1.5MHz, 40mW/cm² 的超声组矿化效果较其他组好。研究表明, 低强度的脉冲超声可以提高成骨细胞株 MC3T3-E1 增殖、分化和矿化能力, 可能是防治骨质疏松的可行手段之一。

关键词 低强度脉冲超声; 成骨细胞; 增殖; 分化; 矿化

中图分类号 R454.4

文献标志码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2013.32.010

Influence of LIPUS on Proliferation, Differentiation and Mineralization of MC3T3-E1 Cells

WANG Ran¹, MA Jun¹, ZHAN Xin¹, XIN Min¹, WANG Jie², WANG Xiaowen², TANG Jintian², YUE Bingfei^{1,3}

1. Department of Biopharmaceuticals, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China
2. Department of Engineering Physics, Tsinghua University, Beijing 100084, China
3. Department of Laboratory Animal Quality Testing, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

Abstract The aim of the present study is to investigate the effectiveness of low-intensity pulsed ultrasound(LIPUS) on cell proliferation, differentiation and mineralization using of MC3T3-E1 cell line. The MC3T3-E1 cells were exposed to LIPUS with different parameters (frequency and intensity). The cell proliferations, differentiation, and mineralization were determined by CCK-8 method, alkaline phosphatase detection kit, and alizarin red staining, respectively. The ultrasound intensity of 30mW/cm² and 40mW/cm² could promote cell proliferation, while 50mW/cm² inhibit it. The lower intensity group under 1.5MHz and 1.7MHz present better alkaline phosphatase activity. The 1.5MHz and 40 mW/cm² groups showed better mineralization effect than others. LIPUS can promote MC3T3-E1 on cell proliferation, differentiation and mineralization. LIPUS may act as a new method for prevention and treatment of osteoporosis.

Keywords LIPUS; osteoblasts; proliferation; differentiation; mineralization

0 引言

骨质疏松症(Osteoporosis, OP)是由低骨量及骨的细微结构受到破坏而导致的一种系统性骨病^[1]。近年来陆续有研究将低强度脉冲超声(LIPUS)应用于治疗骨质疏松症, 提出超声可以加速成骨作用, 防止骨质疏松模型中的骨量丢失, 可

能对治疗骨质疏松症有效^[2-8]。Akito 等^[9]用 1.5MHz、30mW/cm² 的超声作用于 ROS17/2.8 细胞, 结果显示该参数条件下的超声对细胞分化具有积极的促进作用。本研究旨在进一步验证其有效性, 并初步筛选超声参数。

收稿日期: 2013-08-13; 修回日期: 2013-09-24

作者简介: 王然, 硕士研究生, 研究方向为医学物理与工程, 电子信箱: wangran1851@163.com; 岳秉飞(通信作者), 研究员, 研究方向为比较医学, 电子信箱: y6784@126.com

1 实验设计

成骨细胞是骨形成的主要功能细胞,由间充质细胞分裂分化形成,细胞呈短柱状,有突起。在骨的发生发展历程中,成骨细胞会经历增殖、分化和钙化3个阶段^[10,11]。MC3T3-E1细胞是从小鼠颅盖骨中分离纯化形成的成骨细胞系,是国际上较为公认的骨代谢研究的细胞模型^[12-14]。

成骨细胞在生长早期首先要经过增殖过程,产生新细胞,代替衰老、死亡细胞,从而发展壮大。随着细胞分化水平的提高,其增殖能力随之逐渐减弱,最终成熟的成骨细胞不再具有增殖能力^[13,15]。碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase, ALP)是成骨细胞的一种外酶,具有促进细胞分化、矿化的作用^[16],其活性可以反映成骨细胞的活性或功能状况,可作为成骨细胞分化早期的标志物^[15]。成骨细胞增殖、分化成熟后,骨基质会逐渐矿化为结节,故矿化结节常被看作细胞成骨分化成熟的晚期标志,通常细胞培养2、3周左右矿化结节形成并达到较高水平^[14,17]。

低强度脉冲超声是一种声压波,其强度为1~50mW/cm²,骨组织对此敏感。目前文献报道较多的频率为1.5MHz^[18],为实现参数的筛选,本实验选择了附近区域的几个频率值(1.1MHz、1.5MHz、1.7MHz)。

本实验中,把细胞分裂增殖、分化成熟、基质钙化作为增殖期和分化早、晚期的3项指标,分别采用CCK-8法、ALP检测试剂盒、茜素红染色法检测了LIPUS不同参数对MC3T3-E1细胞增殖、分化和矿化功能的影响。

2 实验方法

2.1 材料

小鼠成骨细胞MC3T3-E1(北京协和细胞资源中心)、 α -MEM培养基(Gibco公司)、CCK-8(日本株式会社同仁化学研究所)、ALP检测试剂盒(碧云天生物技术研究所)、茜素红(西陇化工股份有限公司)、Western及IP细胞裂解液(碧云天生物技术研究所)。

2.2 主要仪器

CO₂培养箱(Thermo公司,型号371)、各种培养瓶、皿(Corning公司)、光学显微镜(Olympus公司,型号BX51)、全自动酶标仪(Bio-rad公司,型号680)、低强度脉冲超声治疗仪(清华大学自主研发,如图1所示)。



图1 低强度脉冲超声治疗仪

Fig. 1 Low-intensity pulsed ultrasound therapeutic device

2.3 分组及干预方法

小鼠成骨细胞株MC3T3-E1培养于 α -MEM培养基,置培养箱内5%CO₂、37℃常规培养,3天换液1次,3~4天传代1次。取对数期细胞以2×10³个/孔和2×10⁴个/孔的密度分别接种于96孔板和12孔板。

实验共分4组:超声组按强度分为30、40、50mW/cm²3组及空白对照组(CON),每个超声强度均设4个平行孔。

2.4 细胞增殖效应

96孔板中接种2×10³个MC3T3-E1细胞。培养24h后,更换新鲜培养液,同时分别施加不同强度和频率的超声,分别在2、4、6天末,各孔培养细胞用磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline, PBS)洗1遍,每孔加100 μ L α -MEM培养液和10 μ L CCK-8的混合液,继续培养2h,随后取上清液在酶标仪上测定波长450nm处的吸光度。

2.5 碱性磷酸酶(Alkaline Phosphatase, ALP)活性测定

12孔板中每孔接种2×10⁴个MC3T3-E1细胞,细胞培养方法及超声强度同2.4所述。每作用3天换液1次,在10天末,各孔加100 μ L Western及IP细胞裂解液,收集上清。用ALP试剂盒检测ALP含量,随后计算相对的ALP活性。

2.6 细胞钙化程度检测

12孔板中每孔接种2×10⁴个MC3T3-E1细胞。细胞培养方法及超声强度同2.4所述。每作用3天换液1次,14天后采用茜素红染色观察。

2.7 统计学处理

计量资料以均值 \pm 标准差($\bar{X} \pm s$)表示。数据处理采用SPSS16.0软件和Microsoft Excel作图。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对细胞增殖的影响

在3个不同频率(1.1 MHz、1.5 MHz、1.7MHz)下,强度为30mW/cm²和40mW/cm²的脉冲超声分别对细胞产生了不同程度的促进作用,而强度为50mW/cm²的脉冲超声均产生了抑制作用。与对照组相比,1.1MHz下不同强度组的促增殖作用不明显,只有强度为40mW/cm²在作用4天后有促增殖作用;1.5MHz下,强度为30mW/cm²和40mW/cm²的超声在第4天和第6日均较对照组有促增殖效果,且强度为30mW/cm²比40mW/cm²作用效果更佳;1.7MHz下,只有强度为30mW/cm²和40mW/cm²两组在第4天较对照组有促增殖作用,结果如图2所示(图2中*与对照组相比 $P < 0.05$)。

3.2 对碱性磷酸酶(ALP)活性的影响

与对照组比较,1.1MHz、50mW/cm²组、1.5MHz、30mW/cm²组、1.1MHz、40mW/cm²组、1.7MHz、30mW/cm²组的MC3T3-E1细胞在脉冲超声作用10天末,其ALP活性均有增加($P < 0.05$),其中1.5MHz、30mW/cm²组效果较突出($P < 0.01$);其他组ALP活性未见明显增加,结果如表1所示(表1中*与对照组相比 $P < 0.05$,**与对照组相比 $P < 0.01$)。

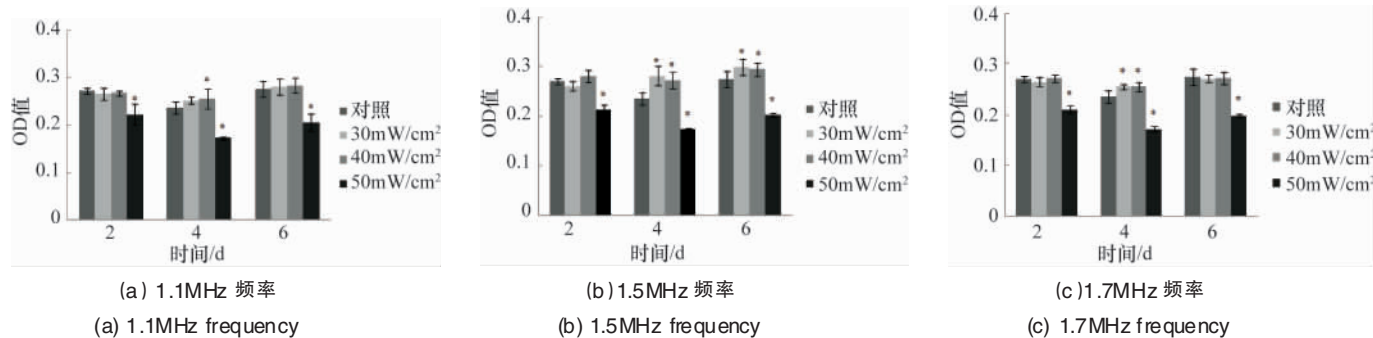


图 2 不同频率和强度的脉冲超声对细胞增殖的影响

Fig. 2 Effects of different frequencies and intensities of LIPUS on cell proliferation

表 1 不同频率不同强度 LIPUS 对 ALP 活性的影响

Table 1 Effects of different frequencies and intensities of LIPUS on the ALP activity

强度	频率			
	0	1.1MHz	1.5MHz	1.7MHz
0	42.73±6.68	—	—	—
30mW/cm ²	—	46.68±4.70	74.50±13.18**	63.05±12.83*
40mW/cm ²	—	43.73±7.46	66.15±10.48*	46.82±16.32
50mW/cm ²	—	64.52±9.99*	48.17±1.62	34.07±2.95

3.3 对矿化结节的影响

随着成骨细胞分化成熟,成骨细胞形成多层叠加的结节样结构,并不断分泌基质和矿物质,称为矿化结节(mineralized bone nodular structure, MBNS)。与对照组比较,MC3T3-E1 细胞在脉冲超声作用 14 天后,1.5MHz 和 1.7MHz 的 30mW/cm² 和 40mW/cm² 的 4 个超声组可见明显的矿化结节,其中 1.5MHz, 40mW/cm² 组的矿化效果更好,结果如图 3 所示。

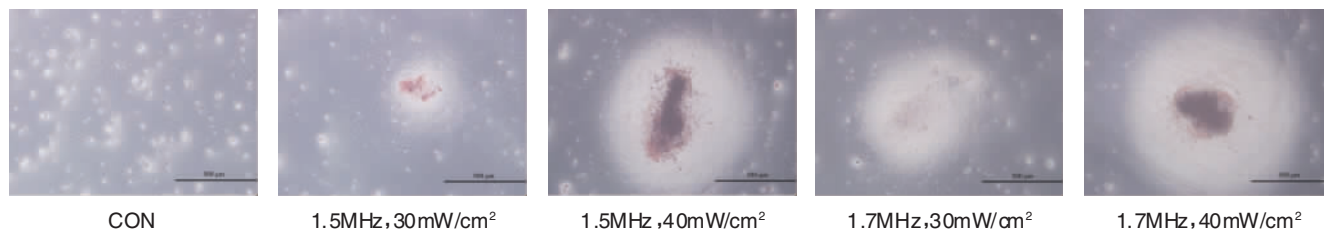


图 3 不同频率不同强度 LIPUS 对矿化效果的影响

Fig. 3 Effects of different frequencies and intensities of LIPUS on MBNS

4 讨论

超声波作用于生物体时,可引起生物体系的功能或结构发生变化。目前较为公认的超声治疗作用主要有 3 种:机械效应、温热效应和理化效应。高强度、大剂量的超声可能对组织器官产生抑制或破坏作用,而低强度、小剂量的超声会产生刺激调节的作用。

CCK-8 法检测细胞增值率结果表明:LIPUS 对 MC3T3-E1 细胞产生促增殖作用($P<0.05$),江淳等^[9]利用 LIPUS 对脂肪源干细胞增殖分化的研究也得到了同样的效果。实验中还发现超声强度为 30mW/cm² 的作用效果较 40mW/cm² 更好,而 50mW/cm² 强度对 MC3T3-E1 细胞产生抑制作用($P<0.05$)。提示低强度的脉冲超声才对 MC3T3-E1 细胞具有促增殖作用,而较高强度的脉冲超声可能由于产生了过大的机械破坏力而抑制细胞生长。

ALP 检测结果表明:作用 10 天后,1.5MHz 和 1.7MHz 的较低强度组均较对照组的 ALP 活性有增加 ($P<0.05$),1.5MHz, 30mW/cm² 组效果更为突出($P<0.01$),这与 Akito 得

出的结果一致^[9]。Leung K.S.等^[20]对人骨膜细胞做的研究同样证实了 LIPUS 对促进成骨细胞分化的有效性。提示较低强度的脉冲超声(30mW/cm²、40mW/cm²)对 MC3T3-E1 细胞具有促进分化的作用。

本实验中,茜素红染色在 30mW/cm² 和 40mW/cm² 强度下可见明显钙化结节,且 40mW/cm² 强度的作用效果更好。这与 ALP 活性检测结果不完全一致,其原因值得进一步探讨,可能与后期 ALP 活性水平随矿化进程不断变化最终趋于稳定甚至下降有关^[21],或培养时间加长使得细胞的敏感性增强有关。

本实验中较低强度的脉冲超声可促进细胞增殖、分化、矿化,但随着强度增加,细胞各项能力未见相应增加,这可能是由于较大的超声强度对细胞产生一定的破坏能力。S.R. Angle 等^[22]证实了低于 30mW/cm² 的强度对成骨细胞依然有效,且 2mW/cm² 组的矿化效果较其他组更好,在后续的实验中可以吧强度跨度加大,更好的对比强度影响成骨细胞生长的效果。目前有关 LIPUS 的不同频率和强度对成骨细胞

MC3T3-E1 的增殖、分化、矿化效果的相关报道甚少,缺少相关参照,有关本实验结果还需进一步研究。

5 结论

LIPUS 是近年来物理治疗研究领域的热点,本实验设计探讨了 LIPUS 对体外培养成骨细胞的直接作用,探讨了不同频率与强度的 LIPUS 对 MC3T3-E1 的作用,证实了 LIPUS 用于骨质疏松症治疗的潜力,并在一定水平筛选了频率和强度参数,发现 1.5MHz 下的 30mW/cm² 到 40mW/cm² 可能是比较有效的治疗参数。

为进一步完善相关研究结果,需要深入开展以下研究。

(1)进一步研究其作用机制。虽然 LIPUS 用于促进成骨细胞生长的有效性已经被证实,在细胞增值率、ALP 活性、成骨相关基因及蛋白表达、矿化结节形成方面都有显著提高,但是具体的分子机制研究还不是十分明确,还需要开展实验阐明相关作用机制。

(2)操作参数进一步筛选。虽然 LIPUS 的参数筛选工作已取得一些进展,已有实验证明超声频率、强度、作用时间是影响超声效果的重要因素,但是研究范围不甚全面,且结果不甚一致。进一步的参数筛选工作需要更多探讨。

(3)建立更佳模型体系。由于人体内的骨质变化是成骨细胞与破骨细胞共同作用的结果,下一步或可联合成骨与破骨细胞,建立二者的共同生长体系,更有效研究其作用效果。

参考文献 (References)

- [1] 郑和昕,江纆,袁放,等.血清性激素水平在老年男性原发性骨质疏松症中的变化[J].临床内科杂志,2006,23(2):121-123.
Zheng Hexin, Jiang Ying, Yuan Fang, et al. Journal of Clinical Internal Medicine, 2006, 23(2): 121-123.
- [2] Warden S J, Bennell K L, Matthews B, et al. Efficacy of low-intensity pulsed ultrasound in the prevention of osteoporosis following spinal cord injury[J]. Bone, 2001, 29(5): 431-436.
- [3] Kokubu T, Matsui N, Fujioka H, et al. Low intensity pulsed ultrasound exposure increases prostaglandin E2 production via the induction of cyclooxygenase-2 mRNA in mouse osteoblasts [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999, 256(2): 284-287.
- [4] Wu S, Kawahara Y, Manabe T, et al. Low-intensity pulsed ultrasound accelerates osteoblast differentiation and promotes bone formation in an osteoporosis rat model[J]. Pathobiology, 2009, 76(3): 99-107.
- [5] Carvalho D C L, Cliquet A. The action of low-intensity pulsed ultrasound in bones of osteopenic rats[J]. Artificial Organs, 2004, 28(1): 114-118.
- [6] Cheung W H, Chow S K, Sun M H, et al. Low-intensity pulsed ultrasound accelerated callus formation, angiogenesis and callus remodeling in osteoporotic fracture healing[J]. Ultrasound in Medicine & Biology, 2011, 37(2): 231-238.
- [7] 王磊,张先龙,曾炳芳.低强度脉冲超声促进卵巢切除大鼠骨折愈合的超微结构研究[J].生物骨科材料与临床研究,2008,5(1):8-11.
Wang Lei, Zhang Xianlong, Zeng Bingfang. Orthopaedic Biomechanics Materials and Clinical Study, 2008, 5(1): 8-11.
- [8] 刘沐青,郭霞,王晓云.低强度脉冲超声波防止废用性骨质疏松症[J].科技导报,2010,28(11):43-46.
Liu Muqing, Guo Xia, Wang Xiaoyun. Science & Technology Review, 2010, 28(11): 43-46.
- [9] Suzuki A, Takayama T, Suzuki N, et al. Daily low-intensity pulsed ultrasound-mediated osteogenic differentiation in rat osteoblasts [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2009, 41(2): 108-115.
- [10] Manolagas S C, Jilka R L. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis [J]. The New England journal of medicine, 1995, 332(5): 305-311.
- [11] 武密山,赵素芝,李恩,等.地黄活性成分辛醇对小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 增殖、分化和矿化的影响[J].中国药理学通报,2010,26(4):509-513.
Wu Mishan, Zhao Suzhi, Li En, et al. Chinese Pharmacological Bulletin, 2010, 26(4): 509-513.
- [12] Sudo H, Kodama H A, Amagai Y, et al. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria[J]. The Journal of Cell Biology, 1983, 96(1): 191-198.
- [13] 丁佩惠,唐琪,陈莉丽.柚皮苷对小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 增殖、分化和矿化的影响[J].中国中药杂志,2009,13(7):1712-1716.
Ding Peihui, Tang Qi, Chen Lili. China Journal of Chinese Materia Medica, 2009, 13(7): 1712-1716.
- [14] 刘盟,马玉,高晓黎,等.新疆马鹿角提取物对成骨细胞 MC3T3-E1 增殖、分化和矿化的影响[J].中成药,2012,34(1):148-151.
Liu Meng, Ma Yu, Gao Xiaoli, et al. Chinese Traditional Patent Medicine, 2012, 34(1): 148-151.
- [15] Aubin J E. Advances in the osteoblast lineage[J]. Biochemistry and Cell Biology, 1998, 76(6): 899-910.
- [16] Howlett C R, Cave J, Williamson M, et al. Mineralization in vitro cultures of rabbit marrow stromal cells[J]. Clinical Orthopaedics and Related Research, 1986, 213(12): 251-263.
- [17] 张金超,刘丹丹,易长青,等.金纳米粒子对成骨细胞 MC3T3-E1 增殖、分化和矿化功能的影响[J].科学通报,2010,55(6):435-441.
Zhang Jinchao, Liu Dandan, Yi Changqing, et al. Chinese Science Bulletin, 2010, 55(6): 435-441.
- [18] Woo D G, Ko C Y, Kim H S, et al. Evaluation of the potential clinical application of low-intensity ultrasound stimulation for preventing osteoporotic bone fracture[J]. Annals of Biomedical Engineering, 2010, 38(7): 2438-2446.
- [19] 江淳,郭风劲,许涛等.低强度脉冲超声对大鼠脂肪干细胞增殖及骨分化的影响[J].中国医学物理与康复杂志,2011,33(6):408-412.
Jiang Ting, Guo Fengjin, Xu Tao, et al. Chinese Journal of Physical Medicine and Rehabilitation, 2011, 33(6): 408-412.
- [20] Leung K S, Cheung W H, Zhang C, et al. Low Intensity Pulsed Ultrasound Stimulates Osteogenic Activity of Human Periosteal Cells[J]. Clinical orthopaedics and related research, 2004(418): 253-259.
- [21] Unsworth J, Kaneez S, Harris S, et al. Pulsed low intensity ultrasound enhances mineralisation in preosteoblast cells [J]. Ultrasound in medicine & biology, 2007, 33(9): 1468-1474.
- [22] Angle S R, Sena K, Sumner D R, et al. Osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells by various intensities of low-intensity pulsed ultrasound[J]. Ultrasonics, 2011, 51(3): 281-288.

(编辑 四恬)